

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24687014

研究課題名(和文)細胞のがん化に関するエンドサイトーシス機構の構造的基盤

研究課題名(英文)Structural basis for the mechanism of endocytosis involved in oncogenic transformation

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) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：エンドサイトーシスは真核細胞が細胞外から外部の物質を細胞内に取り込む仕組みの1つであり、細胞表面受容体の内在化など、様々な基本生命現象を担うが、近年、細胞のがん化にも深く関与しているという知見が蓄積してきている。本研究課題では、特になん化に関するエンドサイトーシス関連タンパク質に着目して構造機能解析を行った。その結果、クラスリン依存性エンドサイトーシスの最初のステップであるクラスリン重合過程を担うSGIP1やFCHO1タンパク質による、がん化に深く関与するEps15タンパク質の認識機構の解明に成功した。今回の研究により、細胞のがん化とエンドサイトーシスの関係の理解が進展すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Endocytosis is a process for eukaryotic cells to internalize extracellular molecules into the cells, which plays an important role in various physiological processes, such as receptor internalization. Endocytosis is also recently implicated in oncogenic transformation. In this study, we performed the structural and functional analyses of endocytic proteins involved in oncogenic transformation. We revealed the mechanism of the recognition of Eps15, which is deeply involved in oncogenic transformation, by SGIP1 and FCHO1, which are key players of the clathrin-assembly step of clathrin-mediated endocytosis. Thus, this study deepens our understanding of the link between oncogenic transformation and endocytosis.

研究分野：構造生物学、生化学

キーワード：X線結晶構造解析 エンドサイトーシス がん

1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは、真核細胞が細胞外から外部の物質を細胞内に取り込む基本的な仕組みの一つであり、体細胞における栄養摂取、シナプスにおける神経伝達物質のリサイクリング、細胞表面受容体の内在化など、様々な基本生命現象を担っている。最近、エンドサイトーシス関連タンパク質が、細胞のがん化に深く関与しているという知見が蓄積してきているが、そのメカニズムには不明な点も多い。

2. 研究の目的

本研究は、特に細胞のがん化と関わりの深いエンドサイトーシス関連タンパク質の構造機能解析を行い、エンドサイトーシスによる細胞のがん化への関与のメカニズムの一端を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

エンドサイトーシス関連タンパク質のうち、細胞のがん化と関わりの深いタンパク質について、主にX線結晶構造解析などの構造生物学的手法と、等温滴定熱測定、ゲルろ過、などの生化学的手法を用いて、これらのタンパク質の構造機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) SGIP1 の μ homology domain (μ HD) の結晶構造解析

クラスリン依存性エンドサイトーシスの最初のステップであるクラスリン重合過程に関与するSGIP1とFCHo1の2種類のタンパク質の μ HDの発現精製と結晶化を行った。その結果、FCHo1の μ HDについては良好な結晶が得られなかったが、SGIP1の μ HDについて良好な結晶を得て、SAD法と分子置換法を用いて2つの異なる空間群での構造決定に成功した(図1)。

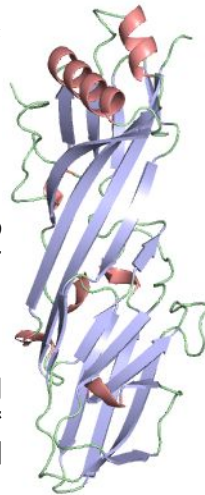


図1 SGIP1の μ HDの結晶構造

(2) SGIP1の μ HDに結合するEps15の領域の同定

SGIP1の μ HDに結合し、がん化と関連の深い他のエンドサイトーシス関連タンパク質であるEps15の約260残基の領域の発現精製を行い、この領域がSGIP1の μ HDとサブ μ Mオーダーの解離定数で結合することを等温滴定熱測定やBiacoreを用いて決定した。その後、Eps15のこの領域に由来する異なるフラグメントを複数調製し、SGIP1の μ HDとの結合の強さを等温滴定熱測定やゲルろ過に

