

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22730

研究課題名（和文）Na,KポンプによるRas-PI3Kシグナル伝達の時空間的制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular basis of the spatiotemporal regulation of Ras-PI3K signaling by Na,K-ATPase

研究代表者

柏木 彩花（Kashiwagi, Sayaka）

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：60880002

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：すべての臓器に普遍的に発現するNa,K-ATPaseは細胞外物質の取り込み（エンドサイトーシス）を制御することが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかでない。本研究はRas-phosphoinositide 3-kinase (PI3K)シグナル伝達が「いつ・どこで」起こるのかという時空間的制御の観点から、蛍光バイオイメージングの手法を用い、Na,K-ATPaseによるエンドサイトーシス制御メカニズムを解析した。その結果、エンドソーム上のNa,K-ATPaseがポンプ機能を介してRas-PI3K複合体のエンドソーム局在を抑制し、エンドサイトーシスを制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シグナル伝達においては、分子が細胞内の「いつ・どこで」活性化するかが遺伝子の発現制御や細胞の形態変化などの応答を決定する上で重要である。本研究ではシグナル伝達分子の活性や局在を生細胞で経時的に解析できる蛍光バイオイメージングの手法を活用し、Na,K-ATPaseによるエンドサイトーシス制御機構を、シグナル伝達の時空間的制御という側面から検証した。本研究で得られた知見は、エンドサイトーシスを介して細胞に侵入するウイルスに対し、侵入過程を標的とした新規治療法の開発への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Na,K-ATPase, which is universally expressed in all organs, is known to regulate the uptake of extracellular substances (endocytosis), but the detailed mechanism remains unclear. In this study, we investigated the regulatory mechanism of endocytosis by Na,K-ATPase in terms of spatiotemporal regulation of Ras-phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling. The results suggest that endosomal Na,K-ATPase regulates endocytosis by suppressing the endosomal localization of Ras-PI3K complex via its Na,K pump function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 Ras-PI3K複合体 Na,K-ATPase エンドサイトーシス 時空間的制御 蛍光バイオイメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

Na,K-ATPase は全ての臓器において普遍的に発現し、脂質膜を隔てた Na<sup>+</sup>イオンと K<sup>+</sup>イオンの電気化学的勾配を生み出す。近年ではこうした形質膜におけるポンプとしての役割だけではなく、細胞内シグナル伝達や細胞接着における新たな機能が明らかになりつつある。特にシグナル伝達においては、Na,K-ATPase が種々のキナーゼや受容体、トランスポーターと結合することが分かっており、Na,K-ATPase はイオンポンプとしての機能に加えて、タンパク質間相互作用を介して結合パートナーの機能を調節するシグナル伝達因子としても注目されている(Reinhard et al., 2013 *Cell Mol Life Sci*)。例えば、Na,K-ATPase は Src と相互作用し、ポンプ阻害薬 ouabain がポンプに結合することによって Src が活性化する。この作用は細胞質の[Na<sup>+</sup>]や[K<sup>+</sup>]に影響を与えない nM レベルでの低濃度でも認められる(Aydemir-Koksoy et al., 2001 *J Biol Chem*; Tian et al., 2006 *Mol Cell Biol*)。また近年、この nM レベルの ouabain が RS ウイルスや MERS コロナウイルスのエンドサイトーシスによる取り込みを抑制することも報告された(Burkard et al., 2015 *J Virol*; Lingemann et al., 2019 *PLoS Pathog*)。ただし、Src シグナルがウイルスの取り込みを亢進させるのか、抑制させるのかについては一致した見解は得られておらず、ouabain による取り込みの抑制が Src シグナル以外のメカニズムであることも示唆されている。すなわち、Na,K-ATPase がどういったメカニズムでエンドサイトーシスを制御するのかについては大いに議論の余地があった。研究代表者の所属研究室はこれまでに、シグナル伝達の時空間的制御によるエンドサイトーシス調節メカニズムを研究してきた。具体的には、低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras とその標的因子の一つである phosphoinositide 3-kinase (PI3K) との複合体が、上皮成長因子(epidermal growth factor, EGF)刺激依存的に細胞膜からエンドソームに移行すること、さらに細胞外物質の取り込みやエンドソームの成熟化の促進には Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在が必要であることを報告している(Fujioka et al., 2011 *PLOS ONE*; Tsutsumi et al., 2009 *Cell Signal*)。その後我々は Ras の標的因子間のアミノ酸配列を比較して PI3K に特異的な配列(Ras-PI3K endosomal localization, RAPEL)を見出した。Ras-PI3K 複合体が初期エンドソームに局在し、エンドサイトーシスを制御するには RAPEL 配列が必須であった。さらに、このアミノ酸配列を過剰発現させることでインフルエンザウイルスの取り込みが抑制されることが分かった。その後、Ras-PI3K シグナル伝達の時空間的制御機構を明らかにするため、RAPEL 配列と結合するタンパク質を網羅的に探索したところ、候補因子として Na,K-ATPase の  $\beta$ 1 サブユニットが同定された。実際に  $\beta$ 1 サブユニットの過剰発現は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在およびエンドサイトーシスを抑制した。これらの結果から、我々は Na,K-ATPase が Ras-PI3K 複合体の局在制御を介してエンドサイトーシスを制御しているのではないかと予想した。

