

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293041

研究課題名(和文) エンドサイトーシスと外来因子取込を制御する細胞内シグナル伝達マシナリー

研究課題名(英文) Intracellular signaling machinery controlling endocytosis and uptake of extracellular materials

研究代表者

大場 雄介 (Ohba, Yusuke)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30333503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：エンドゾームは自ら積極的にシグナルを発することで多様な機能を発揮するプラットフォームである。しかし、生きた細胞でのダイナミクスと細胞機能との関連の詳細は不明な点が多い。本研究では、アンジオテンシンII (Angiotensin II) 2型受容体(AT2R)が、1型受容体(AT1R)シグナル伝達を負に調節するためには、AT1RとAT2Rのヘテロ二量体化とそのエンドサイトーシスによる内在化、さらに複合体内の受容体間分子配向変化が重要であることを見出した。また、この機能には両方の受容体の活性化が不可欠であること、プロテインキナーゼC (PKC) によるAT2RのC末端のセリン残基のリン酸化が重要であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Endosome is a multifunctional platform through the emission and the regulation of a variety of signal transduction pathways. However, the relationship between signaling dynamics and cell function via the endosomes in living cells has yet to be analyzed in detail. In this study, we demonstrated that angiotensin II (Angiotensin II) type 2 receptor (AT2R) negatively regulates type 1 receptor (AT1R)-signaling through a series of events including heterodimerization of AT1R and AT2R, internalization via endocytosis of the complex, change in the molecular orientation of receptors in the complex. We also clarified that activation of both receptors and phosphorylation of serine residues at the C-terminus of AT2R by protein kinase C (PKC) are indispensable for this function.

研究分野：細胞生理学

キーワード：蛍光バイオイメージング エンドサイトーシス シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

シグナル伝達は、細胞内の「いつ・どこ」で生じるかという時空間的な制御によって、その多様性と多能性が緻密に管理されている。例えば、神経成長因子受容体は、局在の違いにより異なる下流因子を活性化することが解っており、神経成長因子による分化シグナルにおいては、エンドゾームでの受容体活性化が重要であると考えられている。現在まで、エンドゾームから発信されるシグナルの重要性が徐々に解き明かされつつあり、我々もエンドゾームは自ら積極的にシグナルを発することで多様な機能を発揮するプラットフォームであることを報告している (Honda, *et al. Nature* 434: 1035, 2005)。

エンドサイトーシスとシグナル伝達の関係に関する研究はこれまで多く行われてきた。例えば、siRNA を用いた網羅的解析によりエンドサイトーシス関連因子が多数同定され、エンドサイトーシスが高度に制御されたシステムであることが明らかになりつつある。しかし、このような静的パラメータ収集の進行と比べ、時空間的かつ動的パラメータの収集は大きく遅れを取っている。

これまで我々は、フェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer, FRET) 等のイメージング手法による生きた細胞におけるシグナル伝達研究を行ってきた (Ohba, *et al. EMBO J.* 22: 859, 2003; Fujioka, *et al. Nat. Commun.* 4: 2763, 2013 他)。これらの成果によりシグナル伝達とエンドサイトーシスの精密な相互機能連関の存在が明らかになった。

2. 研究の目的

アンジオテンシン II (angiotensin II, AII) は心血管疾患の発症において重要な役割を果たす多機能ペプチドである。AII 受容体には 4 つのサブタイプが同定されており、いずれも G タンパク質共役型受容体である。1 型受容体 (angiotensin type 1 receptor, AT1R) は最も研究された受容体であり、AII 誘導性血管収縮に関与している。Extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK、以下 ERK) は、AT1R シグナルの鍵となる因子である。ERK は、protein kinase C (PKC) 依存性、 β アレスチン依存性、および上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) トランス活性化依存性にリン酸化される。一方、AT1R 以外の受容体の病態生理学的役割およびシグナル伝達機構は未知な点が多い。2 型受容体 (AT2R) は AT1R の作用を抑制することが報告されており、その一部は ERK の活性化を阻害することによるらしい。しかし、AT1R による ERK 活性化を AT2R が抑制する詳細な分子メカニズムは議論の余地がある。本研究は、AII 受容体の細胞内局在と相互作用を生きた細胞で解析することで、AT2R による AT1R の抑制機序の解明を目指した。その結果、AT1R と AT2R がエンドサイトーシ

