

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291037

研究課題名(和文)細胞膜突出構造の膜形態制御機構と生理機能

研究課題名(英文)Formation mechanisms for cellular protrusions and their physiological functions

研究代表者

末次 志郎(Shiro, Suetsugu)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：70345031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：様々な生命現象に応じた多彩な細胞膜の突起構造が作り分けられる機構は明らかではない。細胞膜に結合し、共通のアクチン制御因子を制御するタンパク質ファミリーとしてBARタンパク質が同定された。本研究では、BARタンパク質のなかで新規に突起構造形成への関与が示された二つのタンパク質の新規な突起膜構造形成機構を明らかにした。それらは、膜陥入構造を形成できないヘテロ多量体を形成し、陥入構造形成の抑制によって細胞の移動に関わる突起構造形成を行う機構と、ホモ多量体形成によるタンパク質シート構造により大きな突起様のファゴサイトーシスカップを形成する機構であった。

研究成果の概要(英文)：There are a variety of plasma membrane structures with various shapes. However, it is unclear how these structures are generated downstream of actin cytoskeleton. We found the BAR domain superfamily proteins that regulate the actin cytoskeleton through a variety of their protein surfaces that bind to the corresponding membrane-curvatures. CIP4 and GAS7 are unique F-BAR domain protein with their involvements in the protrusions, whereas the other F-BAR domains are involved in membrane invaginations such as clathrin-coated pits and caveolae. In this study, we found the membrane deformation of CIP4 for invagination is inhibited by the hetero-protein complex formation, thereby promoting the formation of membrane protrusions. In contrast, GAS7 F-BAR domain exhibited unique oligomeric assembly, forming the protein sheet for phagocytosis cup formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞突起

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞は、数十～数百マイクロメートルの大きさで、分化や環境に応じて変化に富んだ形態をとる。細胞の形態は、細胞表面の多様な数十から数百ナノメートルのナノスケール構造、すなわち、陥入構造(クラスリン被覆小孔、カベオラなど)と突起構造(ラメリポディア、フィロポディアなど)の集合体である。これらのナノスケール構造は非常に動的で、ホルモンや成長因子などの外部刺激に応答して、数秒から数分で形成、消失する。その形成と消失はアクチン繊維の形成と消失(アクチン重合と脱重合)に依存していることが知られていた。これらのアクチン繊維の形成は、主に低分子量 G タンパク質の下流で WASP ファミリータンパク質と Arp2/3 複合体によって形成されていることが判明した。例えば、クラスリン被覆小孔が切断され小胞となる過程ではアクチン重合が駆動力を発揮する。しかし、上述の多様なナノスケールの膜構造を正確に形成するには、その近傍でアクチンが重合するだけでは不十分である。このことはアクチン重合促進タンパク質と膜脂質を仲介するタンパク質の存在を示唆していた。

(2) WASP ファミリータンパク質は、そのアミノ酸配列の中央にポリプロリンを持つため、多数の SH3 ドメイン含有タンパク質と結合することが予想された。結合タンパク質を探索し、FBP17、CIP4、PACSIN2、IRSp53 などを同定した。これらは C 末端側に SH3 ドメイン、N 末端側に当時機能未知の coiled-coil 領域を持っていた。私たちは、この N 末端領域が、新規の脂質結合ドメインであることを突き止めた。このドメインを持つタンパク質を総称して BAR ドメイン含有タンパク質(BAR タンパク質)と呼ぶ。FBP17 や CIP4 の N 末端領域を細胞に過剰発現させたところ、顕著な細胞膜の陥入を誘導した。また、人工の脂質膜小胞(リポソーム)と混合したところ、不定形のリポソームが一定の直径の管状構造に変化した。結晶構造や電子顕微鏡像の解析により、FBP17 と CIP4 の BAR ドメインは、ほとんど同一の構造を持ち、そのバナナ状の立体構造の凹側の表面を介して脂質膜に結合し、さらにはせん状に集合、整列することで、脂質膜を管状に変形することが明らかになった(Shimada, 2007 Cell, 2010 FEBS lett 他)。

