

# EGF 受容体によるエンドソームダイナミクスの制御

東京女子医科大学 総合研究所  
田邊 賢司

## 1. 序論

上皮成長因子受容体 (EGF受容体) は多様な細胞でその発現が認められ、そのリガンドであるEGFに結合することで細胞の増殖/分化を誘導する受容体型チロシンキナーゼのひとつである。多くのがんでEGF受容体の過剰発現や遺伝子変異が見つかっており、世界中の研究者がEGF受容体の下流のシグナル伝達機構解明に取り組んでいる。活性化されたEGF受容体は細胞内に取り込まれ、細胞内小器官の一つである初期エンドソームに到達する。その後、初期エンドソームはその膜構造を変化させながら細胞内を移動し(エンドソームダイナミクス)、様々な部位へシグナルを伝えるプラットフォームとして機能する。EGF受容体もこの「シグナリング・エンドソーム」を介してシグナルを様々な場所に伝えている。

我々はこれまでエンドソームダイナミクスを制御するタンパク質の同定/解析を行なっており、脂質膜形成を司るダイナミンや、膜伸展の張力に関わるアクチンとその制御因子であるコルタクチンを同定した (Mesaki and Tanabe et al., PLoS ONE 2011, Ohashi and Tanabe et al., PLoS ONE 2011, Tanabe et al., CIB, 2011)。最近我々は、これらタンパク質の足場として働くリン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール4リン酸 (PI(4)P) が初期エンドソーム上に局在することを見出した (未発表データ)。一方、PI(4)Pを生成するホスファチジルイノシトール4キナーゼ (PI4K) のアイソフォームであるPI4KII  $\alpha$  がエンドソーム上に局在し、活性化したEGF受容体と複合体を形成することが報告されている (Minogue et al., J. Cell Sci. 2005)。本研究では、PI4KII  $\alpha$  がエンドソーム上のPI(4)P産生を担っているのか、さらに初期エンドソーム輸送への関与を解析し、EGF受容体による細胞内輸送制御の可能性について検討した。

## 2. 方法

### ・細胞培養

HeLa細胞 (東北大加齢医学研究所医用細胞資源センターより分与) をDMEM/10%ウシ胎児血清/ペニシリン・ストレプトマイシン添加培地にて37°C、5%CO<sub>2</sub>で培養した。

### ・siRNAトランスフェクション

PI4KII  $\alpha$  特異的siRNAおよびネガティブコントロールsiRNAはAmbion社より入手した。カバースリップ上に培養したHeLa細胞にLipofectamine2000 (Invitrogen社) を用いてトランスフェクションし、48~72時間後に解析を行った。

### ・免疫蛍光染色

カバースリップ上に培養したHeLa細胞を3.7%ホルマリンで固定し、Hammondらの方法に従って免疫染色を行った (Hammond et al., 2009)。1次抗体として抗EEA1抗体 (CST社)、抗PI(4)P抗体 (Echelon社)、抗PI4KII  $\alpha$  抗体 (英UCL・Minogue博士より分与) を用いた。2次抗体にはAlexa488標識ロバ抗ウサギIgG抗体、Alexa555標識ヤギ抗マウスIgM抗体、Alexa488ロバ抗マウスIgG抗体 (全てモレキュラープローブ社) を用いた。

### ・標識リガンド輸送アッセイ

siRNAを導入したHeLa細胞を血清飢餓培地 (DMEM, 0.1%BSA) で1時間培養した後、Alexa488標識トランスフェリンおよびAlexa555標識EGF (Invitrogen社) を含む培地に交換し、氷上で1時間細胞をラベルした。その後、標識リガンドを含まないDMEM/10%FBS培地に交換し、37°Cで培養した。一定時間後に3.7%ホルマリンで固定し、PBSで洗浄後、スライドガラスにマウントし共焦点顕微鏡にて観察した。

## 3. 結果

### ・PI4KII $\alpha$ の発現抑制によるPI(4)Pの変化

エンドソーム上に局在することが報告されているPI4KII  $\alpha$  について、その発現が細胞内のPI(4)P産生に寄与しているのかを調べるため、siRNAを用いた発現抑制を行った。siRNA導入細胞において抗PI(4)P抗体と初期エンドソームのマーカーであるEEA1の抗体で二重染色を行ったところ、PI4KII  $\alpha$  特異的siRNAを導入した場合にのみ初期エンドソーム上のPI(4)Pが消失している事が確認できた。一方、

