

# 共焦点顕微鏡が捉えた、リサイクリングエンドソームのダイナミックな膜変形

リサイクリングエンドソームをチューブ状に長く伸ばす膜変形は、細胞膜表面から細胞内に取り込まれた受容体や接着分子などの機能分子が再び細胞膜表面へとリサイクルされる際に重要な役割を担っており、細胞増殖、運動、分化など多彩な細胞機能に寄与している。そのため、種々の機能分子のリサイクリング機構の破綻は、組織・器官形成の異常やがん転移に関わっていると考えられる。複数の分子がリサイクリングエンドソームのチューブ構造の形成に関係していることが知られているが、その詳細な分子機序は不明なままである。

徳島大学大学院医学研究科生化学分野の坂根亜由子先生、佐々木卓也先生らは、細胞内での分子輸送に関わる小器官(オルガネラ)のひとつであるリサイクリングエンドソームがダイナミックな膜変形を引き起こす仕組みを新たに見出した。

共焦点顕微鏡は、通常の共焦点画像取得に加えて、3次元構築、タイムラプスイメージング、FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching : 光褪色後蛍光回復法) など様々なアプリケーションにおいて解像度の良い画像を取得可能であり、坂根先生らの研究においてリサイクリングエンドソームの膜変形を捉え、その分子機序を明らかにすることに貢献した。本アプリケーションノートでは、坂根先生らの発見について、共焦点顕微鏡による寄与を中心にご紹介する。

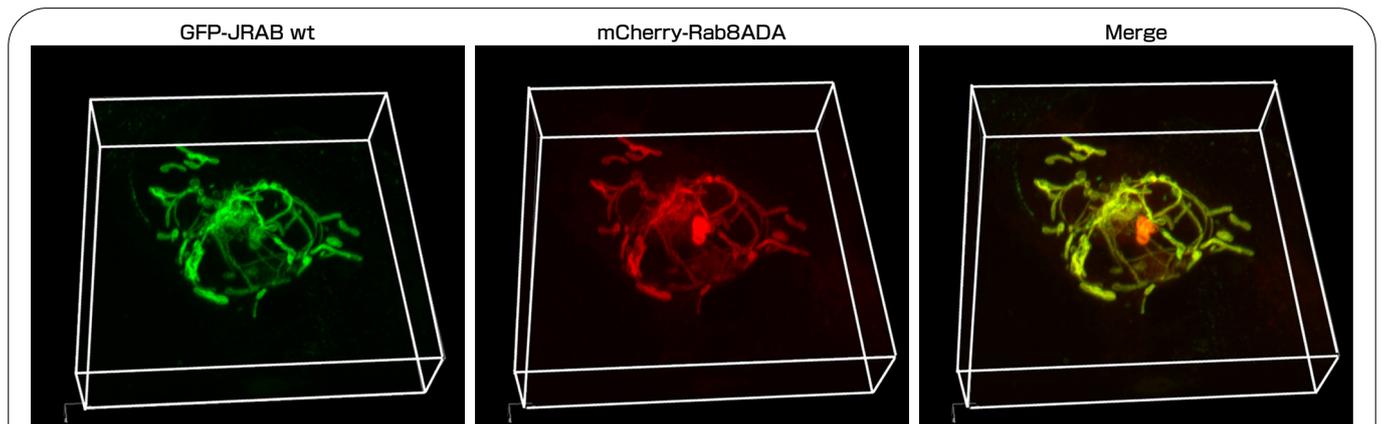
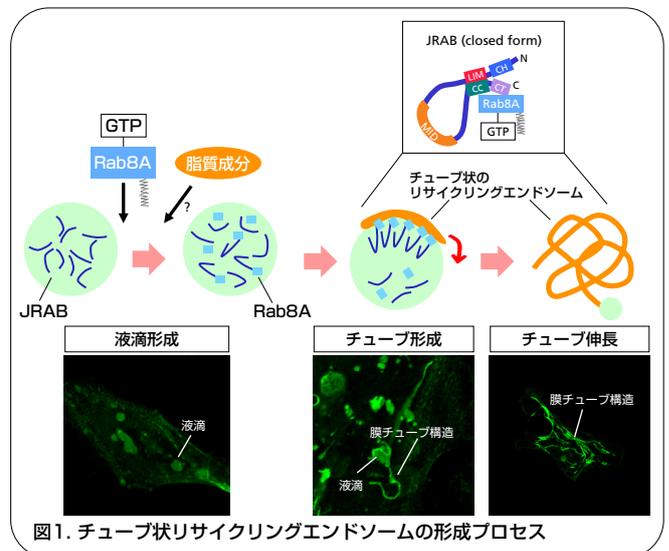
キーワード：共焦点顕微鏡、リサイクリングエンドソーム、膜変形、液-液相分離、FRAP解析

