



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ras-PI3Kシグナルの時空間制御を介したエンドサイトーシス制御機構に関する研究
Author(s)	佐藤, 絢
Description	配架番号 : 2457
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13443号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13443
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91681
Type	doctoral thesis
File Information	Aya_Sato.pdf



学位論文

Ras-PI3K シグナルの時空間制御を
介したエンドサイトーシス制御機構に
関する研究

(Studies on the regulatory mechanism of
endocytosis by spatiotemporal control of
Ras-PI3K signaling)

2019 年 3 月

北海道大学

佐藤 絢

学位論文

Ras-PI3K シグナルの時空間制御を
介したエンドサイトーシス制御機構に
関する研究

(Studies on the regulatory mechanism of
endocytosis by spatiotemporal control of
Ras-PI3K signaling)

2019 年 3 月

北海道大学

佐藤 絢

【目次】

【発表論文目録および学会発表目録】	1
【要旨】	3
【略語表】	6
【緒言】	8
<u>第1章 PI3K由来ペプチドによるエンドサイトーシスを介したインフルエンザウイルスの侵入と感染の抑制</u>	12
【緒言】	12
【実験方法】	14
【結果】	24
【考察】	45
<u>第2章 ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドサイトーシス制御機構</u>	48
【緒言】	48
【方法】	51
【結果】	64
【考察】	94
【総括および結論】	99
【謝辞】	101
【利益相反】	102
【引用文献】	103

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

Yoichiro Fujioka*, Aya O. Satoh*, Kosui Horiuchi, Mari Fujioka, Kaori Tsutsumi, Junko Sasaki, Prabha Nepal, Sayaka Kashiwagi, Sarad Paudel, Shinya Nishide, Asuka Nanbo, Takehiko Sasaki, and Yusuke Ohba (*Equal contributor)

A peptide derived from phosphoinositide 3-kinase inhibits endocytosis and influenza virus infection

Science Signaling (in submission)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 佐藤絢、藤岡容一郎、堀内浩水、ネパールプラバ、西出真也、南保明日香、大場雄介.

「Ras-PI3K シグナルによるエンドサイトーシス制御機構におけるミトコンドリアポアタンパク質の関与」

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 1 日～2015 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド

2. 佐藤絢、藤岡容一郎、堀内浩水、ネパールプラバ、西出真也、南保明日香、大場雄介.

「Involvement of mitochondrial outer membrane protein in Ras-PI3K signaling-mediated endocytosis」

第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22 日～2016 年 3 月 24 日、札幌コンベンションセンター

3. 佐藤絢、藤岡容一郎、堀内浩水、西出真也、ネパールプラバ、堀口美香、王セイ、南保明日香、大場雄介.

「Ras-PI3K シグナルを介したエンドサイトーシス制御機構におけるミトコンドリアポアタンパク質の機能解析」

第 68 回日本細胞生物学会、2016 年 6 月 15 日～2016 年 6 月 17 日、京都テルサ

4. 佐藤絢、藤岡容一郎、堀内浩水、藤岡真理、Paudel Sarad、西出真也、南保明日香、大場雄介。
「PI3K 由来ペプチドによるインフルエンザウイルス感染の抑制」
第 69 回日本細胞生物学会、2017 年 6 月 13 日～6 月 15 日、
仙台国際センター
5. 佐藤絢、藤岡容一郎、堀内浩水、藤岡真理、Paudel Sarad、西出真也、南保明日香、大場雄介。
「Inhibition of endocytosis and influenza virus infection by a PI3K-derived peptide」
第 3 回細胞競合国際シンポジウム、2017 年 8 月 29 日、北海道大学クラーク
会館
6. 佐藤絢、藤岡容一郎、堀内浩水、Nepal Prabha、柏木彩花、吉田藍子、藤岡真理、Paudel Sarad、南保明日香、大場雄介。
「A mitochondrial outer membrane protein is involved in the regulation of Ras-PI3K signaling-mediated endocytosis」
第 70 回日本細胞生物学会、第 51 回日本発生生物学会合同大会 2017 年 6 月 5
日～6 月 8 日、タワーホール船堀
7. 佐藤絢、藤岡容一郎、堀内浩水、ネパールプラバ、柏木彩花、吉田藍子、藤岡真理、パウデルサラド、笹島仁、南保明日香、大場雄介
「ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドサイトーシス制御機構」
第 98 回北海道医学大会生理系分科会、2018 年 10 月 6 日、北海道大学歯学部
講堂

【要旨】

背景と目的

低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras は、多数の標的因子との結合を時間的、空間的に制御することで多彩な細胞生理機能において中心的な役割を担っている。当研究室はこれまでに、Ras の標的因子である phosphoinositide 3-kinase (PI3K) のうちクラス IB の触媒サブユニット PI3Kp110 γ (以後 PI3K と記載) は、上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) の刺激依存的に Ras と複合体を形成すると、他の標的因子とは異なり細胞膜だけでなくエンドソーム上でも機能することを明らかにしている。実際に、PI3K はエンドソーム上で活性化し、エンドサイトーシスおよびインフルエンザウイルス感染を促進する。しかし、Ras-PI3K 複合体のみがエンドソームに局在するメカニズムは未知である。そこで、本研究は蛍光イメージングを用いてそのメカニズムの解明を目指した。

材料と方法

第 1 章: Ras の標的因子の Ras 結合ドメイン (Ras-binding domain, RBD) のアミノ酸配列を多重配列アライメントにより比較した。Ras-PI3K 複合体は蛍光タンパク質再構成法により可視化し、その挙動を共焦点顕微鏡で観察した。取得した画像は解析ソフト MetaMorph を用いて定量解析した。細胞のエンドサイトーシス能は、蛍光標識デキストランの取り込みを蛍光顕微鏡下で観察することで評価した。細胞のインフルエンザウイルスの取り込みは、蛍光免疫染色法を用いて可視化したウイルス核タンパク質 (nucleoprotein, NP) とエンドソームの共局在を定量することで評価した。ウイルス感染は、NP の蛍光強度を定量することで評価した。合成ペプチドは外部発注により入手した。第 2 章: PI3K の特異的配列に結合する因子は酵母ツーハイブリッド法を用いて探索した。タンパク質間相互作用は免疫沈降法およびウエスタンブロットティングにより評価した。ノックダウン実験は候補因子に対する低分子干渉 RNA (siRNA) を細胞に導入し、定量 PCR 法またはウエスタンブロットティングにより候補因子の mRNA またはタンパク質発現量を評価した。Ras-PI3K 複合体の挙動および細胞のエンドサイトーシス能は第 1 章と同様に評価した。ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の定量は、ミトコンドリアの周囲 0.31 μm 以内に局在するエンドソームの面積を定量することで評価した。エンドソームの酸性化は、pH 感受性蛍光色素標識デキストランを用いて評価した。ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の人為

的な誘導は光遺伝学法を用いた。

結果

第 1 章: Ras の主な標的因子の RBD のアミノ酸配列を比較したところ、PI3K には 28 アミノ酸からなる特異的配列が存在した。この特異的配列を欠損させた変異型 PI3K と Ras の複合体は、野生型 PI3K との複合体と比較して EGF 刺激後にエンドソームと共局在する Ras-PI3K 複合体のシグナルが減弱した。このことから、PI3K の特異的配列を Ras-PI3K endosomal localization (RAPEL) 配列と命名した。RAPEL に蛍光タンパク質を付加して細胞に過剰発現させたところ、コントロールの細胞と比較して EGF 刺激後に Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在が抑制された。また、RAPEL の過剰発現により蛍光標識デキストランの取り込みとインフルエンザウイルスの細胞侵入および感染が抑制された。さらに、RAPEL はペプチドとして細胞に取り込ませてもウイルス感染抑制効果を示した。第 2 章: 酵母ツーハイブリッド法による RAPEL 結合因子探索の結果、候補因子の一つとしてミトコンドリア外膜タンパク質の voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) が同定された。VDAC2 ノックダウン細胞はコントロール細胞と比較して Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在が抑制され、pH 感受性蛍光標識デキストランのシグナルが減弱した。また、生細胞内でミトコンドリアとエンドソームの挙動を詳細に観察したところ、コントロール細胞では EGF 刺激後に両者の相互作用が促進されたのに対し、VDAC2 ノックダウン細胞では変化が認められなかった。さらに光遺伝学ツールを用いてミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を人為的に誘導すると、エンドソームの酸性化が促進された。

考察

第 1 章: Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在に必要な配列である RAPEL の過剰発現、および RAPEL ペプチドの細胞への導入はインフルエンザウイルス感染を抑制した。これらの結果から、RAPEL ペプチドを用いた抗ウイルス治療法開発への展開が将来的に期待される。第 2 章: RAPEL 結合因子として同定された VDAC2 は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在とエンドソームの酸性化を制御した。さらに、VDAC2 は EGF 刺激依存的なミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を介してエンドソームの酸性化を促進することが示唆された。そのメカニズムの一つとして、両者が相互作用した時にミトコンドリアから放出された

ATPがエンドソーム上の vacuolar (H^+) ATPase (V-ATPase) に供給され、V-ATPase が H^+ をエンドソーム内に汲み上げることよりエンドソームの酸性化が促進されるという仮説が考えられる。今後はこの仮説を検証し、異種オルガネラ間相互作用によるエンドソーム酸性化促進の分子メカニズムとその生理学的意義を明らかにしたい。

結論

第 1 章: EGF 刺激依存的な Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を制御する PI3K の特異的配列 RAPEL を同定した。RAPEL の過剰発現および RAPEL ペプチドの導入は、インフルエンザウイルス感染を抑制した。第 2 章: RAPEL 結合因子として同定されたミトコンドリアの VDAC2 は、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を正に制御した。また、VDAC2 はエンドソームの酸性化および EGF 刺激依存的なミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を促進した。

【略語表】

AbA: aureobasidin A

BiFC: bimolecular fluorescence complementation

CDC25: cell division cycle 25

CFP: cyan fluorescent protein

CPPs: cell-penetrating peptides

DAG: diacylglycerol

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

EEA-1: early endosome antigen 1

EGF: epidermal growth factor

ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2

FBS: fetal bovine serum

FITC: fluorescein-5-isothiocyanate

FYVE: Fab-1, YOTB, Vac1, EEA-1

Gal4 BD: Gal4 DNA binding domain

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GFP: green fluorescent protein

GLUT1: glucose transporter 1

HA: hemagglutinin

IP₃: inositol triphosphate

IPTG: isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

LiAc: lithium acetate

LB: lysogeny broth

MAM: mitochondria-associated membrane of the endoplasmic reticulum

MANOVA: multivariate-analysis of variance

MAPK: mitogen-activated protein kinase

NA: neuraminidase

NCBI BLAST: National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool

NP: nucleoprotein

OD: optical density

one-way ANOVA: one-way analysis of variance

PA: polymerase acidic protein
PB: polymerase basic protein
PBS: phosphate-buffered saline
PEG: polyethylene glycol
PEI: polyethyleneimine
PH: pleckstrin homology
PI: phosphatidylinositol
PI(3)P: phosphatidylinositol 3-phosphate
PI(4)P: phosphatidylinositol 4-phosphate
PI(3,4)P₂: phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate
PI(4,5)P₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI(3,4,5)P₃: phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PI3K: phosphoinositide 3-kinase
PVDF: polyvinylidene difluoride
PX: Phox
RalGDS: Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
RAPEL: Ras-PI3K endosomal localization
RBD: Ras-binding domain
Rgl: Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like
RIPA: radio-immunoprecipitation assay
Rlf: RalGDS-like factor
SH: Src homology
SNARE: soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor)-attachment protein receptor
siRNA: small interference RNA
SOC: super optimal broth with catabolite repression
TE: Tris-EDTA
TBS: Tris-buffered saline
VDAC: voltage-dependent anion channel
VPS: vacuolar protein sorting
ZONAB: ZO-1-associated nucleic acid-binding protein

【緒言】

エンドサイトーシスは細胞外の栄養物や細胞膜表面の受容体などを細胞内に取り込む機構であり、細菌やウイルスなどの病原体が細胞内に侵入する入口にもなる。取り込む物質の種類やメカニズムの違いから、ピノサイトーシス (飲作用) とファゴサイトーシス (食作用) に大別され、さらにピノサイトーシスはクラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシス、クラスリンおよびカベオラ非依存性エンドサイトーシスに分けられる (Mayor and Pagano, 2007)。マクロピノサイトーシスはクラスリンおよびカベオラ非依存性エンドサイトーシスに含まれる (Conner and Schmid, 2003)。いずれの経路も大きくは以下のような流れで進む。細胞膜上の物質が認識されると細胞膜が陥入 (または物質を覆うように膜が隆起) して小胞が形成され、小胞が細胞内に移行する。小胞は初期エンドソームや後期エンドソームとの融合を経て成熟化し、最終的にリソソームと融合して内部の物質が分解される。受容体などの一部の物質は初期エンドソームを経てリサイクリングエンドソームと融合し、再び細胞膜上に戻る。エンドソームは物質を輸送する単なる容れ物として考えられていたが、近年では細胞内シグナル伝達において積極的にシグナルを発信するプラットフォームとしても役割を果たすことが明らかにされており (Murphy et al., 2009)、この機能が注目されている。

細胞内シグナル伝達は、分化、増殖、遺伝子発現、小胞輸送などのさまざまな機能を制御しており、細胞の恒常性維持にとって重要な機構である。細胞内シグナル伝達に関わるシグナル伝達分子は、適切な細胞の生理機能を発揮するために「いつ」、「どこで」結合し、活性化するかを緻密に制御されている。低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras は、転写、増殖、生存、細胞遊走など多くの細胞機能を制御するシグナル伝達分子であり (Bos et al., 2007)、Ras 自身や標的因子の活性化を時空間的に制御することで多様な機能を適切に使い分けていると考えられている。

Ras は Harvey rat sarcoma virus のホモログ (同族体) の H-Ras、Kirsten rat sarcoma virus ホモログの K-Ras、神経芽細胞腫から単離された N-Ras の三つの種類が存在し、これら三つの Ras のアミノ酸配列は約 80%の相同性を有している (Boguski and McCormick, 1993)。Ras の変異はさまざまなヒトの悪性腫瘍において高頻度で見られ、H-Ras は膀胱がんや副腎がん、K-Ras は膵がんや大腸がん、N-Ras はリンパ性腫瘍や黒色腫で特に多く見られる (Prior et al., 2012)。変異によ

り恒常的に活性化した Ras は GTPase 活性化タンパク質によって不活性化されなくなり、異常な細胞の増殖や細胞死、浸潤などを引き起こす (Karnoub and Weinberg, 2008)。Ras は C 末端に CAAX モチーフを有しており、これにより細胞膜に輸送される。CAAX モチーフ内のシステイン残基が farnesyltransferase によってファルネシルシステインに変換された後、小胞体に局在する RAS-converting CAAX endopeptidase 1 によって AAX 基が切断される (Boyartchuk et al., 1997; Hancock et al., 1989)。その後、H-Ras、N-Ras はゴルジ装置の protein acyltransferase によって C 末端の他のシステイン残基がパルミトイル化されて細胞膜に局在する (Swarthout et al., 2005)。K-Ras はパルミトイル化修飾を受けないが、C 末端のリジン残基が連なった polybasic region を介して細胞膜に局在する (Hancock et al., 1991)。以上の過程を経て Ras は細胞膜に局在して機能するが、Ras は細胞膜だけでなく小胞体やゴルジ装置の膜上でも活性化しており (Chiu et al., 2002)、細胞内膜への局在化が Ras の活性化に重要である。

正常細胞において、Ras は活性化型と不活性化型を循環している。GDP が結合した不活性化型の Ras は、グアニンヌクレオチド交換因子によって GDP が解離し、代わりに細胞質内に高濃度に存在する GTP が結合して活性化状態となる。活性化型の Ras は GTPase 活性化タンパク質によって GTP が加水分解されると再び不活性化型に戻る。Ras 自身は酵素活性を持たないが、10 を超える下流の標的因子を使い分けることで様々な細胞機能の制御を可能にしている (Vojtek and Der, 1998)。例えば、Ras の標的因子の一つであるセリン・スレオニンキナーゼの Raf は古典的 mitogen-activated protein kinase kinase (MAPK) 経路を活性化し、リン酸化された extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) が核移行することにより転写が促進される (Robbins et al., 1992; Vojtek et al., 1993)。Ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RalGDS) は CDC25 homology ドメインを介して Ral を活性化させ (Urano et al., 1996)、Ral が ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB) などの標的因子と結合するとエンドサイトーシスや転写が促進される (Frankel et al., 2005; Nakashima et al., 1999)。phospholipase C ϵ は PI(4,5)P₂ を inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) と diacylglycerol (DAG) に分解し、DAG による protein kinase C の活性化と IP₃ の生成により細胞内の Ca²⁺濃度を上昇させる (Kishimoto et al., 1980; Streb et al., 1983)。

Rasの代表的な標的因子の一つであるphosphoinositide 3-kinase (PI3K) は、細胞膜のイノシトールリン脂質のイノシトール環三位の水酸基をリン酸化する酵素

であり、構造的な特徴と基質特異性によってクラスIA、IB、II、IIIに分類される (Thorpe et al., 2015)。クラスIAは触媒サブユニットと制御サブユニットのヘテロ二量体であり、それぞれのサブユニットには三つのアイソフォーム (触媒サブユニット: p110 α , p110 β , p110 δ 、制御サブユニット: p85 α , p85 β , p55 γ) が存在する (Vanhaesebroeck et al., 2012)。受容体型チロシンキナーゼが活性化すると、リン酸化チロシンと触媒サブユニットのSH2ドメインとの結合を介してPI3Kが細胞膜にリクルートされ、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) を基質としてphosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P₃) を産生する (Hawkins et al., 1992)。クラスIBの触媒サブユニットであるp110 γ はp85結合ドメインを持たず、代わりにp101およびp84の制御サブユニットとヘテロ二量体を形成する (Stephens et al., 1997) が、制御サブユニット非存在下でも酵素活性をもつという報告がある (Kular et al., 1997; Stoyanov et al., 1995)。p110 γ はGタンパク質共役型受容体の活性化により解離した三量体Gタンパク質のG $\beta\gamma$ サブユニットと細胞膜で結合して活性化すると、クラスIAと同様にPI(4,5)P₂を基質としてPI(3,4,5)P₃を産生する (Stoyanov et al., 1995; Suire et al., 2005)。また、クラスIの触媒サブユニットはRas結合ドメイン (Ras-binding domain, RBD) を有しており、Rasの下流でも活性化される (Ong et al., 2001)。クラスIIの触媒サブユニットには三つのアイソフォーム (PI3KC2 α , PI3KC2 β , PI3KC2 γ) が存在し、phosphatidylinositol (PI) や phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P) を基質としてPI(3)Pやphosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PI(3,4)P₂) を産生する (Vanhaesebroeck et al., 2012)。クラスIIの必須の制御サブユニットは明らかになっておらず、その活性化機構はいまだ解明されていない。クラスIIIのvacuolar protein sorting 34 (VPS34) は制御サブユニットであるVPS15と二量体を形成し、PIを基質としてPI(3)Pを産生する (Vanhaesebroeck et al., 2012) が、クラスIIと同様に詳しい活性制御機構はまだ明らかになっていない。PI3Kは、産生したイノシトールリン脂質と結合するpleckstrin homology (PH) ドメイン、Fab1, YOTB, Vac1, and EEA-1 (FYVE) ドメイン、Phox (PX) ドメインを持つ下流因子を活性化させることで、細胞の生存や膜輸送を制御している。例えば、セリン・スレオニンキナーゼであるAktはPI(3,4,5)P₃と結合するPHドメインを有しており、PI3Kの活性化により細胞膜に移行して酵素活性が上昇する (Song et al., 2005)。PXドメインを持つsorting nexin 3は、PI(3)Pとの結合を介して初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへの輸送を制御する (Worby and Dixon, 2002)。

当研究室は以前に、H-RasとPI3KクラスIBの触媒サブユニットであるp110 γ の複合体（以後RasとPI3Kと呼ぶ）がRas-RafとRas-RalGDS複合体とは異なり、上皮増殖因子（Epidermal growth factor, EGF）刺激後に細胞膜からエンドソームに移行することを明らかにし、エンドソーム上でPI3Kが活性化していることを報告した（Tsutsumi et al., 2009）。また、Ras-PI3K複合体のエンドソーム移行がクラスリン非依存性エンドサイトーシスおよびインフルエンザウイルス感染を促進することを報告した（Fujioka et al., 2011）。Ras-PI3Kシグナルが時空間的に制御される細胞生物学的意義は明らかになったが、その分子メカニズムは未知であった。そこで、本研究はRas-PI3K複合体のエンドソーム移行の分子メカニズムの解明を目指した。

本博士論文は2部で構成される。

本研究は、Ras-PI3K複合体のエンドソーム移行を制御するPI3Kの特異的配列（Ras-PI3K endosomal localization (RAPEL) と命名）の発見から始まった。この発見をもとに、RAPELに結合する因子がRas-PI3K複合体のエンドソーム移行を制御するという仮説を立てた。第1章では、この仮説を検証するためにRAPELを細胞に過剰発現させ、RAPELがクラスリン非依存性エンドサイトーシスとインフルエンザウイルスの侵入および感染に対してドミナントネガティブ効果を発揮するかを検討した。第2章では、RAPELに結合する因子が存在し、この因子がRas-PI3K複合体をエンドソームヘリクルートするという仮説を立ててさらに研究を進めた。RAPEL結合因子の網羅的探索により同定されたミトコンドリア外膜タンパク質のvoltage-dependent anion channel 2 (VDAC2)の機能を解析した結果、ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によってエンドサイトーシスが制御されることが示唆された。

第1章 PI3K由来ペプチドによるエンドサイトーシスを介したインフルエンザウイルスの侵入と感染の抑制

【緒言】

インフルエンザウイルスはエンベロープを持つマイナス鎖の1本鎖RNAウイルスで、A型、B型、C型に分類される。毎年冬期に流行を引き起こすウイルスの一つであるA型インフルエンザウイルスは8本のゲノムRNAを有しており、ヘマグルチニン (hemagglutinin, HA)、ノイラミニダーゼ (neuraminidase, NA)、マトリクスタンパク質1 (matrix 1/2, M1/2)、RNAポリメラーゼ (polymerase acidic protein, PA, polymerase basic protein 1/2, PB1/2)、核タンパク質 (nucleoprotein, NP) から構成される。インフルエンザウイルスは自身のHAを介して宿主細胞表面のシアル化された物質と結合し、エンドサイトーシスを介して細胞内に侵入する。侵入したウイルスはエンドソーム内のpHの低下によってHAがエンドソーム膜と融合すると、ウイルスRNAが細胞質に放出される。宿主の核内でウイルスゲノムが複製されてウイルス粒子が再構成されると、再び細胞膜のシアル化タンパク質と結合する。ウイルスのNAによりHAとシアル化タンパク質の結合が切断され、ウイルス粒子が細胞外に放出される (Watanabe et al., 2010)。

インフルエンザウイルスは初めにクラスリン依存性エンドサイトーシスの経路で侵入することが明らかにされた (Matlin et al., 1981)。しかし、クラスリン依存性およびカベオラ依存性エンドサイトーシスを阻害してもウイルスが細胞内に侵入することが示され (Sieczkarski and Whittaker, 2002)、2011年にクラスリン非依存性エンドサイトーシスであるマクロピノサイトーシスの経路でも侵入することが明らかになった (de Vries et al., 2011)。当研究室からも、Ras-PI3Kシグナルにより促進されるクラスリン非依存性エンドサイトーシスを介してインフルエンザウイルスが細胞内に侵入することを報告しており (Tsutsumi et al., 2009; Fujioka et al., 2011)、インフルエンザウイルスはクラスリン依存性と非依存性の両方の経路で細胞内に侵入する。

本研究はRas-PI3K複合体のエンドソーム移行メカニズムを明らかにするため、Rasの主な標的因子三つのRBDのアミノ酸配列を比較した。PI3KはRas-PI3K複合体のエンドソーム移行を制御する特異的なアミノ酸配列を有しており、この配列をRAPELと命名した。RAPELの過剰発現によりインフルエンザウイルスの侵入と感染が抑制されたことから、RAPELが抗ウイルス薬に応用できるのではないかと考えた。そこでRAPELに細胞膜透過性を付加したRAPELのペプ

チドを細胞に導入したところ、細胞のウイルス感染が有意に抑制された。

【実験方法】

配列解析

PIK3p110 α (NP_006209.2)、PIK3p110 β (NP_006210.1)、p110 γ (NP_001269356.1)、p110 δ (NP_005017.3)、c-Raf1 (NP_002871.1)、B-Raf (NP_004324.2)、A-Raf (NP_001645.1)、RalGDS (NP_006257.1)、Rgl1 (NP_055964.3)、Rgl2 (NP_004752.1)、Rgl3 (NP_001155088.2)、Rlf (AAC52724.1) のアミノ酸配列は National Center for Biotechnology information (NCBI) Protein Database から入手した。それぞれの標的因子の RBD は、入手した配列から NCBI Conserved Domain Database の CD Search tool を用いて同定し、ClustalW を用いて RBD のアミノ酸配列を比較した。

試薬・抗体

ヒト EGF 組換え体タンパク質は PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA) から購入した。Hoechst 33342、Alexa Fluor 546 標識デキストラン (10 kDa)、Alexa Fluor 546 標識トランスフェリン、Alexa Fluor 594 および Alexa Fluor 647 標識抗マウス、抗ウサギおよび抗ラットイムノグロブリン G (IgG) 二次抗体は Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA) から購入した。Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウスおよび抗ウサギ IgG 二次抗体は GE Healthcare (Little Chalfont, UK)、HRP 標識抗ラット IgG 二次抗体は Life Technologies (Carlsbad, CA) から購入した。抗 EEA-1 抗体は BD Biosciences (San Jose, CA, USA)、抗 GST 抗体、抗 β -actin 抗体は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪、日本)、抗 ERK 抗体 (9102S)、抗リン酸化 ERK 抗体 (9101S)、抗 Akt 抗体 (9272S)、抗リン酸化 Akt (S473) 抗体 (9271S) および抗 Rab7 抗体 (9367S) は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) から購入した。抗 GFP 抗体は株式会社医学生物学研究所 (名古屋、日本)、抗 HA 抗体 (3F10) は Roche (Indianapolis, IN, USA)、抗 NP 抗体 (ab20343) は Abcam (Cambridge, UK)、抗 Ras (Ab-3) 抗体は Oncogene (Cambridge, MA, USA)、抗 FlagM2 抗体は Stratagene (La Jolla, CA, USA) および Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入した。

細胞培養

ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株 HEK293T (CRL-11268)、イヌ由来腎臓尿管上皮細胞株 MDCK (CCL-34)、ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞株 A549 (CCL-185)、ヒト上皮様細胞癌由来細胞株 A431 (CRL-1555) は American Type Culture

Collection (Manassas, VA, USA) から入手した。アフリカミドリザル由来腎臓上皮細胞株 Cos-1 (JCRB9082) は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 (大阪、日本) から購入した。細胞は 37°C、5%CO₂ 湿潤環境下で、1%ペニシリン-ストレプトマイシン (ナカライテスク株式会社、京都、日本) および 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, Thermo Fisher Scientific) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Sigma-Aldrich) を用いて培養した。

PIK3CG が欠損したマウス胚性線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast, MEF) は、東京医科歯科大学難治疾患研究所病態生理化学分野の佐々木雄彦先生から譲与頂いた (Sasaki et al., 2000)。野生型 PI3K γ および変異型 PI3K γ (Δ RAPEL、KE、EK、EE) が恒常的に発現する *PIK3CG*^{-/-}MEF 細胞を樹立するために、pCXN2-3 \times HA p110 γ 、pCXN2-3 \times HA p110 γ Δ RAPEL、pCXN2-3 \times HA p110 γ KE、pCXN2-3 \times HA p110 γ EK、pCXN2-3 \times HA p110 γ EE の発現プラスミドを *ScaI* で処理して直鎖化した。直鎖化したプラスミドを nucleofection (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany) を用いて *PIK3CG*^{-/-}MEF 細胞に遺伝子導入した。細胞を限外希釈して 10 cm ディッシュ (Corning) に播種し、0.5 mg/ml G418 硫酸塩 (Sigma-Aldrich)、10%FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有 DMEM を用いて 37°C で 3 日間培養した。約 3 日毎に培地交換しながらコロニーを単離し、PI3K γ 、PI3K γ Δ RAPEL、PI3K γ KE、PI3K γ EK、および PI3K γ EE 恒常発現 *PIK3CG*^{-/-}MEF 細胞を樹立した。これらの細胞は抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングによってタンパク質発現を確認し、0.2 mg/ml G418 硫酸塩、10%FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有 DMEM で培養した。

遺伝子導入

HEK293T 細胞、Cos-1 細胞、MDCK 細胞、A431 細胞への遺伝子導入はポリエチレンイミンマックス (Polyethyleneimine "MAX", PEIMAX, Polysciences, Warrington, PA, USA) を用いた。OPTI-MEM (Life Technologies) 250 μ l にプラスミドを加えて混ぜ、滅菌脱イオン水で 2 mg/ml に希釈した PEIMAX をプラスミド最大 2.5 μ g あたり 2 μ l 加えて 5 分間室温でインキュベートし、細胞培養液に添加した。CO₂ インキュベーター内で 6 時間インキュベートした後、細胞培養液を交換した。MEF 細胞への遺伝子導入には nucleofection (Amaxa Biosystems) を用い、添付文書に記載された方法に従って行った。細胞株は PCR Mycoplasma Test

Kit (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を用いてマイコプラズマ感染の有無を調べた。

プラスミド構築

pCAGGS-VN-H-Ras WT、pCXN2-Flag-p110 γ RBD-VC、(Tsutsumi et al., 2009)、pBlueScript II SK(+)-p110 γ 、pCXN2-3 \times HA-PI3K p110 γ 、pCAGGS-Venus-H-Ras V12、(Fujioka et al., 2011) は当教室で以前に作製されたものを使用した。pCAGGS-CFP、pCAGGS-Venus、pCAGGS-EGFP-H-Ras V12 (Ohba et al., 2003)、pRaichu-Ras 146X (Mochizuki et al., 2001) は京都大学大学院生命科学研究科生体制御学松田研究室で以前に作製されたものを用いた。pCMV-TagRFP-EEA-1 (#42635) は Addgene (Cambridge, MA, USA) から購入した。

p110 γ RBD Δ RAPEL の cDNA は Δ RAPEL_F/RBD_R のプライマーセット (表 1) を用いて PCR 法で増幅した。増幅した配列を *XhoI* と *NotI* で切断し、pCXN2-Flag-VC の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングして pCXN2-Flag-p110 γ RBD Δ RAPEL-VC を作製した。野生型 p110 γ RBD および p110 γ RBD Δ RAPEL も同様に、pCAGGS-CFP、pCAGGS-mRFP、pCAGGS-GST ベクターの *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングし、pCAGGS-CFP-p110 γ RBD、pCAGGS-mRFP-p110 γ RBD、pCAGGS-GST-p110 γ RBD、pCAGGS-CFP-p110 γ RBD Δ RAPEL、pCAGGS-mRFP-p110 γ RBD Δ RAPEL、pCAGGS-GST-p110 γ RBD Δ RAPEL を作製した。pCAGGS-GST は、まず *EcoRI* と *BglIII* で切断した GST を pCAGGS-RAPEL の *EcoRI/BglIII* サイトにサブクローニングして pCAGGS-GST-RAPEL を作製した。次にこれを *XhoI* と *NotI* で切断して RAPEL を抜き出し、Klenow 酵素で平滑化して pCAGGS-GST を作製した。RAPEL と RAPEL のトランケーション変異体 (CT9、CT20、NT8、M11) の配列は、それぞれ CFP_F/RAPEL_R、CT9_F/CARG2、CT20_F/CAGR2、CFP_F/NT8_R、CFP_F/NT19_R、CT20_F/NT19_R のプライマーセットを用いて PCR 法で増幅した。PCR で増幅したこれらの配列を *XhoI* と *BglIII* または *EcoRI* と *NotI* で切断し、pCAGGS-ECFP の *XhoI/BglIII* または *EcoRI/NotI* サイトにサブクローニングし、pCAGGS-ECFP-RAPEL および RAPEL のトランケーション変異体を作製した。RAPEL-M11 の二つのリジンをグルタミン酸に置換した変異体 (RAPEL-M11 EE、EK、KE) の作製は、EE_F/EE_R、EK_F/EK_R、KE_F/KE_R のオリゴヌクレオチドのセットを 95°C でアニールした後 *XhoI* と *NotI* で切断し、pCAGGS-CFP に

サブクローニングして pCAGGS-CFP-RAPEL-M11 EE、pCAGGS-CFP-RAPEL-M11 EK、pCAGGS-CFP-RAPEL-M11 KE を作製した。p110 γ Δ RAPEL の cDNA は Δ RAPEL_F/PI3K_R のプライマーセットを用いて PCR 法で増幅した。増幅した配列を *XhoI* と *NotI* で切断し、pCXN2-3 \times HA の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングして pCXN2-3 \times HA-p110 γ Δ RAPEL を作製した。全長の p110 γ 変異体である p110 γ KE、EK および EE の cDNA は、p110 γ KE_F/ p110 γ KE_R、p110 γ EK_F/ p110 γ EK_R、p110 γ EE_F/ p110 γ EE_R のプライマーセットを用いて pBlueScript II SK(+)-p110 γ をテンプレートに PCR 法で増幅した。PCR 産物を *DpnI* で 37°C で 2 時間消化し、エタノール沈殿後の PCR 産物に滅菌蒸留水を加えて再懸濁した。2 \times Rapid Ligation Kit (Roche) と T4 Polynucleotide Kinase (東洋紡、大阪、日本) を加えて 37°C で 2 時間インキュベートし、コンピテントセルを形質転換して pBlueScript II SK(+)-p110 γ KE、pBlueScript II SK(+)-p110 γ EK、pBlueScript II SK(+)-p110 γ EE を得た。これらのプラスミドを *XhoI* と *NotI* で切断し、pCXN2-3 \times HA-p110 γ の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングして pCXN2-3 \times HA-p110 γ KE、pCXN2-3 \times HA-p110 γ EK、pCXN2-3 \times HA-p110 γ EE を作製した。

PCR 法で増幅したすべての PCR 産物は、pCR-BluntII-TOPO ベクターまたは pCR2.1-TOPO ベクター (Life Technologies) に組み込み、コンピテントセル (JM109 株) を形質転換した。形質転換したコンピテントセルに super optimal broth with catabolite repression (SOC) 培地を加えて 37°C で 1 時間振盪し、40 μ g/ml カナマイシン含有 Lysogeny Broth (LB) プレート上で一晩培養した。得られたコロニーを 40 μ g/ml カナマイシン含有 LB 培地で振盪後、AxyPrepTM Plasmid DNA Purification Miniprep Kit (Axygen, Union City, CA, USA) または FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス、東京、日本) を用いてプラスミドを精製し、シーケンス解析にて配列を確認した。シーケンス解析には M13 forward/reverse primer を用い、北海道システムサイエンス株式会社 (札幌、日本) または北海道大学遺伝子病制御研究所 (札幌、日本) に依頼した。データの解析は DNA Dynamo (Blue Tractor Software, UK) を用いた。