(3) 現在では、BAR ドメインを持つタンパク質(BAR タンパク質)は 70 種ほどがヒトにおいて知られている。その立体構造には多様性があり、その差異に応じて誘導される膜構造も異なっている。例えば、FBP17 はクラスリン被覆小孔の、PACSIN2 はカベオラの、陥入構造の形成にそれぞれ関与する(Shimada, 2007 Cell, Senju, 2011 JCS 他)。このように陥入構造に関与する BAR ドメインは多数存在する。これに対して、フィロポディアやラメリポディアなどの突起構造は、クラスリン

被覆小孔などの陥入構造とは細胞膜の変形方向が逆向きである。IRSp53 などは inverse BAR (I-BAR) ドメインと呼ばれる BAR ドメインと類似構造のドメインを持つ。しかし、I-BAR ドメインの立体構造はバナナ状に湾曲していないため、脂質結合面が凸面であり、従って、突起構造を形成する(Suetsugu, 2006 JCB, Oikawa 2013Plos One 他)。

(4) 突起構造の形成は、がん細胞の浸潤転移に関わることは広く知られている。それに次いで重要な現象の一つには、ファゴサイトーシスにおけるファゴサイトーシスカップがあげられる。ファゴサイトーシス(食作用)は、特にマクロファージなどの免疫細胞が、異物を「包み込むように」取り込み消化する現象である。この包み込む構造、ファゴサイトーシスカップもまた、他の細胞膜構造と同じように、低分子量 G タンパク質である Cdc42 や Rac の下流で WASP ファミリータンパク質が Arp2/3 複合体を活性化することで駆動されることが知られている。この経路は細胞の移動先端や浸潤に見られるラメリポディアなどの突起構造の形成機構と共通である。

(5) 突起構造に関与する BAR ドメインは、I-BAR をはじめとし、70 種中の 9 種しか、知られていない。しかし、近年の研究は、立体構造上の凸構造を持たない、つまり凹構造をもつ BAR タンパク質もまた、突起構造に局在することがわかってきた。その例として、CIP4 と GAS7 があげられる。

2. 研究の目的

細胞の突起構造は、アクチン重合を駆動力として形成され、がん細胞の浸潤転移に代表される細胞運動やファゴサイトーシス(食作用)などに重要な役割を果たす。細胞膜の直下で行われるアクチン繊維の形成機構は、細胞膜オルガネラ間で共通であるため、様々な生命現象に応じた多彩な細胞膜の突起構造が作り分けられる機構は明らかではない。細胞膜に結合し、共通のアクチン制御因子を制御するタンパク質ファミリーとして BAR タンパク質が同定された。本研究では、BAR タンパク質のなかで新規に突起構造形成への関与が示された CIP4 および GAS7 に焦点を絞り、それらの新規な突起膜構造形成機構を明らかにする。CIP4 については、ヘテロ多量体形成が、GAS7 については、ホモ多量体形成が、それぞれ鍵となると考えられ、これらを通じて、BAR タンパク質の多様な制御を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CIP4 の複合体形成によるがん細胞の浸潤突起の制御

YPEL の発現系の構築と脂質結合実験。
CIP4 の結合タンパク質として酵母 2 ハイブリッド法により YPEL タンパク質を見出した。CIP4 と YPEL タンパク質をそれぞれ精製し、それぞれ単体の場合と YPEL と複合体になっ

た場合の脂質結合を検討した。

YPEL の局在。

YPEL に対する抗体を作成し、内在性タンパク質の局在および様々BAR タンパク質との共局在を調べた。

浸潤転移実験。

RNAi により発現抑制した細胞を用いて、細胞の移動能に与える影響を調べた。

エンドサイトーシスの測定。

CIP4 はエンドサイトーシスに関与していることが知られているので、YPEL を抑制した場合のエンドサイトーシスを調べた。

免疫沈降実験。

免疫沈降実験により内在性の YPEL と CIP4 や他の BAR タンパク質との結合を調べた。

(2) GAS7 によるファゴサイトーシスの突起構造形成制御

立体構造解析。

GAS7 は SH3、WW、F-BAR ドメインの 3 つの機能ドメインからなる。GAS7 の F-BAR ドメインを用いて作成した結晶、および GAS7 の全長タンパク質を用いて作成した結晶から、分解能 3 Å のデータを用いて構造決定を行なった。

