

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20687006

研究課題名(和文) エンドサイトーシスにおける小胞形成機構の構造的基盤

研究課題名(英文) Structural basis of vesicle formation in endocytosis

研究代表者

嶋田 睦 (SHIMADA ATSUSHI)

独立行政法人理化学研究所・生命系放射光利用システム開発ユニット・研究員

研究者番号：70391977

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード： X線結晶構造解析, エンドサイトーシス, 脂質膜, 細胞内シグナル伝達, GTP結合タンパク質, アクチン細胞骨格

1. 研究計画の概要

近年の X 線結晶構造解析の進展により、これまで構造解析の適用の比較的遅れていた細胞生物学的現象においても、その原子分解能レベルでの機構解明が進展しつつある。それらの細胞生物学的現象の一つに、真核細胞が外部から細胞内に物質を取り込む仕組みであるエンドサイトーシスがある。エンドサイトーシスは、細胞表層受容体の内在化や体細胞における栄養摂取などの基本生命現象において重要な役割を果たしている。エンドサイトーシスの進行には、複数の可溶性タンパク質が関与しているが、その機能発現機構の詳細には不明な点も多い。本研究は、真核細胞のエンドサイトーシス過程における小胞形成機構に着目し、関連タンパク質の構造機能解析を行い、ダイナミックな小胞形成機構の一端を解明することを目的とする。

2. 研究の進捗状況

- (1). エンドサイトーシス関連タンパク質である pacsin2/Syndapin II について、その EFC/F-BAR ドメインの構造解析に成功し、エンドサイトーシスにおいて重要な役割を果たすと考えられる、このドメインによる脂質膜変形機構を解明し、FEBS Letters 誌に発表した。
- (2). 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被覆ピットの陥入と、それに付随するアクチン細胞骨格の再編成を担うと考えられているタンパク質である CIP4 と FBP17 について、まず、FBP17 の HR1 ドメインと GTP 結合タンパク質である Cdc42 の複合体の立体構造を決定した。次に、CIP4 および FBP17 の HR1 ドメインと

Cdc42 の正確な結合定数を等温滴定カロリメトリーにより決定し、これまで確認されていなかった FBP17 と Cdc42 の試験管内での結合を確認した。さらに細胞生物学的実験により、CIP4 のクラスリン集積部位への局在が Cdc42 に依存することを解明し、Cdc42 のノックダウンによるエンドサイトーシス効率の低下が、CIP4 や FBP17 のクラスリン集積部位への局在の低下による、クラスリン被覆ピットの陥入やアクチン細胞骨格再編成の阻害によるものであるというモデルを構築した。

(3). 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被覆小胞からの被覆タンパク質の解離に関与するイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素である synaptojanin に関しては、異なる発現系を用いて、複数の領域について発現を試みた。その結果、無細胞タンパク質合成系を用いて可溶性画分へのタンパク質断片の発現に成功した。今後は結晶化に十分な量のタンパク質を得て、構造解析を目指す。

(4). エンドサイトーシスへの関与が示唆されている WAVE2 複合体の部分複合体の構造を決定し、複合体形成機構の一端を解明した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

pacsin2/Syndapin II の EFC/F-BAR ドメインの構造機能解析に関しては、構造解析に成功し、論文発表を行っており、これに関しては順調に研究が進展した。また、CIP4 と FBP17 の構造機能解析に関しては、研究の進展に伴い、新たな機能解析実験を追加したた

め論文の発表には至っていないが、この追加実験により、エンドサイトーシスの機構の理解を深める興味深い結果を得ており、おおむね順調に研究が進展している。synaptojanin の構造機能解析に関しては、構造解析に必要な synaptojanin 断片の可溶性画分への発現に手間取り、最近可溶性画分への発現に成功したところであり、このタンパク質の構造機能解析に関しては親展が遅れている。一方、他のエンドサイトーシス関連タンパク質である WAVE2 複合体の部分複合体の構造解析には成功しており、こちらは順調に研究が進展している。これらの結果を総合して判断すると、おおむね順調に進展していると思われる。

4. 今後の研究の推進方策

(1). CIP4 と FBP17 の構造機能解析に関しては、これまでの結果を速やかにまとめ、最終年度中の論文発表を目指す。

(2). synaptojanin の構造機能解析に関しては、これまでに無細胞タンパク質合成系を用いて N 末端側の SAC ドメインを含む領域と、中央部の 5-phosphatase ドメインおよび RNA recognition motif ドメインを含む領域をそれぞれ別個に可溶性画分に発現させることに成功しており、収量を上げて、結晶化および構造解析を目指す。さらに、両者の共発現や、精製後の混合により、より全長に近い領域の構造決定も目指す。また、構造解析の進展状況により、基質であるイノシトールリン脂質やその誘導体との相互作用の解析も行い、synaptojanin がクラスリン被覆小胞特異的にイノシトールリン脂質の脱リン酸化を行う機構の解明を目指す。

(3) WAVE2 複合体や pacsin2/Syndapin II に関しても適宜構造機能解析を進め、そのエンドサイトーシスにおける役割の解明を進める。

5. 代表的な研究成果

(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)

Atsushi Shimada, Kazunori Takano, Mikako Shirouzu, Kyoko Hanawa-Suetsugu, Takaho Terada, Kiminori Toyooka, Takashi Umehara, Masaki Yamamoto, Shigeyuki Yokoyama, and Shiro Suetsugu, Mapping of the basic amino-acid residues responsible for tubulation and cellular protrusion by the EFC/F-BAR domain of pacsin2/Syndapin II, FEBS Letters, 査読有, 584 巻, 2010 年, 1111-1118.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 嶋田睦, 山本雅貴, 横山茂之, BAR ドメ

インスーパーファミリータンパク質による脂質膜変形機構の構造的基盤, 大阪大学蛋白質研究所セミナー 細胞表面受容体と細胞内輸送, 2011 年 1 月 13 日, 大阪

(2) 嶋田睦, 寺田貴帆, 白水美香子, 山本雅貴, 永山國昭, 末次志郎, 竹縄忠臣, 横山茂之, EFC/F-BAR ドメインタンパク質の構造, 機能と制御, 日本生物物理学会第 47 回年会, 2009 年 10 月 30 日~11 月 1 日, 徳島

(3) 嶋田睦, 外山光俊, 寺田貴帆, 田仲昭子, 菅野純夫, 白水美香子, 山本雅貴, 末次志郎, 竹縄忠臣, 横山茂之, Cdc42-interacting protein 4 (CIP4) による Cdc42 認識機構の構造的基盤, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008), 2008 年 12 月 9 日~12 日