## 2. 研究の目的

本研究は、Na,K-ATPase の  $\beta$ 1 サブユニットがどのようにして Ras-PI3K 複合体の初期エンドソーム局在を制御するか、またそれにより Na,K-ATPase がどのようにしてエンドサイトーシスを制御するかを分子レベルで解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

$\beta$ 1 サブユニットによる Ras-PI3K 複合体の局在制御が、 $\beta$ 1 サブユニットと PI3K の直接の相互作用に依存するかどうかを明らかにする。具体的には、 $\beta$ 1 サブユニットにおける RAPEL 配列結合部位をプルダウンアッセイによって同定し、その部位を欠損した  $\beta$ 1 サブユニットの変異体を作製し、変異体の過剰発現が Ras-PI3K 複合体の局在に及ぼす影響を調べる。また、 $\beta$ 1 サブユニットがどのようなメカニズムを介して Ras-PI3K 複合体の局在を制御するのかを明らかにする。仮説として  $\beta$ 1 サブユニットを介して相互作用するタンパク質による制御を考慮したが、nM レベルの ouabain がエンドソームの pH 低下を介してエンドソームの輸送に影響を与えるという報告(Feldmann et al., 2007 *Am J Physiol Cell Physiol*)から、エンドソームにおけるポンプ機能が Ras-PI3K 複合体の局在制御に関与する可能性も考えられるため、ポンプ阻害薬が Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在、および細胞外物質の取り込みやエンドソームの成熟に及ぼす影響を検証する。

## 4. 研究成果

(1) Na,K-ATPase  $\beta$ 1 サブユニットの RAPEL 配列結合様式の解析

$\beta$ 1 サブユニットは、N 末端側が細胞質に配向する II 型 1 回膜貫通型タンパク質である。そこで、

RAPEL 配列との結合部位を同定するため、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメインのトランケーション変異体、および細胞外ドメイン欠失変異体、細胞質ドメイン欠失変異体を作製した。これらを用いて GST プルダウンアッセイを行ったところ、いずれの変異体も RAPEL 配列との結合を認めた。

Na,K-ATPase の  $\alpha$  サブユニットはクラス IA PI3K と相互作用することが知られている(Yudowski et al., 2000 *Proc Natl Acad Sci USA*)。また、Na,K-ATPase の  $\beta$  サブユニットが  $\alpha$  サブユニットと安定した複合体を形成する際には、 $\beta$  サブユニットの膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインが関与する(Lemas et al., 1994 *J Biol Chem*; Laughery et al., 2003 *J Biol Chem*)。以上から、 $\beta 1$  サブユニットと RAPEL 配列は間接的な相互作用も有することが示唆された。

Ras-PI3K 複合体は細胞質側に局在しているため、 $\beta 1$  サブユニットの細胞質ドメイン欠失変異体と Ras-PI3K 複合体との間に直接的な相互作用はないと想定される。そこで、 $\beta 1$  サブユニットによるエンドサイトーシス制御に Ras-PI3K 複合体との直接の相互作用が不可欠であるかどうかを調べるため、細胞質ドメイン欠失変異体を過剰発現させた細胞にデキストラン (エンドサイトーシスで取り込まれる細胞外物質) を取り込ませたところ、全長の  $\beta 1$  サブユニットを過剰発現させた場合と同様に取り込みが低下していた(図 1)。このことから、RAPEL 配列との間接的な相互作用のみがある場合でも、 $\beta 1$  サブユニットはエンドサイトーシスを抑制すると考えられる。