スで取り込まれながらヘテロ二量体を形成し、その相互作用様式の変化が AT2R による AT1R シグナル抑制に重要なことを見出した。

3. 研究の方法

(1) 発現プラスミド

AT1R および AT2R の cDNA はヒト臍帯静脈内皮細胞の全 RNA を用いた RT-PCR により得た。HA および FLAG タグが開始コドンのメチオニン直後に挿入されるようにフォワードプライマーを設計した。得られた PCR 産物を pCR-BluntII-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングした。HA-AT1R-YFP および FLAG-AT2R-CFP の発現ベクターを得るために、HA-AT1R および FLAG-AT2R をそれぞれ pCXN2-YFPC および pCXN2-CFPC ベクターの *EcoRI-NotI* サイトにサブクローニングした。AT2R の 352 から 354 番目に存在する 3 つのセリン残基をアラニンに置換した変異体は、PCR による mutagenesis で作製した。Entacmaea quadricolor eqFP650 (TurboFP650) の cDNA は Evrogen (Moscow, Russia) から購入し、それをテンプレートに PCR で増幅した産物を pCMV 由来ベクターにサブクローニングして pFX-eqFP650 を得た。ラット ERK2 cDNA を PCR により増幅し、得られた PCR 産物を pFX-eqFP650 ベクターの *XhoI-NotI* サイトにサブクローニングして pFX-eqFP650-ERK2 を得た。全ての PCR 産物はシーケンス解析でその配列を確認した。

(2) 試薬および抗体

AII、リソホスファチジン酸 (LPA) および PD123319 は Sigma から購入した。EGF およびロサルタンは、それぞれ PeproTech および LKT Laboratories から購入し、スタウロスポリンおよび AG1478 は Calbiochem から購入した。Hoechst 33342 および G66983 は、Invitrogen と Cayman Chemical からそれぞれ購入した。FLAG および HA に対する抗体は Stratagene および Roche から購入し、ERK1/2 および phospho-ERK1/2 に対する抗体は Cell Signaling Technology から購入した。ホスホセリンおよびホスホトレオニン検出セットに含まれるリン酸化セリンおよびスレオニンに対する一連の抗体は、Enzo Life Sciences から入手した。

(3) 細胞培養およびトランスフェクション

HeLa および 293T 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, Sigma) で培養した。発現プラスミドは FuGENE HD (Roche) を用いて製造元プロトコールに従って導入した。

(4) イムノブロットングおよび免疫沈降

細胞を可溶化バッファー [20 mM HEPES pH7.5, 50 mM NaCl, 0.3% ジギトニン, 10% グリセロール, 5 mM MgCl₂, 3 mM EGTA, 0.1 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, EDTA 不含プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche)] 中で、氷上で 20 分間インキュベートした後、遠心分離した。得られた上清を SDS-PAGE に供し、分離されたタンパク質をポリビニリデンジ

ウロイド膜 (PVDF, Bio-Rad) に転写した。PVDF 膜を、一次抗体、続いてペルオキシダーゼ標識二次抗体とインキュベートした。ECL ウェスタンブロットリング検出試薬 (GE Healthcare) によって可視化し、LAS-1000 UV ミニイメージアナライザー (FUJIFILM) を用いて検出した。それぞれのバンドの強度はデンシトメーターを用いて定量した。

HA-AT1R-YFP および Flag-AT2R-CFP を発現する HeLa 細胞を、NP-40 可溶化バッファー [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 10%グリセロール, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, EDTA 不含プロテアーゼインヒビターカクテル] 中で溶解し、遠心で得られた上清を protein A-Sepharose ビーズおよび抗 FLAG 抗体とインキュベートした。ビーズに結合したタンパク質を SDS-PAGE により分離し、イムノブロットリングで検出した。

