

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

|                       |  |
|-----------------------|--|
| 機関番号：32660            | 研究種目：基盤研究（C）   |
| 研究期間：2010 ～ 2012      | 課題番号：22570145  |
| 研究課題名（和文）             | エンドサイトーシスによる受容体輸送機構の解明   |
| 研究課題名（英文）             | Analysis of the endocytic and intracellular trafficking pathway of cell surface receptors. |
| 研究代表者                 |  |
| 十島二郎                  | (Toshima Jiro)   |
| 東京理科大学・基礎工学部生物工学科・准教授 |  |
| 研究者番号：00333831        |  |

### 研究成果の概要（和文）：

細胞膜上の受容体はリガンドと結合することにより活性化され、その後、エンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれる。この機構は、細胞増殖シグナルの下方制御やウイルス感染に深く関わっている。しかしながら、活性化した受容体がどのようにしてクラスリン小胞に取り込まれるのか、また受容体を含むクラスリン小胞がどのようにして初期エンドソームに輸送されるのか、についてはまだ十分には解明されていない。本研究において、私達はクラスリン小胞形成の初期過程について、詳細に解析し、受容体の取込み過程に必要な複数のタンパク質の同定に成功した。また、酵母遺伝子欠損ライブラリーのスクリーニングにより、受容体のエンドサイトーシスに異常のみられる変異体の複数単離に成功し、その表現型の解析を行った。これらの成果は、これまで不明であった出芽酵母における受容体のエンドサイトーシス新しい機構の解明に繋がると期待される。

### 研究成果の概要（英文）：

To elucidate the mechanisms how activated receptor is recruited to clathrin coated pits, we screened yeast genome library, and identified Bmh2p, yeast homologue of 14-3-3 protein, as a binding protein for yeast Ste2 GPCR. In addition, we tagged human CCR2B receptor with GFP and succeeded in expressing and analyzing endocytic pathway of the receptor in yeast cells. We also screened about 5000 gene deletion mutants and identified 200 of them that exhibited aberrant endocytic transport.

### 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学、機能生物学

キーワード：エンドサイトーシス、膜輸送

#### 1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは様々な細胞外の物質を細

胞内へと取り込む機構で、栄養物質の摂取、免疫応答機構、細胞膜受容体の取り込みなど多く

の生命現象に関与している。受容体のエンドサイトーシスは、活性化した受容体を速やかに細胞内に取り込み分解する機構であり、これにより、受容体を介する細胞内へのシグナルのダウンレギュレーションが行われる。しかしながら、研究開始当初においては、受容体のクラスリン小胞への輸送機構、およびクラスリン小胞の細胞内エンドソームへの輸送機構については、まだ十分には明らかにされていなかった。これは、活性化した受容体のエンドサイトーシス機構がまだ十分に解明されていないからであり、受容体のエンドサイトーシスによる不活性化の基本原則を明らかにすることは、エンドサイトーシス異常により生じるがんの原因究明のために非常に重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、私達の研究室が新規に開発した出芽酵母のエンドサイトーシスマーカーを用いて、リガンドの結合により活性化した受容体のクラスリン被覆小胞への輸送機構を明らかにすることを目的としている。エンドサイトーシスは下等単細胞生物から哺乳類細胞にいたる全ての生物種において見られる現象であり、出芽酵母と哺乳類細胞のエンドサイトーシスの分子機構は非常に類似している。このことから、本研究では出芽酵母の接合フェロモン受容体をモデルとして用いて先駆的な研究を行い、将来的に得られた知見を哺乳類細胞に応用し、ヒトの病因の解明や、治療法の開発など、医学上の展開の基盤とすることを目的としている。具体的には、活性化した受容体が (1) 活性化後どのようにして速やかにクラスリン小胞へ輸送されるのか、そして細胞内に取り込まれたクラスリン小胞が (2) どのようにして非常に小さなオルガネラである初期エンドソームを認識し、正確に会合するのか、それらの分子メカニズムを解明することにある。これらの分子機構を解明することで、受容体のエンドサイトーシスによる細胞膜から細胞内、そしてリソソームまでの全輸送過程の基本原則を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 受容体がクラスリン小胞へ取り込まれる機構の解明