蛍光顕微鏡観察

ワイドフィールド顕微鏡観察は、BioPoint MAC 6000 フィルターおよびシャッターコントロールユニット (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA)、電動

XY ステージ (中央精機株式会社、東京、日本)、冷却 electron multiplying charge-coupled device (EMCCD) カメラ Rolera EM-C² (QImaging, Surrey, BC, Canada) を搭載した倒立型リサーチ顕微鏡 IX-83 (オリンパス株式会社、東京、日本) を用いた。励起光源は SOLA Light Engine (Lumencor, Beaverton, OR, USA) を用い、各蛍光に対する励起および蛍光フィルターは以下の組み合わせを用いた。CFP: FF-02-438/24 および FF01-483/32 (Semrock, Rochester, NY, USA)。GFP、FITC、Alexa Fluor 488: BP470-490 および BP510-550 (オリンパス)。YFP: FF01-500/24-25 および FF01-542/27 (Semrock)。FRET: FF02-438/24 および FF01-542/27。mRFP、TagRFP、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 594: BP520-550 および BA580IF (オリンパス)。対物レンズは開口数 1.35 の 60 倍油浸対物レンズまたは開口数 0.75 の 20 倍対物レンズ (オリンパス) を使用し、サンプル周囲環境は Chamlide インキュベーターシステム (Live cell instrument, Soul, Korea) を用いて温調した。顕微鏡および周辺機器の制御には MetaMorph ソフトウェア (Universal Imaging, West Chester, PA, USA) を用いた。共焦点顕微鏡観察には FLUOVIEW FV10i (オリンパス)、または sDISK spinning disk confocal microscope (Andor Technology Belfast, UK) を搭載した IX-83 を用いた。sDISK の励起光源は 405 nm、488 nm、561 nm、633 nm のレーザーを搭載したレーザーモジュール (Spectral Applied Research, Hamilton, ON, Canada) を用い、CFP、YFP、TagRFP に対する励起および蛍光フィルターはワイドフィールド顕微鏡と同様の組み合わせを使用した。

蛍光タンパク質再構成法 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) による Ras-PI3K 複合体のライブセルイメージング

1 mM HCl で 10 倍希釈した Cellmatrix Type I-C (新田ゼラチン株式会社、大阪、日本) でコラーゲンコート処理をした 35 mm ガラスベースディッシュ (AGC テクノグラス株式会社、静岡、日本) に細胞を播種し、37°C で 24 時間培養した。pCAGGS-Venus-NT-H-Ras-WT (VN-Ras) 1 μ g と pCXN2-Flag-PI3KRBD-Venus-CT (PI3KRBD-VC) もしくは pCXN2-Flag-PI3KRBD Δ RAPEL-Venus-CT 0.1 μ g を遺伝子導入し、37°C で 24 時間培養した。血清飢餓処理のために、フェノールレッド不含 DMEM/F12 培地 (Life Technologies) に置換して 4 時間培養した。37°C に温調したディスク式共焦点顕微鏡 (sDISK) を用いてタイムラプス撮影を行い、撮影開始 10 分後に終濃度 100 ng/ml の EGF を添加し、さらに 60 分間観察した。

Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行の定量

Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を解析するために、VN-Ras、PI3K RBD-VC および TagRFP-EEA-1 を発現させた細胞をディスク式共焦点顕微鏡 (sDISK) で撮影した。取得した画像のバックグラウンドシグナルを引き、MetaMorph モジュールの TopHat を用いて BiFC シグナル (Ras-PI3K 複合体) と TagRFP シグナル (EEA-1) からなる小胞構造を抽出した。MetaMorph モジュールの Measure Colocalization を用いて Ras-PI3K 複合体と EEA-1 が共局在する面積を定量した。

エンドサイトーシスの評価

Alexa Fluor 546 で標識されたデキストランはクラスリン非依存性エンドサイトーシスの評価に使用し、トランスフェリンはクラスリン依存性エンドサイトーシスの評価に使用した。コラーゲンコート処理をした 35 mm ガラスベースディッシュに細胞を播種し、細胞密度が 70%程度になるまで培養した。終濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ のデキストランまたはトランスフェリンを細胞に加え、デキストランは 10 分間、トランスフェリンは 30 分間 37°C でインキュベートした。冷却した PBS で細胞を 1 回洗浄後、細胞膜表面のデキストランおよびトランスフェリンを除去するために Acid buffer (0.2 M glycine, 150 mM NaCl) (Kameyama et al., 2007) を加えて室温で 30 秒間インキュベートした。これを 2 回繰り返す、PBS で 2 回洗浄後 3%パラホルムアルデヒドで固定した。PBS で洗浄後に蛍光顕微鏡 (IX-83) を用いて観察した。得られた蛍光画像のバックグラウンドシグナルを引き、細胞内の蛍光強度の総和を MetaMorph ソフトウェアで定量した。

蛍光免疫染色法

細胞に 3%パラホルムアルデヒドを加えて室温で 15 分間インキュベートし、細胞を固定した。PBS で洗浄後、0.1% Triton X-100 を加えて室温で 4 分間透過処理をした。PBT (0.1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA)、0.05%Triton X-100 含有 PBS) で洗浄後、1%BSA を加えて室温で 30 分間ブロッキング処理をした。PBT で洗浄後、一次抗体 (抗 NP 抗体: 1/1,000、抗 HA 抗体: 1:1,000、抗 EEA-1 抗体: 1:1,000) を加えて 4°C で一晩インキュベートした。翌日 PBT で洗浄後、各一次抗体に対する Alexa Fluor 594/647 標識二次抗体 (1:250) を加え、遮光して室温で 1 時間インキュベートした。PBT、PBS で洗浄後、蛍光顕

微鏡 (IX-83) または共焦点レーザー顕微鏡 FV10i で観察した。

インフルエンザウイルスの調製

感染多重度 (multiplicity of infection, MOI) が一細胞あたり 0.0001 plaque-forming unit (PFU) になるように、A 型インフルエンザウイルス (A/Puerto Rico/8/34, H1N1; PR8) 株を MDCK 細胞に添加して 37°C で 48 時間インキュベートした。細胞を超遠心してウイルスを単離し、PBS で懸濁後使用時まで -80°C で保存した。ウイルス液に含まれる感染性ウイルスの量はプラークアッセイによって評価した。12 ウェルプレートに MDCK 細胞を播種してコンフルエントにした後、ウイルス感染細胞の培養上清を加えてインキュベートした。1 時間後に上清を取り除き、細胞を 1%Bacto-agar (Sigma-Aldrich) および 5 mg/ml トリプシン (Sigma-Aldrich) 含有 MEM で覆った。5%CO₂ 存在下で 37°C で 2 日間インキュベートした後、プラーク数をカウントした。

蛍光免疫染色法を用いたインフルエンザウイルスの細胞への侵入および感染の評価

コラーゲンコート処理をした 35 mm ガラスベースディッシュに細胞を播種し、細胞密度が 70%程度になるまで培養した。A 型インフルエンザウイルスを MOI 10 PFU/cell (侵入評価) または MOI 1 PFU/cell (感染評価) になるように MEM (MEM [no glutamine], 3.75%BSA, 3.75%NaHCO₃, MEM amino acid, MEM vitamin, 100 mM L-glutamine) に加え、このウイルス液を細胞に添加した。ウイルスの侵入評価は 37°C で 1 時間、感染評価は 37°C で 4 時間インキュベートした。PBS と Acid buffer で洗浄後、3%パラホルムアルデヒドを加えて室温で 15 分間インキュベートし、細胞を固定した。ウイルスの侵入評価は抗 NP 抗体 (1:2,000) および抗 Rab7 抗体 (1:500)、感染評価は抗 NP 抗体 (1:2,000) で免疫染色し、細胞の核は Hoechst 33342 で染色した。細胞へのウイルスの侵入は、共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i) で細胞の上から下まで 0.6 μm 間隔で撮影した。MetaMorph モジュールの Granularity を用いて NP と Rab7 の小胞を抽出し、MetaMorph モジュールの Measure Cololization を用いて両者の共局在の面積を定量した。細胞のウイルス感染は、蛍光顕微鏡 (IX-83) で NP の蛍光画像を取得し、Measure Cololization を用いて核内の NP の蛍光強度を定量した。

ウエスタンブロッティング

EGF 処理の細胞は、無血清培地で 4 時間培養して血清飢餓処理をした後、終濃度 100 ng/ml の EGF を添加して 37°C で 30 分間インキュベートし、Radio-immunoprecipitation Assay (RIPA) buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM Na₃VO₄] で可溶化した。細胞を氷上に 30 分間静置した後、4°C、20,000 × g で 10 分間遠心して上清を回収し、SDS-PAGE にて展開した。展開したタンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore, Darmstadt, Germany) に転写した後、PVDF 膜を 0.1% polyoxyethylenesorbitan monolaurate 含有トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS-T) で希釈した 5% スキムミルクで 1 時間ブロッキング処理をした。TBS-T で希釈した一次抗体 (抗 GST 抗体: 1:1,000、抗 Ras 抗体: 1:1,000、抗 Akt 抗体: 1:1,000、抗リン酸化 Akt 抗体: 1:1,000、抗 Erk 抗体: 1:1,000、抗リン酸化 Erk 抗体: 1:1,000、抗 β-actin 抗体: 1:2,500) と PVDF 膜をハイブリ・バッグに入れて室温で 2 時間振盪後、4°C で一晩振盪した。PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、HRP 標識二次抗体 (1:5,000) に入れて室温で 1 時間振盪した。TBS-T で 3 回洗浄後、ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて LAS-1000UVmini イメージアナライザー (富士フイルム、東京、日本) で検出した。

プルダウンアッセイ

6 ウェルプレートに HEK293T 細胞を 6×10^5 cells/well で播種し、24 時間後に遺伝子導入してさらに 24 時間培養した。細胞を lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM Na₃VO₄] で可溶化して氷上に 30 分間静置し、4°C で 20,000 × g 10 分間遠心して上清を回収した。上清を glutathione Sepharose beads (GE Healthcare) とともに 4°C で 1 時間インキュベートした。4°C 500 × g で 3 分間遠心して上清を取り除き、lysis buffer で洗浄した。この洗浄過程を 3 回繰り返して上清を取り除き、2×SDS sample buffer で溶出した。95°C で 5 分間熱変性させて遠心し、上清をウエスタンブロッティングに用いた。

ペプチド合成

本研究で使用したペプチドは 9-fluorenylmethyloxycarbonyl-固相合成法によって合成され、fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) でラベルした。合成ペプチドの正確性は飛行時間型質量分析法によって確認された。ペプチド合成と精製は BEX (東京、日本) によって行われた。ペプチド導入実験は、コラーゲンでコートした 35 mm ガラスベースディッシュに 1×10^5 cell の MDCK 細胞または HEK293T 細胞を播種し、70%程度の細胞密度になるまで培養した。ディッシュを PBS で 3 回洗浄後、100 μ M のペプチドを含む無血清の DMEM を入れ、37°C で 1 時間インキュベートした。細胞を PBS で 3 回洗浄し、さらに 37°C で 23 時間インキュベートした。

統計解析手法

得られたデータは、3 回の独立した試行から得られた平均 \pm 標準誤差で示した。2 群の平均の差の比較は、分散分析を行った後にスチューデントの *t*-検定 (パラメトリック手法) またはウェルチの *t*-検定 (ノンパラメトリック手法) を行った。2 群以上の多群の比較は一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) とテューキーの HSD 検定を用いた。時系列データの比較は、2 群間が多変量分散分析 (multivariate-analysis of variance, MANOVA)、2 群以上は MANOVA とボンフェローニ法を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とし *P* 値を図中に *で示した。

表 1: 第 1 章で用いたプライマー

クローニング用プライマー	配列 (5'-3')
△RAPEL_F	CCCTCGAGCAGACCATTAAGGTCTCACC
RBD_R	GGGCGGCCGCGTCTGGAGGCGTGTCCAGT
RAPEL_R	TAGCGGCCGCTCAGCTGGTGGTGTGCGG
CT9_F	GGCTCGAGATCGTCATTCACCGCAGC
CT20_F	GGCTCGAGCTGTGGAAGAAGATTGCC
NT8_R	TAGCGGCCGCTCAGTACTCCGGGAGGGGC
NT19_R	TAGCGGCCGCTCAGAAGATGCAGTTGTTGGC
CFP_F	CCGAATCCGCCATGGTGAGCAAGGGCGAG
CAGR2	AGATGCTCAAGGGGCTTCATGATG
EE_F	TCGAGCTGTGGGAGGAGATTGCCAACAACTGCATCTTCTGAGC
EE_R	GGCCGCTCAGAAGATGCAGTTGTTGGCAATCTCCTCCACAGC
EK_F	TCGAGCTGTGGGAGAAGATTGCCAACAACTGCATCTTCTGAGC
EK_R	GGCCGCTCAGAAGATGCAGTTGTTGGCAATCTTCTCCACAGC
KE_F	TCGAGCTGTGGAAGGAGATTGCCAACAACTGCATCTTCTGAGC
KE_R	GGCCGCTCAGAAGATGCAGTTGTTGGCAATCTCCTTCCACAGC
p110 γ EE_F	CGGAGTACCTGTGGGAGGAGATTGCCAACAACTGC
p110 γ EE_R	GCAGTTGTTGGCAATCTCCTCCACAGGTACTION
p110 γ EK_F	CGGAGTACCTGTGGGAGAAGATTGCCAACAACTGC
p110 γ EK_R	GCAGTTGTTGGCAATCTTCTCCTCCACAGGTACTION
p110 γ KE_F	CGGAGTACCTGTGGAAGGAGATTGCCAACAACTGC
p110 γ KE_R	GCAGTTGTTGGCAATCTCCTTCCACAGGTACTION
PI3K_R	CCGGGCCCTCAGCTAGTTAGCGGCCGCCGGCTGAATGTTTCTCTCC
PI3KRBD_F	CCGAA TTCACGTCCAAGCCCCTCCCGG
PI3KRBD_R	CCGTCGACGTCTGGAGGCGTGTCCAG

【結果】

PI3K は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を制御する配列を有する

これまで Ras と標的因子の複合体は細胞膜で機能すると考えられてきたが、当研究室の先行研究から、Ras-PI3K 複合体は Raf や RalGDS といった他の Ras の標的因子とは異なり、EGF 刺激依存的に細胞膜からエンドソームに移行し、エンドソーム上で活性化することが報告されている (Tsutsumi et al., 2009)。さらに、エンドソーム上で活性化した Ras-PI3K シグナルがクラスリン非依存性エンドサイトーシスやインフルエンザウイルスの感染を促進することが明らかになっている (Fujioka et al., 2011)。しかし、EGF 刺激依存的に Ras-PI3K 複合体がエンドソーム移行する分子メカニズムは未知であったため、本研究はその分子メカニズムを明らかにすることを目指した。はじめに、Ras の主な標的因子である Raf (c-Raf1、B-Raf、A-Raf)、PI3K (PI3Kp110 α 、p110 β 、p110 γ 、p110 δ)、RalGEF (RalGDS、Rlf、Rgl1、Rgl2、Rgl3) の RBD のアミノ酸配列を比較した。アミノ酸配列は NCBI Protein Database から入手し、NCBI Conserved Domain Database を用いて RBD を同定し、ClustalW の多重配列アライメントにより比較した (図 1A)。その結果、それぞれのファミリーメンバーは別の姉妹群を形成しており、PI3K 群は Raf 群と RalGEF 群の外群だった (図 1B)。これは、PI3K の RBD は進化的に Raf や RalGEF の RBD とは異なることを示している。次に PI3K p110 α 、p110 β 、p110 γ の RBD のアミノ酸配列を c-Raf1 および RalGDS と比較したところ、PI3KRBD は N 末端の 28 アミノ酸に特徴的な配列を有していた (図 1A)。さらに、PI3KRBD の N 末端の 28 アミノ酸領域は高い相同性を有していた (図 1C)。このことから、N 末端の 28 アミノ酸が PI3K に特異的な局在制御を担う保存された配列であり、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を制御することが示唆された。

そこで、PI3K p110 γ RBD (以後 PI3KRBD と呼ぶ) の N 末端の 28 アミノ酸が欠損した変異型 PI3KRBD を作製し、蛍光タンパク質再構成法 (bimolecular fluorescence complementation assay, BiFC 法) を用いて Ras-PI3KRBD 複合体の挙動を評価した。EGF 刺激前は、野生型と変異型 PI3KRBD は両者とも細胞膜に局在していた。Ras と野生型 PI3KRBD の複合体はこれまでの報告どおり (Tsutsumi et al., 2009)、EGF 刺激後にエンドソームへの移行が観察された (図 2A 上段)。一方、変異型 PI3KRBD と Ras の複合体はエンドソームへの移行がほとんど認められず、核周囲での集積が観察された (図 2A 下段)。次に Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を定量解析するために、TagRFP を融合させた EEA-1 で初期エンド

ソームを可視化してタイムラプス観察を行った。観察開始 10 分後に EGF で刺激してさらに 60 分間観察し、Ras-PI3K 複合体と EEA-1 の共局在の経時変化を定量した。その結果、野生型 PI3KRBD は EGF 刺激後に EEA-1 と Ras-PI3K 複合体の共局在が有意に増加していたのに対し、変異型は共局在がほとんど認められなかった (図 2B)。また、全長の野生型 PI3K p110 γ (PI3K γ) の場合も EGF 依存的に Ras とエンドソーム上で共局在するのに対して、28 アミノ酸を欠損した変異型 PI3K γ はエンドソームへの局在が抑制された (図 2C、D)。次に、28 アミノ酸が欠損した変異型 RBD の Ras 結合能をプルダウンアッセイによって検証したところ、変異型 RBD は野生型と同程度の Ras 結合能を有していた (図 3A、B)。これらの結果から、PI3KRBD の N 末端の 28 アミノ酸は Ras 結合能には影響せずに Ras-PI3K 複合体の局在を制御する機能を持つことが示唆された。そこで、PI3KRBD の特徴的な 28 アミノ酸を Ras-PI3K エンドソーム局在配列 (Ras-PI3K endosomal localization sequence, RAPEL) と命名した。以後 PI3K の 28 アミノ酸を RAPEL と呼ぶ。

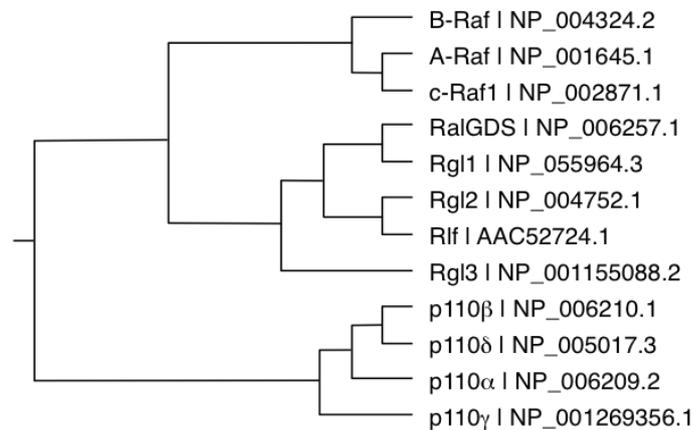
A

```

p110α 173 SSPELPKHIYNKLDKGQIIIVVIWVIVSPNNNDKQKYTLKINHDCVPEQVIAEAIRKKTRSM 232
p110β 180 HEPSIPENLEDKLYGG----KLIVAVHFENCQDVFSFQVSPNMNPIKVNELAIQKRLTIH 235
p110γ 203 TSKPLPEYLWKKIANN-----CIFIVIHRSTTSQTIKVSPDDTPGAILQSFFTKMAKKK 256
c-Raf1 57 -----TIRVFLPNKQRTVVNVNRN-----GMSLHDCLMKALKVR 89
RalGDS798 -----DCCIIRVSLDVDNGNMYKSILVTSQDKAPAVIRKAMDKH 836
          :                               .                               : *

p110α 233 LLSSEQLKLCVLEYQGKYILKVCGCDEYFLEKYPLSQYKYIRSCIMLGRMPNMLMAKES 292
p110β 236 GKEDE-----VSPYDYVLQVSGRVEYVFGDHPLIQFYIRNCVMNRALPHFILVECK 288
p110γ 257 SLMDIPES----QSEQDFVLRVCGRDEYLVGETPIKNFQWVRHCLKNGEEIHVVLDTPPD 312
c-Raf1 90 G-----LQPECCAVFRLLEHKGGKARLDWNTDAASLIGEELQVDFL- 131
RalGDS837 NLEEE-----EPEDYELLQILSDDRKLKIPENANVFYAMNSTANYDFVLKKR----- 883
          .                               :
  
```

B



C

```

p110α 173 SSPELPKHIYNKLDKGQIIIVVIWVIVSP 200
p110β 180 HEPSIPENLEDKLYGGKLIVAVHFENCQ 207
p110γ 203 TSKPLPEYLWKKIANNCIFIVIHRSTTS 230 → RAPEL
          .  :* : . * : . : : : :
  
```

図 1: PI3K は RBD の N 末端に特徴的な配列を有する

- A) Ras の標的因子の RBD アミノ酸配列の多重整列。“・”は低いホモロジー、“:”は高いホモロジー、“*”は同一のアミノ酸を示す。
- B) Ras の標的因子の RBD のアミノ酸配列を ClustalW を用いて解析し、有根系統樹 (UPGMA) を示した。それぞれの分子の accession number は分子名の右に示した。
- C) p110α、p110β、p110γ の N 末端 28 アミノ酸の多重整列。

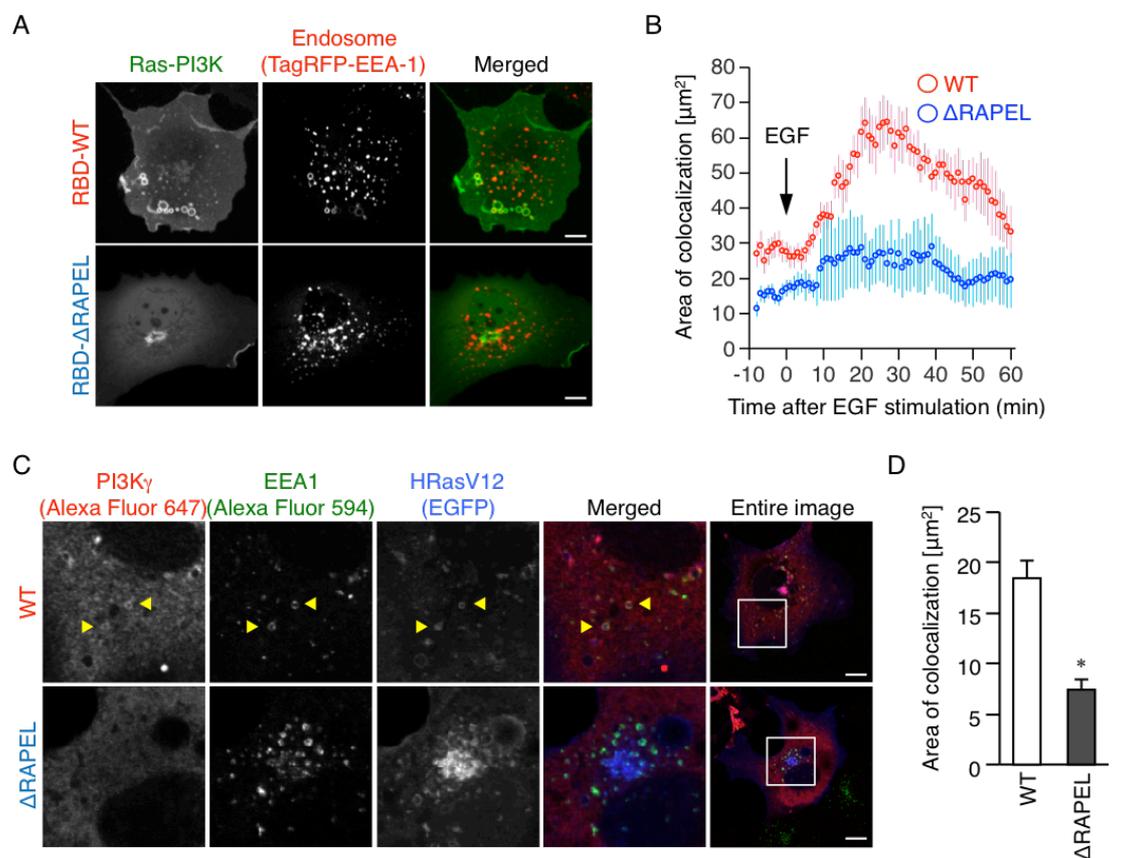


図 2: PI3KRBD の特徴的な配列 RAPEL は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行に必須な配列である

- A) Cos-1 細胞に TagRFP-EEA-1 と VN-H-Ras および PI3KRBD-wild-type (WT)-VC もしくは Δ RAPEL-VC の発現ベクターを導入して 24 時間培養した。4 時間血清飢餓処理後に 100 ng/ml の EGF で刺激し、共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。画像は EGF 刺激後 30 分を示す。(Bar = 10 μm)
- B) 画像解析ソフト MetaMorph を用いて EEA-1 と Ras-PI3K 複合体の小胞構造を抽出し、共局在の面積をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 20$)。 $P < 0.0001$ (MANOVA)。
- C) EGFP-H-RasV12 および HA-PI3KWT もしくは HA-PI3K Δ RAPEL を遺伝子導入した Cos-1 細胞を 3%パラホルムアルデヒドで固定し、抗 HA 抗体および抗 EEA-1 抗体で免疫染色した。Entire image 内の四角い領域を拡大し、画像内の黄色い矢頭は PI3KWT、EEA-1、H-RasV12 が共局在する小胞を示す。(Bar = 10 μm)
- D) 画像解析ソフト MetaMorph の Granularity モジュールを用いて、EEA-1 と PI3K の画像から小胞構造を抽出し、共局在の面積をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す。 $P < 1 \times 10^{-6}$ (Student's *t*-test)。

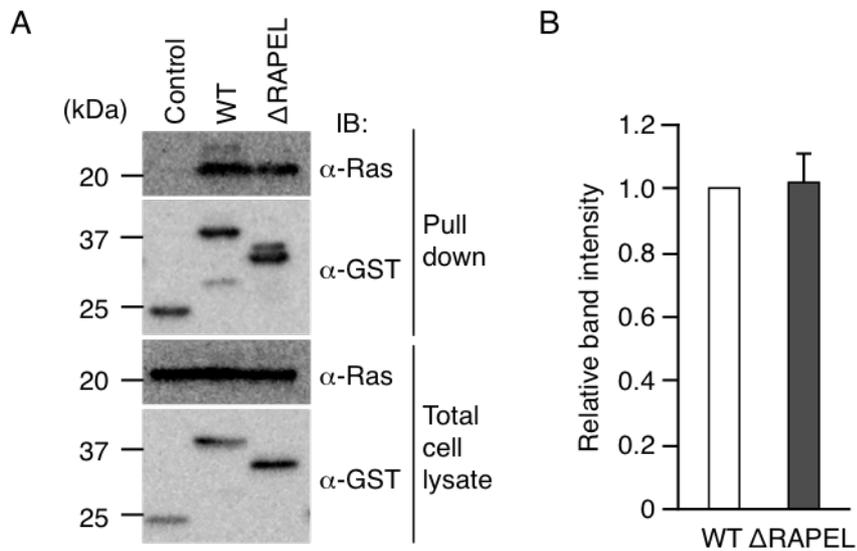


図 3: RAPEL が欠損した PI3KRBD も Ras 結合能を有する

- A) HEK293T 細胞に Venus-H-RasV12 と GST、GST-PI3KRBDWT もしくは GST-PI3KΔRAPEL を導入し、24 時間培養後に細胞可溶化液を回収した。細胞可溶化液に glutathione Sepharose 4B Beads を加えて 1 時間インキュベートし、lysis buffer で洗浄後 SDS sample buffer で懸濁した。沈降物と細胞可溶化液を、抗 GST 抗体と抗 Ras 抗体を用いてウエスタンブロッティングで検出した。
- B) 沈降物の抗 Ras 抗体のブロットの輝度を定量したグラフ。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す。P = 0.400 (Student's *t*-test)。

RAPEL の過剰発現はクラスリン非依存性エンドサイトーシスと Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を抑制する

調節ドメインを含むタンパク質断片の過剰発現は上流因子を捕捉して下流へのシグナル伝達を阻害する効果をもつことがあり、ドミナントネガティブ効果と呼ばれる。もし RAPEL が Ras-PI3K シグナルの時空間的制御に関与するならば、RAPEL の過剰発現が Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を抑制し、これによりエンドサイトーシスが抑制されるのではないかと考えた。そこで CFP を融合させた RAPEL 発現プラスミドを MDCK 細胞に遺伝子導入し、クラスリン非依存性エンドサイトーシスで取り込まれる蛍光標識デキストラン (分子量 10 kDa) を取り込ませてその取り込み量を定量した。その結果、RAPEL が過剰発現した MDCK 細胞はコントロール細胞と比較して有意にデキストランの取り込みが抑制された (図 4A、B)。A549 細胞、Cos-1 細胞、HEK293T 細胞においても同様の現象が認められた。(図 4B)。一方、RAPEL の過剰発現はクラスリン依存性エンドサイトーシスで取り込まれるトランスフェリンの取り込みには影響を与えず、RAPEL はクラスリン非依存性エンドサイトーシスのみを制御することが示された (図 4C、D)。次に、CFP-RAPEL を発現させた Cos-1 細胞の Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を評価したところ、RAPEL の過剰発現により Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行も抑制されることがわかった (図 5A、B)。これらの結果から、RAPEL の過剰発現はクラスリン非依存性エンドサイトーシスと Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行に対してドミナントネガティブ効果をもつことが示された。

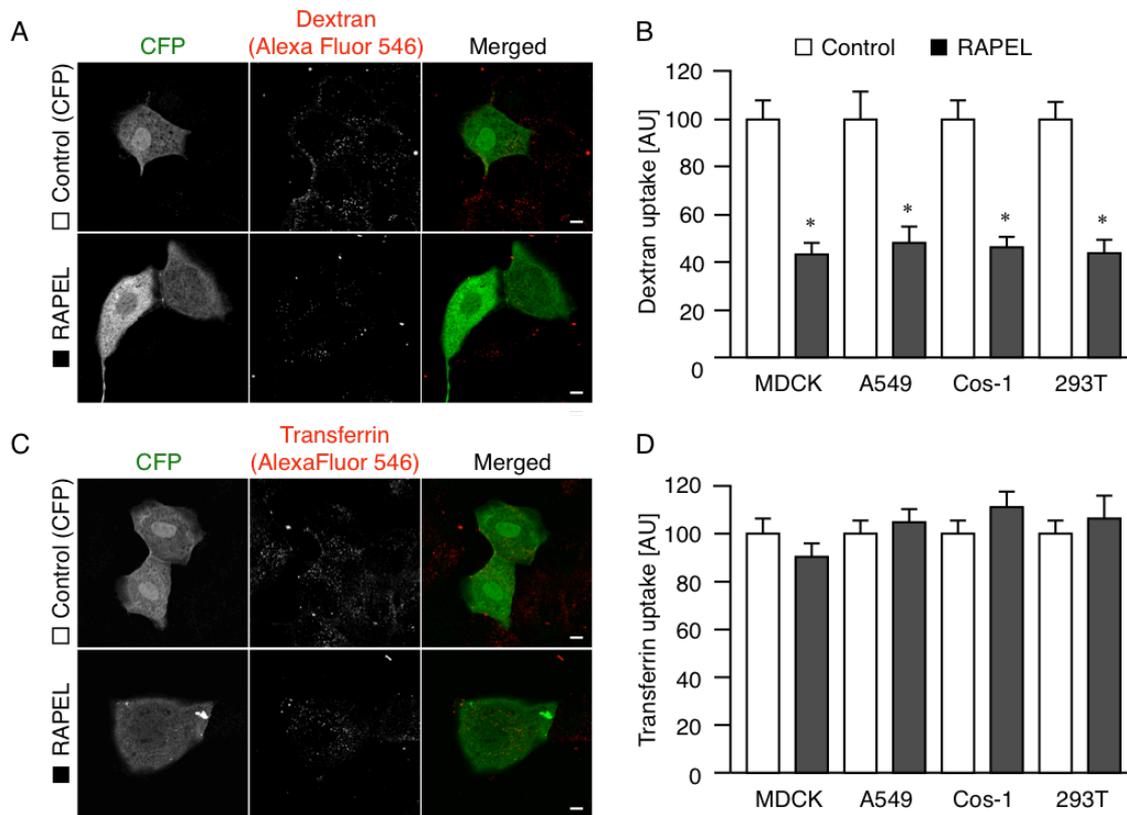


図 4: RAPEL の過剰発現はクラスリン非依存性エンドサイトーシスに対してドミナントネガティブ効果を有する

- A) MDCK 細胞、A549 細胞、Cos-1 細胞、HEK293T 細胞に CFP または CFP-RAPEL を導入して 24 時間培養し、500 $\mu\text{g/ml}$ の Alexa Fluor 546 標識デキストランを加えて 10 分間インキュベートした。細胞を Acid buffer と PBS で洗浄し、3%パラホルムアルデヒドで固定して蛍光顕微鏡で観察した。画像は MDCK 細胞。(Bar = 10 μm)
- B) 解析ソフト MetaMorph を用いて細胞内のデキストラン由来の蛍光強度を測定し、これを取り込み量とした。コントロール細胞に対する取り込み量比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 30$)。 $P < 1 \times 10^{-5}$ (Student's *t*-test)。
- C) MDCK 細胞、A549 細胞、Cos-1 細胞、HEK293T 細胞に A と同様の方法で 500 $\mu\text{g/ml}$ の Alexa Fluor 546 標識トランスフェリンを取り込ませ、洗浄、固定後に蛍光顕微鏡で観察した。画像は MDCK 細胞。(Bar = 10 μm)
- D) C と同様の方法で画像を解析し、コントロール細胞に対する取り込み量比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 30$)。