より検討した。その結果、 μ HDに対する結合能を保持する最小の領域が、Eps15に多数含まれるAsp-Pro-Phe (DPF)配列を短いリンカー配列を挟んで2つ以上連続で含むような領域であることが判明した。

(3) SGIP1の μ HDとEps15由来の約10残基の領域との複合体の結晶構造解析

SGIP1の μ HDと、Eps15のDPF配列が2つ連続する領域に対応するペプチドとの複合体の結晶構造解析を行い、分子置換法により構造決定に成功した(図2)。複合体の立体構造では、ペプチドはこれまでに知られていない新規の μ HD上の結合部位に結合していることが判明した。また複合体の立体構造に基づいてEps15に結合できない μ HD変異体を4種類作製し、実際にこれらの変異体がEps15に結合しないことを確認した。またEps15の2つの連続するDPF配列に含まれる6つの残基の変異体解析も行い、これらの残基は全て μ HDに特異的に認識されていることを確認した。これらの結果により、SGIP1によるEps15認識機構の一端を解明した。

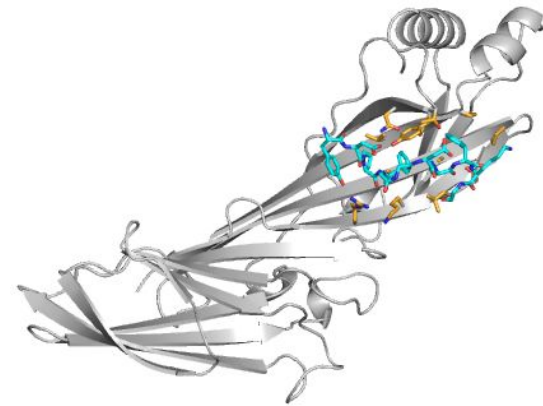


図2 SGIP1の μ HD(灰色)とEps15由来ペプチド(水色)の複合体の結晶構造

(4) DPF配列数の増加によるSGIP1の μ HDへの親和性向上機構

本研究課題の研究の過程で、研究代表者はSGIP1の μ HDが、連続する6つのDPF配列を含む約30残基のフラグメントは、2つのDPF配列だけを含むフラグメントと比較して100倍以上強く結合するという興味深い現象を見いだした。この親和性向上機構の解明のため、6つの連続するDPF配列を含むEps15のフラグメントと μ HDの複合体の結晶化を行い、構造決定に成功した。複合体の結晶構造では、既知の認識部位に結合した2つのDPF配列に対応する電子密度は明瞭に得られたが、他の4つのDPF配列に対応する電子密度は不明瞭であった。したがって親和性の向上は、 μ HD上にDPF配列に対するさらなる結合部位があるためであるという可能性は低いと考えられる。さらに、Eps15の様々な変異

体を用いた解析により、この親和性の向上が遠位の静電相互作用によるものでもないことを示唆する結果を得た。これらのことから、この親和性向上機構は、新規の非直接的なメカニズムによる可能性が高いと考えられる。

(5) FCho1 の μ HD と Eps15 の結合の確認

SGIP1 の μ HD と同様に、FCho1 の μ HD も Eps15 中の 6 つの DPF 配列が連続する領域に強く結合し、より少ない数の連続する DPF 配列を持つフラグメントにはより弱く結合することを等温滴定熱測定により確認した。これらの一連の構造機能解析により、FCho1 やその相同タンパク質である FCho2 の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ステップにおける作動モデルを構築した (図 3)。

