

出芽酵母を用いたエンドサイトーシス機構のイメージング解析

Live-Cell Imaging of Endocytosis in the Budding Yeast

十島 純子^a, 十島 二郎^{b*}

Junko Toshima and Jiro Toshima

^a早稲田大学理工学術院創造理工学部

^b東京理科大学基礎工学部生物工学科

要旨 出芽酵母は分泌やエンドサイトーシスなどの細胞内輸送経路の研究の優れたモデル生物である。従来、出芽酵母を用いた研究は変異体の作成、原因遺伝子の同定といった順遺伝学が主体であったが、近年の蛍光顕微鏡技術のめざましい進歩は、変異体のイメージング解析による表現型解析といった逆遺伝学の研究を可能にしている。本稿では、ライブセルイメージングによる出芽酵母のエンドサイトーシス経路の解析法について紹介する。

キーワード：出芽酵母, エンドサイトーシス, クラスリン, イメージング, EH ドメイン

1. はじめに

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あり、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、病原ウィ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。エンドサイトーシスは直径約 50 nm 程度の微細な膜小胞により仲介される現象であるため、初期のエンドサイトーシス研究は電子顕微鏡による形態学的な手法が主であった。エンドサイトーシスは 1964 年に、Roth らによる電子顕微鏡を用いた哺乳類細胞の観察により、湾曲した細胞膜構造として初めて同定された¹⁾。また、エンドサイトーシス部位には、クラスリンタンパク質により多角形の格子状の構造が形成されることが明らかにされた²⁾。その後、出芽酵母を用いた遺伝学的解析により、数多くのエンドサイトーシス関連タンパク質が同定され、これらの多くが哺乳類細胞においてもエンドサイトーシスの制御因子として働いていることが明らかにされた^{3,4)}。しかしながら、これらのタンパク質がどのように相互作用し、湾曲した細胞膜、およびクラスリン被覆小胞の形成を行っているのかについては不明

な点が多かった。エンドサイトーシス経路におけるタンパク質間相互作用の解明のブレークスルーとなったのは、2003 年の Drubin らの研究である。彼らは蛍光顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより、エンドサイトーシス関連タンパク質の動態を明らかにした^{5,6)}。これまでに、出芽酵母において、60 を超えるエンドサイトーシス関連タンパク質が同定されているが、近年のライブセルイメージング解析を中心とした手法により、これらのタンパク質間の相互作用や、エンドサイトーシスにおける役割が次々に明らかにされている⁴⁾。

2. 出芽酵母のエンドサイトーシス経路

エンドサイトーシス過程は全体として 1~2 分程度の短い現象であり、特に細胞膜の陥入からクラスリン被覆小胞の細胞内への輸送の段階は、約 15 秒の間に起こる非常に早い現象である (図 1)。エンドサイトーシス過程は大きく 3 つの段階に分けることができる⁴⁾。第一段階では初期被覆タンパク質が細胞膜上に集積する。これらの中には、クラスリンタンパク質のほか、ユビキチン結合タンパク質である Edelp, F-BAR ドメインを持つタンパク質である Syp1p などが含まれており、初期のクラスリン被覆ピットの形成を行っている。この初期過程において、エンドサイトーシスの積み荷となる膜タンパク質のクラスリン被覆ピットへの移動も起こる⁷⁾。第二段階では、後期被覆モジュールと言われるタンパク質群が、既に形成されているクラスリン被覆ピットに集積し、クラスリン被覆の成熟を行う。この中には、Pan1p/End3p/Sla1p 複合体や WASP/Myo タンパク質などが含まれる。Pan1p は Arp2/3 複合体の活性化因子であり、Ark1p/Prk1p キナーゼによるリン酸化により、エンドサイトーシス部位におけるアクチン重合の制御とともに、クラスリン被覆の解離を制御している⁸⁾。また、WASP/Myo タンパク質の中の Las17p, Myo3/5p も Arp2/3 複合体の活性化因子であり、第三段階におけるクラスリン被覆小胞の形成を仲介する。第三段階では、アクチンの重合による膜小胞の形成と切り離し、被覆の解離、小胞の細胞内への輸送が起こる。この段階では、Arp2/3 複合体の一過的な活性化による細胞膜の陥入と、Rvs161p/Rvs167p 等によるクラスリン被覆小胞の細胞膜からの切り離しが起こる⁶⁾。