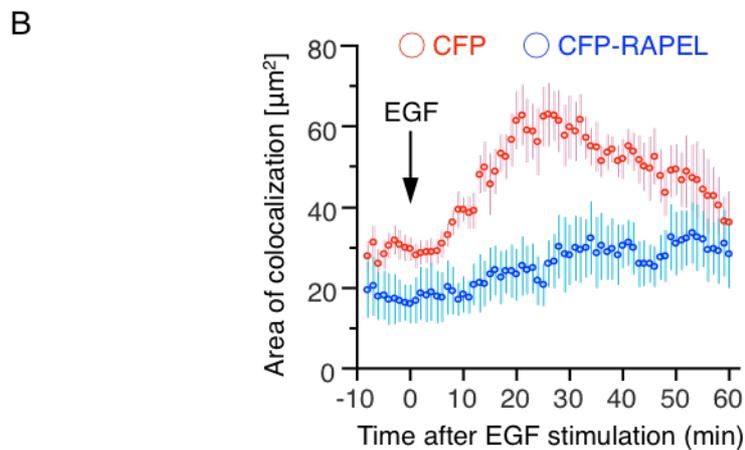
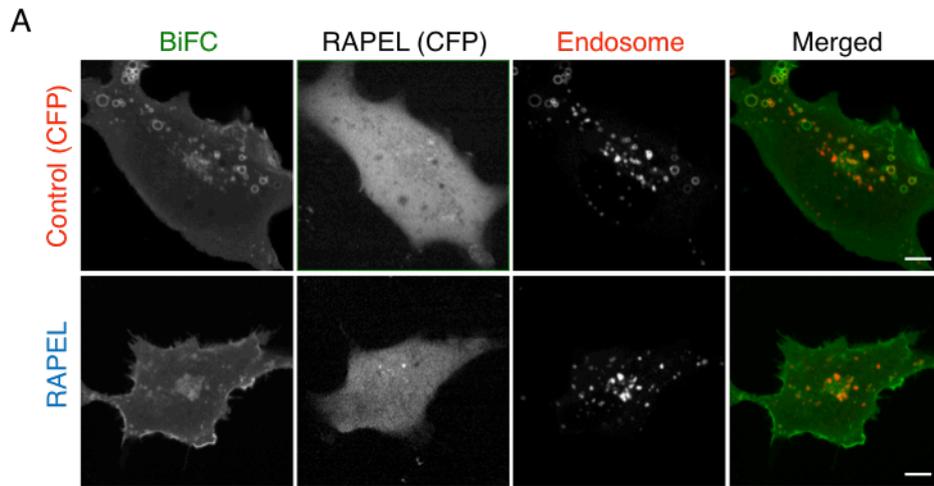


図 5: RAPEL の過剰発現は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行に対してドミナントネガティブ効果を有する

- A) Cos-1 細胞に TagRFP-EEA-1, VN-H-Ras, PI3KRBD-WT-VC と CFP または CFP-RAPEL の発現ベクターを遺伝子導入して 24 時間培養した。4 時間血清飢餓処理後に 100 ng/ml の EGF で刺激し、共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。画像は EGF 刺激後 30 分を示す。(Bar = 10 μm)
- B) EEA-1 と Ras-PI3K 複合体の小胞構造を抽出し、共局在の面積をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す (n ≥ 15)。P = 0.0004 (MANOVA)。

RAPEL の過剰発現はインフルエンザウイルスの侵入と感染を抑制する

当研究室はこれまでに、A 型インフルエンザウイルスがクラスリン依存性エンドサイトーシスだけでなく非依存性エンドサイトーシスの経路も利用して宿主細胞に侵入し、後者の経路を介した侵入と感染には Ras-PI3K シグナルが重要な役割を担うことを報告している (Fujioka et al., 2011; Fujioka et al., 2013)。次に、RAPEL の過剰発現がインフルエンザウイルスの細胞への侵入および感染を阻害するかを検証した。CFP-RAPEL を発現させた MDCK 細胞にウイルスを感染させ 4 時間後に細胞を固定した。細胞核内で複製されたウイルス核タンパク質 (NP) を蛍光免疫染色法によって可視化し、核内の NP の蛍光強度を定量してウイルス感染を評価した。その結果、コントロール細胞と比較して、RAPEL 発現細胞は NP の蛍光強度が低く、RAPEL の過剰発現によりウイルス感染が抑制された (図 6A、B)。A549 細胞、Cos-1 細胞、HEK293T 細胞においてもウイルス感染の抑制が見られた (図 6B)。次にウイルス粒子の侵入を評価するために、CFP-RAPEL を発現させた MDCK 細胞に高力価のウイルスを添加し、1 時間インキュベートした。細胞をパラホルムアルデヒドで固定後、抗 NP 抗体と後期エンドソームのマーカーである抗 Rab7 抗体を用いて免疫染色した。細胞内の NP と Rab7 の共局在を定量した結果、コントロール細胞と比較して RAPEL 過剰発現細胞は NP と Rab7 の共局在が有意に減少した (図 6C)。これらの結果から、RAPEL の過剰発現により細胞のウイルス侵入および感染が抑制されることが示された。Ras-PI3K 複合体が EGF 刺激依存的にエンドソームに移行し、インフルエンザウイルスの取り込みを促進するという先行研究の結果と、RAPEL の過剰発現により Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行が抑制された (図 5A、B) ことから、RAPEL がウイルスの細胞内への侵入と感染を防ぐ効果を有することが示唆された。興味深いことに、RAPEL の過剰発現は EGF による Ras の活性化には影響を与えず、Ras の下流因子である MAPK/ERK のリン酸化および Akt のリン酸化にも影響を与えなかった (図 7A-C)。以上の結果から、RAPEL は細胞膜から発信される Ras や Ras の下流のシグナル伝達に影響することなく、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とエンドサイトーシスを阻害することが示唆された。

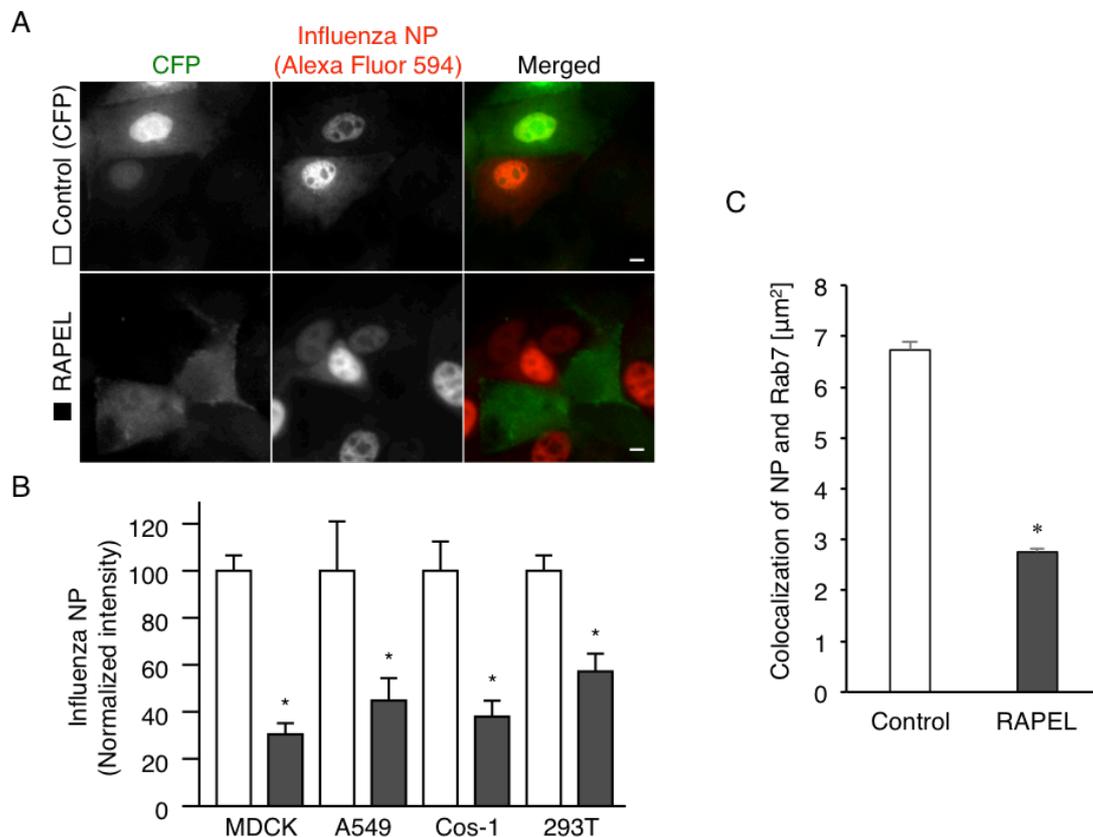


図 6: RAPEL の過剰発現により細胞のインフルエンザウイルス侵入と感染が抑制される

- A) MDCK 細胞、A549 細胞、Cos-1 細胞、HEK293T 細胞に CFP または CFP-RAPEL を導入して 24 時間培養し、MOI が 1 PFU/cell の PR8 を細胞に加えて 4 時間インキュベートし、細胞に感染させた。細胞を 3%パラホルムアルデヒドで固定後、抗 NP 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。画像は MDCK 細胞。(Bar = 10 μm)
- B) 核内の NP の蛍光強度を定量し、コントロール細胞に対する蛍光強度比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 55$)。* $P < 1 \times 10^{-5}$ (Student's *t*-test)。
- C) MDCK 細胞に CFP または CFP-RAPEL を導入して 24 時間培養し、MOI が 10 PFU/cell の PR8 を細胞に加えて 1 時間インキュベートした。細胞を 3%パラホルムアルデヒドで固定後、抗 NP 抗体と抗 Rab7 抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。Z-stack 画像を取得し、各画像の NP と Rab7 の共局在の総面積を定量した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 20$)。* $P < 0.005$ (Student's *t*-test)。

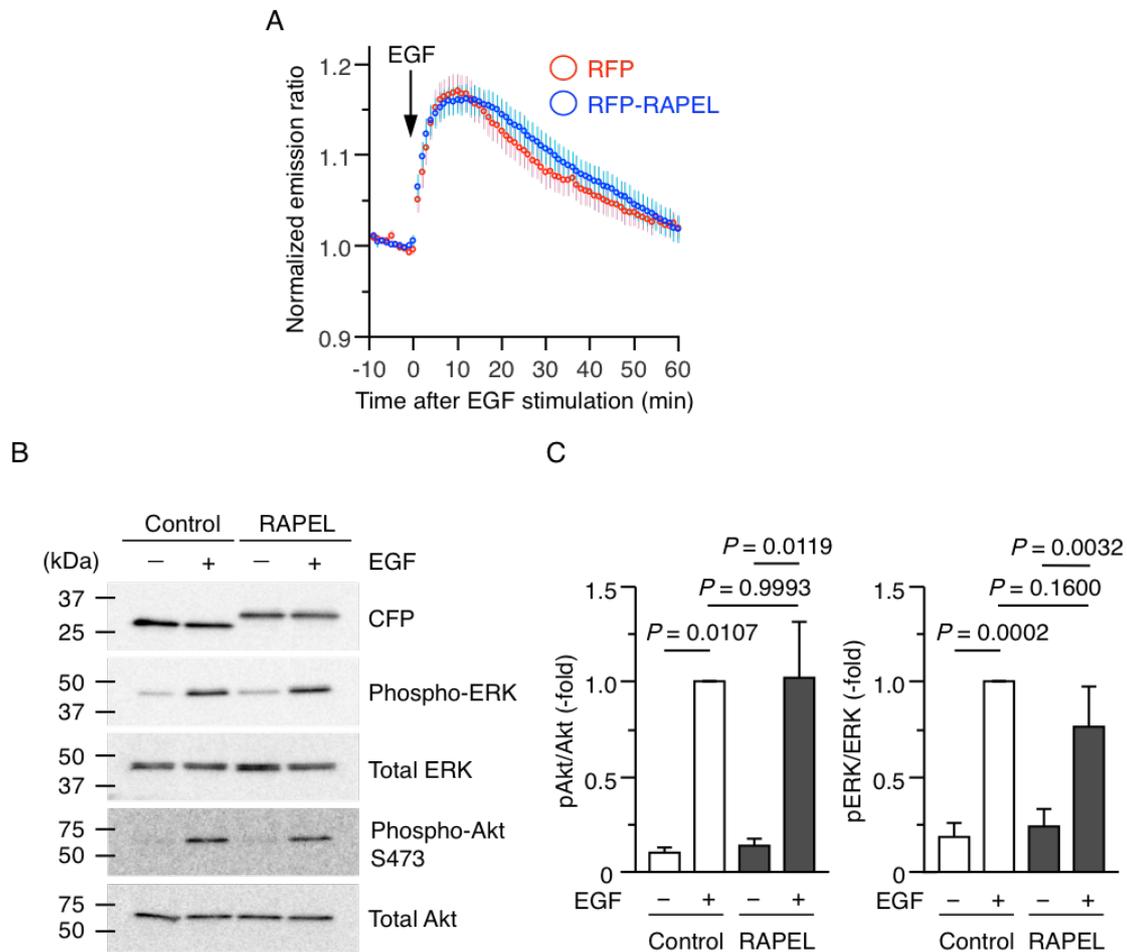


図 7: RAPEL の過剰発現は Ras とその下流因子の活性化に影響を与えない

- A) Cos-1 細胞に Raichu-Ras と RFP または RFP-RAPEL を導入して 24 時間培養し、蛍光顕微鏡でタイムラプス観察した。100 ng/ml の EGF で刺激した時間を 0 とし、規格化した emission ratio (FRET/CFP) をプロットした。emission ratio は Ras の活性化をあらわす。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す ($n \geq 15$)。 $P = 0.6074$ (MANOVA)。
- B) Cos-1 細胞に CFP または CFP-RAPEL を導入し、24 時間培養後に 100 ng/ml の EGF で刺激した。刺激から 30 分後に lysis buffer で細胞を可溶化し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。
- C) B のデータから、phospho Akt (phospho ERK) の輝度を total Akt (total ERK) の輝度で割り、コントロールの EGF (+) を 1 として規格化してプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す ($n = 3$)。 P 値はテューキーの HSD 検定を用いて算出した。

RAPEL のリジン残基がインフルエンザウイルス感染抑制に重要である

次に、ウイルス感染抑制効果をもつ RAPEL の最小アミノ酸配列を同定するため、四つのトランケーション変異体を作製した (図 8A)。N 末端の 8 アミノ酸を削った C 末端の 20 アミノ酸 (CT20) ペプチドを発現させたところ、RAPEL 全長と同程度にウイルス感染が抑制された (図 8B、C)。それに対して、N 末端の 8 アミノ酸 (NT8) ペプチドと C 末端の 9 アミノ酸 (CT9) ペプチドではウイルス感染が抑制されなかった (図 8B、C)。これらの結果から、RAPEL の機能には中央の 11 アミノ酸 (M11) が必要であることが示唆された。そこで M11 ペプチドを細胞に過剰発現させてウイルスの感染を評価したところ、RAPEL 全長と同程度のウイルス感染抑制が認められた (図 8B、C)。

さらに、M11 ペプチド内のどのアミノ酸がエンドサイトーシスとウイルス感染抑制に重要かを検討した。M11 ペプチドは 7 つの非極性アミノ酸、二つの塩基性アミノ酸 (リジン)、二つの極性アミノ酸 (アスパラギン) で構成される (図 9A)。M11 ペプチドのリジン残基の一つは p110 α 、p110 β 、p110 γ に保存されている正電荷のアミノ酸であることから (図 1C)、リジン残基を負電荷のグルタミン酸に置換した変異体ペプチド (図 9A) を作製してウイルス感染を評価した。その結果、リジン残基の両方あるいはどちらかをグルタミン酸に置換したすべての変異体ペプチド (RAPEL-M11-EK、KE、EE) でウイルス感染抑制が減弱した (図 9B、C)。

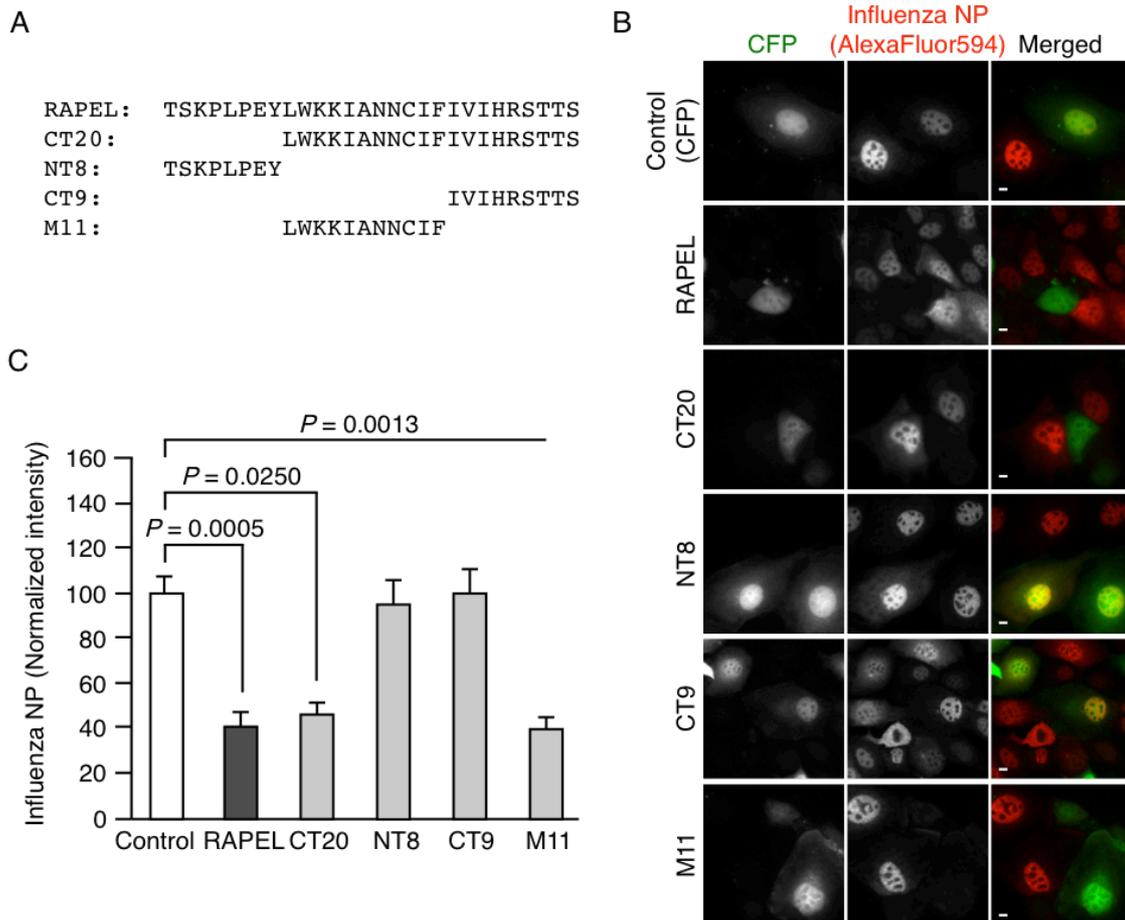


図 8: RAPEL の機能には中央の 11 アミノ酸が必要である

- A) 本実験で使われた RAPEL 全長と RAPEL トランケーション変異体のアミノ酸配列。
- B) MDCK 細胞に CFP または CFP-RAPEL 全長または CFP-RAPEL トランケーション変異体 (CT20、NT8、CT9、M11) を導入して 24 時間培養後、MOI が 1 PFU/cell の PR8 を細胞に加えて 4 時間インキュベートし、細胞にウイルスを感染させた。細胞を固定後に抗 NP 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μ m)
- C) 核内の NP の蛍光強度を定量し、コントロール細胞に対する蛍光強度比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す (n \geq 80)。P 値は一元配置分散分析とテューキーの HSD 検定を用いて算出した。

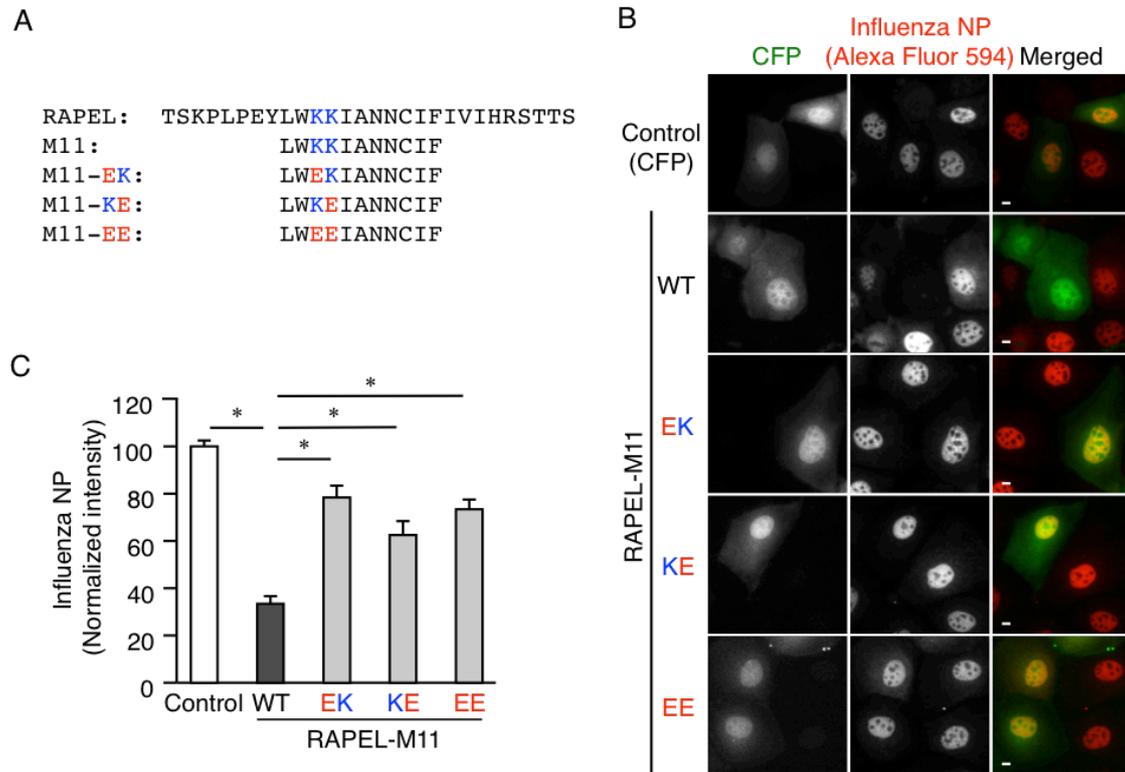


図 9: 中央の 11 アミノ酸のリジン残基が RAPEL の機能に重要である

- A) 二つのリジン残基のどちらか一方、あるいは両方をグルタミン酸に置換した RAPEL-M11 変異体と RAPEL-M11 のアミノ酸配列。
- B) MDCK 細胞に CFP または CFP-RAPEL-M11 または CFP-RAPEL-M11 変異体 (EK、KE、EE) を導入して 24 時間培養した。図 8B と同様の方法で PR8 を感染させて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μ m)
- C) 図 8C と同様の方法で定量し、コントロール細胞に対する蛍光強度比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す (n \geq 80)。* $P < 0.0001$ は一元配置分散分析とテューキーの HSD 検定を用いて算出した。

RAPEL のリジン残基は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行およびエンドサイトーシスを制御する

次に、RAPEL のリジン残基が Ras-PI3K 複合体の局在とクラスリン非依存性エンドサイトーシスを制御するかを検証するため、RAPEL-M11-EK、KE、EE 変異体を過剰発現させた細胞を用いてそれら进行评估した。その結果、RAPEL-M11 発現細胞と比較して、EK、KE、EE の変異体では Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行 (図 10A、B) およびデキストランの取り込み (図 11A、B) の抑制が認められなくなった。さらに、RAPEL のリジン残基が細胞のインフルエンザウイルスの取り込みに重要であるかを調べるため、*PIK3CG* (*PI3K γ* の触媒サブユニットである p110 γ をコードする遺伝子) が欠損した MEF 細胞 (*PIK3CG*^{-/-}MEF 細胞) に野生型 PI3K および変異型 PI3K (Δ RAPEL、RAPEL-M11-EK、KE、EE) を恒常的に発現させた細胞株を樹立した。抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングでそれぞれの PI3K の発現を確認し (図 12A)、これらの細胞を用いてウイルスの取り込み进行评估した。高力価のウイルスとともに 1 時間インキュベートした細胞を固定後、抗 NP 抗体と抗 Rab7 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で細胞の Z スタック画像を取得した。NP と Rab7 が共局在する小胞の面積を定量した結果、野生型 PI3K 発現 *PIK3CG*^{-/-}MEF 細胞は野生型 MEF 細胞と同程度のウイルスが細胞に取り込まれた (図 12B)。一方で、RAPEL 欠損型 PI3K、および RAPEL-M11-EK、KE、EE の変異型 PI3K 発現 *PIK3CG*^{-/-}MEF 細胞は、*PIK3CG*^{-/-}MEF 細胞と同程度にウイルスの取り込みが抑制された (図 12B)。以上より、RAPEL のリジン残基が Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とその後のクラスリン非依存性エンドサイトーシスの制御を介したウイルス粒子の取り込みに重要であることが示された。

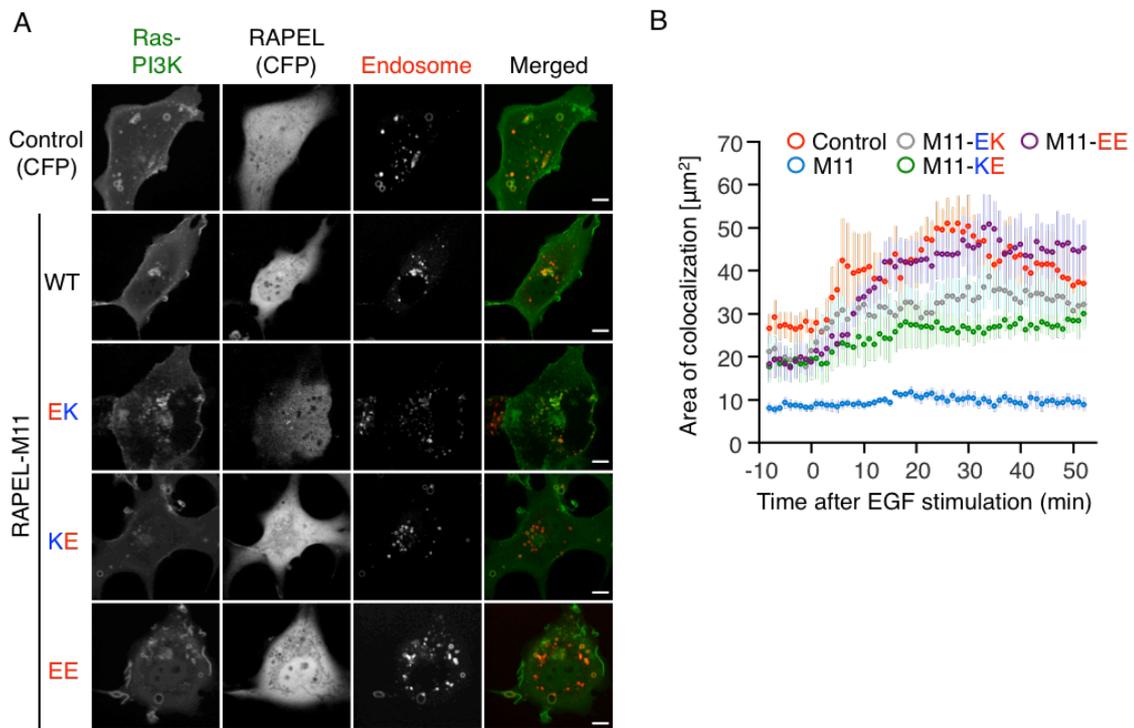


図 10: RAPEL のリジン残基は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を制御する

- A) TagRFP-EEA1、VN-H-Ras、PI3KRBD-WT-VC とともに CFP または CFP-RAPEL-M11 の野生型、または変異体 (KE、EK、EE) を導入した Cos-1 細胞を 4 時間血清飢餓処理後に 100 ng/ml の EGF で刺激し、共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。画像は EGF 刺激後 30 分を示す。(Bar = 10 μm)
- B) EEA-1 と Ras-PI3K 複合体の小胞構造を抽出し、共局在の面積をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す (n ≥ 10)。P 値は MANOVA とボンフェローニ法を用いて算出した。コントロールに対して $P < 0.0001$ (M11)、 $P = 0.842$ (EK)、 $P = 0.0959$ (KE)、 $P = 0.4055$ (EE)。M11 に対して $P = 0.0006$ (EE)。

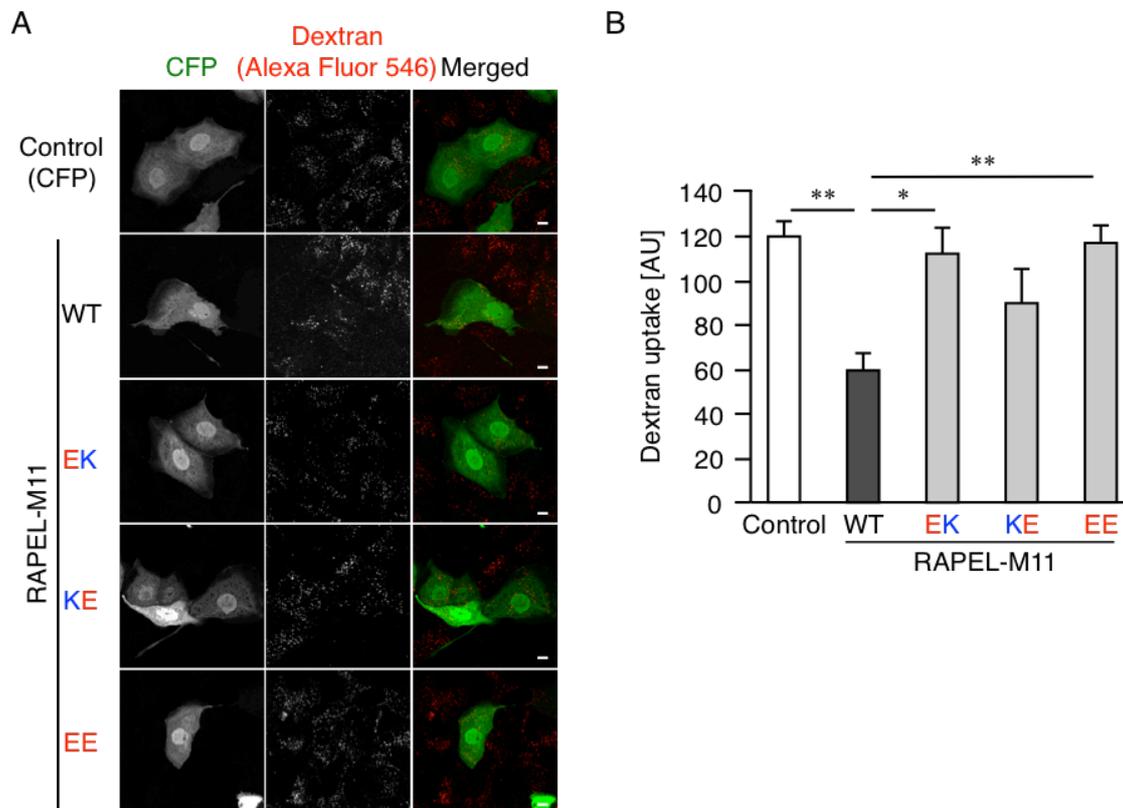


図 11: RAPEL のリジン残基はエンドサイトーシスを制御する

- A) MDCK 細胞に CFP または CFP-RAPEL-M11 または CFP-RAPEL-M11 変異体 (EK、KE、EE) を導入して 24 時間培養した。500 $\mu\text{g/ml}$ の Alexa Fluor 546 標識デキストランを加えて 10 分間インキュベートし、Acid buffer と PBS で洗浄後、細胞を固定して蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μm)
- B) 細胞内のデキストランの蛍光強度を定量し、コントロール細胞に対する蛍光強度比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す。 $*P < 0.002$ 、 $**P < 0.0001$ は一元配置分散分析とテューキーの HSD 検定を用いて算出した。

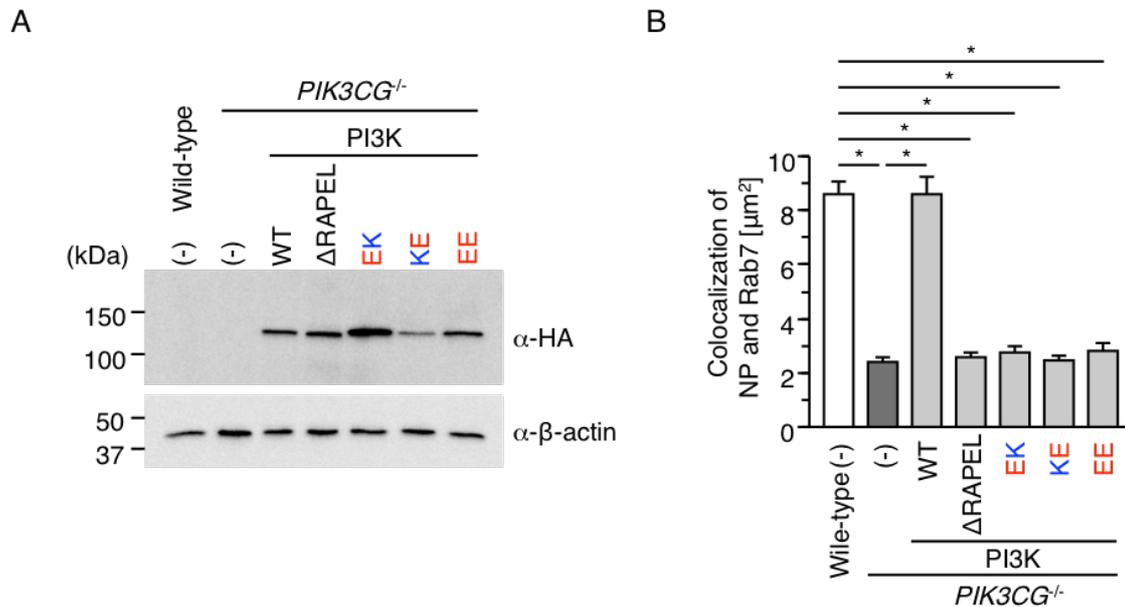


図 12: EK、KE、EE 変異型 PI3K 発現 *PIK3CG*^{-/-} MEF 細胞では細胞のウイルスの取り込みが回復しない

- A) 7 種類の MEF 細胞の細胞可溶化液を回収し、抗 HA 抗体と抗 β -actin 抗体を用いてウエスタンブロッティングで検出した。
- B) 7 種類の MEF 細胞に MOI が 10 PFU/cell のウイルスを加えて 1 時間インキュベートし、細胞を固定した。抗 NP 抗体および抗 Rab7 抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。Z スタック画像を取得し、各画像の NP と Rab7 の共局在の総面積を定量した。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す (n \geq 50)。* $P < 0.0001$ は一元配置分散分析とテューキーの HSD 検定を用いて算出した。