(5) 蛍光顕微鏡

分子間 FRET は以下の方法により観察・解析した。HeLa 細胞をガラス底の 35 mm 培養皿 (Asahi Techno Glass Co.) 上で培養し、蛍光タンパク質融合タンパク質の発現ベクターをトランスフェクションした。冷却 CCD カメラ (Cool-SNAP HQ, Roper Scientific)、励起および吸収フィルターホイール (Ludl Electronic Products) およびキセノン光源を実装したオリンパス IX71 倒立型顕微鏡からなるマルチカラータイムラプスイメージングワークステーションを用いて画像を取得した。周辺機器は MetaMorph ソフトウェア (Universal Imaging) によって制御されている。画像を 30 秒ごとに 1 時間記録した。10 分後に、細胞を AII で刺激した。各時点での、YFP、CFP、および FRET チャンネルを介した蛍光画像を順次取得した。用いたフィルターは、YFP 用 (励起: 500-25 nm; 吸収: 535-26 nm)、CFP 用 (励起: 440-21 nm; 吸収: 480-30 nm)、および FRET 用 (励起: 440-21 nm; 吸収: 535-26 nm) である。ダイクロイックミラーは XF2034 (455DRLP) (Omega Optical) を使用した。画像は、4 × 4 ビニングモードおよび 100 ~ 200 ms の露光時間で取得した。FRET 計算法は以下の通りである。取得した画像からバックグラウンドを差し引いた。FRET (FRET^C) は各画像の各ピクセル毎に、以下の式を用いて補正、計算した。FRET^C = FRET - 0.5 × CFP - 0.02 × YFP。ここで、FRET、YFP および CFP は、FRET、YFP および CFP チャンネルを介してそれぞれ取得された CFP および YFP を共発現する細胞のバックグラウンド減算後の蛍光強度である。CFP および YFP の蛍光について、それぞれ FRET チャンネルへの漏れ込みは 0.5 および 0.02 であった。FRET^C 画像は疑似カラーモードを用いて表示した。YFP 蛍光強度に基づいて細胞全体のマスク画像を作成し、その領域の FRET^C 値を MetaMorph で定量した。

eqFP650-ERK および Hoechst で核染した細胞の蛍光画像は、異なるフィルターセット

(Hoechst, 励起: 400-15 nm, 吸収: 480-30 nm; eqFP650, 励起: 535-30 nm, 吸収: 692-40 nm) を用いて、上記の同様に取得した。Hoechst の蛍光強度に基づいて核領域のマスク画像を作成し、核内の eqFP650-ERK の蛍光強度と細胞全体のそれを定量して ERK 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) AT2R は AT1R 依存性 ERK リン酸化を 選択的に阻害する

AT2R シグナルが AT1R 依存性シグナル伝達に拮抗することが報告されているので、AT1R または他の受容体によって誘導される ERK リン酸化に関する AT2R の作用を検討した。AII 処理による ERK 活性化は AT1R を発現する HeLa 細胞で観察することができた。AT2R 発現は AII 依存性 ERK 活性化を誘導できないが、AII および AT1R 依存性の ERK 活性化を減弱させた。AT2R 阻害薬 PD123319 で処理すると、AII 依存性 ERK 活性化が回復したため、ERK 活性化の抑制は AT2R シグナル伝達に起因すると考えられた。

次に、ERK 活性化に対する AT2R の作用の特性を検討した。EGFR 阻害薬 AG1478 は AII-AT1R 依存性 ERK 活性化に対する抑制効果を持たないことから、この細胞における AT1R シグナル伝達に EGFR のトランス活性化は必要ではない。この条件において、AT2R の発現は EGF、LPA および FBS による ERK 活性化を抑制しなかった。したがって、AT2R が AII-AT1R 依存性 ERK 活性化を選択的にブロックすること、その阻害は ERK カスケード [Raf/MAPK-ERK キナーゼ (MEK) /ERK] よりも上流で生じると推察された。

(2) AT2R は AT1R と相互作用する

そこで、AT2R による AT1R シグナルの抑制は、受容体レベルで生じていると仮定した。共免疫沈降法を用いて AT2R と AT1R の直接的相互作用を調べたところ、AII が存在しない場合でも AT2R は AT1R と結合しており、その結合は AII 処理で 2 倍程度増加した。しかし、AT1R 阻害薬ロサルタンや AT2R 阻害薬 PD123319 はこの相互作用を減弱させなかった。すなわち、生化学的手法で検出した相互作用の強弱は、ERK 活性化のそれと相関がなかった。この結果は、受容体レベルでの抑制の可能性を必ずしも否定するのではなく、むしろ生化学的分析以外のアプローチの必要性を示唆している。