ゴルジ体と思われる核周囲のシグナルは残存していることから、PI4KII  $\alpha$  はエンドソーム上のPI(4)P産生に重要と考えられる。

・PI4KII  $\alpha$  の発現抑制によるリガンド輸送への影響

次にPI4KII  $\alpha$  が初期エンドソームからの輸送に必須かを検討するため、PI4KII  $\alpha$  発現抑制細胞を用いて標識リガンドを用いた輸送解析を行った。リサイクル経路をたどるトランスフェリン (Tfn) と分解経路をたどるEGFそれぞれを異なる蛍光で標識し、細胞内に取り込ませたあと、一定時間経過後の細胞内局在を観察した(図2a)。コントロールsiRNAを導入した細胞では10分後にTfnとEGFが初期エンドソーム上で共局在しているが、60分後にはTfnはリサイクルされるためシグナルが消失し、EGFはリソソームに向かう分解経路をたどるため、細胞内にとどまっている。一方、PI4KII  $\alpha$  発現抑制細胞では60分後もTfnとEGFが共局在したままとまっている(図2b)。細胞内にとどまっているTfnは初期エンドソームのマーカーであるEEA1と共局在していた(図2c)。以上の結果はPI4KII  $\alpha$  の発現抑制によって初期エンドソームからの輸送が阻害されていることを示しており、PI4KII  $\alpha$  が細胞内輸送に重要な役割を担っていることを示唆している。

#### 4. 考察・まとめ

本研究では、エンドソーム上のPI(4)P産生を担っている分子としてPI4KII  $\alpha$  を同定し、初期エンドソームにおける輸送に必須の分子であることを示した。PI4KII  $\alpha$  は活性化したEGF受容体と複合体を形成することから、初期エンドソーム上のEGF受容体がPI4KII  $\alpha$  を介して自身の細胞内輸送を制御していると考えられる。EGF受容体の細胞内膜輸送は受容体からのシグナル伝達を時間的/空間的に制御することから、シグナル伝達制御のカギを握る分子としてさらなる分子メカニズムの解明が期待される。

#### 5. 発表論文、参考文献

- 1) Mesaki, K., Tanabe, K., Obayashi, M., Oe, N., & Takei, K. (2011). *PLoS ONE*, 6(5), e19764.
- 2) Ohashi, E., Tanabe, K., Henmi, Y., Mesaki, K., Kobayashi, Y., & Takei, K. (2011). *PLoS ONE*, 6(5), e19942.
- 3) Tanabe, K., Ohashi, E., Henmi, Y., & Takei, K. (2011). *Communicative & Integrative Biology*, 4, 742-744.
- 4) Minogue, S., Waugh, M. G., Matteis, M. A. De, Stephens, D. J., Berditchevski, F., & Hsuan, J. J. (2006). *J Cell Sci*, 119, 571-581.

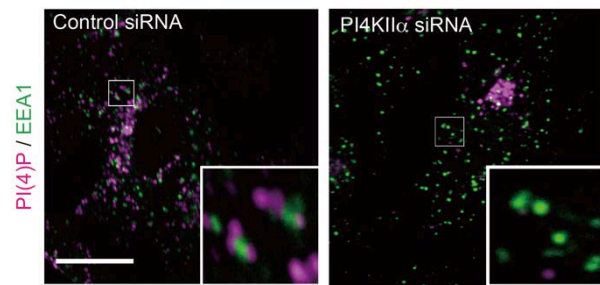


図1 PI4KII  $\alpha$  発現抑制細胞におけるPI(4)PコントロールsiRNAまたはPI4KII  $\alpha$  特異的siRNAを導入した細胞を抗PI(4)P抗体(マゼンダ)および抗EEA1抗体(緑)で染色した。

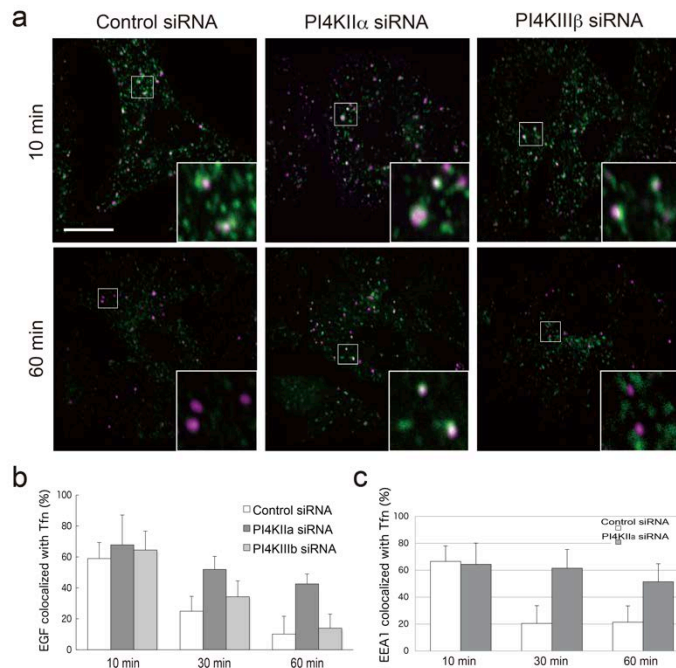


図2 PI4KII  $\alpha$  発現抑制細胞における標識リガンドの輸送コントロールsiRNAまたはPI4KII  $\alpha$  特異的siRNAを導入した細胞に蛍光標識したトランスフェリン(緑)とEGF(マゼンダ)を取り込ませ、経時変化を観察した(a)。トランスフェリンとEGF(b)またはEEA1(c)との共局在率を定量化した。