細胞膜透過型 RAPEL ペプチドはインフルエンザウイルス感染を抑制する

前項でウイルス感染抑制における RAPEL の最小アミノ酸配列が同定されたことから、次に細胞膜透過型ペプチド (cell-penetrating peptides, CPPs) を用いたペプチド治療薬として RAPEL が応用できるかを検討した。11 個のアルギニンからなるポリペプチド (R_{11}) は CPP として用いられており (Futaki et al., 2001)、これを RAPEL-M11 の N 末端側に付加した。さらに蛍光色素 FITC を結合するために、RAPEL-M11 の C 末端側にリジン残基を付加し、そこに FITC を共有結合させた (図 13A)。変異体である RAPEL-11EE、EK、KE の細胞膜透過型ペプチドも同様の方法で作製した。これらのペプチドを細胞培地に加えて細胞に取り込ませたところ、細胞内に取り込まれたペプチドが蛍光顕微鏡下で観察された (図 13B、図 14A)。次に、 R_{11} -RAPEL-M11 ペプチドを取り込ませた MDCK 細胞のウイルス感染を、NP 抗体を用いて免疫蛍光染色法で評価した。その結果、コントロールと比較して有意にウイルス感染が抑制された (図 13B、C)。また、HEK293T 細胞においても同様の結果が得られた (図 14A、B)。一方で、M11 のリジン残基をグルタミン酸に置換した変異体である R_{11} -RAPEL-M11-EE ペプチドでは顕著なウイルス感染抑制が認められなかった (図 13B、C)。HEK293T 細胞は R_{11} -RAPEL-M11-EE ペプチドによって 20%程度ウイルス感染が抑制されたが、その抑制効果は野生型 M11 のペプチドよりも低かった (図 14A、B)。以上の結果から、CPP を付加した R_{11} -RAPEL-M11 ペプチドは A 型インフルエンザウイルスに対するペプチド治療薬として応用できることが示された。

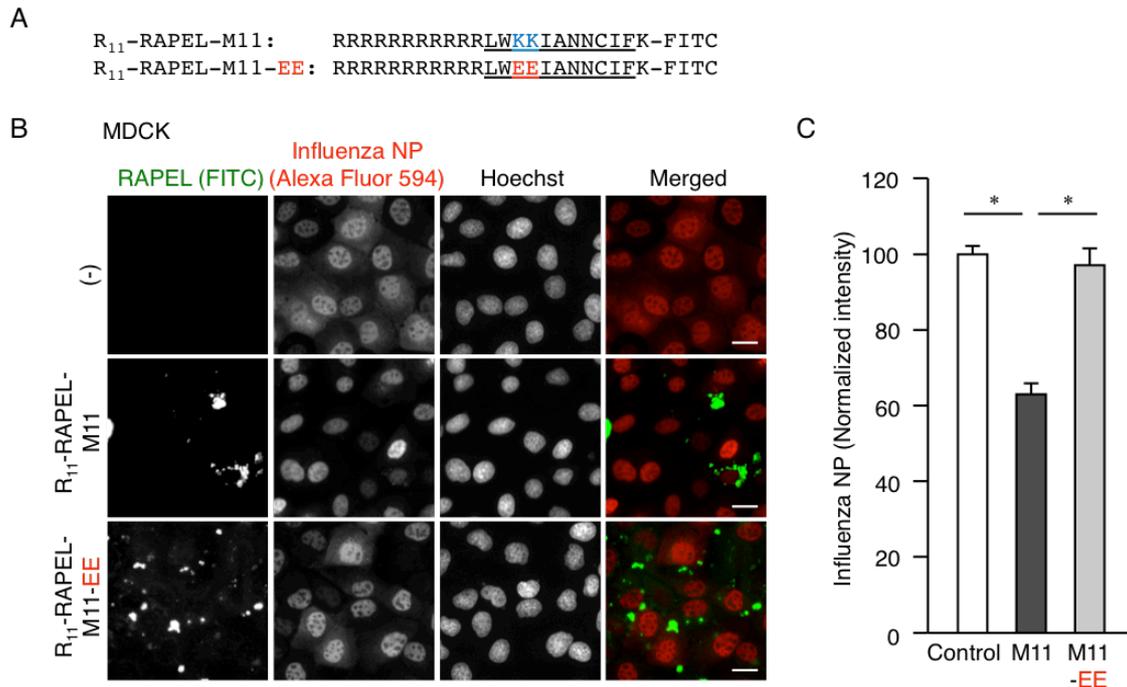


図 13: R₁₁-RAPEL-M11 ペプチドは細胞のウイルス感染を抑制する

- A) 合成ペプチド R₁₁-RAPEL-M11 と R₁₁-RAPEL-M11-EE のアミノ酸配列。
- B) MDCK 細胞に 100 μM の R₁₁-RAPEL-M11 もしくは R₁₁-RAPEL-M11-EE を加えて 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、さらに 24 時間インキュベートし、MOI が 1 PFU/cell の PR8 を加えて 4 時間インキュベートした。細胞を固定後に抗 NP 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μm)
- C) NP の蛍光強度を定量し、コントロール細胞に対する蛍光強度比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す (n ≥ 180)。*P < 0.0001 は一元配置分散分析とテューキーの HSD 検定によって算出した。

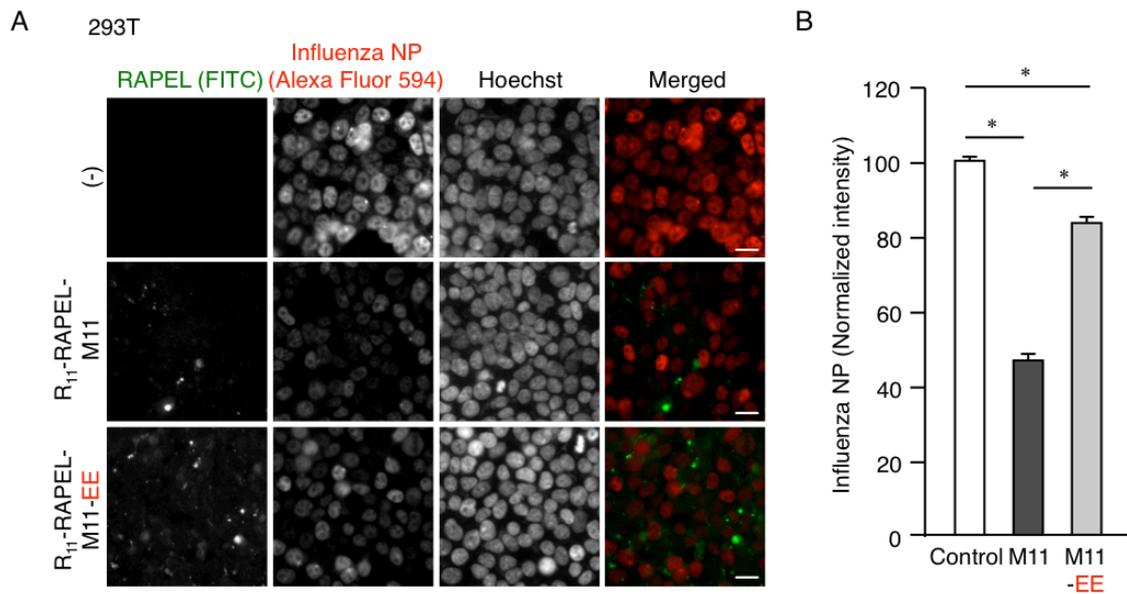


図 14: R₁₁-RAPEL-M11 ペプチドは HEK293T 細胞においてもウイルス感染を抑制する

- A) HEK293T 細胞を用いて、図 13B と同様の方法でペプチドを取り込ませた後、PR8 を感染させて免疫染色を行った。(Bar = 10 μm)
- B) 図 13C と同様の方法で解析し、コントロール細胞に対する NP の蛍光強度比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す (n ≥ 1400)。**P* < 0.0001 は一元配置分散分析とテューキーの HSD 検定によって算出した。

【考察】

本研究の結果から、PI3K は RBD の N 末端に Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を制御する配列を有することが明らかになり、この配列を RAPEL と命名した。RAPEL の過剰発現は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とクラスリン非依存性エンドサイトーシスを抑制し、さらにエンドサイトーシスを介して細胞内に侵入する A 型インフルエンザウイルスの侵入と感染を抑制することが明らかになった (図 15)。細胞膜透過性を付加した RAPEL の合成ペプチドを細胞に導入した場合も過剰発現と同様に細胞のウイルス感染が抑制され、将来的なペプチド治療薬としての RAPEL の有用性が示された。

本研究はクラス IB の触媒サブユニットである p110 γ を用いて実験を行い、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を制御する RAPEL を見出した。RBD を持つ他の PI3K のアイソフォームに関しては、クラス IA の p110 α と p110 β は高い相同性を有し、RAPEL の機能に重要な二つのリジン残基のうち一つを有していた (図 1C)。一方、クラス IA の p110 δ 、クラス II の PI3K-C2 α 、PI3K-C2 β 、PI3K-C2 γ はある程度の相同性を有しているものの、リジン残基は存在しなかった。このことから、PI3K のアイソフォームのうち p110 α と p110 β は p110 γ と同様の機能を有することが示唆される。

CPP と総称される膜透過性ペプチドは、そのままでは細胞膜を透過することができない生理活性物質に結合させることで生理活性物質を細胞外から細胞内に導入することができ、近年がんや神経変性疾患の治療に応用され始めている。100 種類を超える CPP が報告されており、塩基性の HIV-1 の Tat タンパク質由来のペプチド (Frankel and Pabo, 1988) やポリアルギニンペプチド (Tünnemann et al., 2008)、mastopalan と galanin からなる両親媒性のキメラペプチドである transportan (Pooga et al., 1998)、疎水性の合成ペプチドである Pep-7 (Gao et al., 2002) など、特性も様々である。本研究で用いられたポリアルギニンペプチドは非常に効率良く細胞内に移行し、最も利用される CPP の一つである。ポリアルギニンペプチドが細胞内に移行するメカニズムは、アルギニンの側鎖のグアニジノ基と細胞膜表面のプロテオグリカンの硫酸基が水素結合することでペプチドが細胞膜に吸着すると考えられており (Rothbard et al., 2004)、その後大部分がマクロピノサイトーシスによって取り込まれ (Nakase et al., 2008)、一部は直接膜透過すると報告されている (Sakai and Matile, 2003)。本研究では、R₁₁-RAPEL-M11 ペプチドを導入してから 24 時間後にウイルスを感染させたと

ころ、有意なウイルス感染抑制が認められた。しかし、ペプチドが細胞内に移行した後どのようにして細胞質内にとどまるのか、またペプチドの効果の持続時間は明らかになっていない。R₁₁-RAPEL-M11 ペプチドがドミナントネガティブ効果によりウイルス感染を抑制するには、ペプチドが分解されずに細胞質内にとどまる必要がある。先述の報告のように大部分のペプチドがマクロピノサイトーシスで取り込まれる場合、リソソームに到達する前に何らかのメカニズムでエンドソームから細胞質に放出されていると考えられる。R₁₁-RAPEL-M11 ペプチドが細胞膜透過とマクロピノサイトーシスのどちらの経路で主に細胞内に移行するかは、マクロピノサイトーシスを阻害した状態でペプチドを取り込ませ、ペプチドの細胞内移行を定量することで明らかにできると考えられる。細胞質内のR₁₁-RAPEL-M11 ペプチドはプロテアソームやオートファジーによって分解されていると予想されるが、ペプチドによるウイルス感染抑制効果の持続時間はこれらの機構が活性化し始める時間によって決まり、組織によってその感受性は異なると考えられる。例えば、プロテアソームはマウスの組織において精巣や胸腺で活性が高く、肺や心臓、肝臓では活性が低いという報告がある (Berkers et al., 2007)。ヒトでは気道上皮から体内に侵入するインフルエンザウイルスにおいて、R₁₁-RAPEL-M11 ペプチドの抑制効果の持続時間は気道上皮細胞で分解機構が活性化する時間に依存すると考えられる。

A 型インフルエンザウイルスは毎年流行を繰り返し、遺伝子変異による薬剤耐性化が世界的に問題となっている。現在使用されているインフルエンザウイルスに対する薬剤は、ウイルスの細胞外への出芽を防ぐノイラミニダーゼ阻害薬であるオセルタミビル、ウイルスの脱殻やエンドソーム膜との融合を阻害するアマンタジン、宿主核内での RNA 複製を阻害する PB2 阻害薬であるファビピラビル、弱毒化あるいは不活性化したワクチンなどが挙げられる。これらの薬剤は限られた型のウイルスにしか効果がない場合が多く、さらにウイルスの細胞内への侵入は阻害できないため、遺伝子変異による薬剤耐性株の発生を防ぐことができない。本研究でウイルス感染抑制効果が認められた R₁₁-RAPEL-M11 ペプチドは、エンドサイトーシスを阻害することによって細胞内へのウイルスの侵入を防ぐことができるため、唯一のウイルス感染予防薬または治療薬となる可能性がある。さらに、RAPEL はクラスリン非依存性エンドサイトーシスのみを阻害するため、エンドサイトーシス阻害による副作用も軽減できると考えられる。実際に、R₁₁-RAPEL-M11 ペプチドを導入しても細胞毒性はほとんど認

められなかった。インフルエンザウイルスに対する有効なペプチド治療薬開発のためには、今後はマウスなどの動物モデルを用いて R₁₁-RAPEL-M11 ペプチドの効果をもさらに検証していく必要がある。

第1章は RAPEL のドミナントネガティブ効果に焦点を当てて研究を進めた。Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行メカニズムおよび Ras-PI3K シグナリングによるエンドサイトーシス制御については、第2章で詳細に述べる。

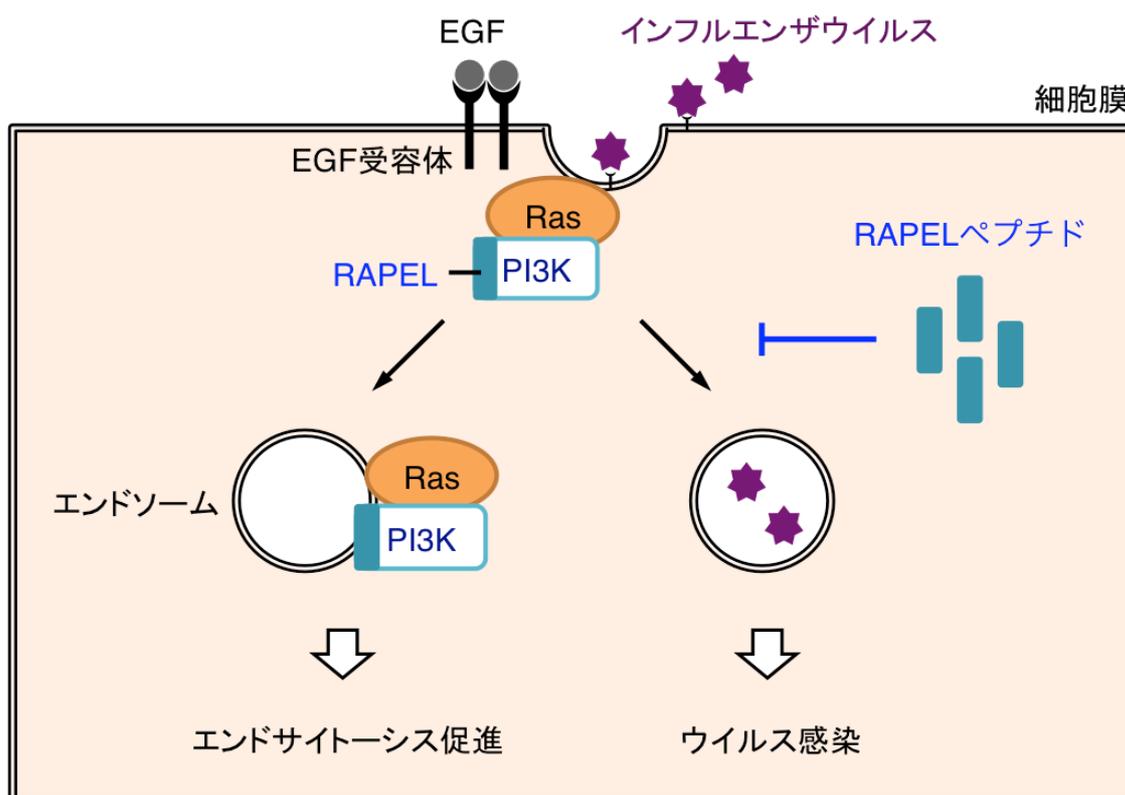


図 15: RAPEL を介した Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行メカニズムおよび RAPEL ペプチドによるインフルエンザウイルス感染の抑制

EGF 刺激依存的な Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行は PI3K の特異的配列 RAPEL によって制御される。また、RAPEL ペプチドの導入は細胞のインフルエンザウイルス感染を抑制する。

第 2 章 ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドサイトーシス制御機構

【緒言】

エンドサイトーシスの過程において、エンドソームは初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームへと成熟していくが、この時にエンドソーム同士の融合とエンドソーム内の酸性化が起こる。エンドソーム膜の融合は Rab GTPase やテザリングタンパク質、soluble NSF-attachment protein receptor (SNARE) タンパク質によって制御されている (Langemeyer et al., 2018)。例えば、Rab GTPase の一つである Rab5 は、初期エンドソーム上でエフェクタータンパク質の一つである VPS34 をリクルートして活性化させる (Shin et al., 2005)。VPS34 によりエンドソーム上に PI(3)P が生成されると、テザリングタンパク質である EEA-1 は FYVE ドメインを介して PI(3)P と結合する (Stenmark et al., 1996)。さらに EEA-1 は Rab5 と相互作用することによって初期エンドソームをテザリングし、SNARE タンパク質とともにエンドソームの融合を促進する (Christoforidis et al., 1999)。エンドソームの酸性化は主に、エンドソーム膜に局在する vacuolar (H^+) ATPase (V-ATPase) が ATP を加水分解してプロトン (H^+) をエンドソーム内に汲み入れることによって促進される (Ohkuma et al., 1982)。また、エンドソームの酸性化には H^+ 以外にも K^+ や Cl^- 、 Ca^{2+} などのイオンも関与することが報告されており、さまざまなイオンによって制御されると考えられている (Scott and Gruenberg, 2011)。

ミトコンドリアは主要な ATP 合成と細胞内の代謝の場であり、 Ca^{2+} シグナリング (Rizzuto et al., 2012)、脂質の合成や輸送 (Mesmin, 2016)、アポトーシス (Wang and Youle, 2009) などの細胞機能にも重要な役割を果たす。これまでミトコンドリアは単体で機能すると考えられていたが、他の細胞小器官と相互作用することでさまざまな細胞機能を発揮することが明らかになってきている。例えば、ミトコンドリアと小胞体が相互作用している膜は mitochondria-associated membrane of the endoplasmic reticulum (MAM) と呼ばれ (Vance, 1990)、MAM ではホスファチジルセリンなどのリン脂質の合成や輸送 (Vance, 2014)、ミトコンドリアの分裂 (Friedman et al., 2011)、オートファゴソーム膜の形成 (Hamasaki et al., 2013) などが起こる。MAM 上でミトコンドリアとペルオキシソームが相互作用し、MAM に局在する mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS) が病原体を認識して活性化した retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) -like receptors

(RLRs) と結合し、炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの産生を促進するという報告もある (Horner et al., 2011)。

エンドソームに関しても他の細胞小器官との相互作用がいくつか報告されている。例えば、小胞体とエンドソームのコンタクトサイトでは、エンドソームがひも状の ER によってくびり切られることによって分裂する (Rowland et al., 2014)。この分裂を阻害するとリソソームの形態が変化し、リソソームで働く酵素の輸送に異常が生じることが明らかにされている (Allison et al., 2017)。他にも、鉄が結合したトランスフェリンを含むエンドソームとミトコンドリアが一過的に相互作用すると、エンドソーム内部の鉄イオンがミトコンドリアに輸送されるという報告もある (Das et al., 2016; Sheftel et al., 2007)。上記のような異なる細胞小器官どうしの相互作用は近年注目されており、これまでにいくつかの組み合わせの細胞小器官相互作用が報告されているが、その機能や分子メカニズム、疾患との関連はまだほとんど明らかにされていない。

本研究の第 1 章で、RAPEL の過剰発現が Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を抑制したことから、第 2 章ではイーストツーハイブリッド法を用いて RAPEL 結合因子を探索した。その結果、ミトコンドリア外膜のポアタンパク質である voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) が同定され、VDAC2 に注目してさらに研究を進めた。

哺乳類の VDAC1、VDAC2、VDAC3 はそれぞれ異なる染色体にコードされたパラログス遺伝子であり、これら三つの塩基配列は約 70%一致する (Sampson et al., 1996)。2014 年に報告されたゼブラフィッシュの VDAC2 の結晶構造解析から、VDAC2 は 19 個の β -strand がミトコンドリア外膜に挿入されてポアを形成し、N 末端の α -helix はポアの中に位置するような構造であることが明らかになっている (Schredelseker et al., 2014)。また、VDAC はミトコンドリア外膜の電位依存性アニオンチャネルと言われており、N 末端が電位依存性の制御に関与していると報告されている (Koppel et al., 1998)。しかしアニオンチャネルと名付けられたが (Schein et al., 1976)、その後 ATP、ADP、NADH、 Ca^{2+} などさまざまな物質を透過することが明らかになっている (Pavlov et al., 2005; Zalman et al., 1980)。電位に応じてポアの大きさが変化して open state と closed state の二つの状態をとるが、これらの状態と物質の選択性については現在も議論が続いている (Colombini, 2016)。酵母では YVDAC1 と YVDAC2 が存在し、主に YVDAC1 がミトコンドリアのチャネルとして機能する (Blachly-Dyson et al., 1997)。YVDAC1 をコード

する POR1 遺伝子が欠損した酵母はミトコンドリア呼吸の障害により生育が抑制されたが、この酵母にマウスの VDAC1、VDAC2、VDAC3 の遺伝子を導入すると生育が回復した (Dihanich et al., 1987; Sampson et al., 1997)。このことから、哺乳類の VDAC の三つのアイソフォームは同じ機能を持つと考えられている。しかし、VDAC1 と VDAC3 のノックアウトマウスはそれぞれミトコンドリアの機能低下 (Anflous et al., 2001) や不妊症 (Sampson et al., 2001) を引き起こすものの生存可能であるのに対して、VDAC2 のノックアウトマウスは発生途中で致死になる (Cheng et al., 2003)。心臓と胸腺のみの VDAC2 をノックアウトしたマウスは胎生致死にはならないが、心筋症やアポトーシス経路に障害が起こり短命であることが報告されている (Raghavan et al., 2012)。これらのことから、VDAC2 は VDAC1 や VDAC3 では補完できない固有の機能を持っていると考えられるが、VDAC2 の特異的な機能は明らかにされていない。

第2章では、RAPEL 結合因子として同定されたミトコンドリアの VDAC2 が、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とクラスリン非依存性エンドサイトーシスを制御することを明らかにした。Ras-PI3K 複合体が局在するエンドソームとミトコンドリアが近接していたことから、ミトコンドリアとエンドソームの相互作用によるエンドサイトーシス制御が示唆された。そこで生細胞内でミトコンドリアとエンドソームを詳細に観察し、EGF 刺激によってミトコンドリア-エンドソーム間相互作用が促進されることを明らかにした。さらに、VDAC2 の過剰発現によりエンドソームの酸性化が促進されたことからエンドソームの酸性化に注目し、光遺伝学法により誘導したミトコンドリア-エンドソーム間相互作用がエンドソームの酸性化を促進することを明らかにした。

【方法】

試薬・抗体

ヒト EGF 組換え体タンパク質、Alexa Fluor 546 標識デキストラン (10 kDa)、Alexa Fluor 546 標識トランスフェリン、抗 GST 抗体、抗 GFP 抗体、抗 FlagM2 抗体、Alexa Fluor 594 標識抗マウス、Alexa Fluor 647 標識抗ラットイムノグロブリン G (IgG) 二次抗体、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウスおよび抗ウサギ IgG 二次抗体は第 1 章と同じものを使用した。Alexa Fluor 488 標識抗マウス、抗ラット、抗ウサギ IgG 二次抗体、MitoTrackerTM Red CMXRos は Thermo Fisher Scientific から購入した。AcidiFluorTM ORANGE 標識デキストランは五稜化学 (札幌、日本) から購入した。HRP 標識抗ヤギ IgG 二次抗体は Promega (Madison, WI, USA)、HRP 標識抗ラット IgG 二次抗体は Life Technologies から購入した。抗 GFP ウサギ血清は京都大学大学院生命科学研究科生体制御学松田研究室の松田道行先生から譲与頂いた。抗 HA 抗体 (3F10) は Roche、抗 β -actin 抗体 (sc-1616) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)、抗 VDAC2 抗体 (HPA043475) は Atlas Antibodies (Stockholm, Sweden) から購入した。

細胞培養

ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株 HEK293T (CRL-11268)、アフリカミドリザル由来腎臓上皮細胞株 Cos-1 (JCRB9082) は第 1 章と同じものを使用した。ヒト上皮様細胞癌由来細胞株 A431 (CRL-1555)、ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa (CCL-2) は American Type Culture Collection から入手した。は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所から購入した。細胞培養は第 1 章と同様の方法で行った。

遺伝子導入

HEK293T 細胞、A431 細胞、Cos-1 細胞への遺伝子導入は第 1 章と同じ方法で行った。HeLa 細胞への遺伝子導入は FuGene HD Transfection Reagent (Roche) を用いた。OPTI-MEM100 μ l にプラスミドとプラスミドの 3 倍量の FuGene HD を加えて混ぜ、室温で 5 分間インキュベートして細胞培養液に添加した。CO₂ インキュベーター内で 6 時間インキュベートした後、細胞培養液を交換した。

プラスミド構築

pCAGGS-VN-H-Ras WT、pCXN2-Flag-p110 γ RBD-VC (Tsutsumi et al., 2009)、pCAGGS-CFP、pCMV-TagRFP-EEA-1 (#42635)、pCAGGS-GST は第 1 章と同じものを用いた。pFX-mito-SECFP は当教室で以前に作製されたものを使用した。pDsRed-Mito Vector は Clontech (Mountain View, CA, USA) から購入した。pEGFP-C1-Rab5 は東京大学大学院総合文化研究科坪井研究室の坪井貴司先生から譲与頂いた。mitoATeam1.03 (Imamura et al., 2009) は東京大学大学院工学系研究科野地研究室の野地博行先生から譲与頂いた。酵母発現ベクターである pGBKT7 Vector と pGADT7 Vector は北海道大学遺伝子病制御研究所プロバイオティクス・免疫ロジー研究部門の宮崎忠昭先生から譲与頂いた。

pGADT7-H-Ras-WT は、pCXN2-Flag-H-Ras-WT-IRES-ECFP を *NotI* で切断後に Klenow 酵素で平滑化した。これをフェノール・クロロホルム処理した後に *EcoRI* で切断し、H-Ras-WT の断片を得た。この断片を pGADT7-Vector の *EcoRI/SmaI* サイトにサブクローニングした。pGBKT7-PI3KRBD は、PI3KRBD_F/PI3KRBD_R のプライマーセット (表 2) を用いて PCR 法で増幅した。PI3KRBD が *EcoRI* と *SaII* で切り出せるようにプライマーを設計したが、シーケンス解析の結果 *SaII* サイトに変異が入っていた。そこで、pCR2.1-TOPO-PI3KRBD を *EcoRI* で切断して得られた PI3KRBD の断片を、アルカリフォスファターゼ処理後の pGBKT7-Vector の *EcoRI* サイトにサブクローニングした。

VDAC1、VDAC2、VDAC3 の cDNA はそれぞれ VDAC1_F/VDAC1_R、VDAC2_F/VDAC2_R、VDAC3_F/VDAC3_R のプライマーセットを用いて PCR 法で増幅した。増幅した配列を *XhoI* と *NotI* で切断し、pCAGGS-3 \times HA の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングして pCAGGS-3 \times HA-VDAC1、VDAC2、VDAC3 を作製した。また、増幅した VDAC2 の配列を *XhoI* と *NotI* で切断し、pCAGGS-Flag および pFX-SECFP の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングして pCAGGS-VDAC2-Flag および pFX-SECFP-VDAC2 を作製した。VDAC2 のトランケーション変異体 (1-41aa、39-83aa、82-129aa、124-165aa、163-204aa、202-245aa、244-269aa、267-294aa、1-81aa、73-149aa、143-221aa、222-294aa) は、VDAC2_F/V2_41_R、V2_39_F/V2_83_R、V2_82_F/V2_129_R、V2_124_F/V2_165_R、V2_163_F/V2_204_R、V2_202_F/V2_245_R、V2_244_F/V2_269_R、V2_267_F/VDAC2_R、VDAC2_F/V2_81_R、V2_73_F/V2_149_R、V2_143_F/V2_221_R、V2_222_F/VDAC2_R のプライマーセットを用いて PCR 法

で増幅した。増幅した配列を *XhoI* と *NotI* で切断し、pFX-SECFP または pCAGGS-3×HA の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングした。pCAGGS-VDAC2-Flag は、pCAGGS-3×HA-VDAC2 を *XhoI* と *NotI* で切断して VDAC2 を切り出し、pCAGGS-Flag の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングして作製した。TOM20 の cDNA は TOM20_F/TOM20_R のプライマーセットを用いて PCR 法で増幅した。増幅した配列を *XhoI* と *NotI* で切断し、pFX-Venus の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングして pFX-TOM20-Venus を作製した。31aa linker-VDAC2 は、31aa linker 配列の 5'末端に *BglIII*、3'末端に *XhoI* を付加した遺伝子配列の全合成を MBL に依頼した。pIDTSMART ベクターに挿入された 31aa linker 配列を *BglIII* と *XhoI* で切断し、pFX-EYFP-FAT の *BglIII/XhoI* サイトにサブクローニングし、まず pFX-EYFP-31aa linker-FAT を作製した。次に pFX-EYFP-31aa linker-FAT を *XhoI* と *NotI* で切断して FAT を抜き出し、*XhoI/NotI* で切り出した VDAC2 をサブクローニングして pFX-EYFP-31aa linker-VDAC2 を作製した。pJNKAR1-VDAC2-116aa linker-SECFP は、pJNKAR1EV (3555NES) (Komatsu et al., 2011) を *EcoRI* と *Asp718* で切断し、Klenow 酵素による平滑化およびアルカリフォスファターゼ処理をした。次に pFX-SECFP-VDAC2 を *XhoI* と *NotI* で切断して VDAC2 を切り出し、Klenow 酵素で平滑化した後に pJNKAR1EV にサブクローニングして pJNKAR1-VDAC2-116aa linker-SECFP を作製した。Split GFP₁₋₁₀ および split GFP₁₁ は、東京大学大学院理学系研究科小澤研究室の小澤岳昌先生から pCold-split GFP₁₋₁₀ および pCold-Smac-split GFP₁₁-Flag を譲与頂き、それらをテンプレートに用いて PCR 法で cDNA を増幅した。split GFP_{1-10}_F/split GFP_{1-10}_R と split GFP_{11}_F/split GFP_{11}_R のプライマーセットを用いて PCR 法で増幅後、split GFP₁₋₁₀ は増幅した配列を *EcoRI* と *NotI* で切断し、pFX ベクターの *EcoRI/NotI* サイトにサブクローニングして pFX-split GFP₁₋₁₀ を作製した。split GFP₁₁ は増幅した配列を *BglIII* と *XhoI* で切断し、pFX-SECFP-FAT の *BglIII/XhoI* サイトにサブクローニングし、まず pFX-split GFP₁₁-FAT を作製した。次に pFX-split GFP₁₁-FAT を *XhoI* と *NotI* で切断して FAT を抜き出し、*XhoI/NotI* で切り出した VDAC2 をサブクローニングして pFX-split GFP₁₁-VDAC2 を作製した。pFX-split Cerulean₁₋₁₀ は、split Cerulean_{1-10}_F145A_N146I_H148D}_F/ split Cerulean_{1-10}_F145A_N146I_H148D}_R および split Cerulean_{1-10}_S72A}_F/ split Cerulean_{1-10}_S72A}_R のプライマーセットを用いて pFX-split GFP₁₋₁₀ の全長を PCR で増幅した。PCR 産物に *DpnI* を入れて 37°C で 2 時間消化し、エタノール沈殿}}}}}}}}

後の PCR 産物を滅菌蒸留水に再懸濁した。2×Rapid Ligation Kit (Roche) と T4 Polynucleotide Kinase (東洋紡) を加えて 37°C で 2 時間インキュベートし、コンピテントセルを形質転換してプラスミドを得た。CIB1 は CIB1_F/CIB1_R のプライマーセットを用いて PCR で増幅した。増幅した配列を *Bam*HI と *Bg*III で切断し、pFX-TOM20-mCherry および pFX-TOM20-iRFP の *Bam*HI/*Bg*III サイトにサブクローニングして pFX-TOM20-mCherry-CIB1 および pFX-TOM20-iRFP-CIB1 を作製した。pFX-CRY2-FYVE-SECFP および pFX-CRY2-FYVE-iRFP は、基礎生物学研究所 定量生物学研究部門の青木一洋先生から譲与頂いた pCX4puro-CRY2-cRaf を *Eco*RI と *Xho*I で切断して CRY2 を切り出し、pFX-FYVE の *Eco*RI/*Xho*I サイトにサブクローニングして pFX-CRY2-FYVE を作製した。次にこのプラスミドを *Not*I と *Bg*III で切断し、*Not*I/*Bg*III で抜き出した SECFP および iRFP をサブクローニングして pFX-CRY2-FYVE-SECFP および pFX-CRY2-FYVE-iRFP を作製した。

クローニングのための PCR 法では、目的の遺伝子を含むプラスミドまたは HEK293T 細胞の cDNA を鋳型として用いた。プラスミド構築の手順は第 1 章と同様の方法で行った。

イーストツーハイブリッド法

イーストツーハイブリッド法は Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech) を用いて、添付文書に記載された方法に従って行った。手順の概略を以下に示す。

1. コンピテント酵母の作製

-80°C で凍結保存された Y2H Gold 株と Y187 株を YPDA 寒天培地にストリークして 30°C で 3 日間培養し、形成されたコロニーを YPDA 培地 3 ml を入れたカルチャーチューブに回収した。30°C で 8 時間振盪培養した後、YPDA 培地を 50 ml 入れた滅菌済 500 ml 羽根つきフラスコに酵母培養液を入れ (Y2H Gold 株は 200 μ l、 Y187 株は 3 ml)、OD₆₀₀ = 0.15 - 0.3 に達するまで 30°C でさらに振盪培養した。24 時間後に OD₆₀₀ を測定したところ、Y2H Gold 株は 0.18、 Y187 株は 0.12 であったので培養液を 50 ml コニカルチューブに移し、室温 700 × g で 5 分間遠心した。遠心後上清を取り除き、100 ml の YPDA 培地で再懸濁してフラスコに戻して再度 30°C で 3 時間振盪

培養した。OD₆₀₀ = 1.5 (Y2H Gold 株) と 0.22 (Y187 株) になったところで培養液を 700 × g で 5 分間遠心した。遠心後上清を取り除き、30 ml の滅菌脱イオン水でペレットを再懸濁し、室温 700 × g で 5 分間遠心した。上清を捨て、1.5 ml の 1.1×TE/LiAc でペレットを再懸濁し、懸濁液を 1.5 ml チューブに移して卓上遠心機で 15 秒間遠心した。上清を取り除き、1.1×TE/LiAc を 600 μl 入れ懸濁し、チューブを氷上に置いた。