(3) AII 刺激は AT1R 依存的に AT2R の内在化を誘導する

AT1R は AII 刺激でエンドソームに蓄積することが知られているため、AT2R が AT1R シグナル伝達を調節するために、細胞内局在が重要なのではないかと仮説をたてた。AT1R および AT2R の細胞内局在と輸送を可視化するため、シアンまたは黄色蛍光タンパク質 (CFP または YFP) で標識された受容体の発現ベクターを調製し、それらの局在を観察した。AII の非存在下では AT1R および AT2R

はともに細胞膜に局在した。AII 刺激により AT1R はすみやかに内在化されたが、AT2R は細胞膜にとどまった。次に、AT1R と AT2R を共発現した細胞における局在およびその変化を調べた。AII 刺激前は AT2R も AT1R も単独発現と同様に細胞膜に局在した。AII で刺激すると、AT2R のみを発現する細胞での局在とは対照的に、AT2R は AT1R とともに内在化され、細胞内の顆粒状構造で共局在した。

FRET は生きた細胞の分子相互作用を研究するための強力なツールである。我々はさらに CFP-AT2R および YFP-AT1R 間の FRET を分析した。静止細胞では弱い FRET シグナルしか検出されなかったが、AII 刺激によってシグナルが増加した。強いシグナルは顆粒状構造で認められた。この結果は以下のことを示唆する。AII が存在しない場合でも AT2R と AT1R は直接結合するが、分子配向的に CFP と YFP の距離が遠く FRET は観察されない。AII 刺激は AT1R と AT2R の結合を強めるとともに、CFP と YFP を近接させ、この構造変化が AT1R と AT2R の間の機能的相互作用を可能にするものと予測された。

(4) 複合体に構造変化誘導には両受容体へのリガンド結合が必要である

AT1R と AT2R の関係をさらに検討するため、AII 依存性受容体会合に対する受容体阻害薬の作用を調べた。AT1R 阻害薬であるロサルタンは、2 つの受容体間の FRET シグナルおよび受容体の内在化を完全に抑制した。すなわち、AII 依存性受容体内在化および分子配向の変化は AT1R シグナルに完全に依存している。AT2R 阻害薬である PD12319 は AT1R の内在化を抑制しなかったが、FRET は部分的に抑制した。すなわち、AT2R シグナルも受容体ヘテロ二量体の分子配向の変化に関与していることを示唆している。したがって、両方の受容体からのシグナルが受容体ヘテロ二量体の分子配向変化に不可欠であることが示唆された。

(5) PKC による AT2R リン酸化が AT1R と AT2R の機能的関連に必要である

PKC は AT1R のよく知られた下流エフェクターであるため、PKC 阻害薬の受容体動態に及ぼす影響を調べた。阻害薬処理は AT1R 内在化に影響を及ぼさなかったのに対し、AT2R の内在化は抑制された。さらに PKC 阻害薬は、2 つの受容体間の FRET を特に刺激後 20 分後以降で有意に減少させた。これらのデータは、PKC 活性化が AT1R と AT2R との間の機能的会合（受容体二量体における分子配向変化）およびその後の二量体の共内在化に不可欠なことを示唆する。

最後に、AT2R による AT1R シグナル抑制における PKC の役割の評価を試みた。しかし、PKC 阻害薬は AT1R 依存性 ERK 活性化を抑制するため、本検討には用いることができない。データベース解析により AT2R の C 末端領域に 3 つのリン酸化候補配列が見出され

たため、抗ホスホセリン/スレオニン抗体を用いて AT2R の免疫沈降物をイムノプロットしたところ、AT2R のリン酸化が AII-AT1R シグナル依存的に誘発されることが判明した。そこで、3 つのセリン残基をアラニンに置換した AT2R 変異体 (AT2R-3A) を作製した。野生型 AT2R と比較して、AT1R 依存的なリン酸化は AT2R-3A で減弱していた。また、AT1R による ERK 活性化に対する阻害作用も減少した。さらに、AII 刺激後も AT2R-3A と AT1R の間で FRET はほとんど観察されなかった。以上より、AII-AT1R-PKC による AT2R のリン酸化が、AT2R による AT1R シグナル抑制に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 21 件) 全て査読有り

1. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. S. Kon, K. Ishibashi, H. Katoh, S. Kitamoto, T. Shirai, S. Tanaka, M. Kajita, S. Ishikawa, H. Yamauchi, Y. Yako, T. Kamasaki, T. Matsumoto, H. Watanabe, R. Egami, A. Sasaki, A. Nishikawa, I. Kameda, T. Maruyama, R. Narumi, T. Morita, Y. Sasaki, R. Enoki, S. Honma, H. Imamura, M. Oshima, T. Soga, J.I. Miyazaki, M.R. Duchon, J.M. Nam, Y. Onodera, S. Yoshioka, J. Kikuta, M. Ishii, M. Imajo, E. Nishida, Y. Fujioka, Y. Ohba, T. Sato and Y. Fujita. **Nat. Cell Biol.**, 19(5):530-541,2017 (DOI: 10.1038/ncb3509.)
2. Improved FRET biosensor for the measurement of BCR-ABL activity in chronic myeloid leukemia cells. M. Horiguchi, M. Fujioka, T. Kondo, Y. Fujioka, X. Li, K. Horiuchi, A.O. Satoh, P. Nepal, S. Nishide, A. Nanbo, T. Teshima and Y. Ohba. **Cell. Struct. Funct.** 42(1): 15-26, 2017 (DOI: doi.org/10.1247/csf.16019)
3. Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells. S. Saitoh, T. Maruyama, Y. Yako, M. Kajita, Y. Fujioka, Y. Ohba, N. Kasai, N. Sugama, S. Kon, S. Ishikawa, T. Hayashi, T. Yamazaki, M. Tada and Y. Fujita. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 114(12): E2327-E2336, 2017 (DOI: 10.1073/pnas.1602349114)
4. A leukemogenic kinase, FIP1L1-PDGFR α , and a SUMO E3 ligase, Pias1, form a positive crosstalk via their enzymatic activities. M. Ibata, J. Iwasaki, Y. Fujioka, K. Nakagawa, S. Darmanin, M. Onozawa, D. Hashimoto, Y. Ohba, S. Hatakeyama, T. Teshima and T. Kondo. **Cancer Sci.** 108(2): 200-207, 2017 (国際共著, DOI: 10.1111/cas.13129)