## 研究の概要

リサイクリングエンドソームは、脂質二重膜からなる長いチューブ構造を形成し、細胞膜表面から細胞内に取り込まれた受容体や接着分子などの様々な機能分子が再び細胞膜表面へリサイクルされる際に重要な役割を担っている。

Rabファミリー低分子量Gタンパク質は細胞内小胞輸送の調節に関与していることが知られている。各Rabタンパク質には、GTPが結合した活性型とGDPが結合した不活性型がある。活性型のRabタンパク質は、特異的に相互作用する標的タンパク質を持っており、Rab-標的タンパク質複合体によって、その機能を果たす。したがって、Rabタンパク質の細胞機能を決定するには、まずその標的タンパク質を同定する必要がある。

JRABは、佐々木先生の研究室で行われた以前の研究において、Rab8AとRab13の標的タンパク質として同定された。今回、坂根先生らは、JRAB-Rab8A複合体に着目して、リサイクリングエンドソームの膜ダイナミクスの制御機構の解明を試みた。



## 結果

共焦点3D画像によって、GFP-JRABとmCherry-Rab8ADA（活性型変異体）を発現するHeLa細胞において、JRABがリサイクリングエンドソームのチューブ状構造にRab8ADAと共局在していることがわかった（図2）。

次に、JRABとRab8Aがどのようにリサイクリングエンドソームのチューブ状構造を形成するかを調べた。細胞内で見られる液滴様構造（矢印）は18分後に融合し、そこからリサイクリングエンドソームの長いチューブ状構造が形成された（図3）。

さらに、さまざまな実験結果よりJRAB およびRab8Aは液-液相分離（liquid-liquid phase separation : LLPS）を引き起こすと仮定し、LLPSによる液滴の特徴である液滴内部と周囲のタンパク質の流動性を調べることを試みた。共焦点顕微鏡によりFRAPアッセイを行い、GFP-JRABの蛍光強度をモニターしたところ、ブリーチ後、GFPシグナルは24秒の半減期で回復した（図4）。この結果をさまざまな分子のLLPSで形成される液滴の回復速度と比較し、JRAB液滴が流動性のないタンパク質凝集体ではないことを示すことができた。

また、JRABとRab8Aが、*in vitro*でもLLPSによる液滴を形成するか調べた。その結果、GFP-JRABとmCherry-Rab8ADAは、水溶性の高分子ポリマーであるPEG（polyethylene glycol）の添加により相分離して液滴を形成することが観察された（図5）。

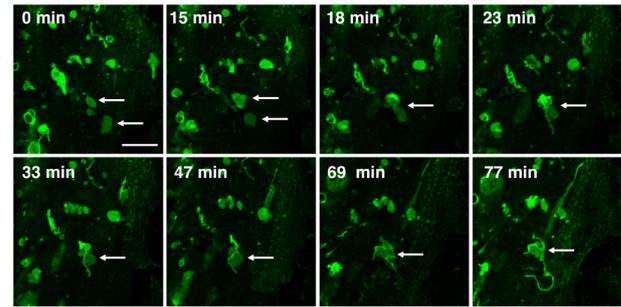


図3. GFP-JRABとHA-Rab8ADAを発現させたHeLa細胞のタイムラプスイメージング

Scale bar: 10 μm

対物レンズ：CFI Plan Apochromat VC 60XC WI, NA 1.2

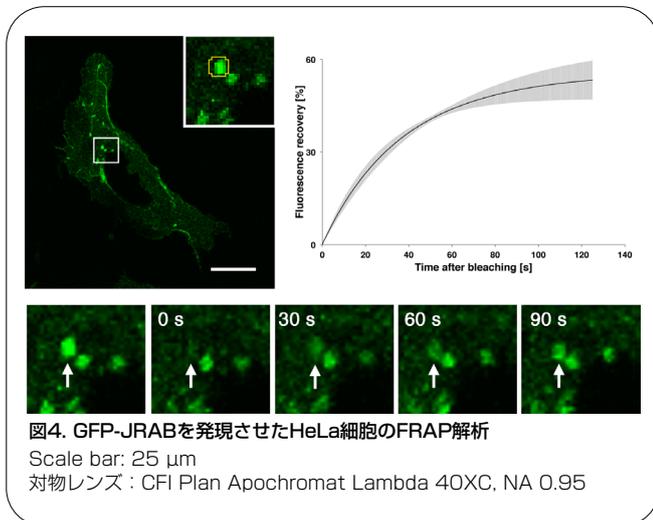


図4. GFP-JRABを発現させたHeLa細胞のFRAP解析

Scale bar: 25 μm

対物レンズ：CFI Plan Apochromat Lambda 40XC, NA 0.95

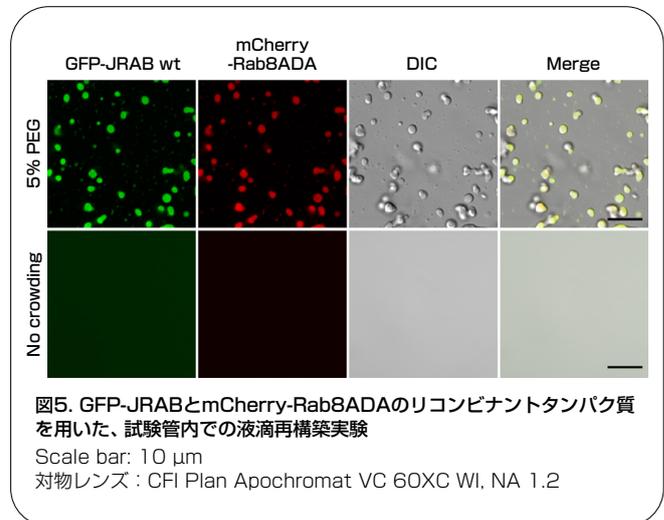


図5. GFP-JRABとmCherry-Rab8ADAのリコンビナントタンパク質を用いた、試験管内での液滴再構築実験

Scale bar: 10 μm

対物レンズ：CFI Plan Apochromat VC 60XC WI, NA 1.2

## まとめ

Rab8Aがその脂質修飾されたC末端領域によってリサイクリングエンドソームに局在し、そこにJRABをリクルートすることを、共焦点顕微鏡を用いて明らかにした。リクルートされたJRABはRab8Aとの結合によりclosed formになり、その結果、リサイクリングエンドソームの膜変形が起こってチューブ状構造が形成されることが示された。さらに、JRAB-Rab8A複合体が形成するリサイクリングエンドソームのチューブ状構造の起源は、細胞内で高濃度になったJRABがRab8Aと共に相分離してできた液滴であることが、ライブイメージングやFRAP、試験管内での液滴再構築実験などの多角的なアプローチによって示唆された。

受容体や接着分子などのリサイクリングは、細胞増殖、運動、分化など様々な細胞機能に寄与しており、その破綻は、組織・器官形成の異常やがん転移に関わると考えられる。したがって、リサイクリングエンドソームの膜ダイナミクスの制御機構の一端が明らかになったことは、今後、発生異常やがん転移機構の理解につながるものと期待される。

## 謝辞

本アプリケーションノートの制作に際して全面的にご協力いただきました、徳島大学大学院医学研究科生化学分野の坂根亜由子先生、佐々木卓也先生に深謝いたします。

## 参考文献

"JRAB/MICAL-L2 undergoes liquid-liquid phase separation to form tubular recycling endosomes"  
Ayuko Sakane, Taka-aki Yano, Takayuki Uchihashi, Kazuki Horikawa, Yusuke Hara, Issei Imoto, Shusaku Kurisu, Hiroshi Yamada, Kohji Takei & Takuya Sasaki  
*Communications Biology*, Volume 4, Article number: 551 (2021)  
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-02080-7>

## 製品情報

### 共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

生細胞への光毒性が低く光退色の少ない高速・高解像度・広視野の共焦点イメージングをサポート。

- ・ 高速：最速毎秒720フレーム（レゾナント 2048 × 16画素）
- ・ 高解像度：最高8K（ガルバノ）/2K（レゾナント）
- ・ 高スループット：  
視野数25 mmの超広視野