出芽酵母の GPCR の一種である Ste2 受容体をモデルとして用いて、活性化した Ste2p 結合タンパク質のスクリーニングを行った。また、クラスリン被覆ピットを可視化するために、エンドサイトーシスの初期過程で働くことが知られている複数のタンパク質に GFP を付加し、その動態を解析した。さらに、出芽酵母を用いた研究により明らかにされた受容体輸送の機構が哺乳類細胞にも適用できるかを調べるために、ヒト GPCR を出芽酵母に発現させ、そのエンドサイトーシスを調べた。

### (2) クラスリン小胞の初期エンドソームへの輸送機構の解明

クラスリン小胞-エンドソーム間の輸送に異常のある変異体の同定を行った。蛍光標識した Ste2 受容体のリガンド(Alexa- $\alpha$ -factor) を用いて、酵母の遺伝子欠損ライブラリーをスクリーニングし、クラスリン小胞-エンドソーム間の輸送に異常がみられる変異体のスクリーニングを行った。また、クラスリン小胞とエンドソームの会合に必要とされるアクチン骨格について、エンドサイトーシスおよびアクチン骨格関連タンパク質の変異体を作製し、アクチンおよびクラスリン小胞の動態解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 受容体がクラスリン小胞へ取り込まれる機構の解明

リガンド-受容体の移動を制御するタンパク質の同定を試みた。酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、ユビキチン化したSte2pに結合する蛋白質の解析を行い、Ste2受容体に特異的に結合する幾つかの蛋白質の単離に成功した。この中で、哺乳類14-3-3蛋白質酵母ホモログであるBmh2pをSte2pの新規結合蛋白質として解析を進めた。哺乳類14-3-3蛋白質は様々な種の細胞において幅広く発現し、高度に保存されているアダプター蛋白質であり、標的蛋白質とリン酸Ser/Thrを介して結合することが知られている。Bmh2pがSte2pにリン酸化依存的に結合するか調べるため、脱リン酸化型Ste2pを作製し結合を調べた。この結果、Bmh2pは脱リン酸化型受容体とは結合しなかった。BMH2遺伝子はクラスリン遺伝子と遺伝学的に相互作用することが報告されており、また、近年哺乳類ホモログである14-3-3も細胞内輸送に関与することが報告されている。これらのことからBmh2pはSte2pのクラスリン被覆小胞によるエンドサイトーシスに関与している可能性が高い。さらに、Bmh2pの他に機能未知タンパク質であるYlr419wを同定し、現在その結合および機能を解析中である。

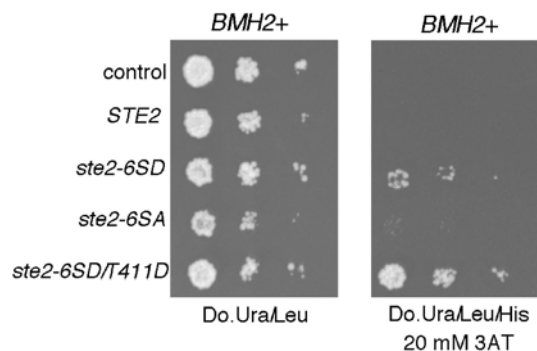


図1. Ste2pのBmh2pへのリン酸化依存的結合

次に、出芽酵母にヒトGPCRを発現し、そのエンドサイトーシスを調べた。ヒトケモカイン受容体の一種であるCCR2BにGFPを付加し、出芽酵母のTPII遺伝子プロモーターの下流につなげ発現させた。その結果、CCR2Bは細胞膜および液胞に局在することが分かった。エンドサイトーシスに必須の遺伝子であるEND3の欠損変異体に発現させたところ、CCR2Bの主要な局在は細胞膜へと変化した。さらに、CCR2Bの細胞内ドメインに存在するYXX $\phi$ モチーフに突然変異を入れたところ、CCR2Bのエンドサイトーシスは著しく抑制された。これらのことは、ヒトCCR2B受容体のエンドサイトーシス機構が出芽酵母でも保存されており、出芽酵母を用いた解析が可能であることを示唆している。