5. Receptor activator of NF- κ B ligand induces cell adhesion and integrin α 2 expression via NF- κ B in head and neck cancers. T. Yamada, M. Tsuda, T. Wagatsuma, Y. Fujioka, M. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, Y. Totsuka, H. Haga, S. Tanaka, M. Shindoh and Y. Ohba. **Sci. Rep.** 6:23545, 2016 (DOI: 10.1038/srep23545)
6. Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. T. Inuzuka, Y. Fujioka, M. Tsuda, M. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, S. Tanaka and Y. Ohba. **Sci. Rep.** 6: 21613, 2016 (DOI: 10.1038/srep21613)
7. Fluorescence bioimaging of intracellular signaling and its clinical application. Y. Ohba and Y. Fujioka. **J. Oral Biosci.** 58(4): 113–119, 2016 (DOI: doi.org/10.1016/j.job.2016.07.002)
8. Epstein-Barr virus exploits host endocytic machinery for cell-to-cell viral transmission rather than a virological synapse. A. Nanbo, K. Kachi, H. Yoshiyama and Y. Ohba. **J. Gen. Virol.** 97(11): 2989-3006, 2016 (DOI: 10.1099/jgv.0.000605.)
9. Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. N. Maishi, Y. Ohba, K. Akiyama, N. Ohga, J.I. Hamada, H. Nagao-Kitamoto, M. Alam, K. Yamamoto, T. Kawamoto, N. Inoue, A. Taketomi, M. Shindoh, Y. Hida and K. Hida. **Sci. Rep.** 6: 28039, 2016 (DOI: 10.1038/srep28039)
10. Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. R. Okumura, T. Kurakawa, T. Nakano, H. Kayama, M. Kinoshita, D. Motooka, K. Gotoh, T. Kimura, N. Kamiyama, T. Kusu, Y. Ueda, H. Wu, H. Iijima, S. Barman, H. Osawa, H. Matsuno, J. Nishimura, Y. Ohba, S. Nakamura, T. Iida, M. Yamamoto, E. Umemoto, K. Sano and K. Takeda. **Nature** 532(7597): 117-121, 2016 (DOI: 10.1038/nature17406)
11. A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)-S1P receptor 2 pathway in Epithelial Defense Against Cancer (EDAC). S. Yamamoto, Y. Yako, Y. Fujioka, M. Kajita, T. Kameyama, S. Kon, S. Ishikawa, Y. Ohba, Y. Ohno, A. Kihara and Y. Fujita. **Mol. Biol. Cell** 27(3): 491-499, 2016 (DOI: 10.1091/mbc.E15-03-0161)
12. Fluorescent protein-based biosensors to visualize signal transduction beneath the plasma membrane. Y. Fujioka, A. Nanbo, S.Y. Nishide and Y. Ohba. **Anal. Sci.**, 31(4): 267-274, 2015 (DOI: 10.2116/analsci.31.267.)
13. Tyr724 phosphorylation of ELMO1 by Src is involved in cell spreading and migration via Rac1 activation. Y. Makino, M. Tsuda, Y. Ohba, H. Nishihara, H. Sawa, K. Nagashima and S. Tanaka. **Cell Commun. Signal.** 13: 42, 2015 (DOI: 10.1186/s12964-015-0113-y)
14. Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. T. Tsukiyama, A. Fukui, S. Terai, Y. Fujioka, K. Shinada, H. Takahashi, T.P. Yamaguchi, Y. Ohba and S. Hatakeyama. **Mol. Cell. Biol.** 35(11): 2007-2023, 2015 (DOI: 10.1128/MCB.00159-15.)
15. Adaptor protein CRK induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells through HGF/c-Met feedback loop. R. Matsumoto, M. Tsuda, L. Wang, N. Maishi, T. Abe, T. Kimura, M. Tanino, H. Nishihara, K. Hida, Y. Ohba, N. Shinohara, K. Nonomura and S. Tanaka. **Cancer Sci.** 106(6): 709-17, 2015 (DOI: 10.1111/cas.12662)
16. P18/Stathmin1 is regulated by miR-31 in ovarian cancer in response to taxane. M.K. Hassan, H. Watari, T. Mitamura, Z. Mohamed, S.F. EL-khamisy, Y. Ohba and N. Sakuragi. **Oncoscience** 2(3): 294-308, 2015 (國際共著, DOI: 10.18632/oncoscience.143)
17. Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low dose metronomic paclitaxel. K. Akiyama, N. Ohga, Y. Hida, N. Maishi, Y. Ohba, A.M. Towfik, T. Kawamoto, H. Ohmura, K. Yamada, C. Torii, M. Shindoh and K. Hida. **Am. J. Pathol.** 185(2): 572-580, 2015 (DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.017)
18. Agonist-promoted ubiquitination differentially regulates receptor trafficking of endothelin type A and type B receptors. K. Terada, T. Horinouchi, Y. Fujioka, T. Higashi, P. Nepal, M. Horiguchi, S. Karki, C. Hatate, A. Hoshi, T. Harada, Y. Mai, Y. Ohba and S. Miwa. **J. Biol. Chem.** 289(51): 35283-95, 2014 (DOI: 10.1074/jbc.M113.544171)
19. Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. R. Mahabir, M. Tanino, E. Aiman, L. Wang, T. Kimura, T. Itoh, Y. Ohba, H. Nishihara, H. Shirato, M. Tsuda and S. Tanaka. **Neuro-Oncology** 6(5): 671-685, 2014 (DOI: 10.1093/neuonc/not239)
20. Histone deacetylase inhibitors sensitize lung cancer cells to hyperthermia: involvement of Ku70/SirT-1 in thermo-protection. M. K. Hassan, H. Watari, A.E. Salah-Eldin, A.S. Sultan, Z. Mohamed, Y. Fujioka, Y. Ohba and N. Sakuragi. **PLoS One** 9(4): e94213, 2014 (國際共著, DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0094213)

21. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. M. Hassan, H. Watari, A. AbuAlmaaty, Y. Ohba and N. Sakuragi. **Biomed Res. Int.** 2014: 150845, 2014 (DOI: dx.doi.org/10.1155/2014/150845)

[学会発表] (計 10 件)