2. コンピテント酵母の形質転換

形質転換は、Y2H Gold 株には Gal4 DNA binding domain (Gal4 BD) に murine p53 が融合した pGBKT7-53、Gal4 BD に Lamin が融合した pGBKT7-Lam、pGBKT7-empty、pGBKT7-PI3KRBD を導入し、Y187 株には yeast Gal4 activation domain に SV40 large T 抗原が融合した pGADT7-T、pGADT7-H-Ras-WT を導入した。予め氷冷した 1.5 ml チューブにプラスミド DNA を 100 ng、95°C で 5 分間熱処理をした carrier DNA を 5 μl、コンピテント酵母を 50 μl 入れ転倒混和した。PEG/LiAc を 500 μl 入れ、10 分おきに攪拌しながら 30°C で 30 分間インキュベートした。ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide, DMSO) を 20 μl 入れて混ぜ、5 分おきにボルテックスミキサーで穏やかに混ぜながら 42°C で 15 分間インキュベートした。卓上遠心機で 15 秒間遠心し、上清を除いて YPD Plus Medium を 1 ml 入れ、再懸濁した。30°C で 15 分間振盪培養し、卓上遠心機で 15 秒間遠心した後、上清を除き 0.9 % (w/v) NaCl を 1 ml 入れて懸濁した。

3. 対照実験

Clontech から購入した Yeast Media Set 2 Plus に含まれている SD/-W with agar、SD/-L with agar、SD/-L/-W with agar を用いて寒天培地を作製し、事前 にすべての寒天培地に 20 mg/ml のカナマイシンを 50 μl 塗布した。また、SD/-W/-L/X-α-Gal/Aureobasidin A (AbA) (DDO/X/A) プレートにはさらに 20 mg/ml X-α-gal を 50 μl、500 μg/ml AbA を 6 μl 塗布した。pGBKT7-53、pGBKT7-Lam または pGBKT7-PI3KRBD を導入した Y2H Gold 株と、pGADT7-T または pGADT7-H-Ras-WT を導入した Y187 株を 0.9 % (w/v) NaCl で 1/10、1/100 に希釈した。Y2H Gold 株希釈液は SD/-Trp プレートに、Y187 株希釈液は SD/-L プレートにそれぞれ 100 μl 塗布し、30°C で培養した。3

日後、2×YPDA 培地を 500 μ l 入れた 1.5 ml チューブに以下の組み合わせでコロニーを入れて混ぜ、30°C 200 rpm で振盪培養して酵母を接合させた (pGBKT7-53 と pGADT7-T および pGBKT7-PI3KRBD と pGADT7-H-Ras-WT [陽性コントロール]、pGBKT7-Lam と pGADT7-T [陰性コントロール])。24 時間後、培養液を滅菌脱イオン水で 1/10、1/100、1/1000 に希釈し、各希釈液 100 μ l を SD/-W、SD/-L、SD/-W/-L (DDO)、DDO/X/A プレートに塗布し、30°C で 5 日間培養後コロニーをカウントした。

4. Bait (PI3KRBD) 自己活性化試験および毒性試験

pGBKT7-PI3KRBD または pGBKT7-empty を導入した Y2H Gold 株を 0.9 % (w/v) NaCl で 1/10、1/100 に希釈し、希釈液 100 μ l を SD/-W、DDO または DDO/X/A プレートに塗布し 30°C で培養した。4 日後、コロニーをカウントした。

5. Bait (PI3KRBD) タンパク質の発現確認

YPDA 培地を 2 ml 入れたカルチャーチューブに pGBKT7-PI3KRBD と pGBKT7-empty を導入した Y2H Gold 株のコロニーを入れ、30°C で振盪培養した。24 時間後、培養液を 2 ml チューブに移し 4°C 13,000 \times g で 3 分間遠心した。上清を取り除いて 100 μ l の滅菌蒸留水にペレットを懸濁し、0.2 M NaOH を 100 μ l 添加し混和した。室温で 5 分間放置した後、4°C 13,000 \times g で 3 分間遠心した。上清を取り除き、2×SDS sample buffer を 50 μ l 加えて懸濁し、ウエスタンブロッティングを行った。

6. ライブラリースクリーニング

対照実験で使用した pGBKT7-PI3KRBD を導入した Y2H Gold 株のコロニーを新しい SD/-W プレートにリストリークし、30°C で培養した。3 日後、シングルコロニーを 500 ml フラスコに入れた SD/-W 培地 50 ml にピックアップし、OD₆₀₀ = 0.8 に達するまで 30°C で振盪培養した。培養液を 50 ml チューブに移し、25°C 1,000 \times g で 5 分間遠心した。上清を取り除き、血球計算盤を用いて全量 4 ml、 1×10^8 cells/ml の濃度になるようペレットを SD/-W で懸濁した。25°C のウォーターバスでライブラリー酵母株 (Mate & Plate™ Library - Universal Human [Normalized], Clontech) 1 ml を解凍し、10 μ l を力価

測定用に別チューブに分注した。滅菌済 2 L フラスコにライブラリー酵母株 1 ml と PI3K-RBD を導入した Y2H Gold 株 4 ml を入れ、2×YPDA 培地を 45 ml 入れた。ライブラリー酵母株の入っていたチューブに 2×YPDA 培地 1 ml を入れて洗い、その液をフラスコに入れて 30°C 41 rpm で振盪培養した。20 時間後に顕微鏡下で接合を確認し、さらに振盪培養を続けた。2 時間後、培養液を 50 ml チューブに移し、25°C 1,000 × g で 10 分間遠心した。上清を取り除き、0.5×YPDA 培地 50 ml でフラスコを洗い、その液でペレットを再懸濁して 25°C 1,000 × g で 10 分間遠心した。この操作を 2 回繰り返した後、上清を取り除いて 0.5×YPDA 培地 10 ml で再懸濁し、全容積を測定した。接合させた培養液を 0.9 % (w/v) NaCl で 1/10、1/100、1/1,000、1/10,000 に希釈し、100 μl を直径 100 mm の SD/-W, SD/-L, DDO プレートに塗布して 30°C で培養した。残りの培養液を直径 150 mm の DDO/X/A プレートに 200 μl ずつ塗布し、30°C で培養した。4 日後、希釈液を塗布したプレートのコロニーをカウントし、接合効率を算出した。翌日、DDO/X/A プレートのコロニーを SD/-Ade/-H/-L/-W/X-α-Gal/AbA (QDO/X/A) プレートにストリークし、30°C で培養した。

7. ライブラリー酵母株の力価測定

スクリーニング時の力価と差が生じないように、希釈したライブラリー酵母株は解凍後 1 時間以内にプレートに塗布した。1.5 ml チューブに 1×YPDA 培地を 1 ml 入れ、ライブラリー酵母株 10 μl を入れて穏やかに混ぜ、これを希釈液 A とした (希釈係数= 10⁻²)。別のチューブに 1×YPDA 培地を 1 ml 入れ、希釈液 A から 10 μl とりチューブに入れて穏やかに混ぜ、これを希釈液 B とした (希釈係数= 10⁻⁴)。1×YPDA 培地 50 μl と希釈液 A 10 μl を混ぜた液と、希釈液 B 50 μl それぞれを SD/-L プレートに塗布し 30°C で培養した。3 日後、コロニーが 30-300 個程度存在するプレートのコロニー数をカウントし、力価を算出した。力価 (Colony Forming Unit, cfu/ml) = コロニー数 / プレートに塗布した量 (ml) × 希釈係数

8. イーストプラスミドの精製

スクリーニングで得られた酵母のコロニーを 1×YPDA 培地 5 ml に入れ、30°C で振盪培養した。12 時間後、培養液を 6 × g で 5 分間遠心した。上清

を取り除き、ペレットを 1 ml の滅菌蒸留水で洗い、 $6 \times g$ で 30 秒間遠心した。上清を取り除き、ペレットを 190 μl の SZB buffer (0.5 M EDTA, 1 M sodium citrate, 2 M sorbitol, Zymolyase, 0.7% 2-mercaptoethanol) に懸濁し、 37°C で 40 分間インキュベートした。SDS-TE を 150 μl 入れて穏やかに混ぜ、 60°C で 10 分間インキュベートした。5 M 酢酸カリウム溶液を 150 μl 入れて穏やかに混ぜ、氷上に 5 分間静置し、 4°C $20,000 \times g$ で 15 分間遠心した。1.5 ml チューブに上清の上の部分を 300 μl とり、3 M 酢酸ナトリウム 200 μl と予め氷冷した 2-プロパノール 1 ml を入れて混ぜ、 -20°C で 10 分間インキュベートした。 4°C $20,000 \times g$ で 5 分間遠心した後上清を取り除き、80 %エタノールを 1 ml 入れ、 4°C $20,000 \times g$ で 5 分間遠心した。上清を取り除いて乾燥させ、50 μl の TE に懸濁した。

9. 大腸菌の形質転換およびプラスミドの精製

大腸菌にイーストプラスミドを加えて形質転換し、LB・アンピシリンプレートに塗布して 37°C で培養した。翌日、コロニーをピックアップして 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン含有 LB 培地 2 ml で一晩培養し、Axygen™ Axyprep™ Plasmid MiniPrep Kit (Fisher Scientific)を用いてプラスミドを精製した。

10. シーケンス解析

シーケンス解析は T7 Sequencing Primer を使い、北海道システムサイエンス株式会社に依頼した。データの解析には National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool (NCBI BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) および DNA Dynamo (Blue Tractor Software) を用いた。

ウエスタンブロッティング

6 ウェルプレートに播種した細胞を NP40 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF] で可溶化し、第 1 章と同様の方法でウエスタンブロッティングを行った。抗 GST 抗体は 1:1,000、抗 HA 抗体は 1:1,000、抗 Flag 抗体は 1:1,000、抗 Myc 抗体は 1:1,000、抗 VDAC2 抗体は 1:500 で反応させた。

免疫沈降法

6 ウェルプレート (Corning) に HEK293T を 6×10^5 cells/well で播種し、24 時間培養後にプラスミドを導入した。6 時間後に培地を交換し、さらに一晩培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄後に NP40 lysis buffer で細胞を可溶化し、 4°C $20,000 \times g$ で 10 分間遠心して上清を回収した。細胞可溶化液に抗 FlagM2 抗体 (Sigma-Aldrich) または抗 GFP ウサギ血清を入れ、 4°C で 1 時間インキュベートした。lysis buffer で 2 回洗浄した Protein G-Sepharose beads (GE Healthcare) を加え、 4°C で 1 時間インキュベートした。 4°C $500 \times g$ で 3 分間遠心して上清を取り除き、lysis buffer を加えて洗浄した。この洗浄過程を 3 回繰り返して上清を取り除いた後、 $2 \times$ SDS sample buffer で溶出した。 95°C で 5 分間熱変性後に遠心し、ウェスタンブロッティングを行った。

プルダウンアッセイ

細胞を NP40 lysis buffer で可溶化し、第 1 章と同様の方法でプルダウンアッセイを行った。

蛍光顕微鏡観察

第 1 章と同じ顕微鏡を用いた。DsRed は BP520-550 (オリンパス) の励起フィルターと BA580IF (オリンパス) の蛍光フィルターを用いた。

蛍光タンパク質再構成法 (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) による Ras-PI3K 複合体のライブセルイメージング

第 1 章と同様の方法でライブイメージングを行った。

Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行の定量

第 1 章と同様の方法で定量した。

RNA 干渉

6 ウェルプレート (Corning) に HEK293T 細胞を 4×10^5 cell/well で播種して 24 時間インキュベートし、導入試薬 RNAiMAX (Life technologies) を用いて VDAC1、VDAC2、VDAC3 に対する siRNA (Ambion, Austin, TX, USA) を 25 pmol トランスフェクションした。(siVDAC1 #1: s14768、siVDAC1 #2: s14769、siVDAC2 #1:

s14771、siVDAC2 #2: s14773、siVDAC2#3: s14772、siVDAC3 #1: s14774、siVDAC3 #2: 230730)。コントロールには AllStars Negative Control siRNA (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いた。ノックダウン効率は定量 PCR 法 (導入後 48 時間) またはウエスタンブロットティング (導入後 72 時間) を用いて評価した。

RNA 抽出と定量 PCR

全 RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、cDNA は SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) を用いて、2.5 µg の RNA から逆転写反応によって得た。qPCR 用のプライマーセット (表 1) と Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Life Technologies) を用いて、StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) にて各分子の mRNA 量を定量した。内在性コントロールには glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。各 VDAC の発現量を各サンプルの GAPDH の発現量を用いて規格化し、コントロールサンプルの値に対する相対値として表示した。

ミトコンドリアの形態および ATP 濃度の評価

コントロール細胞または VDAC2 をノックダウンした A431 細胞を、細胞密度が 70%程度になるように 35 mm ガラスベースディッシュに播種した。終濃度 12.5 nM の MitoTracker[™] Red CMXRos を加えて 37°C で 10 分間インキュベートし、ミトコンドリアを染色した。PBS で 3 回洗浄後にフェノールレッド不含 DMEM/F12 培地を入れ、蛍光顕微鏡 (IX-83) でミトコンドリアの形態を観察した。Rehman、Giedt らの論文に記載されている方法に従い、ImageJ ソフトウェアを用いてミトコンドリアの断片化を評価した (Giedt et al., 2016; Rehman et al., 2012)。バックグラウンドシグナルを引いた元画像に median filter をかけ、8 bit 画像に変換した。次に、ImageJ Plugin の Auto local threshold を用いてミトコンドリア領域を抽出した二値化画像を作成した。二値化画像を open 処理した後に close 処理してノイズを除去し、これをミトコンドリアのマスク画像とした。次に ImageJ の particle counting を用いて、ミトコンドリアのマスク画像からミトコンドリアの数 (particle) とそれぞれのミトコンドリアの面積を測定した。ミトコンドリアの数×10000 / ミトコンドリアの総面積 (pixel) を算出し、ミトコンドリアの断片化を評価した。ミトコンドリア内の ATP 濃度の評価には mitoATeam1.03 を用いた。A431 細胞に mitoATeam1.03 の発現ベクターを遺伝子導入して 24 時

間インキュベートし、蛍光顕微鏡 (IX-83) で観察した。MetaMorph ソフトウェアを用いてバックグラウンドシグナルを引いた CFP および FRET 画像のミトコンドリア領域の蛍光強度を定量し、emission ratio (FRET/CFP) を算出してミトコンドリア内の ATP 濃度を評価した。

エンドサイトーシスの評価

第 1 章と同様の方法で行った。

蛍光免疫染色法

第 1 章と同様の方法で免疫染色した。抗 HA 抗体は 1:1,000、抗 Flag 抗体は 1:1,000、抗 VDAC2 抗体は 1:1,000 で反応させた。

ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の観察

コントロール siRNA または VDAC2 に対する siRNA を導入して 24 時間培養した A431 細胞を、コラーゲンコート処理をした 35 mm ガラスベースディッシュに 3×10^4 cells/well で播種し、37°C で 24 時間培養した。細胞に pEGFP-C1-Rab5 と DsRed-mitochondria を導入し、さらに 37°C で 24 時間培養した。フェノールレッド不含 DMEM/F12 培地に置換して 4 時間血清飢餓処理後、ディスク式共焦点顕微鏡 (sDISK) を用いて 1 分間に 1 枚の時間間隔でタイムラプス観察した。撮影開始 10 分後に終濃度 100 ng/ml の EGF を添加し、さらに 60 分間観察した。

ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の定量

MetaMorph ソフトウェアを用いてミトコンドリアとエンドソームを重ね合わせた画像を作成し、ミトコンドリアとエンドソームが近接している箇所をラインスキャンした。近接している 20 箇所のラインスキャンデータから両者の蛍光強度のピーク間距離の測定し、平均値 (2.8 pixel [0.434 μ m]) を算出した。次に、ミトコンドリアの画像を TopHat 処理し、ミトコンドリア領域を抽出した二値化画像を作成した。二値化画像のミトコンドリアの周囲 2 pixel 分を拡大した二値化画像を新たに作成し、この画像と TopHat 処理したエンドソームの画像を重ね合わせた。2 pixel 拡大させたミトコンドリアと共局在するエンドソームはミトコンドリアと相互作用していると定義し、ミトコンドリアと共局在するエンドソームの面積を定量した。

エンドソームの酸性化の評価

コラーゲンコート処理をした 35 mm ガラスベースディッシュに HeLa 細胞を播種し、翌日 pCAGGS-CFP と pCXN2-3×HA-VDAC2 を遺伝子導入した。Alexa Fluor 488 標識デキストラン (終濃度 500 µg/ml) および AcidiFluor™ ORANGE 標識デキストラン (終濃度 200 µg/ml) を細胞に加え、37°C で 15 分間インキュベートした。細胞を冷却した PBS で 3 回洗浄後、蛍光顕微鏡 (IX-83) を用いて観察した。得られた蛍光画像のバックグラウンドシグナルを引き、細胞内の 2 種類のデキストランの蛍光強度を定量した。pH 感受性である AcidiFluor™ ORANGE 標識デキストランの蛍光強度を pH 非感受性である Alexa Fluor 488 標識デキストランの蛍光強度で割ることによってエンドソームの酸性化を評価した。

光遺伝学法によるミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の誘導

コラーゲンコート処理をした 35 mm ガラスベースディッシュに HeLa 細胞または A431 細胞を播種し、翌日 pFX-FYVE-iRFP-CRY2 と pFX-CIB1-RFP-TOM20 を遺伝子導入した。37°C で 24 時間培養後、ディスク式共焦点顕微鏡 (sDISK) を用いてタイムラプス観察を行った。観察開始 5 分後から 488 nm の光を照射し続け、さらに 25 分間観察した。取得した画像のバックグラウンドシグナルを引き、MetaMorph ソフトウェアの TopHat と Adaptive Threshold を用いてミトコンドリアとエンドソームを抽出した。MetaMorph モジュールの Measure Colocalization を用いてミトコンドリアと共局在するエンドソームの面積を定量した。エンドソームの酸性化は AcidiFluor™ ORANGE 標識デキストランを用いた。pFX-FYVE-CFP-CRY2 と pFX-CIB1-iRFP-TOM20 を発現させた A431 細胞に AcidiFluor™ ORANGE 標識デキストラン (終濃度 200 µg/ml) を加えて 37°C で 10 分間インキュベートし、冷却した PBS で洗浄した。細胞に 488 nm の光を 10 秒間照射後、蛍光顕微鏡 (IX-83) で観察した。バックグラウンドシグナルを引いた画像の AcidiFluor™ ORANGE 標識デキストランの蛍光強度を定量した。

統計解析手法

第 1 章と同様の方法で統計解析を行った。

表 2: 第 2 章で用いたプライマー

クローニング用プライマー	配列 (5'-3')
VDAC1_F	GGCTCGAGATGGCTGTGCCACCCACGTA
VDAC1_R	GGGCGGCCGCTGCTTGAAATTCCAGTCCTAGACC
VDAC2_F	GGCTCGAGATGGCGACCCACGGACAGAC
VDAC2_R	GGGCGGCCGCCAGCCTCCAACCTCCAGGGCGA
VDAC3_F	GGCTCGAGATGTGTAACACACCAACGTAC
VDAC3_R	GGGCGGCCGCCAGCTTCCAGTTCAAATCCCA
TOM20_F	GGCTCGAGCCCCGCCATGGTGGGTCGGAACAGCGC
TOM20_R	GGGCGGCCGCTTCCACATCATCTTCAGCCAA
V2_41_R	GGGCGGCCGCCATCCAGTTTACCAACCCAA
V2_39_F	GGCTCGAGCCCACCATGAAACTGGATGTGAAAACAAA
V2_83_R	GGGCGGCCGCTGTTGAAAAGTCAGACCATACT
V2_82_F	GGCTCGAGCCCACCATGTTTACAGAAAAGTGGAACAC
V2_129_R	GGGCGGCCGCCGTAAGAAGACTTGATTTTAC
V2_124_F	GGCTCGAGCCCACCATGAAAATCAAGTCTTCTTACAA
V2_165_R	GGGCGGCCGCCCTGGTAGCCAGCAAGCCAGC
V2_163_F	GGCTCGAGCCCACCATGGGCTACCAGATGACCTTGA
V2_204_R	GGGCGGCCGCTGATCCTCCAATTTCTGTCC
V2_202_F	GGCTCGAGCCCACCATGGGAGGATCAATTTATCAGAA
V2_245_R	GGGCGGCCGCCAGAAATGGAAGCAGTGGGAT
V2_244_F	GGCTCGAGCCCACCATGATTTCTGCAAAAAGTCAACAA
V2_269_R	GGGCGGCCGCTGTAAGCTTACACCAGGCC
V2_267_F	GGCTCGAGCCCACCATGAAGCTTACTCTCTGTCTT
V2_81_R	GGGCGGCCGCCAGTCAGACCATACTCACACCA
V2_73_F	GGCTCGAGATGTGGTGTGAGTATGGTCTGACT
V2_149_R	GGGCGGCCGCTGGATTGCAGGTCCAGCAAAA
V2_143_F	GGCTCGAGATGTTTGCTGGACCTGCAATCCA
V2_221_R	GGGCGGCCGCCGTGCAGTTGGTACCTGATGT
V2_222_F	GGCTCGAGATGACATCAGGTACCAACTGCAC
split GFP11_F	GGGAATTCGTCGACCCCACCATGCGCGATCACATGGTCCTGCA
split GFP11_R	GGAGATCTAGTGATCCCAGCGCGGCTTCA
split GFP1-10_F	GGGAATTCCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
split GFP1-10_R	GGGCGGCCGCTCACTTCTCGTTGGGGTCTT
split Cerulean1-10_F145A_N146I_H148D_F	GCTGGAGTACAACGCCATCAGCGACAACGTCTATATCACC
split Cerulean1-10_F145A_N146I_H148D_R	GGTGATATAGACGTTGTCGCTGATGGCGTTGTACTCCAGC
split Cerulean1-10_S72A_F	GGCGTGACAGTGCTTCGCCCCGTACCCCCGACCAC
split Cerulean1-10_S72A_R	GTGGTCGGGGTAGCGGGCGAAGCACTGCACGCC
CIB1_F	TTGGATCCGCCACCATGAATGGAGCTATAGG
CIB1_R	TTAGATCTTACTCCTAAATTGCCATAGAG
31aa_linker	AGATCTTACTCAGACCTGGAGCTCAAGGAGAATCTTACTTTTCAAGGTCTTCCACGCGTCGAGTTCATGAGAGGATCGCATCACCA TCACCATCACGGCCTCGAG
定量PCR用プライマー	配列 (5'-3')
VDAC1-qPCR_F	GGGTGCTCTGGTGCTAGGT
VDAC1-qPCR_R	GACAGCGGTCTCCAACCTTCT
VDAC2-qPCR_F	CCAAATCAAAGCTGACAAGGA
VDAC2-qPCR_R	TTTAGCTGCAATGCCAAAAC
VDAC3-qPCR_F	TTGACACAGCCAAATCCAAA
VDAC3-qPCR_R	TGTTACTCCCAGCTGTCCAA
GAPDH-F	AATCCCATCACCATCTTCCA
GAPDH-R	TGGACTCCACGACGTACTCA

【結果】

RAPEL 結合因子の探索

第1章で、RAPELの過剰発現によりクラスリン非依存性エンドサイトーシスが抑制されることが明らかとなった。このことから、PI3KのRAPELに結合する因子がRas-PI3K複合体のエンドソーム移行を制御しているのではないかと予想し、RAPEL結合因子を同定するためにイーストツーハイブリッド法を行った。まずPI3KRBDをY2H Gold株に導入し、PI3KRBDの発現をウェスタンブロッティングで確認した(図16A)。次にPI3KRBDの発現が酵母に有害であるか、またPI3KRBDの発現のみで抗生物質耐性遺伝子が発現しないかを確認するために、Bait (PI3KRBD)の毒性試験および自己活性化試験を行った。毒性試験の結果、空ベクターと比較してコロニーの大きさに違いはなく、コロニー数も減少していなかった(図16B)。自己活性化試験においては、青白選択に用いるX- α -galを塗布したSD/-W/X- α -galプレートで若干青いコロニーが確認されたものの、抗生物質を塗布したSD/-W/X- α -gal/AbAプレートにコロニーは確認されなかった(図16C)。以上の結果から、PI3KRBD導入による酵母への毒性および抗生物質耐性遺伝子の自己活性化は認められず、実験系に問題がないことが確認された。

次に、陽性および陰性対照を用いてさらに実験系を確認した。相互作用が知られているp53(pGBKT7-53)とT抗原(pGADT7-T)を陽性コントロールに、相互作用しない組み合わせであるLamin(pGBKT7-Lam)とT抗原(pGADT7-T)を陰性コントロールとして酵母を接合させ、プレートに播種して培養した。前者はすべてのプレートで生育すると予想され、後者はSD/-L、SD/-W、DDOプレートでは生育し、DDO/X/Aプレートでは生育しないと予想される。また、本研究における陽性コントロールとしてPI3KRBD(pGBKT7-PI3KRBD)とH-Ras-WT(pGADT7-H-Ras-WT)の組み合わせでも実験を行った。その結果、予想通りp53とT抗原およびPI3KRBDとH-Ras-WTの陽性コントロールではすべてのプレートにコロニーが確認され、LaminとT抗原の陰性コントロールではDDO/X/Aプレートにコロニーが確認されなかった(図16D)。

実験系の確認後、PI3KRBD(pGBKT7-PI3KRBD)を導入したY2H Gold株とライブラリー酵母株を用いてPI3KRBD結合因子のスクリーニングを行った。その結果、DDO/X/Aプレートに青いコロニーが5個、白いコロニーが463個確認された。これらのコロニーをSD/-Ade/-H/-L/-W/X/Aプレートに再びストリークしたところ、青いコロニーが6個、白いコロニーが51個確認され、計57個のコ

ロニーからプラスミドを抽出した (図 17)。抽出したプラスミドのシーケンスを BLAST 解析し、最終的に 6 個の因子が同定された (表 3)。本実験で使用したライブラリー酵母の力価は 1.2×10^8 cfu/ml となり、ライブラリー酵母と PI3K-RBD を導入した酵母の接合効率は 8.3% だった。

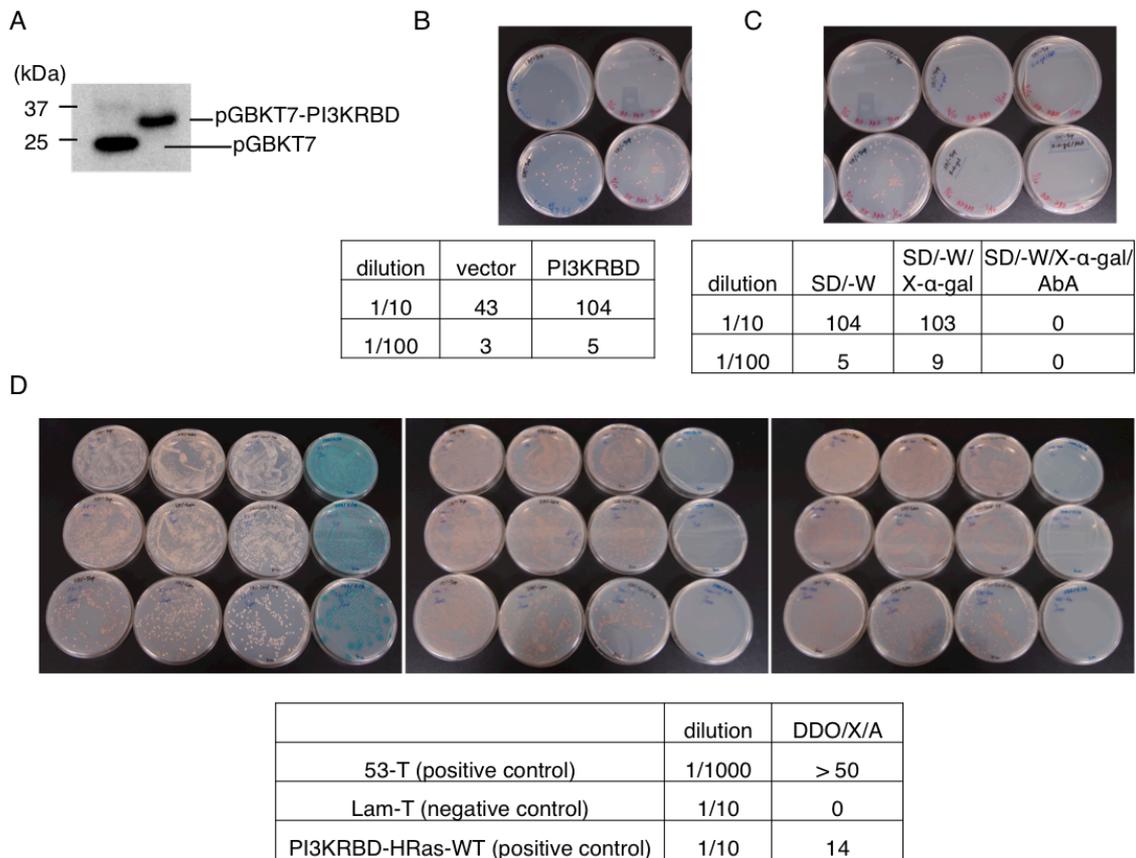
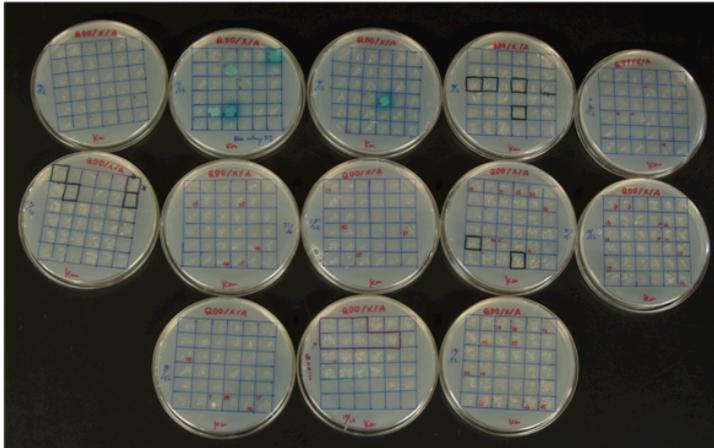


図 16: イーストツーハイブリッド法の実験系の確認

- A) pGBKT7-PI3KRBD を導入した Y2H Gold 株の発現確認。左は空ベクター、右は pGBKT7-PI3KRBD のライセートを流し、抗 Myc 抗体を用いてウエスタンブロッティングで検出した。
- B) Bait (PI3KRBD) 毒性試験の結果。左側は空ベクター、右側は pGBKT7-PI3KRBD を導入した Y2H Gold 株を SD/-W プレートに培養した。表はコロニー数を示す。
- C) Bait (PI3KRBD) 自己活性化試験の結果。pGBKT7-PI3KRBD を導入した Y2H Gold 株を SD/-W/X-α-gal および SD/-W/X-α-gal/AbA プレートに培養した。左側は SD/-W/X-α-gal、右側は SD/-W/X-α-gal/AbA プレート。表はコロニー数を示す。
- D) 対照実験の結果。左上は pGBKT7-53 を導入した Y2H Gold 株と pGADT7-T を導入した Y187 株を接合させ、SD/-W、SD/-L、DDO、DDO/X/A プレートに培養した陽性コントロール。右上と左下は、左上と同様に培養した pGBKT7-Lam と pGADT7-T の陰性コントロールと pGBKT7-PI3KRBD と pGADT7-H-Ras の陽性コントロール。表はコロニー数を示す。



blue colonies	6
white colonies	51

図 17: イーストツーハイブリッド法の結果

pGBKT7-PI3KRBD を導入した Y2H Gold 株とライブラリー導入済みの酵母株を接合させて DDO/X/A プレートに播種して培養し、4 日後にコロニーを QDO/X/A プレートにストリークして培養した。写真はストリークして 5 日目の QDO/X/A プレート。表はコロニー数を示す。

表 3: イーストツーハイブリッド法により同定された PI3K-RBD の結合因子

イーストツーハイブリッド法によって同定されたタンパク質	個数
ポリコーム群タンパク質	1
転写関連タンパク質	1
チャンネル/トランスポーター	3
ユビキチン関連タンパク質	1

ミトコンドリア外膜タンパク質 VDAC2 は RAPEL と相互作用する

イーストツーハイブリッド法により同定された候補因子が哺乳類の細胞内でも PI3KRBD と相互作用するかを調べるために、免疫沈降法を用いて相互作用を検証した。HEK293T 細胞に HA タグを融合させた候補因子と PI3KRBD-Flag を導入し、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降した。その結果、候補因子の一つであるミトコンドリア外膜タンパク質の voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) (Blachly-Dyson et al., 1994) は PI3KRBD と相互作用した (図 18A)。VDAC には三つのアイソフォームが存在することが知られている (Blachly-Dyson et al., 1994)。そこで他のアイソフォームが PI3KRBD と相互作用するかを検証したところ、VDAC1 と VDAC3 も PI3KRBD と相互作用し (図 18B)、さらに VDAC すべてのアイソフォームが RAPEL と相互作用した (図 18C)。

次に、VDAC2 の RAPEL 結合領域を同定するために、VDAC2 を 8 分割したトランケーション変異体を作製し、RAPEL との相互作用を検証した。CFP が融合したこれらの変異体と GST-RAPEL を用いてプルダウンアッセイを行った結果、RAPEL は VDAC2 の 124-165aa および 244-269aa 領域と強く相互作用し、その他の領域においても弱い相互作用が認められた (図 19)。以上から、VDAC2 は少なくとも 2 箇所以上の領域で RAPEL と相互作用することが示唆された。