これら各段階におけるタンパク質の動態は、多くの研究において、ライブセルイメージングにより詳細に解析されている。それらによると、第一段階の初期のクラスリン被覆ピット形成段階は約 60~135 秒とそれぞれのエンドサイトーシス部位において大きな差がみられる (図 1)。これに対して、第二段階以降の過程は非常に規則正しく起こる^{4,9)}。つまり、一度後期被覆モジュールのタンパク質群がエンドサイトーシス部位へとリクルートされると、その約 20 秒後にはアクチン重合が開始され、小胞の形成と細胞内への輸送が完了する。初期被覆タンパク質が細胞膜に集積する機構についてはまだ全く分かっていないが、細胞膜内の電荷をもった脂質が関与しているのではないかと考えられている。クラスリン被覆小

^b 〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6 丁目 3-1

* TEL: 03-5876-1717

E-mail: jtosiscb@rs.noda.tus.ac.jp

2013 年 9 月 17 日受付

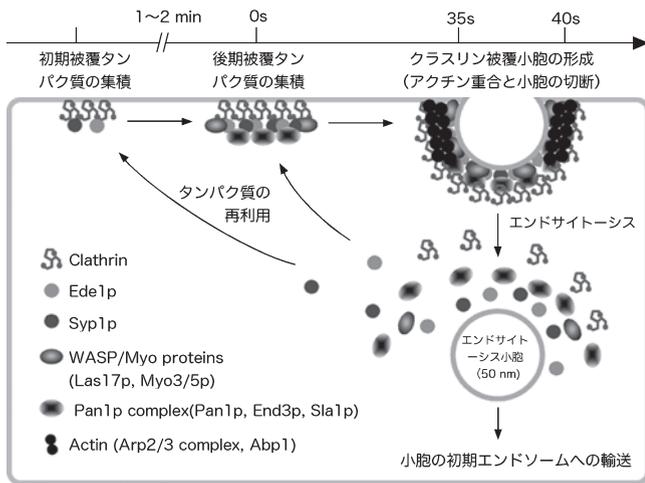


図1 出芽酵母のエンドサイトーシスの模式図

エンドサイトーシス過程におけるタンパク質局在の時間変化を示す。図上のタイムバーは後期被覆タンパク質がエンドサイトーシス部位にリクルートされる時間を基準にしている。詳細については本文を参照。

胞は細胞内に取込まれると、速やかに被覆タンパク質を解離し、初期エンドソームへと融合する。

3. エンドサイトーシスを観察する蛍光顕微鏡システムの概要

エンドサイトーシス小胞は約 50 nm と非常に小さい構造であり、その中で起こるタンパク質構成の変化も非常に早く起こる。このため、エンドサイトーシス部位での複数のタンパク質の動態を観察するためには、フィルターホイール等による観察波長の切り替えでは間に合わず、異なる 2 種類の蛍光波長の同時観察が可能である蛍光顕微鏡システムが必要である。私達の研究室では、オリンパスの倒立型顕微鏡に二光源落射蛍光投影管 (IX2-RFAW) と、二波長同時観察ユニット (DualView ユニット, 日本ローパー社) を取り付けたシステムを採用している (図 2)。蛍光タンパク質には GFP と mRFP を使用し、2 波長同時励起用フィルターとダイクロックミラーにより励起されるこれらの蛍光を二波長同時観察ユニットにより分光し、観察する。システム全体の制御はモレキュラーデバイス社の MetaMorph により行う。このようなシステムを用いて、対象のタンパク質がエンドサイトーシス部位へ現れる、もしくは解離するタイミングの解析や、目的のタンパク質をコードする遺伝子の変異によるエンドサイトーシスへの影響の解析等が可能になる。

4. エンドサイトーシスタンパク質の動態解析法

図 3 にエンドサイトーシスの後期被覆タンパク質の一つである Sla1p とアクチン制御因子である Abp1p の同時二重色ライブセルイメージングの例を挙げる。出芽酵母において、エンドサイトーシスは図 3A に示すように細胞膜周辺に“点状”に観察される。Sla1p と Abp1p は同じクラスリン被覆小

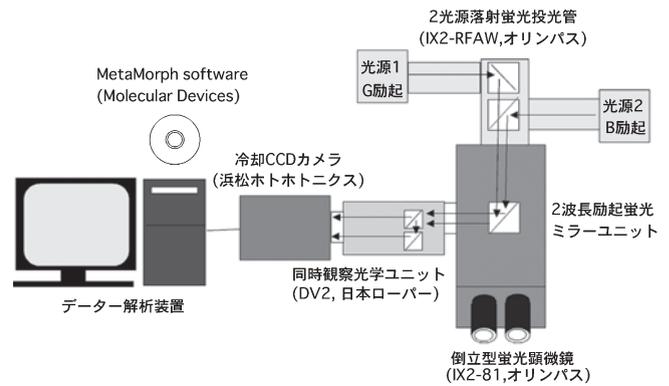


図 2 エンドサイトーシスの観察用の顕微鏡システムの概略図
オリンパスの倒立型顕微鏡 (IX2-81) に緑色、赤色の二重同時撮影用の装置を付属。詳細については本文を参照。

胞で働くタンパク質であるが、局在パターンは少し異なる。これは、これらのタンパク質が細胞膜に現れるタイミングとその部位に留まる時間が異なるためである。図 3B は図 3A の細胞の母細胞部位について、2 秒間隔で撮影したモニター写真を示している。異なる色の矢頭は異なるエンドサイトーシス部位を示しており、白の矢頭で示したエンドサイトーシス部位では、まず 2 秒目の写真において Sla1p が現れ、24 秒目の写真で Abp1p が現れている。このエンドサイトーシス部位における各タンパク質の出現するタイミングは、目的のエンドサイトーシス部位のみを切り抜いたモニター写真解析 (図 3C) を行うことで正確に調べることができる。さらに、エンドサイトーシス部位の断面のキモグラフ (Kymograph) を作成することにより、クラスリン被覆小胞が細胞内へと取込まれる動きを調べることができる (図 3D)。図 3E は Sla1p および Abp1p のエンドサイトーシス部位への滞在時間 (patch lifetime) を示しており、Sla1p が 32.3 ± 5.8 秒、Abp1p が 13.8 ± 1.9 秒である。また、図 3F では Sla1p および Abp1p の蛍光強度の変化と細胞膜からの移動距離を示している。濃緑で示した Sla1p の蛍光強度はエンドサイトーシス部位に現れてから徐々に増加し、ピークに達した後急速に消失する。黄緑で示す Sla1p の移動度と比較すると、Sla1p の蛍光強度がピークに達するとほぼ同時に Sla1p の移動度が増加することが分かる。このことは、Sla1p はクラスリン被覆小胞過程において、次第にその量を増やし、小胞が細胞膜から切り取られた直後に小胞膜から解離することを示している。また、赤で示す Abp1p については、小胞の細胞内への移動の直後に蛍光強度がピークに達することが分かる。さらに、Abp1p の動きはエンドサイトーシス小胞の動きを反映しており、その動きをトラッキングすることができる (図 3G)。このように、エンドサイトーシスの同時二重色ライブセルイメージングにより得られたデータを解析することにより、エンドサイトーシス関連タンパク質がエンドサイトーシスの過程においてどのように機能しているかを予測することができる。

