

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 5 月 31 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23870027

研究課題名（和文） 活性化受容体のエンドサイトーシスによる細胞内輸送機構の解明

研究課題名（英文） he mechanisms of endocytic transport for activate receptor in budding yeast.

研究代表者

十島純子 (Toshima Junko)

東京理科大学・総合研究機構・ポストドクトラル研究員

研究者番号：00431552

研究成果の概要（和文）： 受容体がクラスリン小胞へ取り込まれる機構を解明するために、酵母ゲノムライブラリーを用いたスクリーニングを行い、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同定した。また、13 種のヒト GPCR に GFP を付加し出芽酵母に発現させることに成功した。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については、出芽酵母の全遺伝子（約 6500 種類）の約 8 割の変異体についてスクリーニングが完了し、約 200 種類の輸送に異常が見られる変異体を同定した。

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 GPCR. In addition, we tagged 13 human GPCR with GFP and succeeded in expressing in yeast cells. We also performed screening of about 80 % of yeast gene knock out strains for endocytosis defect, and identified about 200 genes that exhibited defects in endocytic transport.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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、細胞外シグナルの下方制御、病原ウイルスの細胞内への感染など多くの生命現象に関与している。私は以前の研究で、活性化した受容体が細胞膜上で集積し、その後クラスリン小胞へ移動する現象を可視化することに成

功した。しかしながら、その分子機構についてはまだ不明な点が多かった。一方、受容体を取り込んだクラスリン小胞は初期エンドソームへと輸送されるが、私は以前の研究で、クラスリン小胞が細胞内へと取り込まれる場所と時間を正確に認識し、その場所に向かって積極的に動くという非常に興味深い現象を発見した。しかしながら、これらの輸送

を制御する分子機構についても研究開始当時において全く解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞膜上にランダムに局在する細胞膜受容体が **(I) 活性化後どのようにしてクラスリン小胞へ移動するか、そして細胞内に取り込まれたクラスリン小胞が広大な細胞質の中で (II) 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していくことで、活性化した受容体が細胞膜上から細胞内、そして最終的にリソソームまで運ばれる、そ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 については、まず①受容体の移動を制御するタンパク質の同定、を試みた。そのためにユビキチン化した受容体に結合する蛋白質のスクリーニングを行った。また、受容体のリン酸化は、その後のユビキチン化を引き起こすため、スクリーニングにより同定したタンパク質がリン酸化型受容体に特異的に結合するかを調べた。また②ヒト GPCR を用いた受容体輸送の分子機構の解析、については、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 については、まず①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。Alexa- \square -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。野生型細胞ではクラスリン小胞に取り込まれた Alexa- \square -factor はエンドサイトーシスにより約 20 分でリソソームへと輸送されるのに対して、酵母 Rab 蛋白質の遺伝子欠損変異体では Alexa- \square -factor は細胞質のクラスリン小胞へ蓄積する。本研究では、酵母の遺伝子欠損ライブラリーを用いて、同様の方法で出芽酵母の全遺伝子(約 6000 個)を対象とした網羅的なスクリーニングを行った。また、②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については、クラスリン小胞もしくはエンドソームに局在する蛋白質、もしくはリソソーム(液胞)への輸送に関わる蛋白質の中から約 50 種類について、これらの遺伝子欠損変異体におけるクラスリン小胞、初期エンドソームの動態を、蛍光イメージングにより解析した。

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

酵母 GPCR である Ste2p のリン酸化型特異的に結合する蛋白質の同定を試みた。酵母ゲノムライブラリーを用いて 40 万種の形質転換体をスクリーニングした結果、23 個のポジティブなコロニーを得、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同定した。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。そこで Bmh2p の Ste2p への結合がリン酸化依存적であるかを調べるため、脱リン酸化型 Ste2p との結合を調べた。この結果、Bmh2p は脱リン酸化型 (Ste2-6SA) とは結合しなかった。以前の研究において、*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、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参与している可能性が示唆された。また②ヒト GPCR を用いた受容体輸送の分子機構の解析については、13 種の GFP を付加したリガンドが既知のヒト GPCR 遺伝子を出芽酵母の *TPI1* 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、GPCR の局在は細胞膜および細胞質内、また一部の GPCR では小胞体に局在することが分かった。更に幾つかの GPCR については細胞膜に加えて、液胞内への蓄積が見られたが、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、GPCR の主要な局在は細胞膜へと変化した。このことは、細胞膜上の GPCR が恒常的なエンドサイトーシスにより液胞へと輸送されていることを示す。

(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、

についてエンドサイトーシスマーカーである Alexa- \square -factor を用いて、①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。本年度は、出芽酵母の全遺伝子(約 6500 種類)の約 8割の変異体についてスクリーニングが完了し、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。また、②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。クラスリン小胞やエンドソームに局在する蛋白質、もしくはリソソーム(液胞)への輸送に関わる蛋白質の中から約40種類を選別し、これらの遺伝子欠損変異体における、クラスリン小胞の動態を解析した。これらの遺伝子の中にはAlexa- α -factorの輸送に異常が認められた遺伝子も含まれていたが、クラスリン小胞とエンドソームの会合に明らかな異常があるものについては現在解析中である。

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 2件)

1. Ryohei Suzuki*, Junko Y. Toshima* (*共第一著者), 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* (*corresponding authors), Chisa Kanno, Chie Kawata and Jiro Toshima*: Localization and functional requirement of yeast Na⁺/H⁺ exchanger, Nhx1p, in the endocytic and protein recycling pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1823: 534-543, (2012)

[学会発表] (計 21件)

1. 川村苑子, 十島純子, 十島二郎、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, 十島二郎, 第35回 日本分子生物学会年會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, 十島二郎, 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 日本分子生物学会年會, 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, 十島二郎, 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 日本分子生物学会年會, 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, 十島二郎, 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 日本分子生物学会年會, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 十島二郎, 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, 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, 十島二郎, 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, 2012年09月04日~2012年09月06日, 京都

19. 鈴木 良平, 十島純子, 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, H23年12月15日 横浜

20. 十島純子, Regulation of clathrin coat assembly by Eps15 homology domain-mediated interactions during endocytosis. The American society for cell biology, Annual Meeting, H23年12月5日, Denver USA

21. 十島純子, Regulation of clathrin coated assembly by EH Domain-mediated interaction during endocytosis, 第63回日本細胞生物学会, H23年6月27日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
十島純子 (Toshima Junko)
東京理科大学・総合研究機構・
ポストドクトラル研究員
研究者番号: 00431552

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: