

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18516

研究課題名(和文)小胞形成と共役したNedd4L活性化機構の解明

研究課題名(英文)The activation of Nedd4L in concert with membrane curvature generation

研究代表者

坂本 泰久(SAKAMOTO, Yasuhisa)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：20613392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はユビキチン化を介して積荷分子のエンドサイトーシスを制御するE3ユビキチン化酵素Nedd4Lの活性化機構の解明である。その鍵となるエンドサイトーシス小胞の役割とアダプター分子ARRDC1の関与を調べた。まず、ARRDC1が細胞膜のリン脂質に結合することを示し、そのリン脂質特異性、リン脂質結合領域を規定した。これらの情報を元に、試験管内でNedd4Lの活性化モデルを再構築した。その結果、Nedd4Lが基質分子をユビキチン化する際に、ARRDC1とエンドサイトーシス小胞に結合して活性化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the mechanisms by which E3 ligase Nedd4L is activated and ubiquitinates cargo proteins in endocytosis. To do so, we reconstituted the process in vitro, examined the role of endocytic vesicle and an adaptor protein ARRDC1. First, we showed direct interaction of ARRDC1 with several phospholipids and determined the phospholipid binding region. Next, we reconstituted the activation model of Nedd4L in vitro. In the cargo protein ubiquitination, Nedd4L was activated by the binding to ARRDC1 and endocytic vesicles.

研究分野：機能生物化学

キーワード：エンドサイトーシス ユビキチン化 膜カーブ

1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスにおいて細胞膜は半球状に細胞内に陥没し、最終的に細胞膜から分離して小胞となり細胞内に取り込まれる。平坦な細胞膜からカーブした小胞が効率的に形成されるためには膜変形分子の働きが必要である。クラスリン型エンドサイトーシスにおいて Epsin、AP180、FCH2 といった膜変形分子がクラスリン被覆小胞の形成に関わることが報告された (Itoh et al., *Science* 2001; Ford et al., *Nature* 2002)。一方で特定の膜のカーブを認識し結合する膜カーブ結合分子が存在する。小胞が持つ膜カーブはそのような分子の集散、活性化を制御する。これまでに膜カーブ結合分子は小胞体-ゴルジ体間輸送、エキソサイトーシス、オートファジーの制御に関わることが報告された。エンドサイトーシスにおける膜変形分子の役割は明らかになりつつあるが、膜カーブ結合分子の関与は不明である。

2. 研究の目的

これまでに我々は、エンドサイトーシスにおける小胞形成 (膜変形) の過程で E3 ユビキチン化酵素 Nedd4L が活性化することを見出した。活性化した Nedd4L は積荷分子をユビキチン化し、積荷分子はユビキチン化を目印に集積する分子群の働きで小胞に取り込まれ、エンドサイトーシスされる。本研究では、Nedd4L 活性化機構の詳細を明らかにするため、Nedd4L と結合するアダプター分子 ARRDC1 の機能解析、さらに Nedd4L-ARRDC1 複合体の制御における小胞の膜カーブの役割を研究した。

3. 研究の方法

本研究では主に以下の 2 点の解明を試みた。

ARRDC1 のリン脂質結合様式

ARRDC1 がリン脂質に結合する責任領域を同定し、ARRDC1 の細胞膜局在機構を理解する。さらに ARRDC1 の膜カーブへの結合を明らかにする。

ARRDC1 による Nedd4L 活性制御機構

再構築系を利用して Nedd4L 活性化における膜カーブと ARRDC1 の役割を明らかにする。

4. 研究成果

< ARRDC1 のリン脂質結合機能の解析 >
ARRDC1 と様々なリン脂質種との結合を網羅的に調べ ARRDC1 はフォスファチジルイノシトールリン酸 (PI3P、PI4P、PI5P)、フォスファチジルイノシトールニリン酸 (PI(3,4)P、PI(3,5)P、PI(4,5)P)、フォスファチジルイノシトール三リン酸 PI(3,4,5)P₃、フォスファチジン酸、そしてフォスファチジルセリンなど広範な酸性リン脂質に結合することを明らかにした (図 1)。