## (2) クラスリン小胞の初期エンドソームへの輸送機構の解明

エンドサイトーシスマーカーであるAlexa- $\alpha$ -factorを用いて、クラスリン小胞-エンドソーム間の輸送に異常がみられる変異体のスクリーニングを行った。この結果、約200種類の輸送に異常が見られる変異体を同定した。得られた変異体を輸送異常の表現型で分類すると、「細胞膜から細胞内の輸送」、「エンドソーム間の輸送」、「エンドソームからリソソームへの輸送」の三つに大きく分類することができた。この中で、「細胞膜からの取り込みに異常があるもの」について、さらにクラスリン被覆小胞の形成段階に与える影響、またエンドソームマーカーの細胞内への取り込み量の解析を行った。この結果、約10種類の変異体ではクラスリン被覆の形成過程に異常があること、また約20種類についてはエンドソームマーカーの細胞への結合効率が低下していることが分かった。また、本スクリーニングにより、約10種類の機能未知の遺伝子の同定に成功した。現在、これらの遺伝子の機能について解析を行っている。また、クラスリン小胞とエンドソームの会合に異常がある変異体の解析を行った。エンドサイトーシス関連およびアクチン細胞骨格関連タンパク質約50種類について、これらの遺伝子欠損変異体におけるアクチン細胞骨格およびクラスリン小胞の動態を解析した。この結果、アクチン重合制御因子であるSrv2の変異体において、クラスリン小胞の細胞内への取り込みが著しく抑制されていることが分かった。また、この変異体においてはアクチンフィラメントの形態、および重合速度などに顕著な異常がみとめられた。この結果より、Srv2を介したアクチン骨格の制御がエンドサイトーシス過程におけるクラスリン小胞とエンドソームの会合において重要であることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件) 査読あり

1. Ryohei Suzuki, Junko Y. Toshima, and Jiro Toshima: Regulation of clathrin coat assembly by Eps15 homology domain-mediated interactions during endocytosis. *Mol. Biol. Cell*, 23: 687-700, (2012)
2. Ai Kojima, Junko Y. Toshima, Chisa Kanno, Chie Kawata and Jiro Toshima: Localization and functional requirement of yeast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, Nhx1p, in the endocytic and protein recycling pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1823: 534-543, (2012)
3. Junko Toshima, Jiro Toshima: Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis via ubiquitination. *Seikagaku*. 82: 636-641 (2010).
4. Junko Toshima, Jiro Toshima: Defective downregulation of receptor in cancer. *The Medical Frontline*, 65, 931-938, (2010).

[学会発表] (計39件)

1. 川村苑子, 十島純子, 十島二朗、出芽酵母 Rab GTPase YPT6p の細胞内局在と細胞内輸送における役割、第35回 日本分子生物学会、2012年12月11日~2012、福岡
2. 岡田明日香, 長島万希子, 樋口章子, 坂本悠, 十島純子, 十島二朗、第35回 日本分子生物学会 アクチン結合タンパク質 Srv2p のエンドサイトーシスにおける役割、2012年12月11日~2012年12月14日 福岡
3. 西ノ明祥, 十島純子, 古川大貴, 佐藤祥史, 十島二朗、出芽酵母 Rab5 ファミリータンパク質の細胞内輸送における役割。第35回 日本分子生物学会、2012年12月11日~2012年12月14日、福岡
4. 斎藤麻由, 植野一馬, 長島万希子, 小島愛, 十島純子, 十島二朗、細胞壁ストレス応答センサー Wsc1p の細胞内輸送経路における V-ATPase の役割、第35回 日本分子生物学会、2012年12月11日~2012年12月14日、福岡
5. 添田慶太郎, 原田久美, 藤本陽, 千葉丈, 十島純子, 十島二朗、出芽酵母を用いたヒト G タンパク質共役受容体の発現とエンドサイトーシスの解析、第35回 日本分子生物学会、2012年12月11日~2012年12月14日、福岡
6. 富田剛史, 河田大樹, 十島純子, 十島二朗、Arf-GTPase 活性化蛋白質 Glo3p のエンドサイトーシス輸送における役割、第35