シグナル伝達経路における位置づけ。

GAS7 を制御、あるいは GAS7 が制御するタンパク質を同定するために、GAS7 結合タンパク質を酵母 2-ハイブリッド法を用いて探索した。

試験管内再構成。

GAS7 は、試験管内においても脂質膜と結合し、脂質膜の形状を変化させると考えられる。従って、試験管内で精製脂質により構成した人工脂質膜と反応させ、その形状の変化を電子顕微鏡を用いて調べた。

分子集合の解析。

GAS7 を HeLa 細胞などに過剰発現させることで、その細胞内の特徴的な局在、分子集合様式を調べた。

超解像解析。

GAS7 の局在を超解像顕微鏡を用いて調べることによって、細胞における GAS7 の分子集合を調べた。

ファゴサイトーシスの検討。

GAS7 のファゴサイトーシスへの関与、および、膜結合や分子集合に関わる変異体の発現の効果を調べた。

4. 研究成果

(1) CIP4 の複合体形成によるがん細胞の浸潤突起の制御

FBP17 と CIP4 は、ほとんど同一の立体構造を持つ。FBP17 と CIP4 の F-BAR ドメインを再構成脂質膜と反応させると、ともに立体構造に対応した凹構造の脂質二重膜のチューブが観測され、両者にほとんど違いが見られない。したがって、細胞内での局在、また、浸潤への関与の違いは CIP4 に特異的に存在する結合タンパク質にあると考え、CIP4 の BAR ドメ

イン(BAR ドメインの中で F-BAR ドメインサブファミリーに属する)に特異的に結合するタンパク質を、酵母 2 ハイブリッド法を用いて探索した。その結果、CIP4 の BAR ドメイン特異的な結合タンパク質として、YPEL を見いだした。

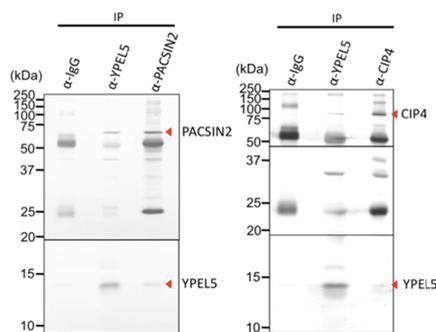
YPEL は 5 つのファミリーを持つが、その 5 つ全てが CIP4 に結合した。過剰発現した FBP17 は、試験管内の脂質膜変形と対応した細胞膜陥入構造を誘導する。ところが CIP4 は陥入構造を誘導せず、細胞の浸潤先端に局在する。YPEL を RNAi で発現抑制した細胞で CIP4 を過剰発現させたところ、FBP17 同様に細胞膜陥入構造を誘導する事を HeLa 細胞、B16 細胞などのがん細胞で見出した。このような陥入様の局在の YPEL RNAi による変化は、内在性の CIP4 においても見られた。さらに、内在性の CIP4 と YPEL5 の共局在を抗体染色により見出した。免疫沈降実験により、内在性の CIP4 と YPEL の局在を確認した(図 1)。さらに、YPEL1 と 5 を RNAi により発現抑制した細胞では、CIP4 依存的な浸潤能が低下していた。

YPEL タンパク質が CIP4 特異的な相互作用様式を持つかどうか調べた。まず、CIP4 以外の BAR ドメインを持つタンパク質と人工脂質膜との相互作用を YPEL が抑制できるかどうか調べた。その結果、CIP4 に加えて、程度の違いはあるものの、PACSIN2 や FBP17 と脂質の結合も YPEL が抑制することを見出した。すなわち、CIP4 結合タンパク質として同定されたものの、多様な F-BAR ドメインタンパク質の機能を調節していることが示唆された。すなわち、このタンパク質は、膜形態の一般的な制御因子となっている可能性を見出した。

ついで、YPEL と PACSIN2 の細胞内でのタンパク質相互作用や、共局在を調べた。その結果、内在性の PACSIN2 との共局在の観察に成功した。また免疫沈降実験により内在性 PACSIN2 と YPEL の結合を確認した(図 1)。さらに siRNA による YPEL の発現抑制実験を行い、PACSIN2 の局在する膜構造の形状が変化することを確かめた。

これらのことから、確かに YPEL は CIP4 や PACSIN2 の局在や機能を制御していることが示唆された。一方、生化学的な解析は、組み

図 1 CIP4、PACSIN2 と YPEL の免疫沈降による結合の検討



換えタンパク質の可溶化が困難であることから、結合部位の同定や複合体の生成には至っていない。今後結合部位の同定や可溶化のための変異体作成を進める予定である。

(2) GAS7 によるファゴサイトーシスの突起構造形成制御

GAS7 の F-BAR ドメインの立体構造解析に着手し、タンパク質の大量調製、結晶化、X 線回折実験による反射データの取得、および位相決定に成功し、九州大学 嶋田睦 准教授の協力を得て、精密構造モデルを構築した。また、GAS7 全長の結晶の作成にも成功し、反射データの取得、構造決定を行なったが、F-BAR ドメイン以外の構造は解析できなかった。

GAS7 の BAR ドメイン、他の F-BAR ドメインに類似しているが、より直線状の構造を持っていた。すなわち、F-BAR ドメインの膜結合面の曲率が、BAR ドメインの形成する膜構造の曲率半径に対応することを考えると、GAS7 の F-BAR ドメインはより大きな膜構造、すなわち、大きな陥入構造と捉えることも可能であるファゴサイトーシスカップに対応する大きな膜曲率に対応すると考えられた。

興味深いことに、GAS7 の F-BAR ドメインは、タンパク質結晶中で、特徴的な相互作用を行い、シート状の構造形成が示唆された。得られた立体構造を元に、変異導入を進め、脂質結合面を明らかにした。その結果、機能する膜構造と立体構造が明らかになった。

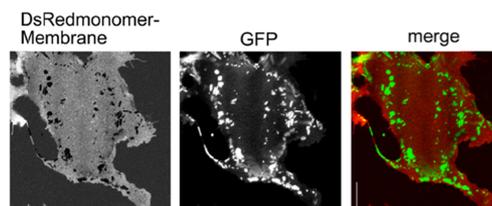
GAS7 を HeLa 細胞に過剰発現させたところ、他の既知の BAR ドメインが、細長い突起や勧誘構造を誘導することと異なり、GAS7 はファゴサイトーシスに関連するリング状あるいはシート状に集合した構造を細胞膜上に形成することを見いだした。興味深いことに、この GAS7 のシート構造は、細胞膜上を拡散するミリスチン化された蛍光タンパク質を排除したことから、密なタンパク質集合であることがわかった(図2)。大きなカップ状構造は、その形状により、ファゴサイトーシスカップを示唆したので、マクロファージ細胞(RAW264)において、GAS7 の局在を抗体染色により調べたところ、ファゴサイトーシスカップへの GAS7 の内在性タンパク質の局在を見出した。

さらに GAS7 に対する RNAi を用いて GAS7 の発現抑制をしたところ、ファゴサイトーシスの基質として用いられる Zymosan などのファゴサイトーシスを抑制することを示した。さらに、内在性の GAS7 は確かにファゴサイトーシスカップに局在した。マクロファージの GAS7 ノックアウト株を作成し、GAS7 の機能を調べたところ、ファゴサイトーシスカップの形成に関与していることが示唆された。ファゴサイトーシスカップは突出膜様の構造であり、凹面の膜結合面を持つ BAR タンパク質が機能することは非常に興味深い。また超解像解析を行い、ファゴサイトーシスにおける GAS7 の局在を詳しく調べたところ、高