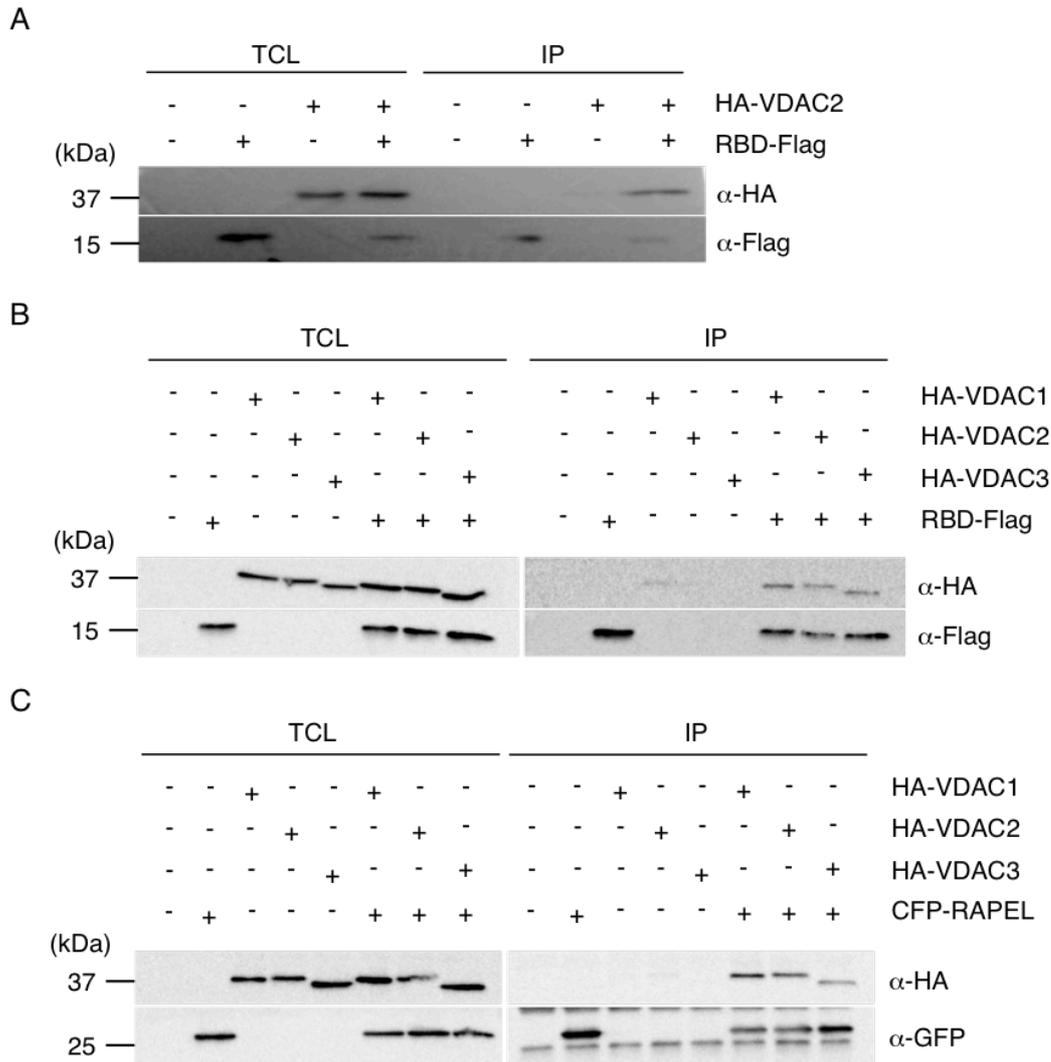


図 18: VDAC2 とそのアイソフォームは RAPEL と相互作用する

- A) HEK293T 細胞に HA-VDAC2 と PI3KRBD-Flag を導入し、24 時間培養後に細胞可溶化液を回収し、抗 Flag 抗体と protein A sepharose beads で免疫沈降した。免疫沈降物と細胞可溶化液を、抗 Flag 抗体と抗 HA 抗体を用いてウエスタンブロッティングで検出した。
- B) A と同様の方法で各 VDAC のアイソフォームと PI3KRBD の相互作用を調べた。
- C) B と同様に、VDAC の三つのアイソフォームと PI3KRBD の RAPEL の相互作用を調べた。

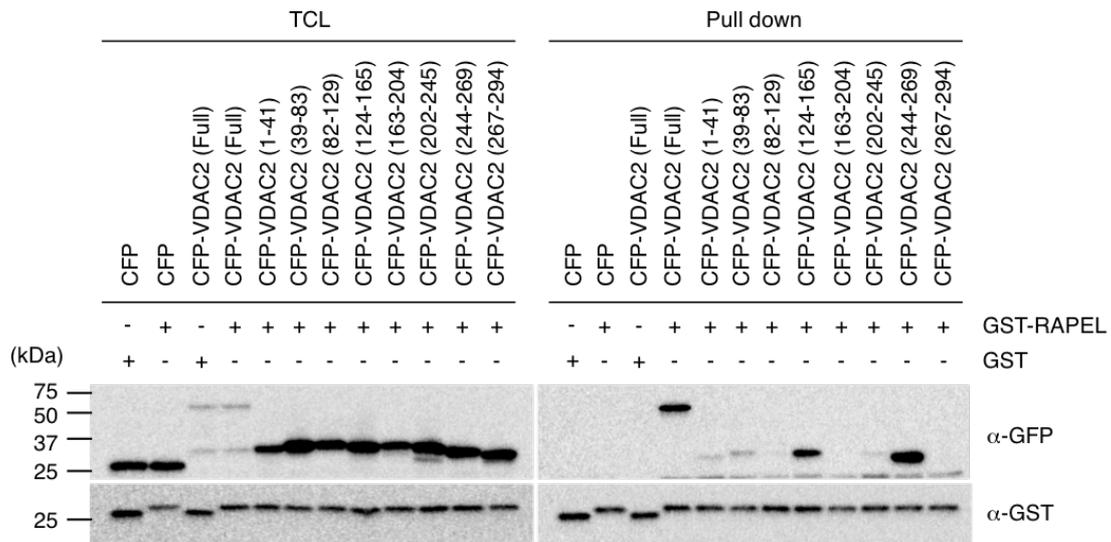


図 19: VDAC2 は複数の領域で RAPEL と相互作用する

HEK293T 細胞に GST-RAPEL と CFP-VDAC2 全長または CFP-VDAC2 トランケーション変異体を導入し、24 時間培養後に細胞可溶化液を回収した。細胞可溶化液に glutathione Sepharose beads を加えて 1 時間インキュベートし、lysis buffer で洗浄後に SDS sample buffer で懸濁した。沈降物と細胞可溶化液を、抗 GST 抗体と抗 GFP 抗体を用いてウエスタンブロッティングで検出した。

VDAC2 は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を制御する

次に、VDAC2 が EGF 刺激依存的な Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を制御するかを検討した。A431 細胞に VDAC2 に対する 2 種類の siRNA (siVDAC2 #2、siVDAC2 #3) をそれぞれ導入し、ウエスタンブロッティングによって VDAC2 のノックダウンを確認した (図 20A)。この細胞における Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を、図 2B と同様に解析した。その結果、2 種類の siRNA を用いて VDAC2 をノックダウンした細胞はコントロールの細胞と比較して、EGF 刺激後も Ras-PI3K 複合体と EEA-1 の共局在が増加せず、複合体のエンドソーム移行が抑制された (図 20B、C)。次に、VDAC2 のノックダウンによるミトコンドリアへの影響を調べるため、ミトコンドリアの形態およびミトコンドリア内の ATP 濃度を評価した。その結果、siVDAC2 #3 はミトコンドリアの断片化やミトコンドリア内の ATP 濃度の変化は認められなかったが、siVDAC2 #2 では有意な変化が認められた (図 21A-C)。2 種類の siRNA で異なる結果が得られたが、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行は両方の siRNA で抑制されたことから、VDAC2 のノックダウンによる Ras-PI3K 複合体の移行の抑制はミトコンドリアの機能低下によるものではないと考えられる。siVDAC2 #2 の表現型がオフターゲット効果によるものかを検証する必要があるが、これらの結果から、VDAC2 は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を制御することが示唆された。

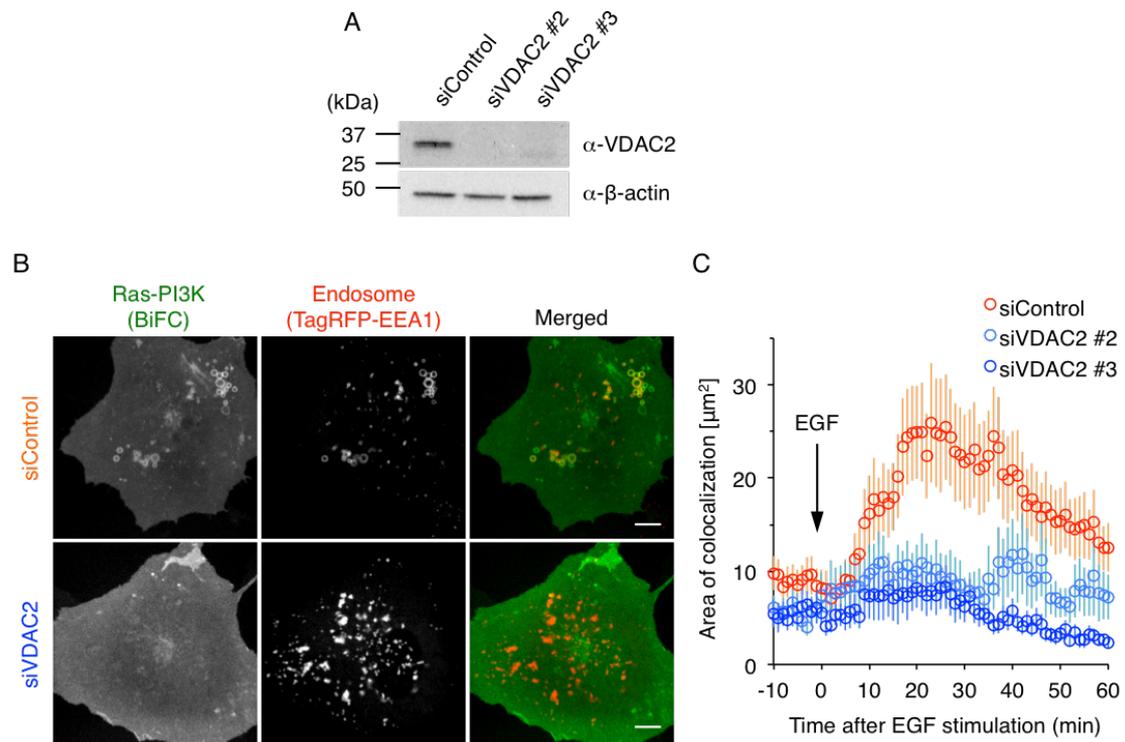


図 20: VDAC2 のノックダウンにより Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行が抑制される

- A) A431 細胞にコントロール siRNA または VDAC2 に対する siRNA を導入して培養した。72 時間後に細胞可溶化液を回収し、抗 VDAC2 抗体と抗 β -actin 抗体を用いてウエスタンブロッティングで検出した。
- B) コントロール siRNA または siVDAC2 を導入して 48 時間経過した A431 細胞に、TagRFP-EEA-1 と VN-H-Ras および PI3KRBD-WT-VC を導入して 24 時間培養した。4 時間血清飢餓処理後に 100 ng/ml の EGF で刺激し、共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。画像は EGF 刺激後 30 分を示す。(Bar = 10 μm)
- C) EEA-1 と Ras-PI3K 複合体の小胞構造を抽出し、共局在の面積をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 14$)。 $P < 0.0001$ (MANOVA)。

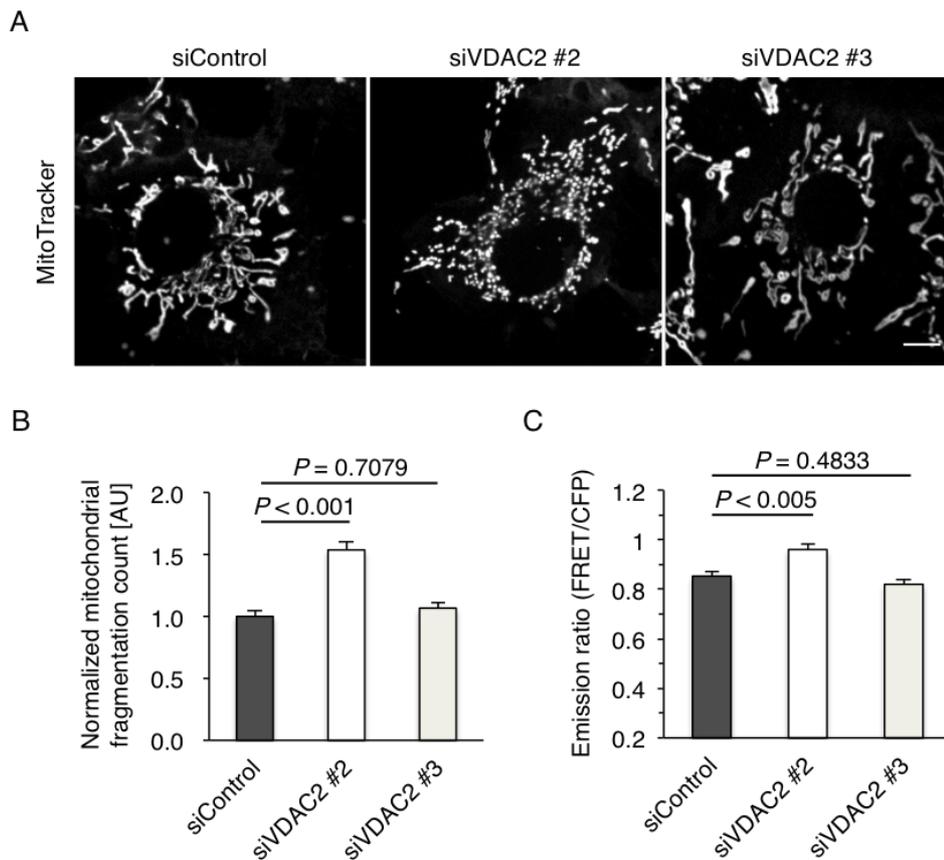


図 21: ミトコンドリアの状態は 2 種類の siRNA で異なる

- A) コントロール siRNA または siVDAC2 を導入して 72 時間経過した A431 細胞に 12.5 nM の MitoTrackerTM Red CMXRos を加えて 10 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、共焦点顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μ m)
- B) ImageJ Plugin の Auto local threshold を用いてミトコンドリアのマスク画像を作成し、Particle counting を用いてマスク画像からミトコンドリアの数とミトコンドリアの面積を測定した。ミトコンドリアの数 \times 10000 / ミトコンドリアの総面積 (pixel) を算出し、siControl の平均を 1 として規格化してプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 65$)。P 値は一元配置分散分析とテューキーの HSD 検定によって算出した。
- C) コントロール siRNA または siVDAC2 を導入して 48 時間経過した A431 細胞に、mitoATeam1.03 を導入し、24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。ミトコンドリア領域の CFP と FRET の蛍光強度を定量し、emission ratio (FRET/CFP) をプロットした。emission ratio は ATP 濃度をあらかず。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 75$)。P 値は一元配置分散分析とテューキーの HSD 検定を用いて算出した。

VDAC2 はクラスリン非依存性エンドサイトーシスを正に制御する

次に、VDAC2 がクラスリン非依存性エンドサイトーシスを制御するかを検討した。VDAC2 に対する siRNA を HEK293T 細胞に導入し、72 時間後に蛍光標識したデキストランを取り込ませて取り込み量を定量した。その結果、コントロールと比較してデキストランの取り込み量が減少した (図 22A)。前項で VDAC1 および VDAC3 も RAPEL と相互作用する結果が得られており (図 18C)、これらのアイソフォームによって機能が相補されてしまう可能性があるため、VDAC すべてをノックダウンした場合の細胞のエンドサイトーシス能も評価した。各 VDAC に対する siRNA を HEK293T 細胞に導入し、定量 PCR 法を用いてそれぞれの mRNA 量の減少を確認した (図 22C)。この細胞に蛍光標識デキストランを取り込ませた結果、トリプルノックダウンの細胞の取り込み量は VDAC2 単独のノックダウン細胞と同程度であった (図 22A)。また、VDAC2 を過剰発現させるとデキストランの取り込み量は増加した (図 22B)。次に、VDAC2 がクラスリン依存性エンドサイトーシスを制御するかを検証した。VDAC2 のノックダウンおよび過剰発現細胞を用いてトランスフェリンの取り込みを評価したところ、両者ともコントロールの細胞と比較してトランスフェリンの取り込みに有意な差は認められなかった (図 23A、B)。以上より、VDAC2 はクラスリン非依存性エンドサイトーシスの正の制御因子であることが示唆された。

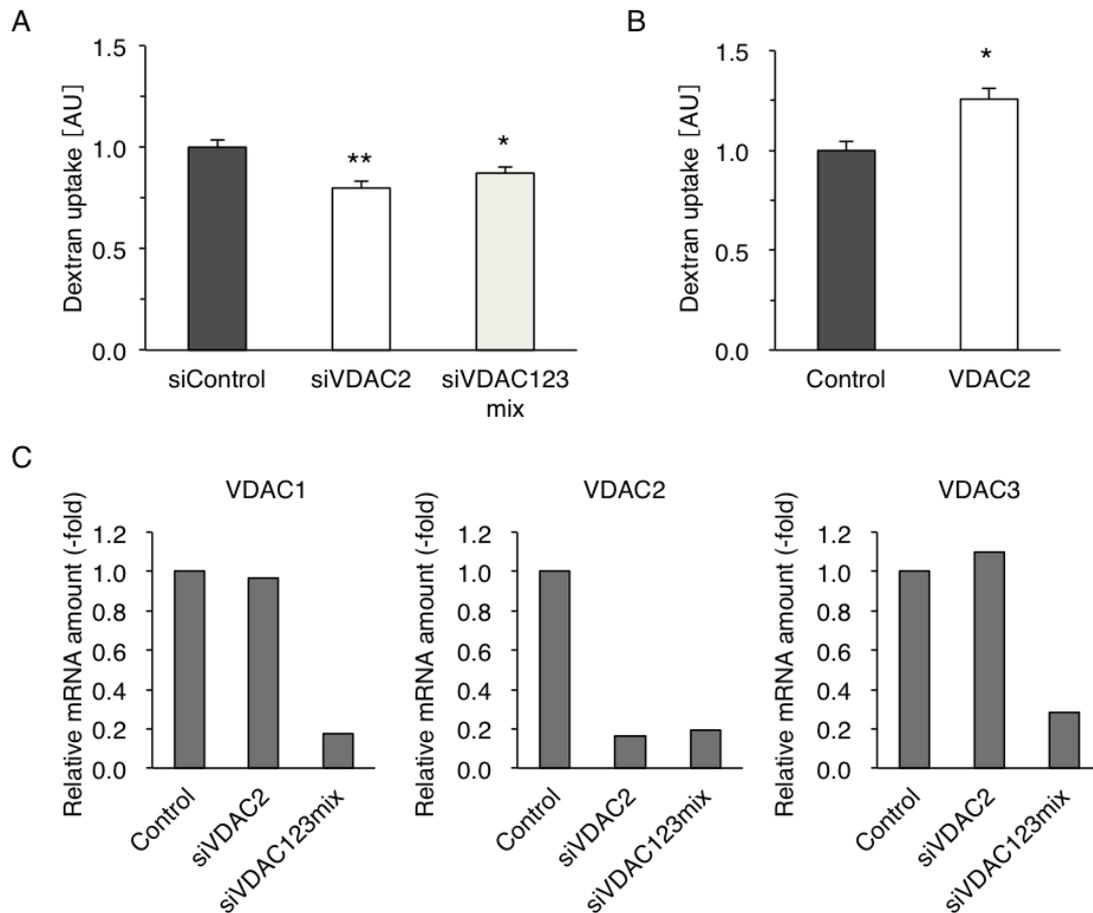


図 22: VDAC2 のノックダウンによりデキストランの取り込みが減少する

- A) HEK293T 細胞にコントロール siRNA または VDAC1、VDAC2、VDAC3 に対する siRNA を導入し、72 時間後に 500 $\mu\text{g/ml}$ の Alexa Fluor 546 標識デキストランを加えて 10 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、3%パラホルムアルデヒドで固定して蛍光顕微鏡で観察した。得られた画像から細胞内のデキストランの蛍光強度を定量し、コントロール細胞に対する蛍光強度比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 250$)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.0001$ は一元配置分散分析とテューキーの HSD 検定によって算出した。
- B) HeLa 細胞に HA-VDAC2 と CFP を導入し、24 時間培養した。B と同様の方法でデキストランを取り込ませて細胞を固定し、CFP 発現細胞内のデキストランの蛍光強度を定量した。コントロール細胞に対するデキストランの蛍光強度比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 110$)。* $P < 0.0005$ (Student's *t*-test)。
- C) VDAC1、VDAC2、VDAC3 の mRNA の発現量を定量 PCR 法により解析した。GAPDH の発現量で規格化し、コントロール siRNA を 1 としてプロットした。

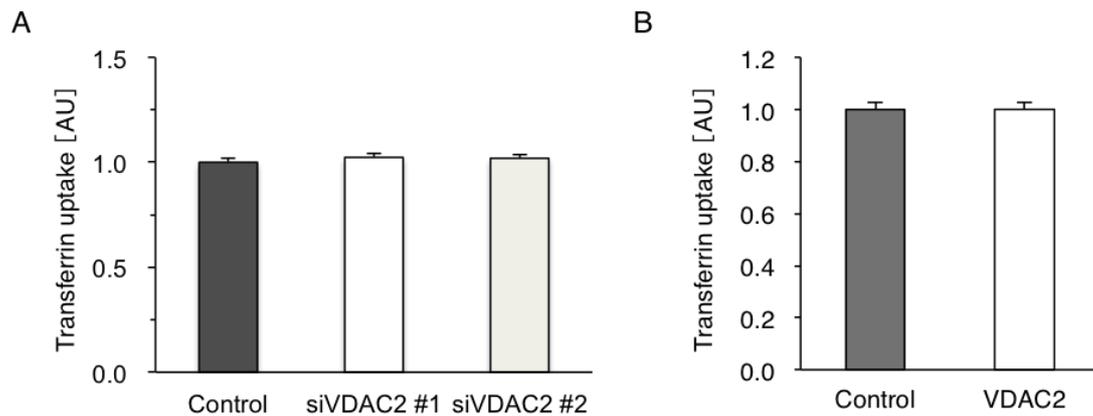


図 23: VDAC2 のノックダウンはトランスフェリンの取り込みに影響を与えない

- A) HEK293T 細胞にコントロール siRNA または VDAC2 に対する siRNA を導入し、72 時間後に 500 $\mu\text{g/ml}$ の Alexa Fluor 546 標識トランスフェリンを加えて 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、3%パラホルムアルデヒドで固定して蛍光顕微鏡で観察した。得られた画像から細胞内のトランスフェリンの蛍光強度を定量し、コントロール細胞に対する蛍光強度比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 320$)。* $P = 0.9309$ は一元配置分散分析によって算出した。
- B) HEK293T 細胞に HA-VDAC2 と CFP を導入し、24 時間培養した。D と同様の方法でトランスフェリンを取り込ませて細胞を固定し、CFP 発現細胞のトランスフェリンの蛍光強度を定量した。コントロール細胞に対するトランスフェリンの蛍光強度比をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 250$)。* $P = 0.9868$ (Student's t -test)。

VDAC2 はミトコンドリアとその周囲の顆粒構造に局在する

次に VDAC2 の細胞内局在を観察した。HA-VDAC2 とミトコンドリアマーカーを HeLa 細胞に共発現させ、蛍光免疫染色法を用いて観察したところ、これまでの報告どおり VDAC2 はミトコンドリアに局在していた (図 24A)。次に、VDAC2 内のどの領域がミトコンドリア局在を制御するかを調べた。HA タグを融合させた四つの VDAC2 トランケーション変異体 (1-81aa、73-149aa、143-221aa、222-294aa) を作製し、各変異体の細胞内局在を調べた。すべての変異体で細胞質と核への局在が観察されたが、222-294aa の変異体のみがミトコンドリア局在を示した (図 25)。このことから、VDAC2 は C 末端にミトコンドリア局在を制御する配列を有することが示唆された。

ほとんどの VDAC2 はミトコンドリアに局在していたが、興味深いことに一部の VDAC2 は顆粒構造を形成し、この顆粒構造はミトコンドリアマーカーとは共局在しなかった (図 24A Inset、C)。VDAC2 抗体を用いて内在性の VDAC2 を観察した場合も、同様の顆粒構造が観察された (図 24B Inset、D)。ミトコンドリアは mitochondrial-derived vesicles (MDVs) (Soubannier et al., 2012) と呼ばれる小胞を産生することが知られており、MDVs はミトコンドリア外膜と内膜の両方を含む小胞と、外膜のみの小胞が存在する (Sugiura et al., 2014)。また、VDAC は MDVs に局在することが報告されている (Soubannier et al., 2012)。そこで本実験で観察された VDAC2 の顆粒構造が MDVs であるかを調べるために、ミトコンドリア外膜のマーカータンパク質 TOM20 と内膜のマーカータンパク質 cytochrome c oxidase subunit VIII (DsRed-mito) とともに VDAC2 の局在を観察した。その結果、VDAC2 が局在する顆粒構造はどちらのマーカーとも共局在しなかった (図 26A-C)。このことから、VDAC2 が形成する顆粒状構造はミトコンドリアとも MDVs とも異なる、未知の細胞小器官にも局在することが示唆された。

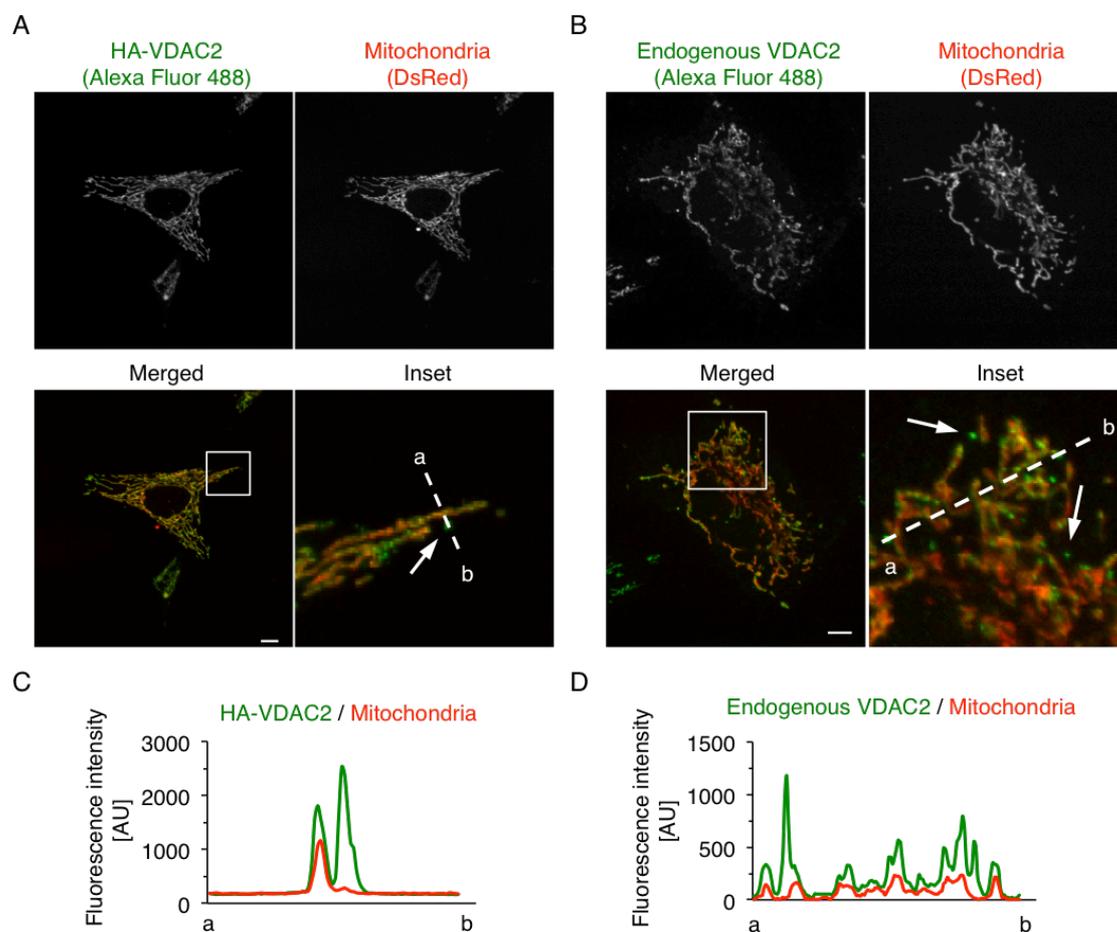


図 24: VDAC2 はミトコンドリアとミトコンドリア周囲の顆粒構造に局在する

- A) HeLa 細胞に HA-VDAC2 と DsRed-Mito を導入して 24 時間培養後に細胞を固定した。抗 HA 抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。右下は重ね合わせ画像内の四角を拡大した画像で、図中の矢印は顆粒状の VDAC2 を示す。(Bar = 10 μm)
- B) DsRed-Mito を導入した HeLa 細胞を 3%パラホルムアルデヒドで固定後、抗 VDAC2 抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。右下は重ね合わせ画像内の四角を拡大した画像で、図中の矢印は顆粒状の内在性の VDAC2 を示す。(Bar = 10 μm)
- C) A の拡大図内に a から b まで線を引き、線上の HA-VDAC2 (緑) と DsRed-Mito (赤) の蛍光強度をプロットした。
- D) B の拡大図内に a から b まで線を引き、線上の VDAC2 (緑) と DsRed-Mito (赤) の蛍光強度をプロットした。

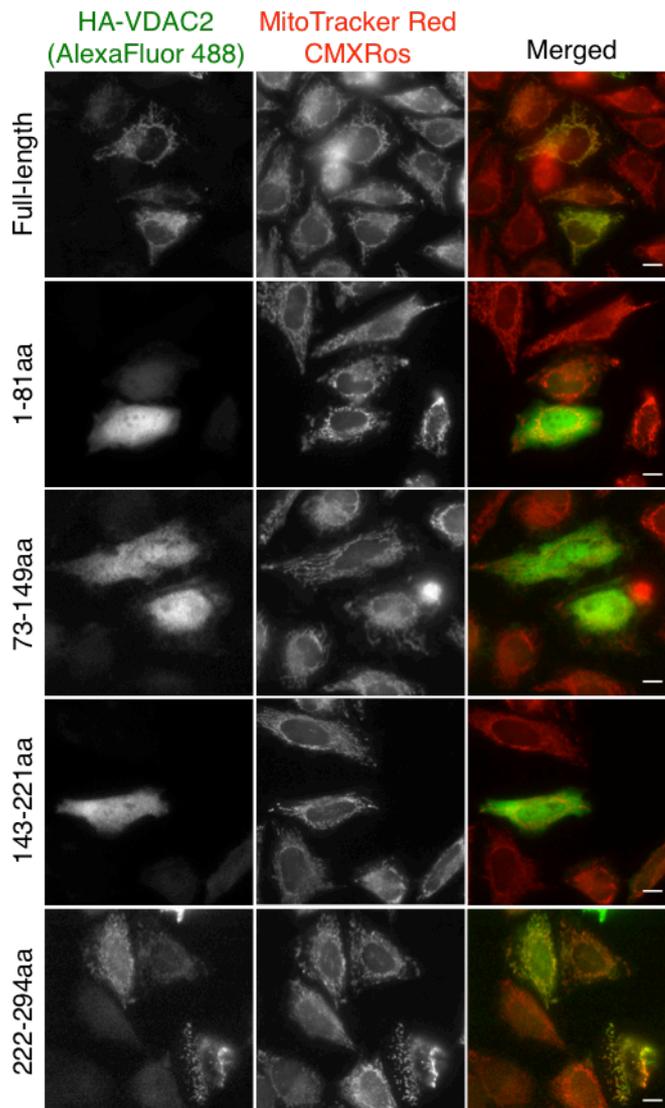


図 25: VDAC2 は C 末端にミトコンドリア局在配列を有する

HeLa 細胞に HA-VDAC2 全長または HA-VDAC2 のトランケーション変異体を導入し、24 時間後に 12.5 nM の MitoTrackerTM Red CMXRos を加えて 10 分間インキュベートした。細胞を 3%パラホルムアルデヒドで固定して抗 HA 抗体で免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μm)

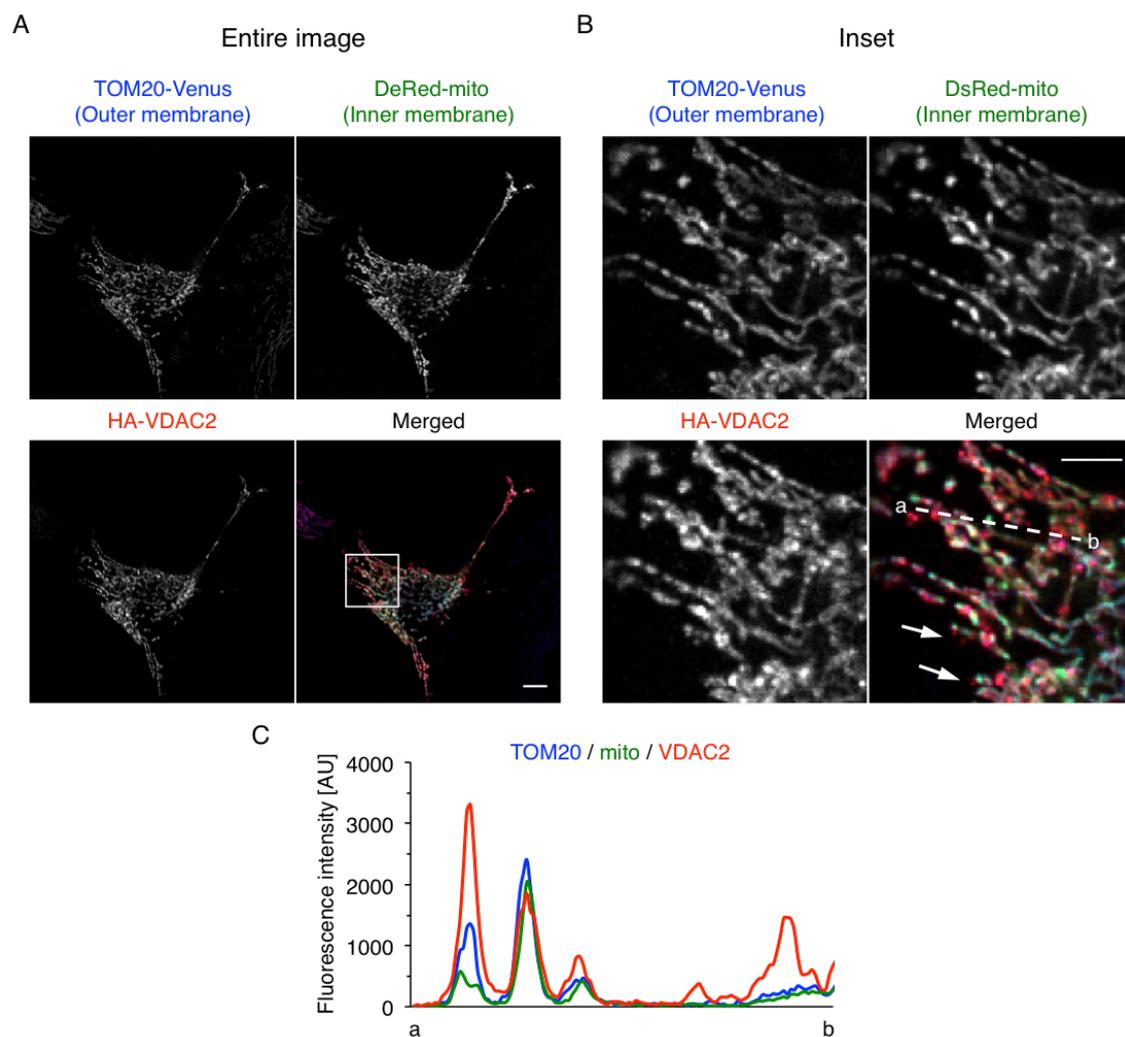


図 26: VDAC2 は MDVs とは異なる未知の細胞小器官にも局在する

- A) HA-VDAC2、DsRed-Mito、TOM20-Venus を導入した HeLa 細胞を固定し、抗 HA 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μm)
- B) C の画像内の四角を拡大した画像。矢印は VDAC2 単独の顆粒構造を示す。(Bar = 5 μm)
- C) D の拡大図内に a から b まで線を引き、線上の Venus-TOM20 (青)、DsRed-Mito (緑)、HA-VDAC2 (赤) の蛍光強度をプロットした。