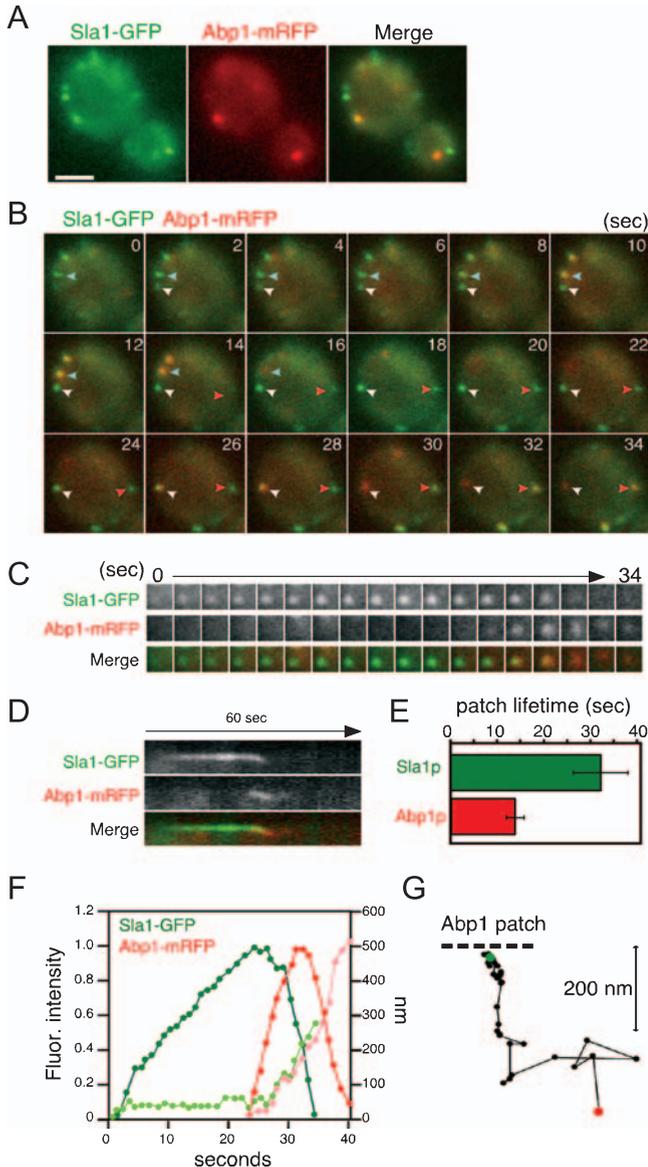


図3 エンドサイトーシスのデータ解析の例

(A) 野生型細胞における Sla1-GFP, および Abp1-mRFP の局在. Sla1-GFP と Abp1-mRFP を発現する細胞を YPD 培地で対数増殖期まで培養後, 緑, 赤の蛍光を同時に撮影. Bar, 1 μ m. (B) 図 A における母細胞のモニタージュ写真. 二重色同時撮影した写真を 2 秒ごとに示す. 図中の異なる色の矢頭は異なるエンドサイトーシス部位を示す. (C) 図 B における白色の矢頭のエンドサイトーシス部位のモニタージュ写真. Sla1-GFP の動態を上段に, Abp1-mRFP を中段に, 重ね合わせた図を下段に示す. 各フレーム間の時間は 2 秒. (D) 図 C のエンドサイトーシス部位のキモグラフ. (E) Sla1-GFP, および Abp1-mRFP のエンドサイトーシス部位への局在時間. 50 サンプルから得られたデータの平均値とエラーバーで示す. (F) Sla1-GFP および Abp1-mRFP のエンドサイトーシス部位における蛍光強度の変化と移動距離. 濃緑, Sla1-GFP の蛍光強度の変化; 黄緑, Sla1-GFP の最初にエンドサイトーシス部位に現れた部位からの移動距離; 赤, Abp1-mRFP の蛍光強度の変化; 淡赤, Abp1-mRFP の最初にエンドサイトーシス部位に現れた部位からの移動距離. 左縦軸は各蛍光強度の最大値を 1.0 とした相対値を示す. 右縦軸は移動距離を示す. (G) Abp1-mRFP の動態のトラッキングの例. 緑丸と赤丸は始点と終点を示す. 黒点は 0.5 秒ごとの Abp1-mRFP の位置を示す. 点線は細胞膜の位置を示す.