密度の構造体を形成していた。

2-hybrid 法を用いて、GAS7 の結合タンバ

図2 GAS7 の細胞内タンパク質シート
GAS7 とミリスチン化された DsRed が互いに排他的に局在している。



ク質を探していくつかの結合タンパク質の候補を得た。これらのタンパク質と GAS7 の結合は、共沈実験及び発現タンパク質の共局在により観察した。現在、これらのタンパク質が GAS7 の脂質膜への結合などの機能にどのように関与しているか解析している。

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 7 件)

Itoh Y., Kida K., Hanawa K., Suetsugu S., Yeast Ivy1p Is a Putative I-BAR-domain Protein with pH-sensitive Filament Forming Ability in vitro. , Cell Struct Funct., 査読有, Vol.41(1), 2016, 1-11, 10.1247/csf.15014e

Suetsugu S., Higher-order assemblies of BAR domain proteins for shaping membranes., Microscopy (Oxf), 査読有, Vol.65, No.3, pp.201-210, 10.1093/jmicro/dfw002

末次志郎、高橋重成、伊藤弓弦、竹村和浩、嶋田睦、北尾彰朗、森泰生、TRPV4 イオンチャネルのアンキリンリピートドメインと PI(4,5)P2 の相互作用による新たな制御機構、生物物理、査読有、55 巻、2015、5 号、262-265、10.2142/biophys.55.262

Senju Y., Rosenbaum E., P Shah C., Hamada-Nakahara S., Itoh Y., Yamamoto K., Hanawa-Suetsugu K., Daumke O., Suetsugu S., Phosphorylation of PACSIN2 by protein kinase C triggers the removal of caveolae from the plasma membrane., Journal of Cell Science, 査読有, Vol.128, No.15, 2015, 2766-2780, 10.1242/jcs.167777

末次志郎、細胞膜形態形成に関わるタバ^oク質と細胞骨格制御の研究、査読有、生化学、2014、86 巻、5 号、637-649、http://www.jbsoc.or.jp/ebook/ebook_JBS8605/#636

Suetsugu S., Kurisu K., Takenawa T., Dynamic Shaping of Cellular Membranes by Phospholipids and

Membrane-Deforming Proteins., 査読有,
Physiological Reviews, 2014, Vol.94,
No.4, 1219-1248,
10.1152/physrev.00040.2013
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, 査読有, Nature Commun,
Vol.5, 2014, p.4994,
10.1038/ncomms5994

[学会発表](計26件)

末次志郎, BARドメインタンパク質の立体構造とファゴサイトーシにおける機能, 第122回日本解剖学会, 2017.3.29, 長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

末次志郎, BARドメインタンパク質の立体構造とファゴサイトーシにおける機能, 第137回日本薬学会年会, 2017.3.25, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Yuzuru Itoh, Kazuki Kida, Kyoko Hanawa, Shiro Suetsugu, Yeast Ivy1p Is a Putative I-BAR-domain Protein with pH-sensitive Filament Forming Ability in vitro., American Society for Cell Biology, 2016.12.6, Moscone center (San Francisco, USA)

久保田悟, 瑤京子, 末次志郎, F-BARタンパク質 GAS7 と脂質膜の相互作用の解析, 第39回日本分子生物学会年会, 2016.12.1, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

大山拓也, 木田和輝, 北又学, 瑤京子, 末次志郎, MIM の I-BARドメインと脂質膜との相互作用, 第39回日本分子生物学会年会, 2016.12.1, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

磯野早織, 久保田悟, 中原明香, 瑤京子, 末次志郎, GAS7 と相互作用する新規タンパク質の探索, 第39回日本分子生物学会年会, 2016.12.1, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

末次志郎, BARタンパク質による細胞膜の形態形成とファゴサイトーシの関連, 第54回日本生物物理学会年会, 2016.11.25, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

末次志郎, Regulation of Caveolar Morphology by the F-BAR Domain Protein PACSIN2/Syndapin, 第22回国際眼研究学会, 2016.9.28, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

