

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840037

研究課題名(和文)細胞膜カーブを介した新しいシグナル伝達複合体のモデル構築

研究課題名(英文)The role of membrane curvature in the regulation of novel signaling complex

研究代表者

坂本 泰久(Sakamoto, Yasuhisa)

熊本大学・生命科学研究部・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)：HECTタイプのE3ユビキチンリガーゼNedd4ファミリーに属すNedd4Lは積荷分子のユビキチン化を介してエンドサイトーシスを制御する。本研究ではalphaアレスチンファミリーARRDC1によるNedd4L制御機構を調べ、以下のことが明らかになった。ARRDC1は湾曲した細胞膜に直接結合し、Nedd4Lを細胞膜にリクルートした。ARRDC1は細胞膜カーブに依存してNedd4Lを活性化し、基質のユビキチン化を促進した。本研究によって細胞膜カーブがARRDC1とNedd4Lのシグナル伝達複合体を制御する機構が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Nedd4L is a member of HECT type E3 ubiquitin ligase Nedd4 family. Nedd4L induces endocytosis through the ubiquitination of cargo proteins. In this study, we examined the mechanism by which alpha-arrestin family ARRDC1 regulates Nedd4L. ARRDC1 directly binds to membrane curvature and recruits Nedd4L. ARRDC1 activates Nedd4L and mediates the ubiquitination of cargo protein in membrane curvature dependent manner. These results indicate that membrane curvature plays a pivotal role in the regulation of ARRDC1-Nedd4L protein complex.

研究分野：生化学

キーワード：細胞膜カーブ エンドサイトーシス ユビキチン化

### 1. 研究開始当初の背景

HECT タイプ E3 ユビキチンリガーゼ Nedd4 ファミリーに属す Nedd4L は積荷分子のユビキチン化を介してクラスリン型エンドサイトーシスを制御する。Nedd4L は Ca イオン依存的に細胞膜に結合する C2 ドメインとユビキチン化酵素活性を持つ HECT ドメインの分子内相互作用によって自己抑制されており、その活性化機構には不明な点が多い。最近、私共は Nedd4L の活性化に重要な細胞膜の特性として、微小な細胞膜のカーブを見出した。このような微小な細胞膜カーブは細胞内ではクラスリン被覆ピットで観察される。クラスリン被覆ピットにおける Nedd4L の局所的な活性化は細胞膜タンパク質のユビキチン化と、それに続くエンドサイトーシスに必須であると考えられる。

### 2. 研究の目的

我々が見出した Nedd4L の活性化メカニズム、すなわちクラスリン被覆ピットの細胞膜カーブによる細胞内シグナル伝達分子の活性化は普遍的なメカニズムなのか？それを証明するために、Nedd4L 以外の分子がクラスリン被覆ピットの細胞膜カーブによって機能調節されるモデルを検証する必要がある。私共は新たに細胞膜カーブを認識する分子として、alpha アレスチンファミリーの ARRDC1 を同定した。alpha アレスチンファミリーと Nedd4 ファミリーは酵母からヒトまで保存されており、タンパク質相互作用するなど遺伝的相関がある。両者の協調的な働きを調べることでシグナル伝達における細胞膜カーブの役割の普遍性と進化における保存性が明らかになると考えられる。

### 3. 研究の方法

ARRDC1 が Nedd4L とタンパク質複合体を形成し、細胞膜カーブを介して Nedd4L の活性化を制御する機構を明らかにする。そのため以下二つの点を明らかにする。

ARRDC1 が細胞膜カーブを認識する機構を明らかにする。

培養細胞に ARRDC1 の様々な領域を強制発現させ、細胞膜への局在を調べる。さらに組み換えタンパク質とリポソームを用いた結合実験によって ARRDC1 とリン脂質の結合を詳細に調べる。