1. 大場 雄介、藤岡 容一郎、蛍光イメージングを用いた細胞内シグナル伝達によるエンドサイトーシスの制御機構の解析、第122回解剖学会、2017年3月28-30日、長崎大学坂本キャンパス(長崎県 長崎市) 招待
2. 大場 雄介、藤岡 容一郎、西出 真也、南保 明日香、蛍光イメージングで紐解くインフルエンザウイルス感染の分子基盤、第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25-27日、つくば国際会議場(茨城県 つくば市) 招待
3. 大場 雄介、近藤 健、豊嶋 崇徳、慢性骨髄性白血病分子標的治療薬効果評価のための FRET バイオセンサーの開発と改良、第75回日本癌学会学術総会、2016年10月6-8日、パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
4. 大場 雄介、藤岡 真理、堀口 美香、近藤 健、豊嶋 崇徳、生きた白血病細胞で BCR-ABL 活性を精密測定するための FRET バイオセンサーの改良、第89回日本生化学会大会、2016年9月25-27日、仙台国際センター 東北大学川内北キャンパス(宮城県 仙台市)
5. 大場 雄介、インフルエンザウイルス粒子の取り込みを制御するシグナル伝達機構、第6回北海道探索病理学研究シンポジウム、2016年9月17日、ニューオータニイン札幌(北海道 札幌市) 招待
6. 堀内 浩水、藤岡 容一郎、佐藤 絢、Prabha Nepal、堀口 美香、Jing Wang、西出 真也、南保 明日香、小布施 力史、大場 雄介、Ras-PI3K 複合体の時空間制御を介したエンドサイトーシス調節因子の探索、第68回日本細胞生物学会、2016年6月15-17日、京都テルサ(京都府 京都市)
7. 藤岡 容一郎、西出 真也、佐藤 絢、堀内 浩水、Prabha Nepal、堀口 美香、Jing Wang、南保 明日香、大場 雄介、インフルエンザウイルス宿主細胞侵入を制御する宿主側因子の同定、第68回日本細胞生物学会、2016年6月15-17日、京都テルサ(京都府 京都市)

[図書] (計 4 件)

1. Fujioka M, Asano Y, Nakada S and Ohba Y. SH2 domain-based FRET biosensor for measuring BCR-ABL activity in living CML cells. **Methods in Molecular Biology. SH2 domains** Kazuya Machida K and Liu BA (ed.) Springer, New York, (p513-534), 2017 (ISBN: 978-1-4939-6760-5)
2. Ras-PI3K シグナルによるエンドサイトーシスとウイルス粒子取り込みの制御機構.

藤岡 容一郎、大場 雄介. **生化学** 87(1): 91-100, 2015

3. 細胞の少数制と多様性に挑むシングルセルアナリシス—患者血液と FRET バイオセンサーを用いた薬効果予測 大場 雄介. **生体の科学** (金原出版) 65(2): 171-175, 2014

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: フェルスター共鳴エネルギー移動用ポリペプチド

発明者: 大場 雄介 権利者: 北海道大学

種類: 特許 番号: PCT/JP2014/060185

出願年月日: 2014年4月8日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 3 件)

名称: FRET 計測措置及び FRET 計測方法

発明者: 中田成幸、大場 雄介ほか

権利者: 三井造船株式会社、北海道大学

種類: 特許 番号: 5695190

取得年月日: 2015年2月13日

国内外の別: 国内

名称: BCR-ABL チロシンキナーゼ活性測定試薬

発明者: 大場 雄介、近藤 健

権利者: 北海道大学

種類: 特許 番号: 5665262

取得年月日: 2014年12月19日

国内外の別: 国内

名称: FRET 計測措置及び FRET 計測方法

発明者: 中田成幸、大場 雄介ほか

権利者: 三井造船株式会社、北海道大学

種類: 特許 番号: 5585973

取得年月日: 2014年8月1日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://cp.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場 雄介 (Yusuke Ohba)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 30333503

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

南保 明日香 (Asuka Nanbo)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 60359487

西出 真也 (Shinya Nishide)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 40451398

藤岡 容一郎 (Yoichiro Fujioka)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 70597492

(4) 研究協力者

藤岡 真理 (Mari Fujioka)

堀内 浩水 (Kosui Horiuchi)

佐藤 絢 (Aya O. Satoh)