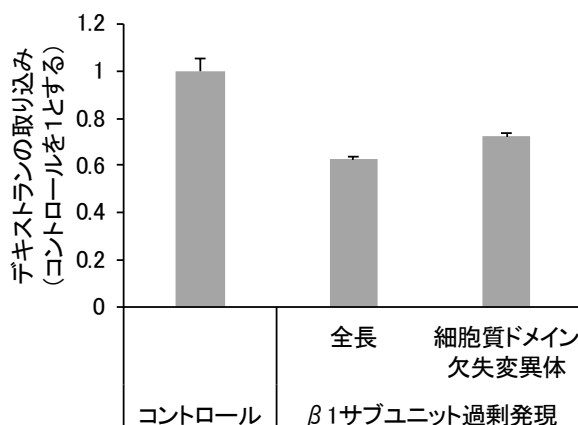


図1 細胞質ドメインを欠失させた $\beta 1$ サブユニットはデキストランの取り込みを抑制する

$\beta 1$ サブユニット(全長及び細胞質ドメイン欠失変異体)を発現させた細胞に蛍光標識デキストランを取り込ませた。細胞質ドメイン欠失変異体 $\beta 1$ サブユニットも、全長 $\beta 1$ サブユニットと同様に過剰発現によりデキストラン取り込みを抑制した。error bars, SEM.

## (2) Na,K-ATPase $\beta 1$ サブユニットのノックダウンが Ras-PI3K 複合体の局在制御に与える影響の解析

事前実験で得られているデータが過剰発現の系によるものであったため、 $\beta 1$  サブユニットのノックダウン・ノックアウト実験に資する細胞株の探索を行った。この過程で、 $\beta 1$  サブユニットの発現量が高いほど、EGF 刺激後の Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在が低下するという知見が得られた。また  $\beta 1$  サブユニットの発現量は  $\alpha 1$  サブユニットの発現量と正に相関した。続いて、 $\beta 1$  サブユニットの発現量が高い細胞株のうち、EGF 刺激で Ras-PI3K 複合体がエンドソームに移行する HEK 293T 細胞を用いてノックダウン実験を行った。しかしデキストラン取り込みや Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在にはコントロールと比較して差が見られなかった。ウェスタンブロットでタンパク質の発現量を定量したところ、 $\alpha 1$  サブユニットの発現量が低下していないことが明らかになり、このことから、ノックダウン実験で差が見られなかったのは、 $\alpha 1$  サブユニットの発現量が十分に減らなかったためと予想された。

## (3) Na,K-ATPase のポンプ機能が Ras-PI3K 複合体の局在制御に与える影響の解析

研究成果(1)より、 $\beta 1$  サブユニットが Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を制御するメカニズムは、細胞質に存在するタンパク質との直接的な相互作用よりも、膜貫通型タンパク質ないしエンドソーム内腔のタンパク質を介した作用が関与することが示唆された。そこで研究成果(2)を踏

まえ、 $\beta 1$  サブユニットと相互作用し、Na,K-ATPase を形成する触媒サブユニット、 $\alpha$  サブユニットに着目し、ポンプ機能が Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在に与える影響を調べた。まずは低濃度の ouabain 存在下でデキストランを取り込ませたところ、コントロールと比較して取り込みが亢進した(図 2A)。また、同条件で LysoTracker を用いて酸性オルガネラを染色すると、エンドソームの成熟化が促進していることが示された(図 2B)。そこで Ras-PI3K 複合体の局在制御に与える影響を調べたところ、低濃度の ouabain 存在下では Ras-PI3K 複合体の初期エンドソーム移行が促進することが確かめられた(図 2C)。この濃度の ouabain は細胞質の $[Na^+]$ や $[K^+]$ には影響を与えず、一方でエンドソーム pH を低下させ、その機構はエンドソームに局在する Na,K-ATPase の抑制と考えられている。このことから、エンドソーム上の Na,K-ATPase がエンドソーム pH の調節を介して Ras-PI3K 複合体の局在を制御する可能性が示唆された。これまでに、エンドソームの酸性化を担う vacuolar proton ATPase の機能を bafilomycin A1 で阻害すると、後期エンドソームに向かう分解経路は抑制されるものの、リサイクリングエンドソームに向かうリサイクル経路は抑制されないことが知られている(Bayer et al., 1998 *J Virol*)。我々は、 $\beta 1$  サブユニットを過剰発現させると Ras-PI3K 複合体が核傍傍に集積すること、それらがリサイクリングエンドソームマーカーと共局在することを確かめている。