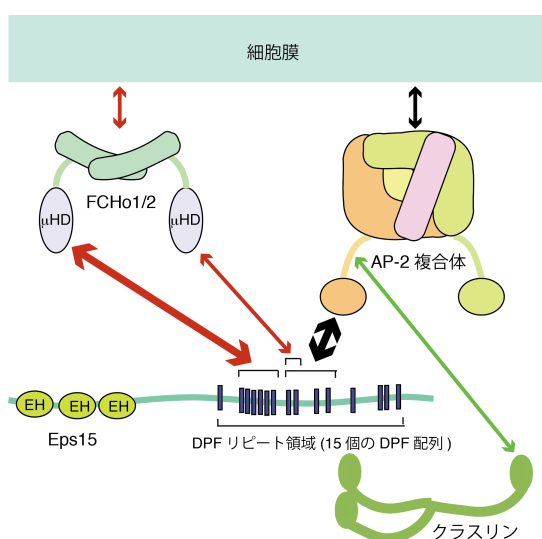


図 3 FCho1/2 と Eps15 によるクラスリン重合機構の模式図

(6) 他のがん化に関与するエンドサイトーシス関連タンパク質の構造機能解析

大腸菌の発現系を用いて、がん化に関与するエンドサイトーシス関連タンパク質である PTRF の全長タンパク質の発現精製にも成功したが、結晶化に十分な量を得ることはできなかった。

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 3 件)

Takahashi N, Hamada-Nakahara S, Itoh Y, Takemura K, Shimada A, Ueda Y, Kitamata M, Matsuoka R, Hanawa-Suetsugu K, Senju Y, Mori MX, Kiyonaka S, Kohda D, Kitao A, Mori Y, Suetsugu S, TRPV4 channel activity is modulated by direct interaction of the ankyrin

domain to PI(4,5)P₂, Nat. Commun., 査読有, 5 巻, 2014, 4994

DOI: 10.1038/ncomms5994

Matsumoto S, Shimada A, Nyirenda J, Igura M, Kawano Y, Kohda D, Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, 110 巻, 2013, 17868-17873

DOI: 10.1073/pnas.1309777110

Matsumoto S, Shimada A, Kohda D, Crystal structure of the C-terminal globular domain of the third paralog of the Archaeoglobus fulgidus oligosaccharyltransferases, BMC Struct. Biol., 査読有, 13 巻, 2013, 11 (9 pages)

DOI: 10.1186/1472-6807-13-11

〔学会発表〕(計 9 件)

山口 淳子、神田 大輔、嶋田 睦 (代表)、SGIP1 μ homology ドメインによる 2 つの連続する DPF 配列認識機構の構造的基盤、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16~17 日、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都府・京都市)

Atsuko Yamaguchi, Daisuke Kohda, Atsushi Shimada (代表), Structural basis for the recognition of Eps15 by the SGIP1 μ homology domain, 23rd congress and general assembly of the international union of crystallography (IUCr2014), 2014 年 8 月 11 日, Montreal (Canada)

山口 淳子、神田 大輔、嶋田 睦 (代表)、SGIP1 μ homology ドメインによる Eps15 認識機構の構造的基盤、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 27 日、ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア (神奈川県・横浜市)

山口 淳子、神田 大輔、嶋田 睦 (代表)、SGIP1 μ homology domain による Eps15 認識機構の構造的基盤、平成 26 年度日本生化学会九州支部例会、2014 年 5 月 18 日、九州大学病院キャンパス コラボステーション I (福岡県・福岡市)

Atsuko Yamaguchi, Daisuke Kohda, Atsushi Shimada (代表), Structural basis for the recognition of tandem DPF motifs by the SGIP1 μ homology domain, International Symposium between Kyushu University Post-Global Centers of Excellence Program and School of Biomedical Sciences, Monash University, 2014 年 2 月 7 日, Melbourne (Australia)

嶋田 睦 (代表)、末次 志郎、松永 笑子、
外山 光俊、寺田 貴帆、白水 美香子、竹
縄 忠臣、山本 雅貴、横山 茂之、Cdc42
による CIP4 ファミリータンパク質のク
ラスリン被覆ピットへの局在機構の構造
的基盤、第 35 回日本分子生物学会年会、
2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場・マ
リンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)

嶋田 睦 (代表)、末次 志郎、松永 笑子、
外山 光俊、寺田 貴帆、白水 美香子、竹
縄 忠臣、山本 雅貴、横山 茂之、Cdc42
による CIP4 のクラスリン被覆ピットへ
の局在機構の構造的基盤、第 12 回日本蛋
白質科学学会年会、2012 年 6 月 21 日、名
古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://vsb.bmr.kyushu-u.ac.jp/VSB/index.html>

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004442/>

6 . 研究組織

(1)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： 7 0 3 9 1 9 7 7