- 回 日本分子生物学会年會, 2012年12月11日~2012年12月14日, 福岡
7. 仲田瑛亮, 岡田明日香, 長島万希子, 樋口章子, 十島純子, 十島二朗, 出芽酵母のアクチン仲介型エンドサイトーシスにおける Rho ファミリー GTPase によるアクチン骨格の制御機構の解析, 第 35 回 日本分子生物学会年會, 2012年12月11日~2012年12月14日, 福岡
  8. 古屋英里, 菅野知紗, 十島純子, 十島二朗, 出芽酵母におけるアクチン骨格依存的なエンドソーム運動の解析, 第 35 回 日本分子生物学会年會, 2012年12月11日~2012年12月14日, 福岡
  9. 西ノ明祥, 十島純子, 古川大貴, 佐藤祥史, 十島二朗, 出芽酵母 Rab5 ファミリータンパク質の細胞内輸送における役割, 第 85 回 日本生化学会大会, 福岡, 河田大樹, 富田剛史, 仲田瑛亮, 十島純子, 十島二朗, Arf GTPase 活性化蛋白質 Glo3p のエンドサイトーシス経路における役割, 第 85 回 日本生化学会大会 2012年12月14日~2012年12月16日 福岡
  10. 柏熊竜太郎, 宮下雅志, 十島純子, 十島二朗, 細胞膜における脂質成分変化のクラスリン被覆小胞形成に与える影響, 第 85 回 日本生化学会大会, 2012年12月14日~2012年12月16日, 福岡
  11. 清水茂樹, 植野一馬, 十島純子, 十島二朗, 新規な脂肪滴局在タンパク質ファミリーの同定とタンパク質リサイクリング経路における役割, 第 85 回 日本生化学会大会, 2012年12月14日~2012年12月16日, 福岡
  12. 富田剛史, 河田大樹, 十島純子, 十島二朗, アクチン結合タンパク質 Srv2p のエンドサイトーシスにおける役割, 第 85 回 日本生化学会大会, 2012年12月14日~2012年12月16日, 福岡
  13. 仲田瑛亮, 岡田明日香, 長島万希子, 樋口章子, 十島純子, 十島二朗, 出芽酵母のアクチン仲介型エンドサイトーシスにおける Rho ファミリー GTPase によるアクチン骨格の制御機構の解析, 第 85 回 日本生化学会大会, 2012年12月14日~2012年12月16日, 福岡
  14. 添田慶太郎, 原田久美, 藤本陽, 千葉丈, 十島純子, 十島二朗, 出芽酵母を用いたヒト G タンパク質共役受容体の発現とエンドサイトーシスの解析, 第 85 回 日本生化学会大会, 2012年12月14日~2012年12月16日, 福岡
  15. 岡田明日香, 長島万希子, 十島純子, 十島二朗, エンドサイトーシス過程における Rho タンパク質によるアクチン骨格制御機構の解析, 第 45 回 酵母遺伝学フォーラム研究報告会, 2012年09月04日~2012年09月06日, 京都
  16. 川村苑子, 十島純子, 十島二朗, 出芽酵母 Rab GTPase YPT6p の細胞内局在と小胞輸送における役割の解析, 第 45 回 酵母遺伝学フォーラム研究報告会, 2012年09月04日~2012年09月06日, 京都
  17. 西ノ明祥, 十島純子, 古川大貴, 佐藤祥史, 十島二朗, 出芽酵母 Rab5 ファミリー蛋白質の細胞内輸送経路における役割, 第 45 回 酵母遺伝学フォーラム研究報告会, 2012年09月04日~2012年09月06日, 京都
  18. 十島純子, 植野一馬, 斎藤麻由, 十島二朗, 出芽酵母 V-ATPase の細胞膜蛋白質のリサイクリングにおける役割, 第 45 回 酵母遺伝学フォーラム研究報告会, 2012年09月04日~2012年09月06日, 京都
  19. 河田大樹, 十島純子, 十島二朗: 出芽酵母低分子量 GTPase 活性化タンパク質 (GAP) の細胞内小胞輸送における役割. 第 34 回 日本分子生物学会年會 (横浜), 2011年12月13日~16日
  20. 西ノ明祥, 十島純子, 十島二朗: 出芽酵母 Rab5 ファミリー Ypt52 の細胞内局在および小胞輸送における役割. 第 34 回 日本分子生物学会年會 (横浜), 2011年12月13日~16日
  21. 河田千絵, 十島純子, 小島愛, 菅野知紗, 十島二朗: 出芽酵母 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 対向輸送体 Nhx1p の細胞内局在とエンドサイトーシスおよびリサイクリング経路における役割. 第 34 回 日本分子生物学会年會 (横浜), 2011年12月13日~16日
  22. 植野一馬, 十島純子, 十島二朗: 出芽酵母 V-ATPase の蛋白質リサイクリング経路における役割. 第 34 回 日本分子生物学会年會 (横浜), 2011年12月13日~16日
  23. 菅野知紗, 十島純子, 十島二朗: 出芽酵母におけるエンドソームのアクチン細胞骨格に依存した運動. 第 34 回 日本分子生物学会年會 (横浜), 2011年12月13日~16日
  24. 鈴木良平(4), 柏熊竜太郎, 古屋絵里, 斎藤麻友, 十島純子, 十島二朗: 出芽酵母における EH ドメインタンパク質によるエンドサイトーシスの制御機構の解析. 第 34 回 日本分子生物学会年會 (横浜), 2011年12月13日~16日
  25. 岡田明日香, 長島万希子, 十島純子, 十島二朗: 出芽酵母のアクチン仲介型エンドサイトーシスにおける Rho ファミリー GTPase によるアクチン骨格の制御機構の解析. 第 34 回 日本分子生物学会年會 (横浜), 2011年12月13日~16日
  26. 川村苑子, 十島純子, 十島二朗: 出芽酵