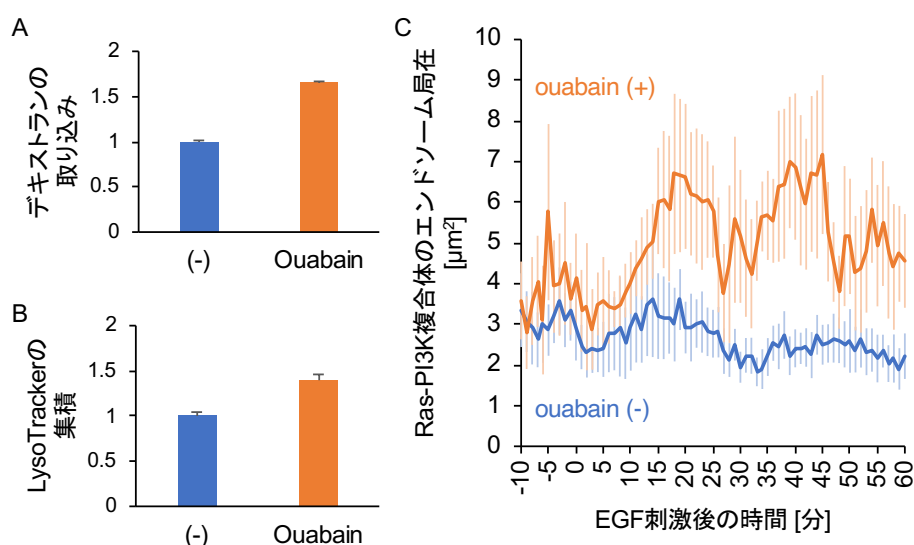


図2 低濃度ouabain存在下でデキストラン取り込み、エンドソームの酸性化、Ras-PI3K複合体の初期エンドソーム移行が促進する

(A)(B) 100 nM ouabain存在下で蛍光標識デキストラン (A) ないし LysoTracker (B) を添加し、30分後に蛍光観察を行った。(C) HEK293T細胞にRas-PI3K複合体の形成を可視化するバイオセンサーと初期エンドソームマーカーを発現させ、血清飢餓ののち、EGF刺激を行った。ouabain (+) の条件では、観察の1時間前から100 nM ouabainによる前処理を行った。バイオセンサーと初期エンドソームマーカーの共局在を面積で定量した。error bars, SEM.

以上のことから、Na,K-ATPase  $\beta 1$  サブユニットはエンドソームに局在する  $\alpha$  サブユニットの量ないしポンプ機能を制御することで、エンドソームの pH を調節し、Ras-PI3K 複合体の初期エンドソーム局在を抑制することが示唆された。RS ウイルスや MERS コロナウイルスのエンドサイトーシスによる細胞侵入を抑制すると報告された ouabain でデキストランの取り込みが亢進するという予想外の結果が得られたが、ウイルス粒子と EGF では惹起する細胞内シグナルが異なる可能性や、エンドソーム内イオン濃度が変化したことにより、ウイルスが宿主細胞膜に融合できず、細胞侵入できなかった可能性が考えられる。

今後は  $\alpha$  サブユニット結合不全変異体の  $\beta 1$  サブユニットを作製し、ポンプ機能の関与を検証する。また、既存のイオンポンプ阻害薬のほか、光遺伝学を用いてエンドソームの pH や $[Na^+]$ 、 $[K^+]$  を任意のタイミングで調節できる実験系を立ち上げ、これらのイオンが Ras-PI3K 複合体の局在に与える影響を確かめる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujioka Yoichiro, Kashiwagi Sayaka, Yoshida Aiko, Satoh Aya O., Fujioka Mari, Amano Maho, Yamauchi Yohei, Ohba Yusuke	4. 巻 -
2. 論文標題 A method for the generation of pseudovirus particles bearing SARS coronavirus spike protein in high yields	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.21047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuzuki Atsushi, Fujioka Yoichiro, Yoshida Aiko, Kashiwagi Sayaka, Amano Maho, Hira Tohru, Nakamura Akinobu, Miyoshi Hideaki, Atsumi Tatsuya, Ohba Yusuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct visualization of glucagon like peptide 1 secretion by fluorescent fusion proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------