ARRDC1 とリン脂質の結合を調べる過程で、我々はビオチン アビジン結合を利用したタンパク質 リポソーム結合実験を行った。その際、biotin とリン脂質の間に様々な性質と長さのスペーサーを持つビオチン化リン脂質を開発した。このスペーサーがリポソーム タンパク質結合実験に与える影響を評価し論文発表した (Sakamoto et al. *J. Biochem.* 2017) (図 2)。

この実験系を用い、ARRDC1 がエンドサイトーシス小胞と非常に似たサイズの膜カーブに結合することを示した。

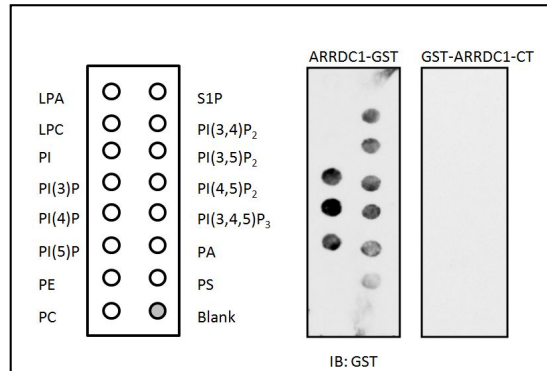


図 1 ARRDC1 のリン脂質結合

ARRDC1 を様々なリン脂質が付着した膜と反応させ、リン脂質結合性を調べた。ARRDC1 の全長分子はリン脂質に結合したが、アレスチドメインを欠く ARRDC1-C 変異体は結合しなかった。

ARRDC1 が細胞膜カーブに結合する様式を明らかにするため、変異体の作成を試みた。細胞内で細胞膜局在を失う変異体の作成は成功した。しかし試験管内でリン脂質結合、細胞膜カーブ結合を調べるための組換えタンパク質の作成を試みたところ、組換えタンパク質の不溶化によって精製には至らなかった。

< 細胞内局在における動態解析 >

膜近傍での ARRDC1 の局在、動態を明らかにするため全反射蛍光顕微鏡によって ARRDC1 のクラスリン被覆ピットでのダイナミクスを解析した。その結果、ARRDC1 はクラスリン、FCH2 といった小胞形成に関わるタンパク質とクラスリン被覆ピットに共同在することを明らかにした。ARRDC1 は半減期の長いクラスリン被覆ブランクよりむしろ半減期の短いクラスリン被覆ピットにおいてクラスリン、FCH2 と共同在した (図 3)。

以上の結果から、ARRDC1 は Nedd4L とともに酸性リン脂質、細胞膜カーブに反応してクラスリン被覆ピットに局在化し、膜タンパク質のユビキチン化を介したエンドサイトーシスを制御すると考えられる。

< 細胞内での Nedd4L 活性化の評価 >
Nedd4L 活性化における ARRDC1 の関与を細胞

レベルで調べるため、Nedd4L の自己ユビキチン化を指標とした細胞アッセイ系の確立を目指した。しかし HEK293 細胞に Nedd4L と ARRDC1 を発現させると Nedd4L のユビキチンリガーゼ活性依存的に Nedd4L と ARRDC1 のタンパク質量が減少したことから、共発現システムを用いたアッセイ系は実行困難になった。そこで間接的な評価として Nedd4L がユビキチン化を介して制御する積荷分子のエンドサイトーシスを指標として ARRDC1 の関与を調べた。HeLa 細胞に様々な ARRDC1 変異体を発現させ、積荷分子のエンドサイトーシスを調べた。その結果、積荷分子のエンドサイトーシスには ARRDC1 の Nedd4L 結合領域、また ARRDC1 と細胞膜リン脂質との結合領域が必須であることが示唆された。

< 試験管内での Nedd4L 活性化の評価 >
Nedd4L の活性化機構をさらに詳しく解明するため、試験管内での Nedd4L 活性化再構築実験を行った。これによって Nedd4L による基質分子のユビキチン化の ARRDC1 依存性、ARRDC1 の膜結合依存性、基質分子の膜局在依存性、小胞のサイズ依存性が明らかになった。

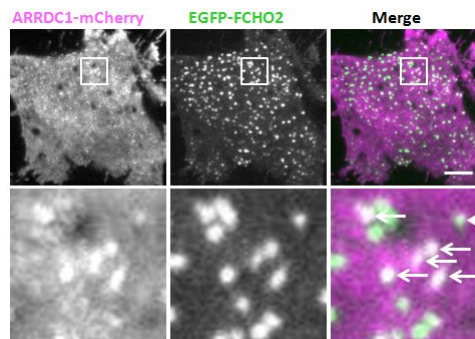
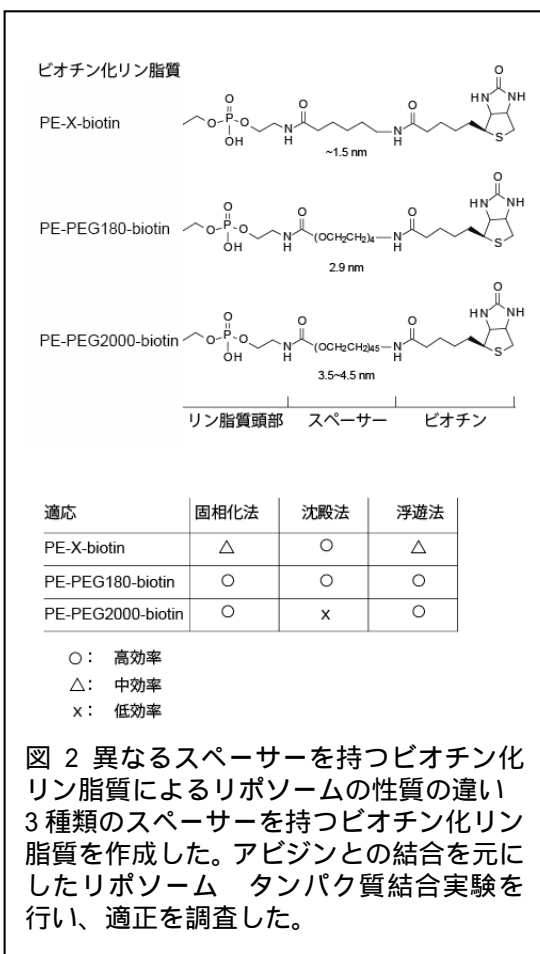


図 3 全反射顕微鏡を用いた膜近傍での ARRDC1 の局在解析
HeLa 細胞に蛍光タンパク質を付加した ARRDC1 を発現させ全反射顕微鏡で観察した。ARRDC1 はクラスリン関連分子 FCH2 とクラスリン被覆ピットに共局在した (矢印)。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)
Sakamoto, Y., Kikuchi, K., Umeda, K., and Nakanishi, H. (2017). Effects of various spacers between biotin and the phospholipid headgroup on immobilization and sedimentation of biotinylated phospholipid-containing liposomes facilitated by avidin-biotin interactions. J. Biochem. 162, 221-226. DOI: 10.1093/jb/mvx016
査読あり

[学会発表](計 1 件)
Sakamoto, Y., Umeda, K., Kikuchi, K., and Nakanishi, H. 第 39 回日本分子生物学会年会(横浜) 平成 28 年 11 月 30 日-12 月 2 日 poster session. 2P-0344: alpha-arrestin ARRDC1 regulates Nedd4L in concert with membrane curvature

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://sites.google.com/site/lab1yakurihp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 泰久 (Sakamoto, Yasuhisa)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：20613392

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()