ARRDC1 による Nedd4L 活性制御機構を明らかにする

培養細胞に Nedd4L を強制発現し、Nedd4L の自己ユビキチン化を指標に Nedd4L 活性化を測定する。この時に ARRDC1 の働きを調べる。異なるアプローチとして組み換えタンパク質を用いた *in vitro* ユビキチン化実験によって Nedd4L の自己ユビキチン化、基質のユビキチン化を調節する因子を検証する。

### 4. 研究成果

本研究では Nedd4L と基質を繋ぐアダプター分子 ARRDC1 の機能における細胞膜カーブの役割を検証し以下の事を明らかにした。

ARRDC1 の細胞膜局在に関わる責任領域を詳細に調べ、膜結合に必要な領域を同定した(図1)。

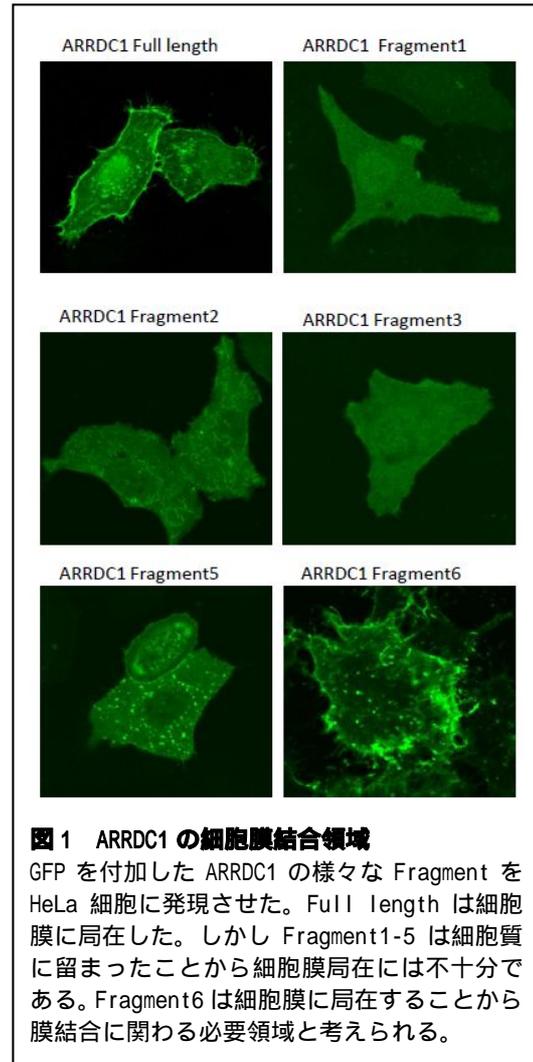


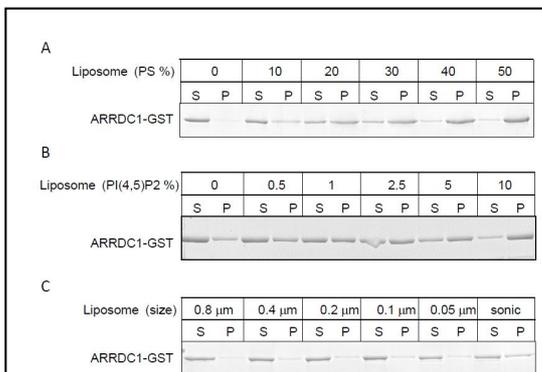
図1 ARRDC1 の細胞膜結合領域

GFP を付加した ARRDC1 の様々な Fragment を HeLa 細胞に発現させた。Full length は細胞膜に局在した。しかし Fragment1-5 は細胞質に留まったことから細胞膜局在には不十分である。Fragment6 は細胞膜に局在することから膜結合に関わる必要領域と考えられる。