5. 二重色ライブセルイメージングによるエンドサイトーシスにおける EH ドメインの機能解析

出芽酵母において, ライブセルイメージングがその真面目を表すのは変異体解析においてである. 出芽酵母は 1 倍体 (1n) で生育できることから, 突然変異体および遺伝子ノックアウトを容易に作成することができる. 次に, エンドサイトーシス関連タンパク質に見られる EH ドメインについて, その変異体を用いた二重色ライブセルイメージングにより解析を行った例について紹介する. EH (Eps15 homology domain) ドメインは哺乳類の Eps15 タンパク質の N 末端領域に存在する 100 アミノ酸程度のドメインであり, クラスリン被覆の一部である AP-2 複合体の結合因子として同定された^{10,11}. このドメインは出芽酵母から哺乳類細胞にいたる多くの生物間で保存されており, 特にエンドサイトーシスに関わるタンパク質に多く見られる. 出芽酵母では Pan1p, End3p, および Ede1p の 3 つのエンドサイトーシス関連タンパク質に見られ, それぞれ複数個の EH ドメインを有している (図 4A)¹². 図 4B には EH ドメイン内で非常によく保存された配列を示しているが, この中の Trp 残基は, EH ドメインの結合配列の一つである NPF モチーフの認識に必要とされる¹³. 私達はこの EH ドメインの Trp 残基に変異を入れた際に, クラスリン被覆小胞の形成にどのような影響を与えるかを調べた⁹. 図 5 は各変異体における Sla1p, Abp1p の動態と野生型細胞との比較を示している. 図 5A は Pan1p と End3p の EH ド

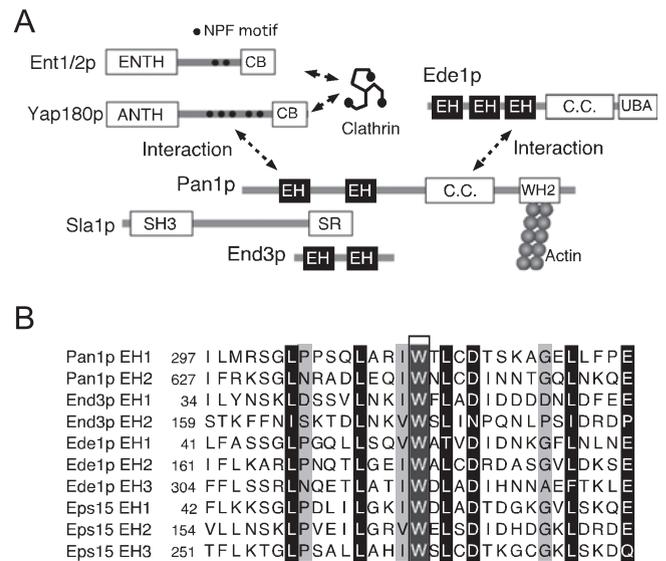


図4 EH ドメインを介したエンドサイトーシス関連タンパク質間の相互作用

Pan1p, End3p は 2 つ, Ede1p は 3 つの EH ドメインを有する. Pan1p, Sla1p, End3p は安定な Pan1p 複合体を形成しており, Ede1p と遺伝的な相互作用を持つ. EH ドメインは Ent1/2p や Yap180p などに見られる NPF モチーフと結合し, クラスリンと間接的に結合している. (B) Pan1p, End3p, Ede1p, Eps15 の EH ドメインの比較. 黒い部分は保存されたアミノ酸を示す.

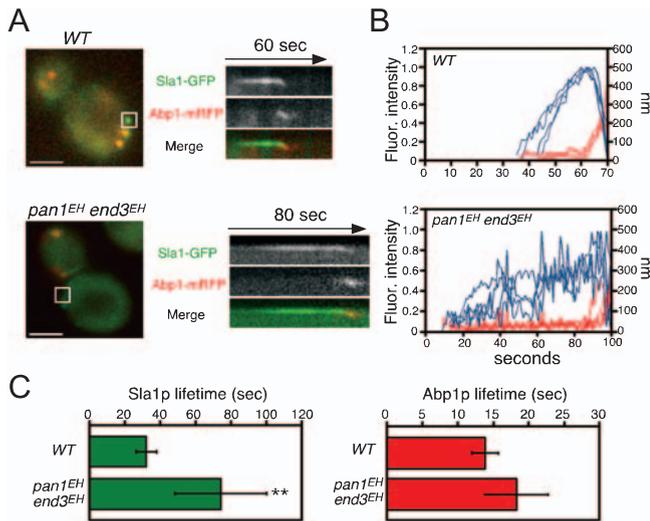


図5 Pan1p, End3pのEHドメイン変異によるエンドサイトーシスへの影響

(A) 野生型細胞およびEHドメイン変異体におけるSla1-GFP, およびAbp1-mRFPの局在とキモグラフ。Sla1-GFP, Abp1-mRFPを発現する細胞をYPD培地で対数増殖期まで培養後、緑、赤の蛍光を同時に撮影。Bar, 1 μ m. (B) 野生型細胞およびEHドメイン変異体におけるSla1-GFPのエンドサイトーシス部位における蛍光強度の変化と移動距離。(C) Sla1-GFP, およびAbp1-mRFPのエンドサイトーシス部位への局在時間。50サンプルから得られたデータの平均値とエラーバーで示す。各データは文献9より一部転載。