- 母 Rab GTPase YPT10p の細胞内局在と小胞輸送における役割の解析. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2011 年 12 月 13 日~16 日
27. 古川大貴, 十島純子, 西ノ明祥, 佐藤祥史, 十島二郎: Role of yeast Rab5-like protein, Ypt51p, Ypt52p, and Ypt53p, in the intracellular trafficking pathway 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2011 年 12 月 13 日~16 日
28. 十島純子, 鈴木良平, 十島二郎: Regulation of clathrin coat assembly by Eps15 homology domain-mediated interactions during endocytosis. アメリカ細胞生物学会, (デンバー, USA) 2011 年 12 月 3 日~7 日
29. 小島愛, 菅野知紗, 河田千絵, 十島純子, 十島二郎: Localization and functional requirement of yeast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, Nhx1p, in the endocytic and protein recycling pathway. アメリカ細胞生物学会, (デンバー, USA) 2011 年 12 月 3 日~7 日
30. 十島純子, 鈴木良平, 十島二郎: Regulation of clathrin coat assembly by EH Domain-mediated interactions during endocytosis. 第 63 回日本細胞生物学会大会 (北海道), 2011 年 6 月 27 日~29 日
31. 植野一馬, 十島純子, 十島二郎: Identification of a novel recycling factor, Wrd1p, as a protein required for efficient localization of Wsc1p to the plasma membrane. 第 63 回日本細胞生物学会大会 (北海道), 2011 年 6 月 27 日~29 日
32. 宮下雅志, 十島純子, 十島二郎: Regulation of clathrin-coated vesicle formation in the budding yeast. 第 63 回日本細胞生物学会大会 (北海道), 2011 年 6 月 27 日~29 日
33. 古川 大貴, 十島 純子, 佐藤 祥史, 十島二郎: The role of yeast Rab5-like protein, Ypt51p, Ypt52p and Ypt53p, in the intracellular trafficking pathway. 第 63 回日本細胞生物学会大会 (北海道), 2011 年 6 月 27 日~29 日
34. 宮下雅志, 十島純子, 十島二郎: 出芽酵母における Ede1p と Syp1p によるクラスリン被覆形成の調節. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (神戸), 2010 年 12 月 6 日~9 日
35. 中島慶大, 十島純子, 十島二郎: 出芽酵母 Rab7 ホモログ Ypt7p のエンドサイトーシスにおける役割. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (神戸),

2010 年 12 月 6 日~9 日

36. 佐藤祥史, 十島純子, 小島愛, 澤口朗, 十島二郎: 出芽酵母 Rab5 ホモログ Ypt51/52p の細胞内輸送における役割. 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会 (神戸), 2010 年 12 月 6 日~9 日
37. 菅野知紗, 十島純子, 十島二郎: 出芽酵母でのエンドソーム運動におけるアクチン細胞骨格の役割. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (神戸), 2010 年 12 月 6 日~9 日
38. 樋口章子, 野村聖子, 長島万希子, 十島純子, 十島二郎: エンドサイトーシスにおけるアクチン重合調節蛋白質 Formin の動態解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (神戸), 2010 年 12 月 6 日~9 日
39. 植野一馬, 長島万希子, 小島愛, 十島純子, 十島二郎: Wsc1p を利用した新規エンドサイトーシス関連蛋白質の同定. 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会 (神戸), 2010 年 12 月 6 日~9 日

[図書] (計 1 件)

1. 分子細胞生物学事典(村上康文編), みみずく舎, 医学評論社, 2013 (分担執筆)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

十島 二郎 (Toshima Jiro)

東京理科大学基礎工学部生物工学科・准教授  
研究者番号:00333831

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし