

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07309

研究課題名(和文) クラスリン依存性エンドサイトーシスにおけるクラスリン重合進行機構の構造的基盤

研究課題名(英文) Structural basis for the progression of clathrin assembly in clathrin-mediated endocytosis

研究代表者

嶋田 睦 (Shimada, Atsushi)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：70391977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：クラスリン依存性エンドサイトーシスは真核生物の細胞が細胞内に物質を取り込む仕組みであり、中心となるタンパク質であるクラスリンが細胞膜上で格子状に重合するクラスリン重合過程から開始される。クラスリン重合を担うタンパク質には、クラスリン格子の中央部、あるいは辺縁部に局在するタンパク質などが存在し、複雑なネットワークを形成してこの過程を進行させる。本研究では、構造生物学的手法と生化学的手法を組み合わせ、クラスリン重合過程の進行を担う鍵となる分子であるEps15やAP-2複合体などの分子の相互作用の構造的基盤を解明し、クラスリン重合進行機構の新規モデルの構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではクラスリン依存性エンドサイトーシスのクラスリン重合ステップに関与するタンパク質について、その相互作用の構造的基盤を解明し、新たなクラスリン重合モデルを構築した。この成果は真核生物における普遍的な生命現象であるクラスリン依存性エンドサイトーシス進行機構の理解を深めるだけでなく、近年注目を集める、クラスリン依存性エンドサイトーシスをターゲットにした創薬の基礎にもなる成果である。

研究成果の概要(英文)：Clathrin-mediated endocytosis is a mechanism by which eukaryotic cells take up extracellular molecules into the cell. Clathrin-mediated endocytosis is initiated by a process called clathrin assembly, where a pivotal protein, clathrin, assembles into the clathrin lattice on the cell membrane. Among the proteins responsible for clathrin assembly, some proteins localize to the central part of the lattice and others localize to the periphery of the lattice, thereby forming a complex network to promote clathrin assembly. In this study, we used structural biological and biochemical techniques and elucidated the structural basis for the interactions of the key molecules of clathrin assembly, such as Eps15 and the AP-2 complex. Based on these results, we constructed a novel mechanistic model of clathrin assembly.

研究分野：構造生物学

キーワード：蛋白質 X線結晶構造解析 等温滴定熱測定 エンドサイトーシス 蛋白質間相互作用 電子顕微鏡

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クラスリン依存性エンドサイトーシスは真核生物が細胞内に外部の物質を取り込む代表的な仕組みの一つであり、体細胞における栄養摂取、シナプスにおけるシナプス小胞のリサイクル、細胞表面受容体の内在化など、真核生物の活動を支える様々な生命現象を担う。またクラスリン依存性エンドサイトーシスは特定のウイルスや病原性細菌の主要な侵入経路にもなる。

クラスリン依存性エンドサイトーシスはまず、中心的役割を果たすタンパク質であるクラスリンが細胞膜の細胞質側で格子状の構造を形成して重合するクラスリン重合過程から開始する。次に、クラスリンに覆われたクラスリン重合部位であるクラスリン被覆ピットが積み荷となる基質を内部に取り込みながら細胞内部に陥入し、その根元に細いネックが形成される。その後、ネックが切断されることでクラスリン被覆小胞が形成される。それぞれの過程では複数のタンパク質が定められた順序でエンドサイトーシス部位に局在し、クラスリン依存性エンドサイトーシスを進行させる。クラスリン依存性エンドサイトーシスのクラスリン重合過程に関与するタンパク質には、クラスリン重合の初期に機能するタンパク質、重合中のクラスリン格子の中央部で機能するタンパク質、格子の辺縁部で機能するタンパク質など様々な機能を持つタンパク質が存在する。これらのタンパク質は複雑な相互作用ネットワークを形成し、協調してクラスリン重合を進行させているが、その詳細な機構の多くは不明である。

クラスリン重合過程ではクラスリンは細胞膜と直接結合せず、クラスリンを細胞膜にリクルートする分子が必要である。そのような働きを担う主要な分子が、AP-2 複合体である。AP-2 複合体は、細胞膜、細胞膜上の基質、クラスリンのいずれとも相互作用し、クラスリンを細胞膜上で重合させる (図 1)。しかし多くの高等真核生物では、クラスリン重合には AP-2 複合体だけでは不十分であり、FCHo1、FCHo2、Eps15 などのタンパク質が必須の役割を果たす (Henne et al., *Science*, 2010) (図 1)。FCHo1 と FCHo2 は相同タンパク質であり、どちらも細胞膜と相互作用する EFC/F-BAR ドメインと、Eps15 と相互作用する μ homology domain (μ HD) を保持している。FCHo1/FCHo2 は、これらのドメインの機能により Eps15 を細胞膜に局在させる (図 1)。その後 Eps15 は、AP-2 複合体の α -adaptin appendage (α -appendage) ドメインや β 2-adaptin appendage (β 2-appendage) ドメインと相互作用し、AP-2 複合体を細胞膜近傍に集積させる足場となる。こうして細胞膜上に集積した AP-2 複合体は、クラスリンの細胞膜上への集積と重合を担う (図 1)。

Eps15 の C 末端側約 400 残基は二次構造を持たない、いわゆる「天然変性領域」である。この領域には、アスパラギン酸、プロリン、フェニルアラニンの 3 つのアミノ酸残基からなる DPF モチーフと呼ばれる短い配列が 15 個含まれる DPF リピート領域が存在する (図 1)。DPF リピート領域は、FCHo1/FCHo2 や、その脳特異的な相同タンパク質である SGIP1 との結合に関与するとともに、AP-2 複合体との結合にも関与する (図 1)。研究代表者らは、FCHo1 や SGIP1 の μ HD による Eps15 の強い認識部位が、6 つの連続する DPF モチーフを含む領域であり、この部位に約 65 nM の解離定数で強く結合することを見いだした (Shimada et al., *Sci. Rep.*, 2016)。また結合は 200 倍以上低下するものの、 μ HD による認識には、最低 2 つの連続する DPF モチーフの存在が必要であることも見だし、さらに SGIP1 の μ HD と、Eps15 の 2 つの連続する DPF モチーフを含むフラグメントの複合体の結晶構造を決定した。結晶構造では 2 つの連続する DPF モチーフはどちらも結合に深く関与し、 μ HD との結合において、連続する DPF モチーフは単独の DPF モチーフと顕著に異なる機能を果たすことが判明した (Shimada et al., *Sci. Rep.*, 2016)。

一方、AP-2 複合体の α -appendage ドメインは、単独の DPF モチーフに約 100 μ M の解離定数で弱く結合するが、Eps15 の C 末端領域には、強い結合部位が一カ所あることが報告されていた。研究代表者らは、この強い結合部位の同定を試み、その結果、 α -appendage ドメインが、 μ HD 結合部位とは異なる、4 つの散在する DPF モチーフを含む Eps15 の約 60 残基の領域に、約 270 nM の解離定数で強く結合することを見いだした (Shimada et al., *Sci. Rep.*, 2016)。したがって 15 個の DPF モチーフによる暗号は、 μ HD と α -appendage ドメインによって、異なる機構で異なる部位が読み取られ、 μ HD と α -appendage ドメインはそれぞれ一カ所で Eps15 に強く結合していることになる (図 1)。しかし、クラスリン重合進行機構解明の鍵となる、 α -appendage ドメインによる Eps15 への強い結合の機構の詳細は不明であった。また Eps15 は、電子顕微鏡観察により、全長では二量体あるいはダン

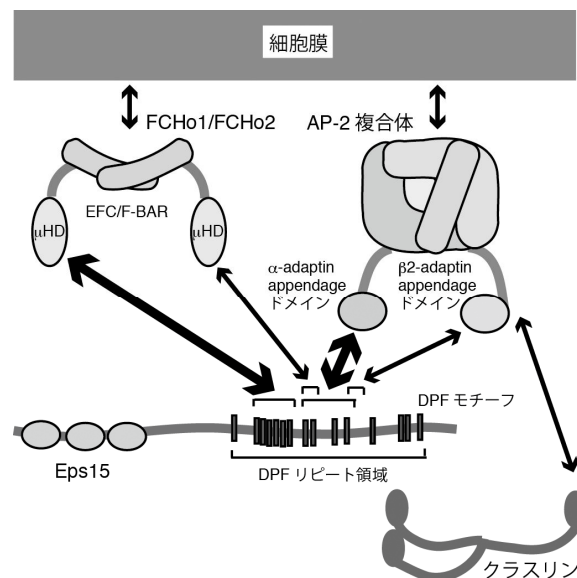


図 1 FCHo1/FCHo2、Eps15、AP-2 複合体による細胞膜上でのクラスリン集積機構の模式図。強い相互作用を太線で示す。

ベル型の四量体として存在することが報告されている (Cupers et al., *J. Biol. Chem.*, 1997)。このうち特徴的なダンベル型の四量体構造は、Eps15 が AP-2 複合体を介してクラスリンを空間的に適切な位置に配置し、クラスリンを格子状に重合するために重要な構造であると推測されている (Cupers et al., *J. Biol. Chem.*, 1997)。しかしこれまでに、Eps15 四量体上での FCho1/2 や AP-2 複合体の空間的相対配置は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、このクラスリン依存性エンドサイトーシスのクラスリン重合過程における鍵となるタンパク質間相互作用の原子分解能レベルでの構造的基盤を確立し、それによるクラスリン重合進行機構の原子分解能レベルでの解明を目指すことである。具体的には、 α -appendage ドメインが4つの散在する DPF モチーフを含む Eps15 の約 60 残基の領域を強く認識する機構を、構造生物学的手法と相互作用解析手法を組み合わせる原子分解能レベルで解明する。さらに、Eps15 や FCho1/2、AP-2 複合体が、どのような空間的相対配置で会合しているかを、電子顕微鏡等を用いた解析により解明し、この相互作用がクラスリン重合において果たす役割についてのモデルを構築する。

またこれまで、クラスリン依存性エンドサイトーシスのクラスリン重合進行機構は、ネットワーク生物学的観点から、エンドサイトーシスに関連する多数のタンパク質が、相互作用の中心である AP-2 複合体やクラスリンに順次集積することにより進行するという、あいまいな形で理解されてきた (Schmid and McMahon, *Nature*, 2007)。しかしこの説明は、AP-2 複合体やクラスリンに多様なタンパク質がどのタイミングで結合し、どのような機構で機能を発揮するかという点については不十分である。本研究では、クラスリン重合進行の鍵となる相互作用を原子分解能レベルで解明し、構造生物学的な観点からこの問題を見直すことで、クラスリン重合進行機構の理解を進展させることも目的の一つとする。

3. 研究の方法

本研究では、まず結晶構造解析により、AP-2 複合体の α -appendage ドメインによる Eps15 認識機構の原子分解能レベルでの詳細を解明する。さらに等温滴定熱測定を用いた変異体解析により、個々の認識部位の結合への寄与を生化学的に解明する。さらにクラスリン重合の個々の過程を Eps15 や FCho1 の全長タンパク質などを用いて試験管内で再構成し、その会合体を電子顕微鏡等の手法により直接観察することで、これらのタンパク質の相対的な空間配置を解明するための実験系の構築を行う。またこれらの研究結果を合わせて検討し、クラスリン依存性エンドサイトーシス関連タンパク質の相互作用ネットワークによる、クラスリン重合機構の進行機構の解明を行う。

4. 研究成果

まず、AP-2複合体の α -appendage ドメインとEps15の約60 残基の領域の複合体の結晶構造解析を行い、これに成功した。得られた結晶構造中、Eps15のDPFモチーフを含む1カ所の領域については、複数の構造生物学的手法で検討したが、Eps15中の2つのDPFモチーフのうちどちらに対応する電子密度かは特定できなかった。しかし等温滴定熱測定を用いた変異体解析により、これらの2つのDPFモチーフはどちらも α -appendage ドメインの同じ部位に同程度の寄与で結合することを支持する結果が得られ、これ以上の検討の必要性が低下したため、ここで構造解析を完了した。その他の変異体解析の結果は結晶構造と概ね一致しており、個々の相互作用部位の結合への寄与の程度や、 α -appendage ドメインによるEps15への強い結合のメカニズムの解明に成功した (未発表)。以上の結果と過去の文献に基づき、クラスリン重合に伴いEps15がクラスリン格子の辺縁部に局在し、そこでクラスリン重合を促進する機構についての新規モデルを構築できた。ここまでの結果をまとめて論文投稿を行ったが、細胞内での実験による生理的意義の検証を要求されたため、査読コメントに基づき、国内やドイツの研究グループとの共同研究で、 α -appendage ドメインに結合するEps15の領域の細胞内発現によるクラスリン依存性エンドサイトーシスに対する効果を検討した。得られた実験結果に基づき、現在さらなる細胞生物学実験を進めており、データが揃い次第、再投稿を予定している。

またクラスリン重合時に Eps15 上で、FCho1、SGIP1 や AP-2 複合体がどのように配置されているかを検討するため、Eps15 の全長タンパク質試料の調製を進めた。Eps15 の全長タンパク質は大腸菌での発現では分解されやすいため、この問題の解決を目指し、バキュロウイルス発現系による発現を試みた。しかし、複数の種類の細胞株を試したものの、いずれも大腸菌での発現よりも分解が進み、問題の解決に至らなかった。FCho1 や SGIP1 の全長タンパク質の発現もバキュロウイルスの発現系では、むしろ大腸菌での発現よりも分解が進んだ。そのため現在、これらのタンパク質の分解の低減された発現を目指し、異なるバキュロウイルス発現ベクターを用いて新たな発現系の構築を進めている。

これらのタンパク質試料の調製と並行して、より生体内環境に近い、脂質膜上での Eps15 や FCho1、SGIP1 の会合の様子の観察を目指し、平面状の脂質単分子膜を電子顕微鏡用グリッド上に形成し、その上での目的タンパク質の会合の様子の直接観察のための実験系の構築を進めた。研究期間中にはまず、FCho1 と同様に EFC/F-BAR ドメインを保持し、脂質膜表面と静電相互作用により結合するタンパク質である GAS7 をコントロールタンパク質として、その脂質膜上での

会合の様子を電子顕微鏡による直接観察を試み、これに成功した（原著論文参照：Hanawa-Suetsugu et al., *Nat. Commun.*, 2019; 責任著者）。これにより、FCHo1/2、Eps15、AP-2複合体が脂質膜上で形成する、クラスリン重合の足場となるドット状会合体の電子顕微鏡による観察のための実験系の構築に道筋をつけることができた。今後、FCHo1、Eps15、SGIP1などの全長試料の調製の進展に応じて、このドット状の会合体の電子顕微鏡観察を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hanawa-Suetsugu K, Itoh Y, Ab Fatah M, Nishimura T, Takemura K, Takeshita K, Kubota S, Miyazaki N, Wan Mohamad Noor WNI, Inaba T, Nguyen NTH, Hamada-Nakahara S, Oono-Yakura K, Tachikawa M, Iwasaki K, Kohda D, Yamamoto M, Kitao A, Shimada A, Suetsugu S	4. 巻 10
2. 論文標題 Phagocytosis is mediated by two-dimensional assemblies of the F-BAR protein GAS7	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12738-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bala Siqin, Shinya Shoko, Srivastava Arpita, Ishikawa Marie, Shimada Atsushi, Kobayashi Naohiro, Kojima Chojiro, Tama Florence, Miyashita Osamu, Kohda Daisuke	4. 巻 1864
2. 論文標題 Crystal contact-free conformation of an intrinsically flexible loop in protein crystal: Tim21 as the case study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129418 ~ 129418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.129418	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋大輔、嶋田睦、Jose Caarveiro、阿部義人、植田正、坂根郁夫
2. 発表標題 DGK 活性制御の分子基盤: N末端RVH領域へのCa ²⁺ 結合の物理化学的解析
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Siqin Bala, Shoko Shinya, Arpita Srivastava, Marie Ishikawa, Atsushi Shimada, Naohiro Kobayashi, Chojiro Kojima, Florence Tama, Osamu Miyashita, Daisuke Kohda
2. 発表標題 Crystal contact-free conformation of an intrinsically flexible loop in protein crystal: Tim21 as the case study
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 韓喜玲、嶋田睦、神田大輔
2. 発表標題 Visualization of the spatial distribution of a presequence peptide in the binding site of the mitochondrial presequence receptor, Tom20, using crystal contact-free space created in protein crystals
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 韓喜玲、嶋田睦、神田大輔
2. 発表標題 Creating crystal contact-free space in protein crystals makes the spatial distribution of a presequence peptide in the binding site of the mitochondrial presequence receptor, Tom20, visible
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口淳子、嶋田睦
2. 発表標題 クラスリン依存性エンドサイトーシスにおけるクラスリン重合調節機構の構造的基盤
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋田睦
2. 発表標題 エンドサイトーシス 関連細胞質タンパク質の構造から迫るクラスリン重合機構 (Insights into clathrin assembly from the structures of cytosolic endocytic proteins)
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----