ARRDC1 は細胞膜に存在する特定のリン脂質に直接結合することを明らかにした(図2)。

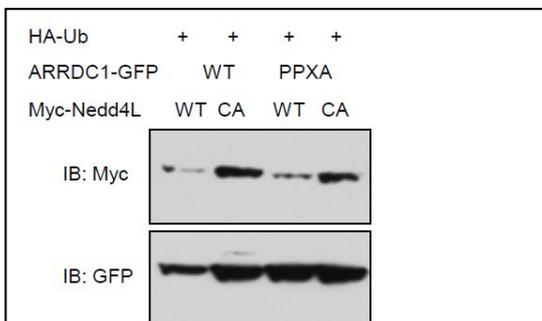
ARRDC1 による Nedd4L の活性化を評価する *in vivo* 実験系の構築を試みた。しかし HEK293 細胞に ARRDC1 と Nedd4L を共発現するとタンパク質相互作用依存的、Nedd4L 活性依存的に両者の発現量が著しく低下したので *in vivo* 実験系では Nedd4L の活性化を評価できなかった(図3)。

Nedd4L の活性化を評価する *in vitro* 実験系を構築した。ARRDC1 は基質と Nedd4L をリンクするだけでなく Nedd4L を活性化することを明らかにした(図4)。



**図2 ARRDC1 のリン脂質結合アッセイ**

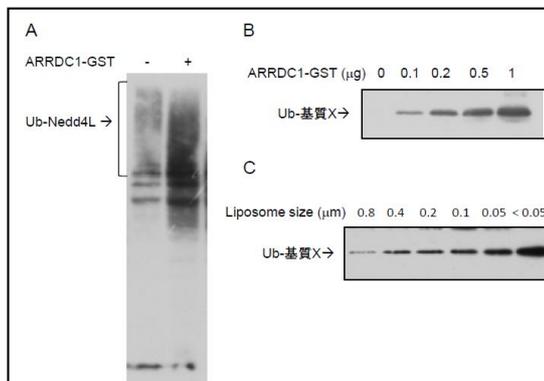
ARRDC1 の組み換えタンパク質とフォスファチジルセリン (PS) またはホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PI(4,5)P2) を図に示す割合で含むフォスファチジルコリンを基本としたリポソームの結合を Sedimentation assay によって調べた。(A) ARRDC1 は PS と (B) PI(4,5)P2 の濃度依存的にリポソームに結合した。(C) 様々なサイズのリポソームとの結合実験から、ARRDC1 は微小な膜カーブにより強く結合することが明らかになった。



**図3 in vivo Nedd4L 活性化アッセイ**

HEK293 細胞に Myc-Nedd4L 野生型 (WT) または不活性化型 (CA)、ARRDC1-GFP 野生型 (WT) または Nedd4L 非結合型 (PPXA)、さらに HA-Ubiquitin を発現させ、細胞ライセートに含まれる発現タンパク質量をウェスタンブロットティング (WB) で解析した。Nedd4L と ARRDC1 の細胞内発現量は Nedd4L の活性依存的 (Nedd4L WT と CA の比較)、ARRDC1 と Nedd4L の結合依存的 (ARRDC1 WT と PPXA の比較) に減少した。

これらの結果から以下のモデルが考えられる。クラスリン被覆ピットに存在する負に帯電したリン脂質、そして細胞膜カーブによって、Nedd4L と ARRDC1 という積荷分子のユビキチン化に関わる分子がリクルートされる。ARRDC1 は Nedd4L のアダプター分子として働き、同時に細胞膜カーブに依存して Nedd4L を活性化する。これによって積荷分子は効率的にユビキチン化されエンドサイトーシスされる。本研究によって細胞膜カーブが ARRDC1 と Nedd4L のシグナル伝達複合体を制御する機構が明らかになった。



**図4 in vitro Nedd4L 活性化アッセイ**

試験管内で Nedd4L の活性化を評価する実験系を構築した。(A) Nedd4L は ARRDC1 によって自己ユビキチン化を促進し活性化する。ユビキチン化した Nedd4L を WB で検出した。(B) Nedd4L は ARRDC1 依存的に基質 X (未発表なので X とする) をユビキチン化した。ユビキチン化した基質 X を WB で検出した。(C) Nedd4L は ARRDC1 存在下でリポソームのサイズ依存的に基質 X をユビキチン化する。径の小さなリポソームほど基質のユビキチン化を促進した。

## 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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：