木田和輝, 瑤京子, 北又学, 末次志郎, BARタンパク質イントロフィリンの膜切断活性とがんにおける変異, 第89回日本生化学会大会, 2016.9.25, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

末次志郎, BARタンパク質による細胞膜の形態形成とファゴサイトーシの関連, 第89回日本生化学会大会, 2016.9.25, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

瑤京子, 清水亜里紗, 福永優也, 末次志郎, 新規結合タンパク質による F-BARタンパク質 CIP4 の管状形成阻害機構の解明, 第68回日本細胞生物学会大会, 2016.6.17, 京都リッツ(京都府京都市) 多羅尾賢斗, 瑤京子, 末次志郎, 加ヘリンの局在化における I-BARタンパク質 IRSp53 の役割, 第68回日本細胞生物学会大会, 2016.6.17, 京都リッツ(京都府京都市)

末次志郎, BARタンパク質による細胞膜の形態形成, 第16回日本蛋白質科学会年会, 2016.6.7, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

木田和輝, 北又学, 瑤京子, 末次志郎, BARタンパク質イントロフィリンの膜切断活性とがんにおける変異, BMB2015, 2015.12.1, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

多羅尾賢斗, 瑤京子, 末次志郎, 上皮間葉転換における IRSp53 の役割, BMB2015, 2015.12.1, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

福永優也, 瑤京子, 末次志郎, 新規結合タンパク質による F-BARタンパク質 CIP4 の管状形成阻害, BMB2015, 2015.12.1, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

Shiro Suetsugu, Nobuyuki Takahashi, Yuzuru Itoh, Kazuhiro Takemura, Akio Kitao, Yasuo Mori, The identification of the ankyrin repeat domain as a novel lipid-binding module, 第53回日本生物物理学会年会, 2014.9.14, 金沢大学(石川県金沢市)

竹村和浩, 末次志郎, 北尾彰朗, アンキリンドメインと脂質の相互作用による TRPV1 チャネル活性の制御, 第53回日本生物物理学会年会, 2015.9.13, 金沢大学(石川県金沢市)

北又学, 末次志郎, ANKHD1 の脂質結合を介した小胞形成能の同定, 第67回日本細胞学会年会, 2015.7.2, 夕陽ホール船堀(東京都江戸川区)

末次志郎, TRPV4 channel activity is modulated by direct interaction of the ankyrin domain to PI(4,5)P2, 第88回日本薬理学会年会, 2015.3.18, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

21 立川正志, 諸根信弘, 末次志郎, 加ヘリンの張力応答反応の理論解析と超解像解析, 第37回日本分子生物学会年会, 2014.11.25, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

22 末次志郎, Identification of ankyrin-repeat domain as a novel lipid-binding module-A study on

regulation of TRPV4 by PI(4,5)P2, CNRS-Jacques Monod Conference "Molecular basis for membrane remodeling and organization 2014, 2014.11.15, CNRS- Conference Jacques Monod Station Biologique de Roscoff (Roscoff, France)

- 23 末次志郎、TRPV4 のリポ脂質による制御、生理学研究所 研究会「TRP 家族研究を通じて見えてきた新たな生理学への光」, 2014.6.5、生理学研究所(愛知県岡崎市)
- 24 立川正志、末次志郎、低浸透圧下でのカバールの変形を物理から理解する、第 6 回日本細胞生物学会大会、2014.6.13、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)
- 25 埴京子、末次志郎、F-BAR ドメイン含有タンパク質 CIP4 の新規結合タンパク質による細胞運動制御、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014.6.13、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)
- 26 北又学、末次志郎、ANKHD1 と ANKRD17 の脂質結合能とその細胞機能分析、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014.6.13、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホ ム ペ ー ジ 等

<http://bsw3.naist.jp/suetsugu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末次志郎 (SUETSUGU SHIRO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：70345031

(2) 研究分担者

末次京子 (SUETSUGU KYOKO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：40391990