

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860132

研究課題名(和文)エンドサイトーシス過程における膜脂質ダイナミクスの可視化解析

研究課題名(英文)Visualization of the phosphoinositide localization during endocytosis

研究代表者

高鳥 翔 (Takatori, Sho)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80624361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エンドサイトーシスにおいて各素過程が円滑に進行するためには、ホスホイノシチドが正しい場所に適切なタイミングで産生される必要がある。本研究では、エンドサイトーシス過程における個々のホスホイノシチドの詳細な分布解明を目指して、急速凍結・凍結割断レプリカ標識法を応用した。膜陥入過程とエンドソームの成熟過程に関わるホスホイノシチドPI(3,4)P<sub>2</sub>、PI(3,5)P<sub>2</sub>の特異的な標識条件を確立し、特にPI(3,5)P<sub>2</sub>がエンドソーム膜中で不均一分布をとるといふ新しい知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The spatio-temporal regulation of phosphoinositide generation is critical for endocytosis. However, the precise localization of individual phosphoinositide remains unclear, due to the technical difficulty in visualizing membrane lipids. In the present study, the quick-freezing and freeze-fracture replica labeling method was applied to reveal the distribution of phosphoinositides during endocytosis. The specific labeling of PI(3,4)P<sub>2</sub> and PI(3,5)P<sub>2</sub> were established. Notably, PI(3,5)P<sub>2</sub> was found to be heterogeneously distributed in the tubular endosome.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ホスホイノシチド エンドサイトーシス 急速凍結法 凍結割断レプリカ

### 1. 研究開始当初の背景

ホスホイノシチドは脂質 2 重層を構成するリン脂質の一種であり、イノシトール環の水酸基が異なる組み合わせでリン酸化された 7 種類の分子から成る。これらの細胞内分布は分子種ごとに異なり、それぞれが特異的な結合タンパク質を膜動員することでオルガネラのアイデンティティ形成に重要な役割を果たしている。一方、オルガネラのアイデンティティ自体が変化する場合に、どのようにホスホイノシチドが変化するのが不明の点が多い。この原因として、脂質の細胞内局在を解析するための技術に様々な不備があることが問題である。たとえば、脂質分布を可視化する技術として、脂質結合タンパク質に蛍光タグを融合した脂質プローブを細胞に発現させる方法が広く用いられている。しかし、この手法の空間分解能では脂質分布と微細形態との関連付けはオルガネラ単位が限界である。また、従来の免疫化学的手法を適用する場合にも、アルデヒド系の化学固定剤が多くの場合に脂質と反応しないことが問題になる。たとえ脂質を固定できる化合物が得られたとしても、脂質の側方拡散は極めて速く、また固定剤の浸透には少なくとも秒から分のオーダーの時間を要するため、ナノレベルの小さなドメインを解析する場合には不十分である。従って、脂質の局在を正確かつ高分解能に捉えられる新しい方法論が要求されている。

### 2. 研究の目的

エンドサイトーシスの進展過程においてはホスホイノシチドの分子種と分布が動的に変化することが示唆されている。しかし、膜脂質の局在決定は容易ではなく、各々の素過程で脂質分子がどのように変化するのか詳細は明らかになっていない。特に、エンドサイトーシス過程での膜変形に見られるナノサイズの脂質分布を明らかにするためには従来の光学的手法では限界がある。そこで本研究では、脂質の局在解析に優れた特徴のある急速凍結・凍結切断レプリカ標識法 (QF-FRL) を応用する。QF-FRL では様々なオルガネラ膜を 2 次元的に観察できるため、分子分布を定量的に解析でき、さらに時間分解能も優れている (Takatori et al., *Biochemistry* 2014)。これらの利点を生かして、膜輸送の各過程において脂質分布の経時的变化を追跡できる電顕手法を確立することを目指した。

### 3. 研究の方法

QF-FRL では、化学固定の代わりにミリ秒オーダーの急速凍結によって脂質の運動を止める。さらに凍結切断法によって生体膜の脂質 2 重層を 2 つの片葉に分け、露出した脂質膜の疎水性部分に白金と炭素を蒸着する。これにより膜分子が分布を保ったまま固定されたレプリカ膜を得る。これを対象に抗体

や脂質プローブによる標識を行い、電子顕微鏡により観察する。

本研究では、出芽酵母および哺乳類細胞において同調的にエンドサイトーシスを誘導できる系と QF-FRL を組み合わせることを計画した。具体的には、出芽酵母のメチオニン輸送担体 MUP1p がメチオニン欠乏条件下では細胞膜に局在するがメチオニンの添加によって同調的にエンドサイトーシスされること、また EGFR を過剰発現する哺乳類細胞に対しては EGF を添加することで EGFR が同調的にエンドサイトーシスされることを利用する。それぞれの系にエンドサイトーシスを誘導した後、様々な時間をおいてから急速凍結を行う。凍結切断レプリカを作製し、各受容体に対する抗体で標識することにより、成熟度の異なるエンドソームを同定する。膜輸送を経時的に追跡しながらホスホイノシチドの標識を比較することにより、エンドサイトーシスの各過程に着目したホスホイノシチドの分布・動態を明らかにできる。

### 4. 研究成果

#### (1) 同調的なエンドサイトーシスの誘導

MUP1p-EGFP を発現する出芽酵母を作出した。EGFP の蛍光はメチオニン欠乏培地中では表面膜にはほぼ限局していたのに対し、メチオニン添加後には液胞に局在化した。しかし、抗 GFP 抗体を用いた QF-FRL では MUP1p を検出できなかった。発現量が検出感度以下であると考えられたため、他の受容体として STE2p に着目した。プロモータ強度および検出用タグの種類を変えた複数の条件を比較検討したところ、表面膜上の STE2p を検出できたが、標識の密度として十分ではなかった。これまでの経験からも、QF-FRL では脂質の検出は高感度で可能な場合が多いのに対し、膜タンパク質の場合には検出困難なことがある。同様に、哺乳類細胞のうち EGFR を高発現することが知られる A431 細胞に対して、抗 EGFR 抗体による標識を行ったが、標識を検出できなかった。以上より、同調的なエンドサイトーシスそのものは誘導できたが、QF-FRL による検出には十分な感度を得ることができなかった。一方、エンドソームが成熟するに伴って分子種が変化する RAB タンパク質に関しては、内在性レベルの発現量でも検出可能な抗体を見出した。そこで、これらマーカータンパク質と脂質プローブの共標識により脂質分布の経時的变化を明らかにするべく、各種ホスホイノシチドの検出系を確立することを優先して行った。

#### (2) PI(3,4)P<sub>2</sub> の超微局在

本研究の開始時点では、エンドサイトーシスに関与する脂質のうち、QF-FRL によって解析できるホスホイノシチドは PI(4,5)P<sub>2</sub> と PI(3)P のみに限られていた。そこで QF-FRL に適用可能な脂質プローブの拡充を図った。

エンドサイトーシスにおける膜陥入の過程では、PI(4,5)P<sub>2</sub> は PI(3,4,5)P<sub>3</sub> を経た後に、PI(3,4)P<sub>2</sub>、PI(3)P へと変化することが示唆されている。このうち PI(3,4)P<sub>2</sub> については、fast endophilin-mediated endocytosis など、最近見つかったエンドサイトーシス経路においても重要視されているため、PI(3,4)P<sub>2</sub> のプローブ作製に着手した。各種のホスホイノシチドを含有するリポソームから凍結割断レプリカを調製し、PI(3,4)P<sub>2</sub> との結合が報告されているリコンビナントタンパク質を作製して反応性を比較した。その結果、TAPP1 タンパク質の PH ドメインと GST からなる融合タンパク質が PI(3,4)P<sub>2</sub> とよく反応することを見出した。このプローブは PI(3,4,5)P<sub>3</sub> リポソームとも反応したが、その反応性は PI(3,4)P<sub>2</sub> に対するよりも弱かった。また TAPP1 以外では、市販の抗 PI(3,4)P<sub>2</sub> 抗体が同様に QF-FRL に適用可能であることを見出した。次に、TAPP1 プローブが生体膜由来の PI(3,4)P<sub>2</sub> の標識に使えるか検討するため、哺乳類細胞の凍結割断レプリカを解析した。ポジティブコントロールとして、PI(3,4)P<sub>2</sub> を増加させることが知られている、過酸化水素で処理した細胞からレプリカを得て解析したところ、表面膜内葉(細胞質側)で TAPP1 プローブの標識が増加していた。一方、プローブとして PI(3,4)P<sub>2</sub> 結合能を欠く TAPP1 変異体 (R211L) を用いた場合にはほとんど標識が認められなかった。従って、細胞由来膜でも PI(3,4)P<sub>2</sub> を特異的に標識できる条件を確立できたと考えている。さらに細胞を PDGF で処理した場合にも PI(3,4)P<sub>2</sub> が発現増加することを確認した。

また PI(3,4)P<sub>2</sub> は、エンドサイトーシスだけでなく、貪食細胞のファゴサイトーシスにも関与することが指摘されている。実際に、TAPP1 と EGFP の融合タンパク質をミクログリア培養細胞に導入することにより、ファゴサイトーシス時のカップ状構造に PI(3,4)P<sub>2</sub> が局在することを確認した。さらに、ファゴサイトーシス時の PI(3,4)P<sub>2</sub> 産生に関わる酵素についてはノックアウトマウスを入手しており、PI(3,4)P<sub>2</sub> の詳細な分布を解析する計画である。