蛍光タンパク質を用いた VDAC2 の可視化

VDAC2 のライブセルイメージングを行うために、CFP-VDAC2 を HeLa 細胞に発現させて観察した。しかし、CFP-VDAC2 はミトコンドリアに局在せず、核と細胞質に局在した (図 27A 上段)。一方で、HA-VDAC2 と VDAC2-Flag はミトコンドリアに局在した (図 27A 中段、下段)。Messina らは、YFP が融合した VDAC3 を HeLa 細胞に発現させ、YFP-VDAC3 がミトコンドリアに局在することを報告しており、その際に YFP と VDAC3 の間に 31 アミノ酸からなる linker 配列 (31aa linker) を挿入していた (Messina et al., 2014)。そこで、EYFP-31aa linker-VDAC3 を作製し、HeLa 細胞に発現させて局在を観察したが、VDAC3 はミトコンドリアに局在しなかった (図 27B 上段)。さらに 116 アミノ酸からなる linker 配列を挿入した VDAC2-116aa linker-SECFP の場合も、VDAC2 はミトコンドリアに局在しなかった (図 27B 下段)。

前項で VDAC2 の 222-294aa トランケーション変異体がミトコンドリアに局在したことから、次に VDAC2 の 222-294aa トランケーション変異体に CFP を融合させてその局在を観察した。その結果、HA タグではミトコンドリアに局在する 222-294aa 変異体は、CFP タグではミトコンドリアに局在しなかった (図 27C)。このことから、蛍光タンパク質が融合した VDAC2 がミトコンドリアに局在できなくなる原因はタグの大きさであることが示唆された。そこでタグの大きさによる問題を解消するために、split GFP (Cabantous et al., 2004) を用いた VDAC2 の可視化を試みた。split GFP は super-folder GFP を 1-10 番目の β -strand (split GFP₁₋₁₀) と 11 番目の β -strand (split GFP₁₁) に切断した二つの断片からなり、他のタンパク質による相互作用がなくても効率的に自己再構成して蛍光を発する性質をもつ (Cabantous et al., 2004)。この性質を利用することで、蛍光タンパク質が融合した VDAC2 をミトコンドリアに局在させることができると予想した (図 28A)。split GFP₁₁-VDAC2 をコードした発現ベクターを作製し、split GFP₁₋₁₀ 発現ベクターとともに細胞に導入して局在を観察した。その結果、split GFP-VDAC2 はミトコンドリアに局在した (図 28B、C)。さらに、split GFP₁₋₁₀ に S72A、F145A、N146I、H148D のアミノ酸変異が入った split Cerulean₁₋₁₀ (Li et al., 2016) を作製し、split Cerulean-VDAC2 もミトコンドリアに局在することを確認した (図 29A)。次に、BiFC 法で可視化する Ras-PI3K 複合体の発現プラスミドと split Cerulean で可視化する VDAC2 の発現プラスミドを細胞に導入し、Ras-PI3K 複合体と VDAC2 の同時観察を試みた。しかし、split Cerulean-VDAC2

は単独発現の時と異なり細胞質全体にびまん性に局在しており、Ras-PI3K 複合体と VDAC2 の同時観察はできなかった (図 29B)。

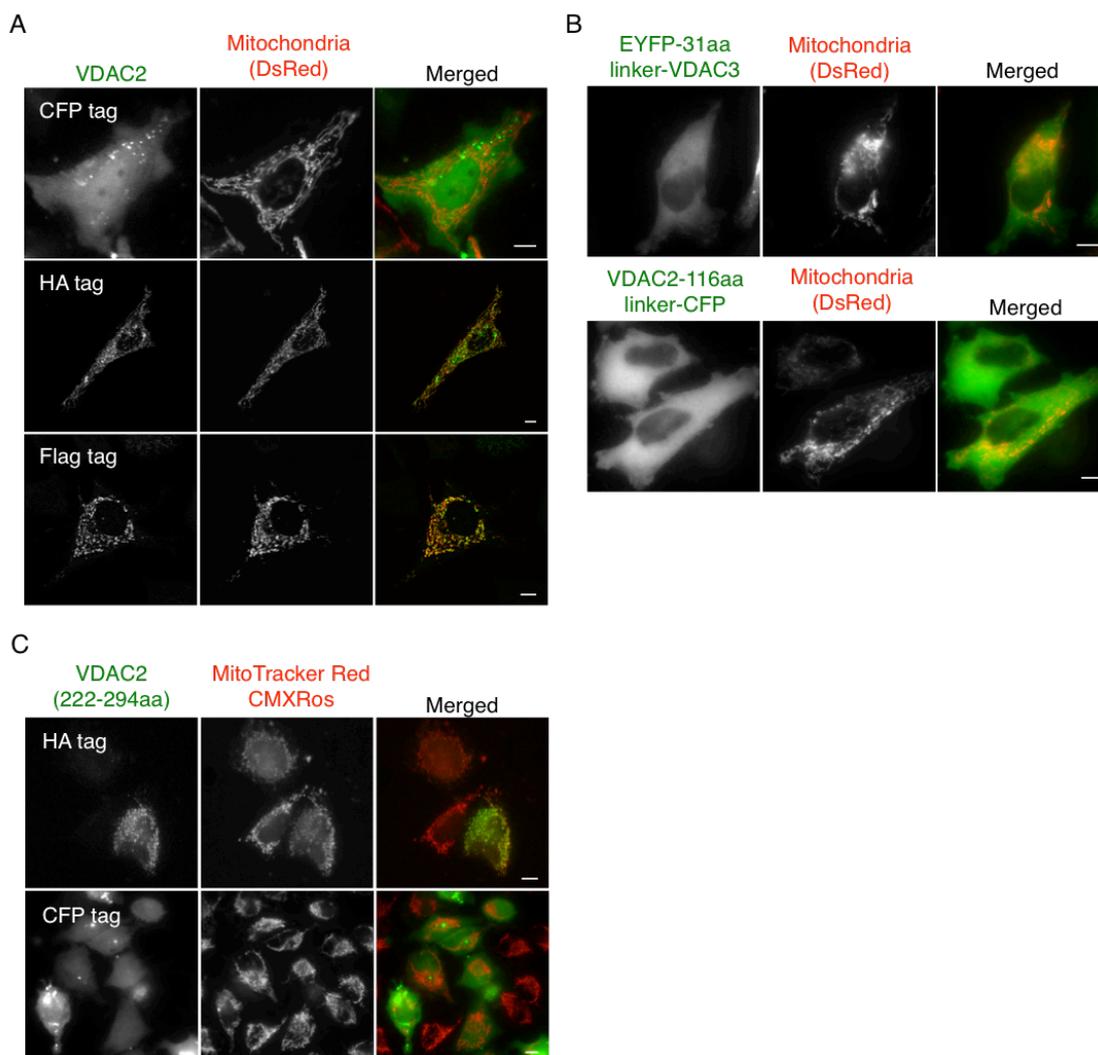


図 27: 蛍光タンパク質タグの VDAC2 はミトコンドリアに局在しない

- A) HeLa 細胞に DsRed-Mito と CFP-VDAC2、HA-VDAC2 もしくは VDAC2-Flag を導入して 24 時間培養し、蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μ m)
- B) 上段は DsRed-Mito と EYFP-31aa linker-VDAC3 を、下段は DsRed-Mito と VDAC2-116aa linker-SECFP を HeLa 細胞に導入し、24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μ m)
- C) HeLa 細胞に HA タグまたは CFP タグの VDAC2 のトランケーション変異体 (222-294aa) を導入した。24 時間後に MitoTrackerTM Red CMXRos で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μ m)

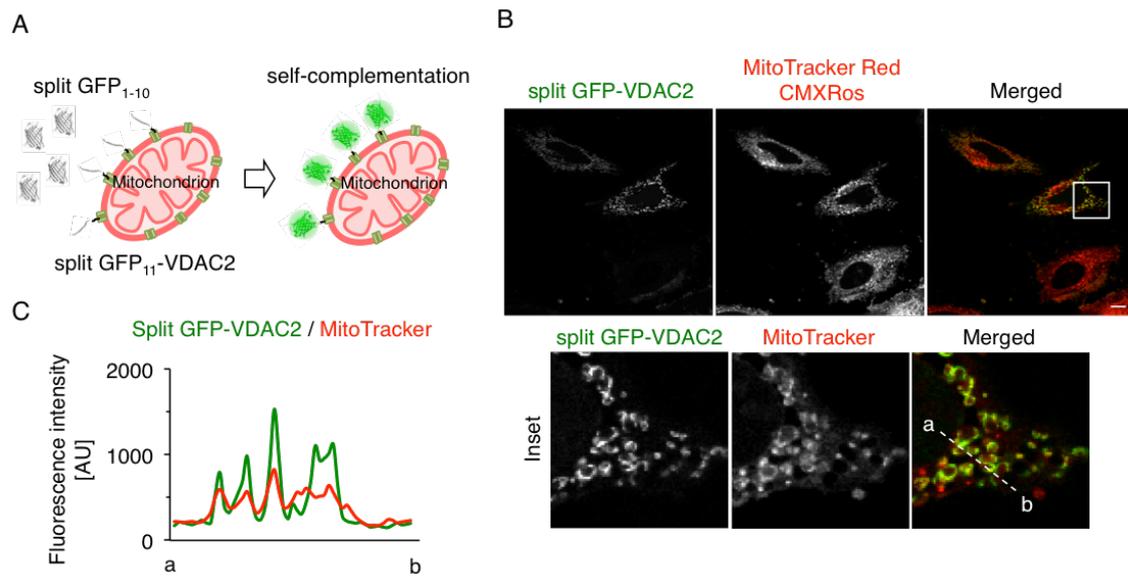


図 28: split GFP による VDAC2 の可視化

- A) split GFP による VDAC2 の可視化の模式図。split GFP₁₋₁₀ と split GFP₁₁-VDAC2 を細胞に共発現させると、細胞質に局在する split GFP₁₋₁₀ とミトコンドリアに局在する split GFP₁₁-VDAC2 が接近した時に split GFP が自己再構成し、ミトコンドリアの VDAC2 を可視化できる。
- B) HeLa 細胞に split GFP₁₋₁₀ と split GFP₁₁-VDAC2 を導入して 24 時間培養した。細胞を MitoTracker™ Red CMXRos で染色後に固定し、共焦点顕微鏡で観察した。下段は重ね合わせ画像内の四角を拡大した画像。(Bar = 10 μm)
- C) E の重ね合わせの拡大図内に a から b まで線を引き、線上の split GFP-VDAC2 (緑) と MitoTracker (赤) の蛍光強度をプロットした。

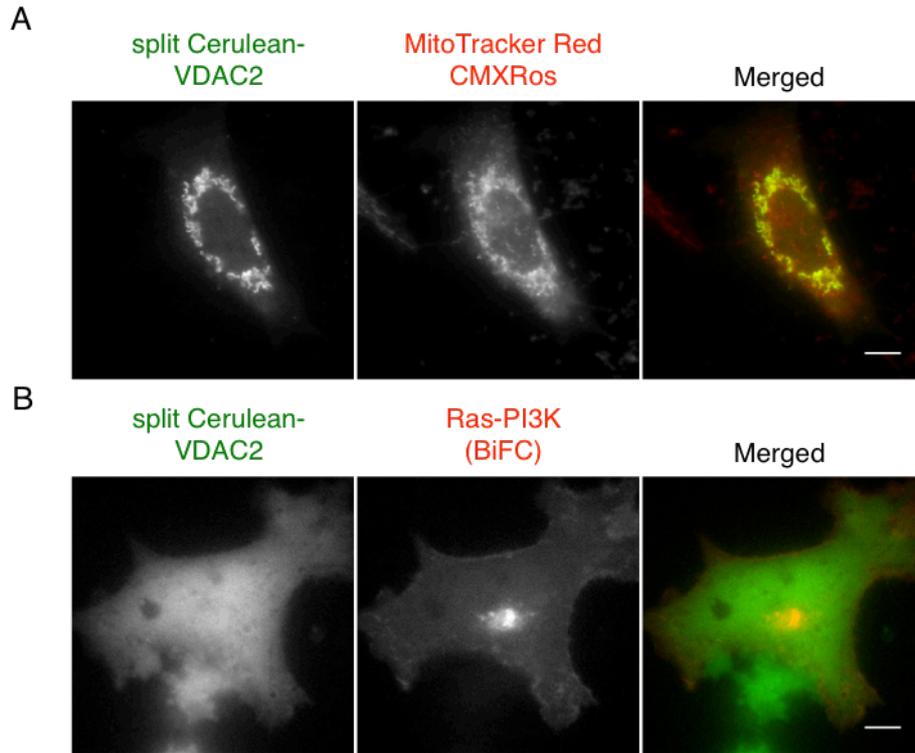


図 29: split Cerulean タグの VDAC2 と Ras-PI3K 複合体の同時観察

- A) splitGFP₁₋₁₀に S72A、F145A、N146I、H148D のアミノ酸変異を導入した split Cerulean₁₋₁₀ と split GFP₁₁-VDAC2 を導入し、E と同様の方法でミトコンドリアを染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μm)
- B) A431 細胞に split Cerulean₁₋₁₀、split GFP₁₁-VDAC2、VN-H-Ras、PI3KRBD-WT-VC を導入して 24 時間培養し、蛍光顕微鏡で観察した。(Bar = 10 μm)

VDAC2 は EGF 刺激依存的なミトコンドリア-エンドソーム間相互作用に関与する

ミトコンドリア外膜のポアタンパク質である VDAC2 が Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を制御する分子メカニズムを明らかにするため、蛍光免疫染色法を用いて Ras-PI3K 複合体と VDAC2 の細胞内局在を観察した。Ras-PI3K 複合体と HA-VDAC2 の発現プラスミドを A431 細胞に導入し、血清飢餓処理後に EGF で刺激した。EGF 刺激から 15 分後に細胞を固定して免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で細胞を観察したところ、Ras-PI3K 複合体が局在する一部のエンドソームはミトコンドリアと近接していた (図 30A、B)。このことから、エンドソームとミトコンドリアが近接し、相互作用することで Ras-PI3K 複合体がエンドソームに移行して繫留されるのではないかと考えた。そこで、Ras-PI3K 複合体、EEA-1 およびミトコンドリアを可視化する発現プラスミドを導入した A431 細胞を EGF で刺激し、これらの挙動をタイムラプス観察した。その結果、EEA-1 と Ras-PI3K 複合体が共局在するエンドソームがミトコンドリアと相互作用しており、両者が相互作用する約 10 分の間に EEA-1 の蛍光強度が次第に減弱していく様子も観察された。(図 30C)。さらに生細胞内で起こるミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を詳細に解析するため、A431 細胞に EGFP-Rab5 と DsRed-mitochondria を発現させ、EGF 刺激後にミトコンドリア-エンドソーム間相互作用が促進されるかを検証した。共焦点顕微鏡を用いて、血清飢餓処理後の細胞を 1 分間隔で 60 分間撮影し、撮影開始 10 分後に EGF を添加した。次に取得した画像からミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を定量するために、本実験におけるミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を定義した。まず、ミトコンドリアとエンドソームが近接している箇所をラインスキャンし、両者の蛍光強度のピーク間距離を測定した (図 31A 左)。ピーク間距離の平均値が 2.8 pixel (0.434 μm) だったことから、ミトコンドリアの周囲 2 pixel (0.31 μm) 以内にあるエンドソームはミトコンドリアと相互作用していると定義した (図 31A、B)。この定義をもとにミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を定量した結果、EGF 刺激後に両者の相互作用が増加することがわかった (図 31C)。さらに VDAC2 をノックダウンした細胞では、EGF 刺激後のミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の増加が認められなくなった (図 31C)。以上の結果から、Ras-PI3K 複合体が局在するエンドソームはミトコンドリアと相互作用することが明らかになり、VDAC2 は EGF 刺激依存的なミトコンドリア-エンドソーム間

相互作用に関与することが示唆された。

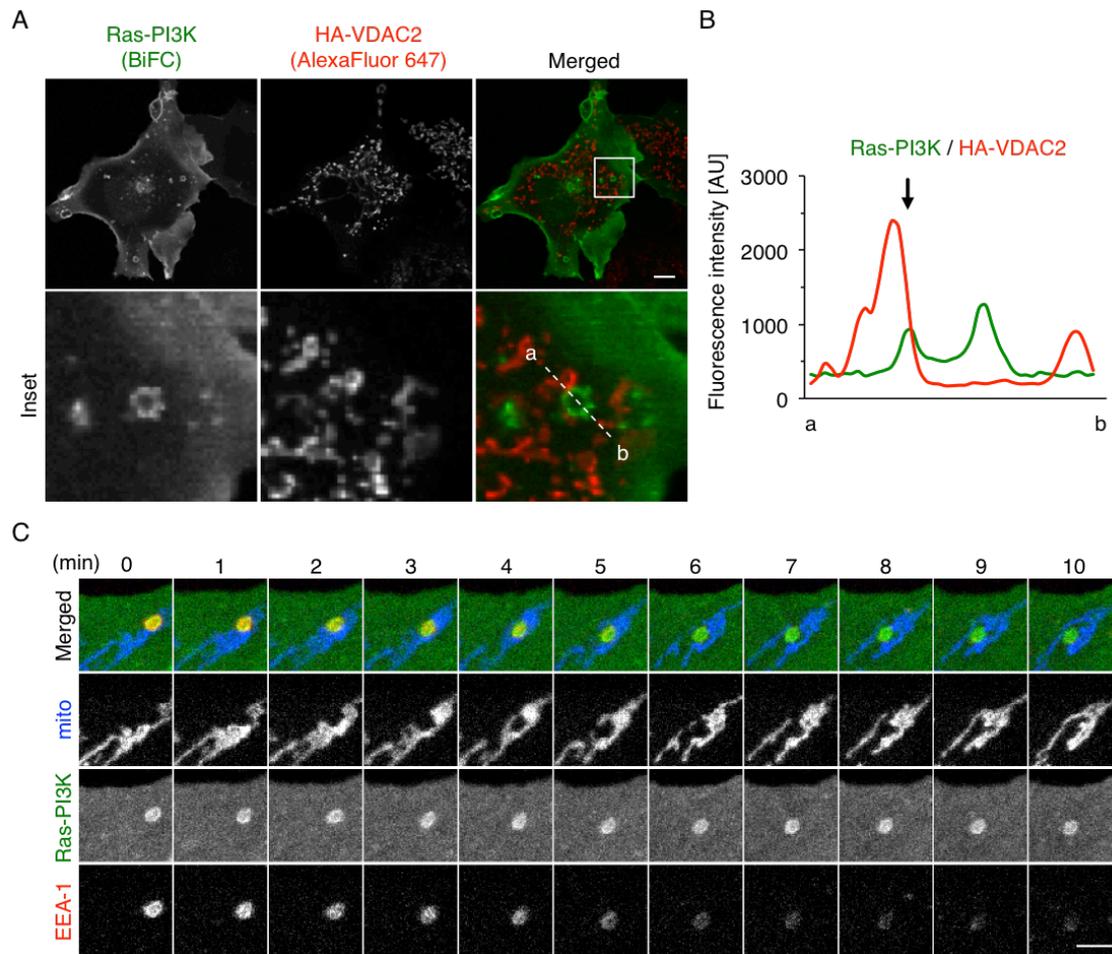


図 30: Ras-PI3K 複合体が局在するエンドソームはミトコンドリアと近接している

A) A431 細胞に HA-VDAC2、VN-H-Ras、PI3KRBD-WT-VC を導入して 24 時間培養後、細胞を固定して抗 HA 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。下段は重ね合わせ画像内の四角を拡大した画像。(Bar = 10 μm)

B) A の重ね合わせの拡大図内に a から b まで線を引き、線上の Ras-PI3K (緑) と HA-VDAC2 (赤) の蛍光強度をプロットした。矢印は Ras-PI3K 複合体が局在するエンドソームとミトコンドリアの近接を示す。

C) A431 細胞に mito-SECFP、VN-H-Ras、PI3KRBD-WT-VC、TagRFP-EEA-1 を導入して 24 時間培養した。4 時間血清飢餓処理後に 100 ng/ml の EGF で刺激し、共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。画像は EGF 刺激から 20 分後の 10 分間を示す。(Bar = 5 μm)

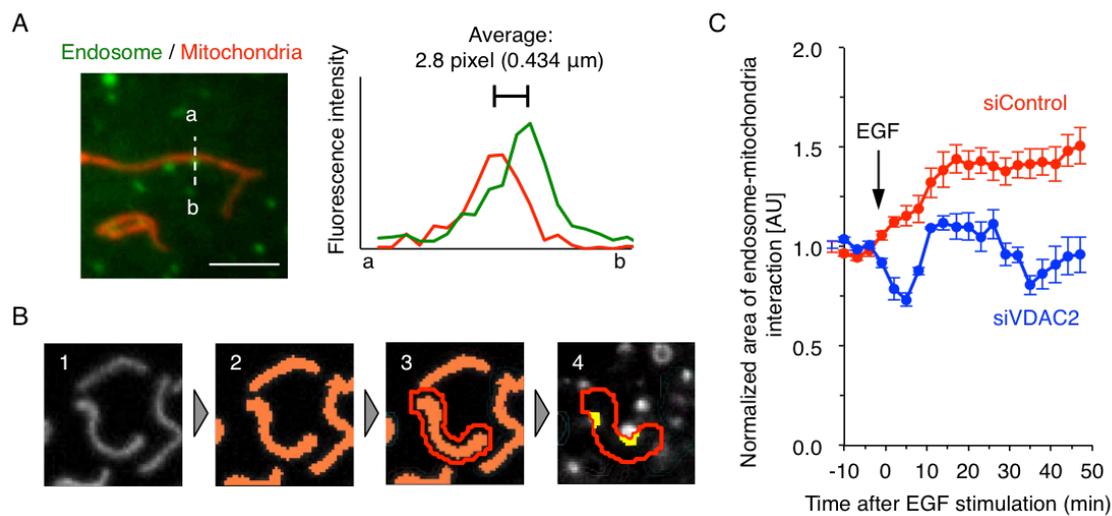


図 31: VDAC2 のノックダウンにより EGF 刺激依存的なミトコンドリア-エンドソーム間相互作用が抑制される

- A) ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の定義。EGFP-Rab5 と DsRed-Mito を導入した Cos-1 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。エンドソームとミトコンドリアが接触しているように見える箇所をラインスキャンして蛍光強度をプロットし、両者の蛍光強度のピーク間距離を測定した。測定した平均値から、ミトコンドリアの周囲 2 pixel (0.31 μm) 以内に位置するエンドソームはミトコンドリアと相互作用していると定義した。(Bar = 5 μm)
- B) ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の定量方法。取得したミトコンドリア画像に閾値を設定し、ミトコンドリアのマスク画像を作成した。マスク画像のミトコンドリアの周囲 2 pixel を拡大したマスク画像を新たに作成し、このマスク画像とエンドソームの画像と重ね合わせて共局在するエンドソームの面積を定量した。画像内の赤い領域は 2 pixel 拡大したミトコンドリアを示す。赤い領域内の黄色は、ミトコンドリアと相互作用するエンドソームの領域を示す。
- C) コントロール siRNA または siVDAC2 を導入して 48 時間培養した A431 細胞に、EGFP-Rab5 と DsRed-mito を導入して 24 時間培養した。4 時間血清飢餓処理後に 100 ng/ml の EGF で刺激し、共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。B の方法でミトコンドリアと相互作用するエンドソームの面積を定量し、撮影開始時の面積を 1 として規格化してプロットした。1 回の実験を行い、データは平均±標準誤差を示す (n ≥ 3)。

VDAC2 はエンドソームの酸性化に関与する

前項で、VDAC2 が EGF 刺激依存的なミトコンドリア-エンドソーム間相互作用に関与し、この相互作用がエンドサイトーシスを制御する可能性が示唆されたが、両者が相互作用した時に何が起きているのかは明らかになっていない。VDAC2 はミトコンドリアのアニオンチャネルと名付けられたが (Schein et al., 1976)、実際にはアニオンだけでなくカチオン (Pavlov et al., 2005) や小分子 (Zalman et al., 1980) も透過することが報告されている。VDAC2 がポアとしての機能することと、ミトコンドリアが ATP を産生する細胞小器官であることから、ミトコンドリアとエンドソームが相互作用した時に、VDAC2 を介してミトコンドリアから放出された ATP がエンドソーム上の V-ATPase に供給されることによってエンドソームの酸性化が促進するという仮説を立てた (図 32A)。この仮説を検証するため、次に VDAC2 がエンドソームの酸性化に関与するかを検討した。VDAC2 を過剰発現させた HeLa 細胞に pH 非感受性蛍光色素 (Alexa Fluor 488) と pH 感受性蛍光色素 (AcidiFluor™ ORANGE) で標識された 2 種類のデキストランを取り込ませ、それぞれの蛍光強度を定量した。VDAC2 の過剰発現によりデキストランの取り込み量が増加する結果が得られているため (図 22B)、AcidiFluor™ ORANGE 標識デキストランの蛍光強度を Alexa Fluor 488 標識デキストランの蛍光強度で割ることでエンドソームの酸性化を評価した。その結果、VDAC2 の過剰発現によりエンドソームの酸性化が促進された (図 32B、C)。

次に、EGF 刺激後のミトコンドリア内の ATP 濃度の変化を調べた。A431 細胞に mitoATeam1.03 を発現させ、血清飢餓処理後に EGF を添加してタイムラプス観察を行った。その結果、EGF 刺激直後にミトコンドリア内の ATP 濃度が減少し、若干回復した後また次第に減少していくことがわかった (図 33A)。VDAC2 をノックダウンした細胞で同様の実験を行ったところ、ノックダウン細胞はコントロールとほとんど同様の傾向を示した (図 33B)。

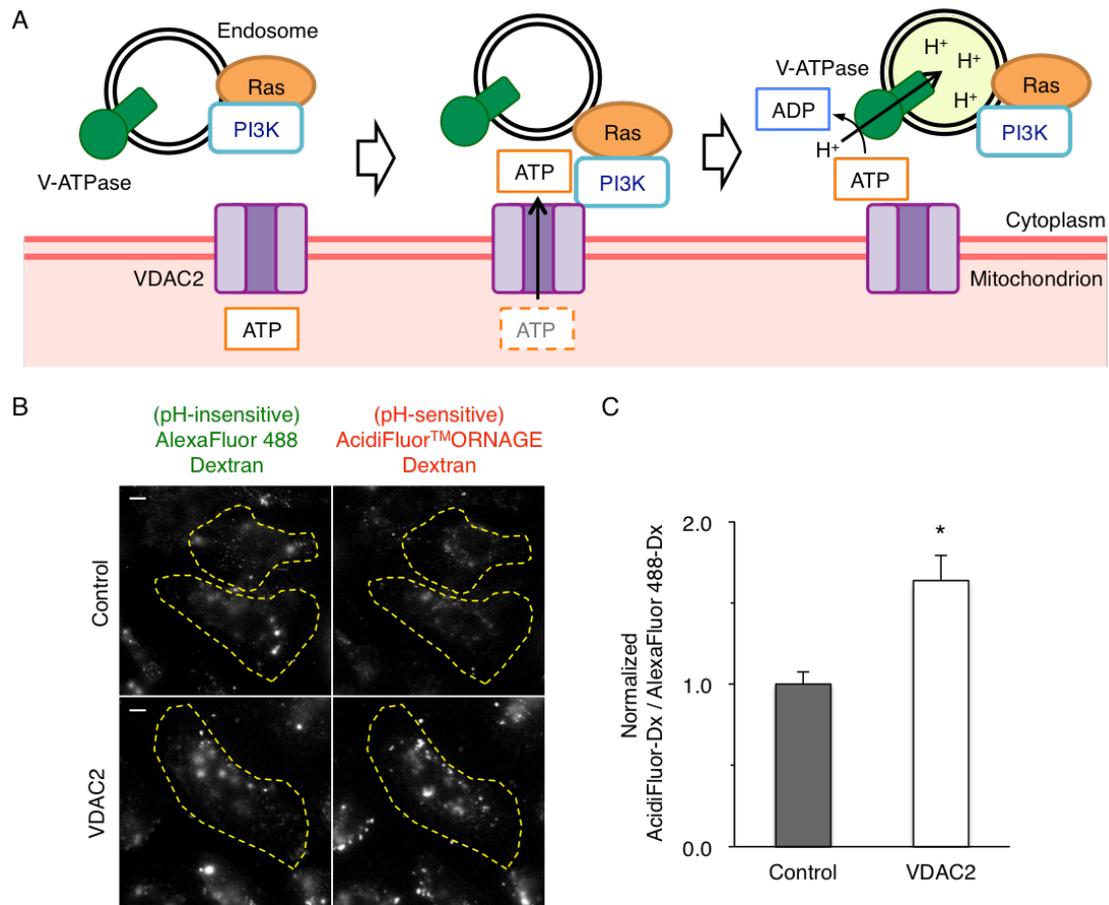


図 32: VDAC2 の過剰発現はエンドソームの酸性化を促進する

- A) ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドソーム酸性化促進の仮説。
- B) HeLa 細胞に HA-VDAC2 と CFP を導入し、24 時間培養した。500 $\mu\text{g/ml}$ の Alexa Fluor 546 標識デキストランと 200 $\mu\text{g/ml}$ の AcidiFluor™ ORANGE 標識デキストランを加えて 15 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、3%パラホルムアルデヒドで固定して蛍光顕微鏡で観察した。黄色い点線の領域は CFP 発現細胞を示す。(Bar = 10 μm)
- C) CFP 発現細胞の二つのデキストランの蛍光強度を定量した。AcidiFluor™ ORANGE デキストラン (AcidiFluor-Dx) の蛍光強度 / Alexa Fluor 488 デキストラン (Alexa Fluor 488-Dx) の蛍光強度を算出し、コントロール細胞を 1 と規格化してプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均 \pm 標準誤差を示す ($n \geq 80$)。* $P < 0.0005$ (Student's *t*-test)。

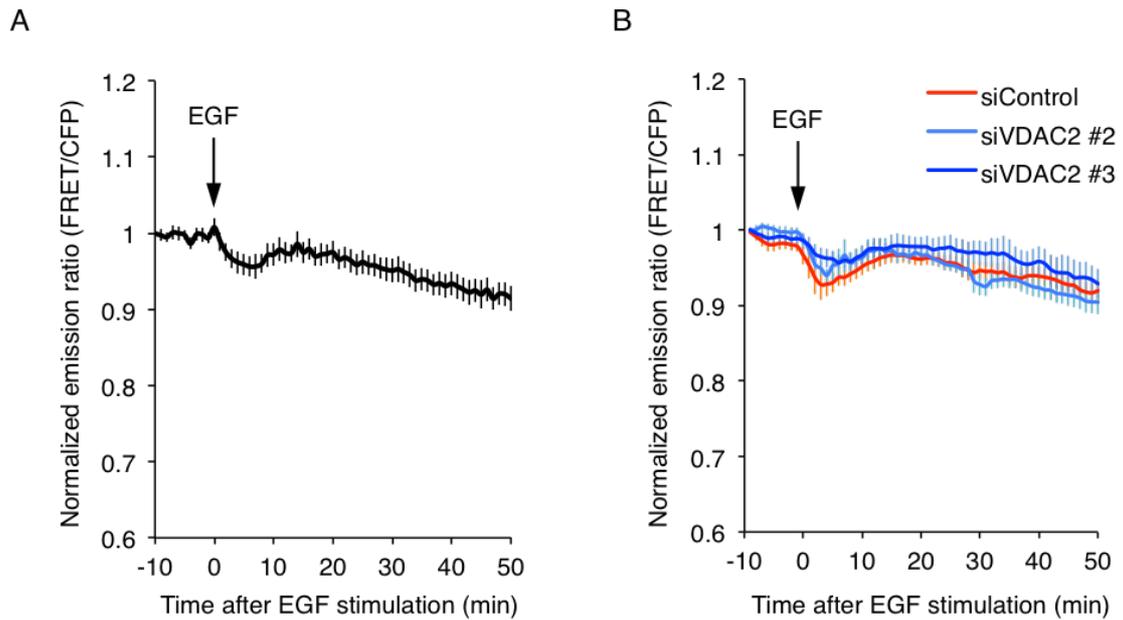


図 33: EGF 刺激後にミトコンドリア内の ATP 濃度が減少する

- A) A431 細胞に mitoATeam1.03 を導入して 24 時間培養した。4 時間血清飢餓処理後に 100 ng/ml の EGF で刺激し、蛍光顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。ミトコンドリア領域の CFP と FRET の蛍光強度を定量し、emission ratio (FRET/CFP) をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す (n = 13)。
- B) コントロール siRNA または siVDAC2 を導入して 48 時間培養した A431 細胞に、mitoATeam1.03 を導入して 24 時間培養した。C と同様の方法でタイムラプス観察を行い、emission ratio を算出した。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す (n ≥ 10)。

ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用はエンドソームの酸性化を促進する

最後に、光遺伝学的手法を用いてミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を誘導した時にエンドソームの酸性化が促進されるかを検証した。光遺伝学ツールとして用いられるシロイヌナズナの青色光受容体タンパク質である cryptochrome 2 (CRY2) は、青色光の照射により calcium-binding protein 1 (CIB1) と結合する性質を持つ (Kennedy et al., 2010)。CRY2 にエンドソームマーカーである FYVE ドメインを融合させ、CIB1 にはミトコンドリアマーカーである TOM20 を融合させたプラスミドを作製し、光刺激によってミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を誘導する光遺伝学ツールを開発した (図 34A)。このツールを発現させた HeLa 細胞を蛍光顕微鏡でタイムラプス観察し、観察中に 488 nm の光を照射してミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を誘導した。得られた画像からミトコンドリアとエンドソームが共局在する面積を定量したところ、光照射後に共局在の面積が増加し、ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の誘導が確認された (図 34B、C)。次に、ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用誘導後にエンドソームの酸性化が促進されるかを調べた。ツールを発現させた細胞に pH 感受性蛍光色素標識デキストランを取り込ませ、10 秒間光照射した後に蛍光顕微鏡で観察し、細胞内のデキストランの蛍光強度を定量した。光照射した細胞は非照射細胞と比較してデキストランの蛍光強度が高く、エンドソームの酸性化が促進した (図 34D)。以上の結果から、ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によりエンドソームの酸性化が促進されることが示唆された。