イン二重変異体におけるSla1p, Abp1pの局在を示しているが、これらは野生型細胞の場合と同様にエンドサイトーシス部位へ局在する。しかしながら、キモグラフおよびライフタイムを見ると、Pan1pとEnd3pの二重変異体では、Sla1pのライフタイムは非常に増加していることが分かる(図5B, C)。これに対して、エンドサイトーシス部位でのアクチンの重合マーカーであるAbp1pの動態は野生型と変異体細胞において大きな違いは見られない(図5C)。この結果は、EHドメインがクラスリン被覆小胞の成熟過程において機能していることを示唆している。このように、エンドサイトーシスのライブセルイメージング解析は研究対象とするタンパク質がエンドサイトーシスのどの過程においてリクルートされ、またその機能が失われたとき、エンドサイトーシスにどのような影響を与えるのかを調べるのに非常に有効な方法である。

6. おわりに

近年のめざましい顕微鏡技術の発達により、非常に小さな生物である出芽酵母におけるライブセルイメージング解析が可能になった。これにより、今まで技術的な問題により、明らかにできなかった様々な生命活動の分子機構を明らかにできるようになった。最近では、従来の顕微鏡の限界よりさらに高い解像度を持つ超解像顕微鏡システムや、新しい電子顕微鏡技術も次々と開発が進められている。イメージング解析は時間分解能と空間分解能との戦いであり、今後さらなる顕微鏡システムの開発を大いに期待したい。

謝辞

本執筆へのご助言を賜りました宮崎大学医学部解剖学講座教授、澤口朗先生に深く感謝をいたします。

文献

- 1) Roth, T.F. and Porter, K.R.: *J. Cell Biol.*, 20, 313–332 (1964)
- 2) Crowther, R.A., Finch, J.T. and Pearse, B.M.: *J. Mol. Biol.*, 103, 785–798 (1976)
- 3) Engqvist-Goldstein, A.E. and Drubin, D.G.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 19, 287–332 (2003)
- 4) Weinberg, J. and Drubin, D.G.: *Trends Cell Biol.*, 22, 1–13 (2012)
- 5) Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D.G.: *Cell*, 115, 475–487 (2003)
- 6) Kaksonen, M., Toret, C.P. and Drubin, D.G.: *Cell*, 123, 305–320 (2005)
- 7) Toshima, J.Y., Toshima, J., Kaksonen, M., Martin, A.C., King, D.S. and Drubin, D.G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 5793–5798 (2006)
- 8) Toshima, J., Toshima, J.Y., Martin, A.C. and Drubin, D.G.: *Nat. Cell Biol.*, 7, 246–254 (2005)
- 9) Suzuki, R., Toshima, J.Y. and Toshima, J.: *Mol. Biol. Cell*, 23, 687–700 (2012)
- 10) Di Fiore, P.P., Pelicci, P.G. and Sorkin, A.: *Trends Biochem. Sci.*, 22, 411–413 (1997)
- 11) Santolini, E., Salcini, A.E., Kay, B.K., Yamabhai, M. and Di Fiore, P.P.: *Exp. Cell Res.*, 253, 186–209 (1999)
- 12) Boettner, D.R., Chi, R.J. and Lemmon, S.K.: *Nat. Cell Biol.*, 14, 2–10 (2012)
- 13) Paoluzi, S., Castagnoli, L., Lauro, I., Salcini, A.E., Coda, L., Fre, S., Confalonieri, S., Pelicci, P.G., Di Fiore, P.P. and Cesareni, G.: *EMBO J.*, 17, 6541–6550 (1998)