### (3) PI(3,5)P<sub>2</sub> の超微局在

エンドソームが膜成熟する過程で働くホスホイノシチドのなかでは、PI(3,5)P<sub>2</sub> の解析に成功した。比較検討した脂質プローブのうち、ATG18 タンパク質をはじめとして PI(3,5)P<sub>2</sub> と反応するものが複数得られた。しかし、いずれも PI(3)P に対する非特異的な結合が確認された。そこで、PI(3)P に対して特異的に結合するが PI(3,5)P<sub>2</sub> とは結合しない p40phox タンパク質の PX ドメインを調製し、反応系中に過剰量共存させたところ、PI(3)P に対する非特異的の反応をほぼ完全に抑えることができた。次に、この系を用いて PI(3,5)P<sub>2</sub> 陽性の細胞内オルガネラを検索し

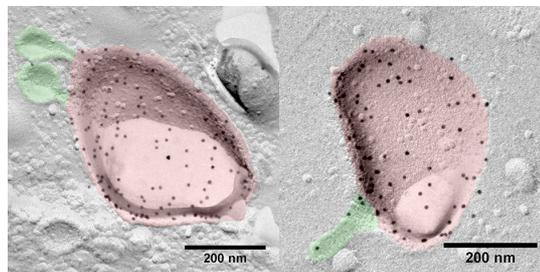
たところ、管状の突起をもつエンドソームに標識が集中していることを見出した。興味深いことに、PI(3,5)P<sub>2</sub> の標識は突起部分では乏しく、起始部である小胞状構造に集中していた(図1)。管状エンドソームは RAB5 および RAB7 陽性であり、初期・後期エンドソームの遷移状態にあるエンドソームであることが示唆された。さらに、蛍光免疫染色による解析では、突起部にレトロマー構成タンパク質が局在していることを見出した。

### (4) 得られた結果の位置づけと今後の展望

エンドサイトーシスの過程においてホスホイノシチドがどのように分布変化するのかこれまで不明な点が多かった。そこで本研究では膜脂質の局在解析に優れた特長のある QF-FRL を適用し、膜陥入過程とエンドソームの成熟過程に関してホスホイノシチドの詳細な分布を明らかにした。特に、管状エンドソームにおいて PI(3,5)P<sub>2</sub> が不均一分布していることを初めて明らかにした。細胞内オルガネラにおいて脂質が偏りをもって分布する例はほとんど知られておらず、結果の新規性は極めて高い。この研究成果は Traffic 誌に掲載され、図表は表紙にも採用された (Takatori et al., Traffic, in press)。

本研究の開始時に企図していた、エンドサイトーシスを同調的に誘導できる系に関しては、蛍光観察レベルでは達成できたが、QF-FRL に応用することは困難だった。一方、エンドソームのマーカータンパク質に関しては、内在性レベルの発現量でも検出可能なものを見出すことができた。脂質プローブをこれらと共標識することにより、エンドサイトーシスを時系列的に解析することが可能になった。今後は、QF-FRL による膜タンパク質の検出感度をさらに高めることにより、膜脂質の詳細な時空間的な分布・動態が明らかになると期待される。

図1. エンドソームにおける PI(3,5)P<sub>2</sub> の分布



### 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5件)

- 1) Kanatsu K, Hori Y, Takatori S, Watanabe T, Iwatsubo T & Tomita T, **Hum Mol Genet**, in press

- 2) Takatori S & Fujimoto T, ***Commun Integr Biol***, in press, DOI:10.1080/19420889.2016.1145319
- 3) Takatori S, Tatematsu T, Cheng J, Matsumoto J, Akano T & Fujimoto T, ***Traffic***, 17(2), pp154-167, 2016
- 4) Takatori S & Fujimoto T, ***Essays Biochem***, 57, pp81-91, 2015
- 5) Iyoshi S, Cheng J, Tatematsu T, Takatori S, Taki M, Yamamoto Y, Salic A & Fujimoto T, ***ACS Chem Biol***, 9(10), pp2217-2222, 2014

〔学会発表〕(計1件)

- 1) 高鳥翔, 立松律弥子, 松本惇, 赤野琢也, 程晶磊, Aktar Sharmin, 藤本豊土: Heterogenous distribution of phospholipids in the membrane revealed by quick-freezing and freeze-fracture replica labeling, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio/index.htm>

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neurops/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高鳥 翔 (TAKATORI, Sho)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号: 80624361