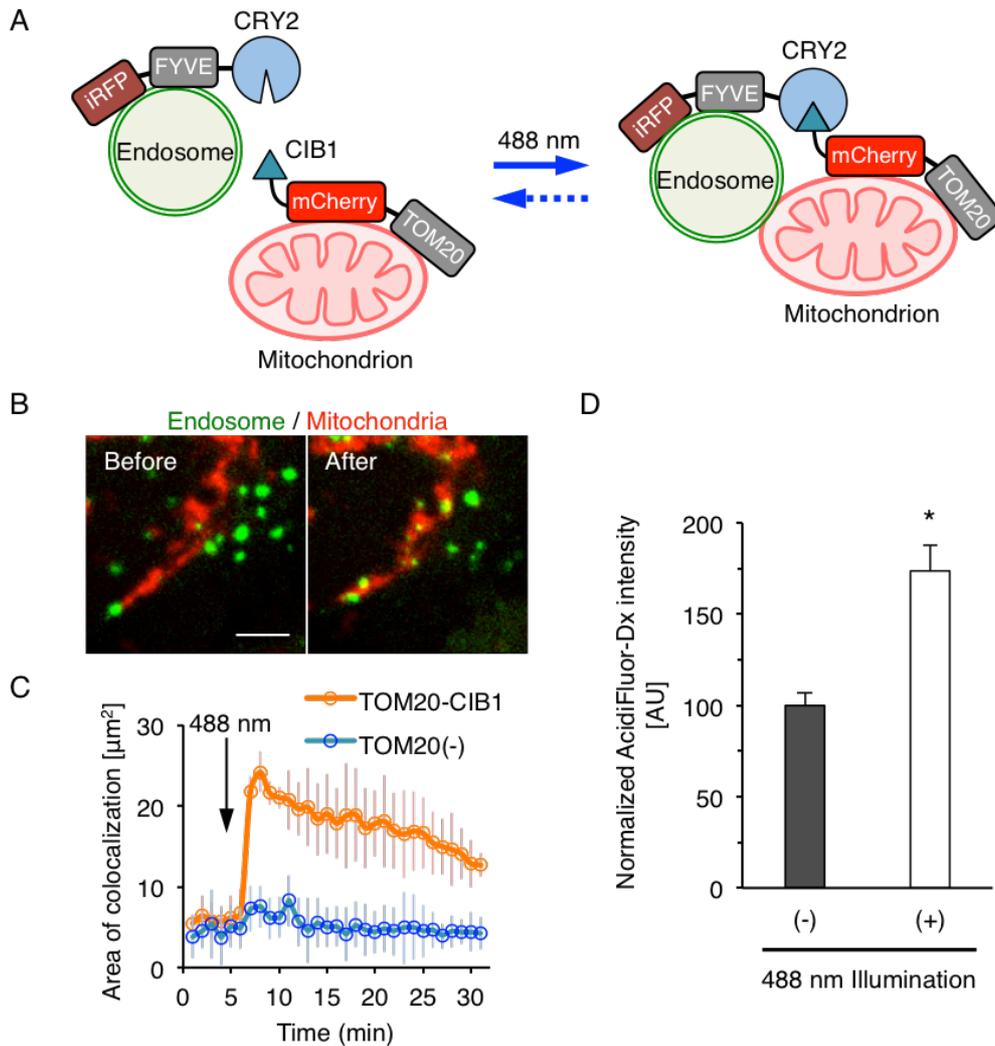


図 34: 光遺伝学により誘導したミトコンドリア-エンドソーム間相互作用はエンドソームの酸性化を促進する

- A) ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を誘導する光遺伝学ツールの模式図。
- B) HeLa 細胞に FYVE-iRFP-CRY2 と CIB1-RFP-TOM20 を導入して 24 時間培養し、蛍光顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。観察中に 488 nm の光を照射した。画像は光照射前後のミトコンドリアとエンドソームを示す。(Bar = 5 μm)
- C) B のデータから細胞内のミトコンドリアとエンドソームの領域を抽出し、両者が共局在する面積をプロットした。矢印は光照射を示す。
- D) FYVE-CFP-CRY2 と CIB1-iRFP-TOM20 を導入した A431 細胞に 200 μg/ml の AcidiFluor™ ORANGE 標識デキストラン (AcidiFluor-Dx) を加えて 10 分間インキュベートし、PBS で洗浄した。488 nm の光を 10 秒間照射し、蛍光顕微鏡で観察した。得られた画像からデキストランの蛍光強度をプロットした。3 回の独立した実験を行い、データは平均±標準誤差を示す (n = 14)。* $P < 0.0001$ (Student's t -test)。

【考察】

RAPEL 結合因子の網羅的探索によって同定されたミトコンドリア外膜のポアタンパク質である VDAC2 は、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とクラスリン非依存性エンドサイトーシスを制御した。また、生細胞内で Ras-PI3K 複合体が局在するエンドソームとミトコンドリアは相互作用していたことから、異なる細胞小器官どうしの相互作用がエンドサイトーシスを制御するという仮説が導き出された。生細胞内でミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の経時変化を観察したところ、EGF 刺激後にミトコンドリア-エンドソーム間相互作用が促進され、VDAC2 がこの相互作用に関与することが明らかになった。さらに、光遺伝学ツールを用いてミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を誘導すると、エンドソームの酸性化が促進された。以上の結果から、VDAC2 は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行と EGF 刺激依存的なミトコンドリア-エンドソーム間相互作用に関与し、この相互作用を介してエンドソームの酸性化を促進することが示唆された (図 35)。

当研究室の先行研究から、Ras-PI3K シグナルがクラスリン非依存性エンドサイトーシスを介したカーゴの取り込みとエンドソームの成熟化を促進することが報告されている (Tsutsumi et al., 2009; Fujioka et al., 2011)。本研究で同定した VDAC2 は、そのノックダウンにより Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在が抑制されたことから Ras-PI3K 複合体の上流因子であると考えられる。したがって、VDAC2 を介したエンドソームの成熟化促進は以下のような分子メカニズムが想定される。VDAC2-PI3K 間の結合を介したミトコンドリア-エンドソーム間相互作用により Ras-PI3K 複合体がエンドソーム上に繫留され、(1) ミトコンドリアからエンドソームに ATP 等のエンドソーム成熟化に必要な物質が供給される。(2) エンドソーム上で活性化した PI3K が PI(3,4,5)P₃ 等のイノシトールリン脂質を産生し、エンドソームの成熟化に必要な分子がリクルートされる。本研究で、EGF 刺激後にミトコンドリア内の ATP 濃度の減少が観察されたが (図 33A)、VDAC2 ノックダウン細胞とコントロール細胞の間で ATP 濃度の経時変化に顕著な差はみられなかった (図 33B)。しかし、本実験は細胞内の全ミトコンドリアを解析しており、エンドソームと相互作用している局所的なミトコンドリアの ATP 濃度の変化をとらえることはできていない。(1) の仮説を検証するためには、今後ミトコンドリア-エンドソーム相互作用部位での局所的な ATP 等の濃度変化を評価する必要がある。また、PI3K と VDAC2 の結合がミトコンドリア-

エンドソーム間相互作用およびエンドソームの成熟化促進に必要なことは証明されていないため、PI3K と結合できない VDAC2 変異体を作製し、VDAC2 ノックアウト細胞を用いたレスキュー実験を行うことで検証したい。(2) に関しては、イーストツーハイブリッド法により RAPEL 結合因子が複数同定されており、他の RAPEL 結合因子がエンドソームの成熟化を制御している可能性が考えられる。実際に、当研究室の他のプロジェクトで RAPEL 結合因子として同定された insulin receptor substrate 4 は、PH ドメインを介してエンドソーム上の PI(3)P に結合し、エンドサイトーシスを促進することが明らかになっている (論文投稿中)。今後は VDAC2 に加え同定された他の候補因子を解析することで、Ras-PI3K シグナルのエンドサイトーシス時空間制御のさらなる解明が期待される。

本研究で提唱したミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドソーム酸性化促進メカニズムの仮説では、ミトコンドリア-エンドソーム間で輸送される物質として ATP を想定した。しかし、ミトコンドリア内の ATP の濃度は細胞質よりも低いため (Imamura et al., 2009)、エンドソーム上の V-ATPase はミトコンドリアと相互作用せずとも効率良く ATP を消費できる環境におかれていると考えられる。したがって、ミトコンドリアとエンドソーム間相互作用がミトコンドリアからエンドソームへの ATP の供給に有利に働くならば、そのコンタクトサイトで ATP が濃縮されている可能性があり、今後検証する必要がある。

本研究では ATP のみを検討したが、ミトコンドリアの VDAC はさまざまなイオンや小分子、特に Ca^{2+} を透過することが多く報告されている (Báthori et al., 2006; Gincel et al., 2001; Tan and Colombini, 2007)。例えば、VDAC1 は小胞体とミトコンドリアのコンタクトサイトに局在し、小胞体の IP_3 受容体と相互作用して小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送を制御する (Szabadkai et al., 2006)。さらにマウス心房筋由来の HL-1 細胞において、VDAC2 をノックダウンするとミトコンドリアの Ca^{2+} の取り込み速度が減少するという報告もある (Subedi et al., 2011)。これらのことから、ATP 以外にも Ca^{2+} がミトコンドリア-エンドソーム間で輸送され、エンドソーム酸性化促進に関与していることが考えられる。エンドソームの酸性化と Ca^{2+} 濃度については、エンドソームの酸性化にしたがって Ca^{2+} 濃度が減少するという報告 (Gerasimenko et al., 1998) と、初期エンドソームより後期エンドソームの方が内部の Ca^{2+} 濃度が高いという報告 (Albrecht et al., 2015) があり、議論の余地が残されている。今後はミトコンドリア内またはエンドソーム内の Ca^{2+} をモニターするバイオセンサーを用いて Ca^{2+} に関しても

検証していきたい。

ミトコンドリアに局在する VDAC2 がエンドソームとの相互作用を介してエンドサイトーシスを制御すると示唆されたが、一方で VDAC2 はミトコンドリアや MDVs とは異なる顆粒構造にも局在することが明らかになった (図 26)。本研究の中ではこの顆粒構造が局在する細胞内小器官を特定できていないが、VDAC2 がミトコンドリア上だけでなく別の細胞小器官からもエンドサイトーシスを制御している可能性が考えられる。その可能性を検証するために、ライブセルイメージングにより Ras-PI3K 複合体と CFP-VDAC2 の挙動の観察を試みたが、CFP-VDAC2 はミトコンドリアではなく核と細胞質に局在してしまった (図 27A 上段)。その後検討を重ねて split GFP (split Cerulean) システムを導入し、蛍光タンパク質をタグしたミトコンドリア局在型 VDAC2 の作製に成功した (図 28B、C)。しかし、BiFC 法により可視化した Ras-PI3K 複合体と split Cerulean-VDAC2 を同時に観察したところ、split Cerulean-VDAC2 は単独発現の時とは異なり細胞質にびまん性に局在した。その理由は以下のように考えられる。蛍光タンパク質再構成法は様々な切断部位で再構成させることができる。Hu と Kerppola は、YFP の N 末端 173 アミノ酸の断片と CFP の C 末端 155 アミノ酸の断片の組み合わせでも再構成が起り、YFP の蛍光が観察されることを報告している (Hu and Kerppola, 2003)。このことから、細胞質の split Cerulean₁₋₁₀ が split Cerulean₁₁-VDAC2 よりも PI3KRBD-VC と結合して再構成してしまい、Ras-PI3K 複合体と VDAC2 を同時に観察できなかったと考えられる。以上より、Ras-PI3K 複合体と VDAC2 のライブセルイメージングは今後の課題である。

VDAC のアイソフォームすべてが RAPEL と相互作用したにもかかわらず、VDAC1/2/3 のトリプルノックダウンによるデキストラン取り込みの抑制は VDAC2 単独のノックダウンと同程度であった。このことから、VDAC のアイソフォームの中で VDAC2 のみがエンドサイトーシス制御に関与していることが示唆される。今後、VDAC1 および VDAC3 のノックダウン細胞を用いて Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行やエンドサイトーシスを評価することで、他のアイソフォームの機能についても明らかにしたい。

VDAC の三つのアイソフォームは同じ機能を持つとされるが (Sampson et al., 1997)、一方で VDAC2 のノックアウトマウスのみが生存不可能であり (Cheng et al., 2003)、その理由は明らかにされていない。本研究から、VDAC2 の新たな機能としてミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の制御が示唆された。VDAC1

と VDAC3 も同様の機能を有するかについては検証していないが、もしこの現象が VDAC2 特異的だとすれば、VDAC2 を介したミトコンドリア-エンドソーム間相互作用が生命にとって不可欠な生理機能に関わっていると考えられる。例えば、クラスリン非依存性エンドサイトーシスで取り込まれる glucose transporter 1 は血液脳関門から D-glucose を輸送し、脳へのグルコース供給に重要な役割を担っている (Augustin, 2010)。また、large neutral amino acids transporter small subunit 1 と呼ばれるアミノ酸トランスポーターもフェニルアラニンやトリプトファンなどの疎水性アミノ酸や L-DOPA を脳に輸送する機能を有し (Duelli et al., 2000; Kageyama et al., 2000)、クラスリン非依存性エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれる (Eyster et al., 2009)。VDAC2 は脳での発現が高いことから (Sampson et al., 1996)、VDAC2 のノックアウトによりミトコンドリア-エンドソーム間相互作用が制御するエンドサイトーシスが阻害され、その結果致死となる可能性が考えられる。

ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の機能に関して、両者が相互作用した時にエンドソームから鉄 (Das et al., 2016; Sheftel et al., 2007) やコレステロール (Charman et al., 2010) がミトコンドリアに輸送されるという報告はあるものの、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。また、この相互作用がパーキンソン病などのミトコンドリアやエンドソームの機能異常が原因とされる神経変性疾患に関与しているかについても未知である。今後は、蛍光イメージングをはじめとするあらゆる手法を駆使して、ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用のさらに詳細な分子メカニズムとその生理的意義に迫りたい。

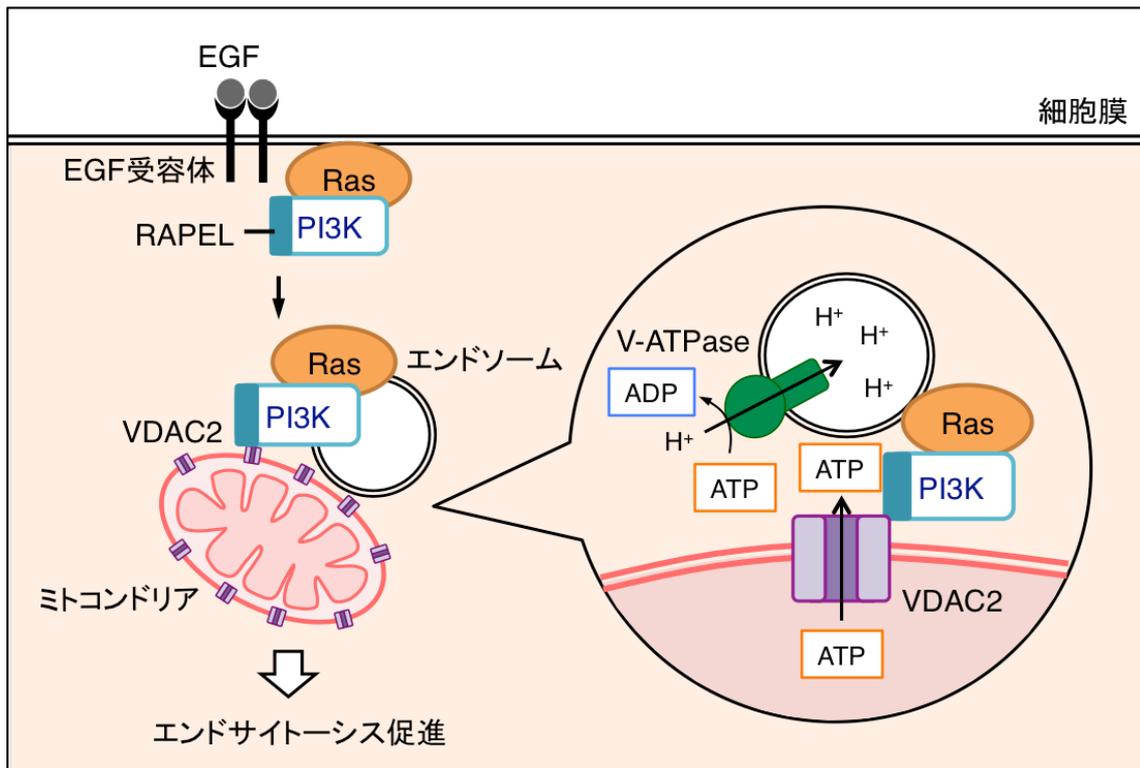


図 35: Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行メカニズムとミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドソーム酸性化促進の仮説

【総括および結論】

第 1 章

1. EGF 刺激依存的な Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を制御する PI3K の特異的配列 (RAPEL) を同定した。
2. RAPEL の過剰発現は Ras とその下流因子の結合および活性化に影響を与ることなく、クラスリン非依存性エンドサイトーシスおよびインフルエンザウイルスの侵入と感染を抑制した。
3. RAPEL の二つのリジン残基が RAPEL の機能を制御した。
4. 細胞膜透過型 RAPEL ペプチドを細胞に取り込ませることでインフルエンザウイルス感染が抑制された。

第 2 章

1. RAPEL の結合因子としてミトコンドリア外膜タンパク質 VDAC2 を同定した。
2. VDAC2 は EGF 刺激依存的な Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行およびクラスリン非依存性エンドサイトーシスを制御した。
3. VDAC2 はミトコンドリアだけでなく細胞内の顆粒構造にも局在した。
4. Ras-PI3K 複合体が局在するエンドソームはミトコンドリアと相互作用した。
5. VDAC2 は EGF 刺激依存的なミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を促進した。
6. ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用はエンドソームの酸性化を促進した。

【新知見の意義・今後の展望】

第 1 章で、PI3Kp110 γ の Ras 結合ドメイン内に Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を制御する RAPEL が同定され、Ras-PI3K シグナルの新たな時空間制御メカニズムが見出された。さらに、RAPEL の過剰発現はエンドソームで活性化する Ras-PI3K シグナルのみを阻害し、Erk や Akt などの下流シグナルの活性化には影響しなかった。このことは、RAPEL が正常な細胞機能に大きな影響を与えることなくインフルエンザウイルス感染を抑制できる、すなわち副作用の少ない抗ウイルス薬となり得ることを示している。抗ウイルス薬としての RAPEL をより現実的にするために、今後はマウスモデルを用いて *in vivo* で RAPEL ペプチドの効果を検証することが必要である。

第2章で、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行はミトコンドリア外膜タンパク質である VDAC2 によって制御されること、および VDAC2 を介してミトコンドリア-エンドソームが相互作用し、エンドソームが酸性化することが示唆された。今後は、エンドソーム内の pH をモニターするバイオセンサーを用いて、ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用後のエンドソームの酸性化を観察し、この仮説をさらに検証したい。

細胞小器官は細胞生理機能に必須の役割を担っており、それぞれが独立して機能すると考えられてきた。しかし近年、小胞体とミトコンドリア (Friedman et al., 2011; Hamasaki et al., 2013; Horner et al., 2011; Vance, 2014)、リソソームとペルオキシソーム (Chu et al., 2015)、小胞体とエンドソーム (Raiborg et al., 2015; Rowland et al., 2014) などの異なる細胞小器官の相互作用が報告されており、これらの相互作用によって発揮される細胞生理機能が注目されつつある。本研究は当初、シグナル伝達の時空間制御機構を明らかにする目的で進められたが、予想外にミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドサイトーシス制御という新しい細胞生理機能の制御機構を見出した。今後は、ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を制御する分子メカニズムとその生理学的意義、疾患との関連を明らかにする。さらに、さまざまな細胞小器官の相互作用がどのように細胞の恒常性維持に寄与しているのかを解明していきたい。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、修士課程から長きにわたり御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究院・医学院細胞生理学教室の教授大場雄介先生に厚く御礼申し上げます。また、大場先生とともに修士課程から6年間、実験の基礎から丁寧に御指導してくださいました北海道大学大学院医学研究院・医学院細胞生理学教室の講師藤岡容一郎先生に深く御礼申し上げます。そして、日々の研究の中で知識や思考力の向上に多大に貢献してくださいました北海道大学大学院医学研究院・医学院細胞生理学教室OBの堀内浩水氏(現北海道大学URAステーションURA)、ならびに教室員の皆様に心より感謝を申し上げます。

【利益相反】

開示すべき利益相反状態はない。

【引用文献】

- Albrecht, T., Zhao, Y., Nguyen, T.H., Campbell, R.E., and Johnson, J.D. (2015). Fluorescent biosensors illuminate calcium levels within defined beta-cell endosome subpopulations. *Cell Calcium* 57, 263–274.
- Allison, R., Edgar, J.R., Pearson, G., Rizo, T., Newton, T., Günther, S., Berner, F., Hague, J., Connell, J.W., Winkler, J., et al. (2017). Defects in ER-endosome contacts impact lysosome function in hereditary spastic paraplegia. *J. Cell Biol.* 216, 1337–1355.
- Anflous, K., Armstrong, D.D., and Craigen, W.J. (2001). Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 276, 1954–1960.
- Augustin, R. (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62, 315–333.
- Báthori, G., Csordás, G., Garcia-Perez, C., Davies, E., and Hajnóczky, G. (2006). Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *J. Biol. Chem.* 281, 17347–17358.
- Berkers, C.R., van Leeuwen, F.W.B., Groothuis, T.A., Peperzak, V., van Tilburg, E.W., Borst, J., Neefjes, J.J., and Ovaas, H. (2007). Profiling proteasome activity in tissue with fluorescent probes. *Mol. Pharm.* 4, 739–748.
- Blachly-Dyson, E., Baldini, A., Litt, M., McCabe, E.R., and Forte, M. (1994). Human genes encoding the voltage-dependent anion channel (VDAC) of the outer mitochondrial membrane: mapping and identification of two new isoforms. *Genomics* 20, 62–67.
- Blachly-Dyson, E., Song, J., Wolfgang, W.J., Colombini, M., and Forte, M. (1997). Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5727–5738.

- Boguski, M.S., and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643–654.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865–877.
- Boyartchuk, V.L., Ashby, M.N., and Rine, J. (1997). Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science* 275, 1796–1800.
- Cabantous, S., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2004). Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 23, 102–107.
- Charman, M., Kennedy, B.E., Osborne, N., and Karten, B. (2010). MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick Type C1 protein. *J. Lipid Res.* 51, 1023–1034.
- Cheng, E.H.Y., Sheiko, T.V., Fisher, J.K., Craigen, W.J., and Korsmeyer, S.J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 301, 513–517.
- Chiu, V.K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J.B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R.L., Cox, A.D., and Philips, M.R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell Biol.* 4, 343–350.
- Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D., and Zerial, M. (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397, 621–625.
- Chu, B.-B., Liao, Y.-C., Qi, W., Xie, C., Du, X., Wang, J., Yang, H., Miao, H.-H., Li, B.-L., and Song, B.-L. (2015). Cholesterol transport through lysosome-peroxisome membrane contacts. *Cell* 161, 291–306.
- Colombini, M. (2016). The VDAC channel: Molecular basis for selectivity. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2498–2502.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44.

- Das, A., Nag, S., Mason, A.B., and Barroso, M.M. (2016). Endosome-mitochondria interactions are modulated by iron release from transferrin. *J. Cell Biol.* *214*, 831–845.
- de Vries, E., Tscherne, D.M., Wienholts, M.J., Cobos-Jiménez, V., Scholte, F., García-Sastre, A., Rottier, P.J.M., and de Haan, C.A.M. (2011). Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog.* *7*, e1001329.
- Dihanich, M., Suda, K., and Schatz, G. (1987). A yeast mutant lacking mitochondrial porin is respiratory-deficient, but can recover respiration with simultaneous accumulation of an 86-kd extramitochondrial protein. *EMBO J.* *6*, 723–728.
- Duelli, R., Enerson, B.E., Gerhart, D.Z., and Drewes, L.R. (2000). Expression of large amino acid transporter LAT1 in rat brain endothelium. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *20*, 1557–1562.
- Eyster, C.A., Higginson, J.D., Huebner, R., Porat-Shliom, N., Weigert, R., Wu, W.W., Shen, R.-F., and Donaldson, J.G. (2009). Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. *Traffic* *10*, 590–599.
- Frankel, A.D., and Pabo, C.O. (1988). Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* *55*, 1189–1193.
- Frankel, P., Aronheim, A., Kavanagh, E., Balda, M.S., Matter, K., Bunney, T.D., and Marshall, C.J. (2005). RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. *EMBO J.* *24*, 54–62.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* *334*, 358–362.
- Fujioka, Y., Tsuda, M., Hattori, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Miyazaki, T., and Ohba, Y. (2011). The Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. *PLoS ONE* *6*, e16324.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides

- having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* *276*, 5836–5840.
- Gao, C., Mao, S., Ditzel, H.J., Farnaes, L., Wirsching, P., Lerner, R.A., and Janda, K.D. (2002). A cell-penetrating peptide from a novel pVII-pIX phage-displayed random peptide library. *Bioorg. Med. Chem.* *10*, 4057–4065.
- Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., and Gerasimenko, O.V. (1998). Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr. Biol.* *8*, 1335–1338.
- Giedt, R.J., Fumene Feruglio, P., Pathania, D., Yang, K.S., Kilcoyne, A., Vinegoni, C., Mitchison, T.J., and Weissleder, R. (2016). Computational imaging reveals mitochondrial morphology as a biomarker of cancer phenotype and drug response. *Sci. Rep.* *6*, 32985.
- Gincel, D., Zaid, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem. J.* *358*, 147–155.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* *495*, 389–393.
- Hancock, J.F., Cadwallader, K., Paterson, H., and Marshall, C.J. (1991). A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J.* *10*, 4033–4039.
- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E., and Marshall, C.J. (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* *57*, 1167–1177.
- Hawkins, P.T., Jackson, T.R., and Stephens, L.R. (1992). Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P₃ by activating a PtdIns(4,5)P₂ 3-OH kinase. *Nature* *358*, 157–159.

- Horner, S.M., Liu, H.M., Park, H.S., Briley, J., and Gale, M. (2011). Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 14590–14595.
- Hu, C.-D., and Kerppola, T.K. (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.* *21*, 539–545.
- Imamura, H., Nhat, K.P.H., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., and Noji, H. (2009). Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 15651–15656.
- Kageyama, T., Nakamura, M., Matsuo, A., Yamasaki, Y., Takakura, Y., Hashida, M., Kanai, Y., Naito, M., Tsuruo, T., Minato, N., et al. (2000). The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Res.* *879*, 115–121.
- Kameyama, S., Horie, M., Kikuchi, T., Omura, T., Tadokoro, A., Takeuchi, T., Nakase, I., Sugiura, Y., and Futaki, S. (2007). Acid wash in determining cellular uptake of Fab/cell-permeating peptide conjugates. *Biopolymers* *88*, 98–107.
- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* *9*, 517–531.
- Kennedy, M.J., Hughes, R.M., Peteya, L.A., Schwartz, J.W., Ehlers, M.D., and Tucker, C.L. (2010). Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat. Methods* *7*, 973–975.
- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* *255*, 2273–2276.
- Koppel, D.A., Kinnally, K.W., Masters, P., Forte, M., Blachly-Dyson, E., and Mannella, C.A. (1998). Bacterial expression and characterization of the mitochondrial outer

membrane channel. Effects of n-terminal modifications. *J. Biol. Chem.* *273*, 13794–13800.

Kular, G., Loubtchenkov, M., Swigart, P., Whatmore, J., Ball, A., Cockcroft, S., and Wetzker, R. (1997). Co-operation of phosphatidylinositol transfer protein with phosphoinositide 3-kinase gamma in the formylmethionyl-leucylphenylalanine-dependent production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in human neutrophils. *Biochem. J.* *325 (Pt 2)*, 299–301.

Langemeyer, L., Fröhlich, F., and Ungermann, C. (2018). Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis. *Trends Cell Biol* 1–14.

Li, Y., Guo, A., and Li, H. (2016). CRASP: CFP reconstitution across synaptic partners. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *469*, 352–356.

Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J. Cell Biol.* *91*, 601–613.

Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* *8*, 603–612.

Mesmin, B. (2016). Mitochondrial lipid transport and biosynthesis: A complex balance. *J. Cell Biol.* *214*, 9–11.

Messina, A., Reina, S., Guarino, F., Magri, A., Tomasello, F., Clark, R.E., Ramsay, R.R., and De Pinto, V. (2014). Live cell interactome of the human voltage dependent anion channel 3 (VDAC3) revealed in HeLa cells by affinity purification tag technique. *Mol. Biosyst.* *10*, 2134–2145.

Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A., and Matsuda, M. (2001). Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* *411*, 1065–1068.

Murphy, J.E., Padilla, B.E., Hasdemir, B., Cottrell, G.S., and Bunnett, N.W. (2009). Endosomes: a legitimate platform for the signaling train. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 17615–17622.

Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G., and Futaki, S. (2008). Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *60*, 598–607.

Nakashima, S., Morinaka, K., Koyama, S., Ikeda, M., Kishida, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kishida, S., and Kikuchi, A. (1999). Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *EMBO J.* *18*, 3629–3642.

Ohba, Y., Kurokawa, K., and Matsuda, M. (2003). Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* *22*, 859–869.

Ohkuma, S., Moriyama, Y., and Takano, T. (1982). Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *79*, 2758–2762.

Ong, S.H., Hadari, Y.R., Gotoh, N., Guy, G.R., Schlessinger, J., and Lax, I. (2001). Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 6074–6079.

Pavlov, E., Grigoriev, S.M., Dejean, L.M., Zweihorn, C.L., Mannella, C.A., and Kinnally, K.W. (2005). The mitochondrial channel VDAC has a cation-selective open state. *Biochim. Biophys. Acta* *1710*, 96–102.

Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M., and Rangel, U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J.* *1*, 67–77.

Prior, I.A., Lewis, P.D., and Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* *72*, 2457–2467.

Raghavan, A., Sheiko, T., Graham, B.H., and Craigen, W.J. (2012). Voltage-dependant anion channels: Novel insights into isoform function through genetic models. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* *1818*, 1477–1485.

- Raiborg, C., Wenzel, E.M., Pedersen, N.M., Olsvik, H., Schink, K.O., Schultz, S.W., Vietri, M., Nisi, V., Bucci, C., Brech, A., et al. (2015). Repeated ER-endosome contacts promote endosome translocation and neurite outgrowth. *Nature* 520, 234–238.
- Rehman, J., Zhang, H.J., Toth, P.T., Zhang, Y., Marsboom, G., Hong, Z., Salgia, R., Husain, A.N., Wietholt, C., and Archer, S.L. (2012). Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J.* 26, 2175–2186.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 13, 566–578.
- Robbins, D.J., Cheng, M., Zhen, E., Vanderbilt, C.A., Feig, L.A., and Cobb, M.H. (1992). Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6924–6928.
- Rothbard, J.B., Jessop, T.C., Lewis, R.S., Murray, B.A., and Wender, P.A. (2004). Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 9506–9507.
- Rowland, A.A., Chitwood, P.J., Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2014). ER contact sites define the position and timing of endosome fission. *Cell* 159, 1027–1041.
- Sakai, N., and Matile, S. (2003). Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14348–14356.
- Sampson, M.J., Decker, W.K., Beaudet, A.L., Ruitenbeek, W., Armstrong, D., Hicks, M.J., and Craigen, W.J. (2001). Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J. Biol. Chem.* 276, 39206–39212.
- Sampson, M.J., Lovell, R.S., and Craigen, W.J. (1996). Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. *Genomics* 33, 283–288.

Sampson, M.J., Lovell, R.S., and Craigen, W.J. (1997). The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. *J. Biol. Chem.* *272*, 18966–18973.

Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R.G., Oliveira-dos-Santos, A.J., Stanford, W.L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I., et al. (2000). Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* *287*, 1040–1046.

Schein, S.J., Colombini, M., and Finkelstein, A. (1976). Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J. Membr. Biol.* *30*, 99–120.

Schredelseker, J., Paz, A., López, C.J., Altenbach, C., Leung, C.S., Drexler, M.K., Chen, J.-N., Hubbell, W.L., and Abramson, J. (2014). High resolution structure and double electron-electron resonance of the zebrafish voltage-dependent anion channel 2 reveal an oligomeric population. *J. Biol. Chem.* *289*, 12566–12577.

Scott, C.C., and Gruenberg, J. (2011). Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH. *Bioessays* *33*, 103–110.

Sheftel, A.D., Zhang, A.-S., Brown, C., Shirihai, O.S., and Ponka, P. (2007). Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood* *110*, 125–132.

Shin, H.-W., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M.R., Modregger, J., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Nystuen, A., et al. (2005). An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J. Cell Biol.* *170*, 607–618.

Sieczkarski, S.B., and Whittaker, G.R. (2002). Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* *76*, 10455–10464.

Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* *9*, 59–71.

Soubannier, V., Rippstein, P., Kaufman, B.A., Shoubridge, E.A., and McBride, H.M. (2012). Reconstitution of mitochondria derived vesicle formation demonstrates selective enrichment of oxidized cargo. *PLoS ONE* 7, e52830.

Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B.H., and D'Arrigo, A. (1996). Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J. Biol. Chem.* 271, 24048–24054.

Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., et al. (1997). The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89, 105–114.

Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., and Nürnberg, B. (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269, 690–693.

Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I. (1983). Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306, 67–69.

Subedi, K.P., Kim, J.-C., Kang, M., Son, M.-J., Kim, Y.-S., and Woo, S.-H. (2011). Voltage-dependent anion channel 2 modulates resting Ca^{2+} sparks, but not action potential-induced Ca^{2+} signaling in cardiac myocytes. *Cell Calcium* 49, 136–143.

Sugiura, A., McLelland, G.-L., Fon, E.A., and McBride, H.M. (2014). A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J.* 33, 2142–2156.

Suire, S., Coadwell, J., Ferguson, G.J., Davidson, K., Hawkins, P., and Stephens, L. (2005). p84, a New $G\beta\gamma$ -Activated Regulatory Subunit of the Type IB Phosphoinositide 3-Kinase p110 γ . *Curr. Biol.* 15, 566–570.

Swarthout, J.T., Lobo, S., Farh, L., Croke, M.R., Greentree, W.K., Deschenes, R.J., and Linder, M.E. (2005). DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras. *J. Biol. Chem.* *280*, 31141–31148.

Szabadkai, G., Bianchi, K., Varnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J. Cell Biol.* *175*, 901–911.

Tan, W., and Colombini, M. (2007). VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim. Biophys. Acta* *1768*, 2510–2515.

Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., and Zhao, J.J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 7–24.

Tsutsumi, K., Fujioka, Y., Tsuda, M., Kawaguchi, H., and Ohba, Y. (2009). Visualization of Ras-PI3K interaction in the endosome using BiFC. *Cell. Signal.* *21*, 1672–1679.

Tünnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R.M., Stöckl, M., Herrmann, A., and Cardoso, M.C. (2008). Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J. Pept. Sci.* *14*, 469–476.

Urano, T., Emkey, R., and Feig, L.A. (1996). Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J.* *15*, 810–816.

Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* *265*, 7248–7256.

Vance, J.E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* *1841*, 595–609.

Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., and Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* *13*, 195–203.

Vojtek, A.B., and Der, C.J. (1998). Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *273*, 19925–19928.

Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., and Cooper, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74, 205–214.

Wang, C., and Youle, R.J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu. Rev. Genet.* 43, 95–118.

Watanabe, T., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2010). Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe* 7, 427–439.

Worby, C.A., and Dixon, J.E. (2002). Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 919–931.

Zalman, L.S., Nikaido, H., and Kagawa, Y. (1980). Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. *J. Biol. Chem.* 255, 1771–1774.