

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：17102

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)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：70391977

研究成果の概要（和文）：

真核細胞が外部の物質を細胞内に取り込む仕組みの一つであるエンドサイトーシスは、細胞表面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。本研究課題では、synaptojanin, PACSIN2/Syndapin II, CIP4, FBP17, Cdc42, WAVE2 複合体などの複数のエンドサイトーシス関連タンパク質およびタンパク質複合体の構造機能解析を行い、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の一端を解明した。

研究成果の概要（英文）：

Endocytosis is a process by which eukaryotic cells internalize extracellular materials into the cell. This process plays an important role in a variety of fundamental physiological responses, such as cell surface receptor internalization and somatic nutrient uptake. In this project, we performed structural and functional analyses of endocytic proteins, such as synaptojanin, PACSIN2/Syndapin II, CIP4, FBP17, Cdc42, and WAVE2 complex, and revealed the structural bases of various aspects of vesicle formation in endocytosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
総計	19,400,000	5,820,000	25,220,000

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

1. 研究開始当初の背景

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。し

かし、真核生物のタンパク質には、分子量の大きなタンパク質やドメイン境界の明らかでないタンパク質も多く、機能発現機構の不明なタンパク質も多数存在する。そのような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シナプスにおけるシナプス小胞のリサイクリング、体細胞における栄養摂取などの様々な基本生命現象において重要な役割を果たしている経路である。代表的なエンドサイトーシス経路の一つであるクラスリン依存性エンドサイトーシスは、(1) クラスリン集積、(2) 細胞膜の陥入、(3) ネック形成、(4) 小胞の細胞膜からの分離、(5) 小胞からの被覆タンパク質の解離、などの複数のステップを経て進行し、各ステップの進行には、クラスリンやダイナミン等の複数の可溶性タンパク質が関与していることが知られていたが、その機能発現機構の詳細には不明な点も多かった。

研究代表者は、本研究課題申請時まで、エンドサイトーシスに関与する複数の関連タンパク質の構造機能解析に取り組んでおり、特にヒト CIP4 とヒト FBP17 の新規脂質膜変形モジュールである EFC/F-BAR ドメインについては、その立体構造を決定し、電子顕微鏡観察、生化学実験、細胞生物学的手法を組み合わせることで、EFC/F-BAR ドメインによる脂質膜チューブ化機構とそのエンドサイトーシスにおける役割を世界に先駆けて解明した (Shimada et al., Cell, 129, 761-772, 2007)。

エンドサイトーシス過程の進行にはこれらのタンパク質以外にも多数の可溶性タンパク質が関与しており、これらのうち、特に構造機能解析の遅れているエンドサイトーシス関連タンパク質の構造機能解析を進めることで、エンドサイトーシスにおける小胞形成機構の理解を深めるために、本研究計画を申請した。

2. 研究の目的

本研究課題の研究目的は、立体構造や作動機構の詳細の不明なエンドサイトーシス関連タンパク質について構造機能解析を行い、エンドサイトーシスにおけるダイナミックな小胞形成機構の一端を解明することにある。具体的な研究対象として、クラスリン依存性エンドサイトーシスの小胞形成におけるネック形成ステップに関与すると考えられる sorting nexin 9 (SNX9) や、エンドサイトーシス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 を中心に構造機能解析を進めることを当初計画していたが、SNX9 に関しては、課題申請直後に海外の他のグループにより立体構造と機能解析についての報告が出されたため、CIP4 や FBP17, Cdc42, PACSIN2/Syndapin II, WAVE2 複合体などの他のエンドサイトーシス関連タンパク質の構造機能解析にもより力を入れ、synaptojanin とともに構造機能解析を進

めることとした。

3. 研究の方法

(1) synaptojanin の構造機能解析

クラスリン依存性エンドサイトーシスにおける小胞の細胞膜からの分離や、小胞からの被覆タンパク質の解離において重要な役割を果たす synaptojanin タンパク質は、基質特異性の異なる二つのイノシトールリン脂質脱リン酸化ドメインである SAC ドメインと、inositol 5-phosphatase ドメインを保持している。このうち、SAC ドメインはリン酸化状態の異なる複数のイノシトールリン脂質に対して、広い脱リン酸化活性を保持するが、その基質認識機構の詳細は判明していない。一方、5-phosphatase ドメインは、イノシトールリン脂質の 5 位のリン酸基を特異的に脱リン酸化する。これらのドメインは、クラスリン依存性エンドサイトーシスの特定のステップで協調して機能すると考えられるが、機能発現の調節機構や特に SAC ドメインによる基質認識機構の詳細は不明である。

この synaptojanin タンパク質のエンドサイトーシスにおける機能発現機構を解明するために、まず、構造解析や生化学的解析に適した synaptojanin タンパク質フラグメントを精製標品として得ることを目指した。構造機能解析に適した synaptojanin タンパク質試料を得るために、ヒト synaptojanin の二つのアイソフォームである synaptojanin 1 と synaptojanin 2 について、SAC ドメインと 5-phosphatase ドメインを含む複数のフラグメントの大量発現精製を試みた。フラグメントは、大腸菌発現系による GST 融合タンパク質としての発現や、大腸菌無細胞タンパク質発現系による His-tag 融合タンパク質としての発現により調製した。その結果、synaptojanin 2 に関して、大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いて、5-phosphatase ドメイン単独、および SAC ドメインと 5-phosphatase ドメインの複合体 (二つのドメインを別々に共発現した試料) の可溶性画分への大量発現精製に成功し、これらの試料を用いて市販の結晶化スクリーニングキットによる結晶化を行った。また、SAC ドメインと 5-phosphatase ドメインを含む約 1000 残基の領域に関しても無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質試料の発現精製を行った。

(2) CIP4 と Cdc42 および FBP17 と Cdc42 の複合体の構造機能解析

CIP4 と FBP17 は、クラスリン依存性エンドサイトーシスの膜陥入ステップとエンドサイトーシスに付随するアクチン細胞骨格の再編成に関与するタンパク質である。CIP4 と FBP17 は、研究代表者らのグループが過去に

構造決定を行った EFC/F-BAR ドメインに加え、Rho ファミリーの GTP 結合タンパク質である Cdc42 に結合する HR1 ドメインを保持しており、これらのドメインはクラスリン依存性エンドサイトーシスにおいて協調して機能していると考えられる。しかし、HR1 ドメインと Cdc42 の結合の生理的意義の詳細は不明であった。研究代表者らは、Cdc42 の結合が CIP4 や FBP17 のクラスリン集積部位へのリクルートに必須であるという仮説を立て、その検証のために下記の実験を行った。

Cdc42 と CIP4 の HR1 ドメインの複合体の結晶構造は本研究課題開始時に既に得ていたが（未発表）、FBP17 に関しては、細胞内での Cdc42 との共局在が示されていたが、試験管内での Cdc42 への結合活性が報告されておらず、実際に Cdc42 に結合するかどうか、またその結合様式の詳細も不明であった。そのため、まず X 線結晶構造解析により、FBP17 の HR1 ドメインと Cdc42 の複合体の立体構造の決定を行った。構造決定に使用した FBP17 の HR1 ドメインと Cdc42 のタンパク質試料は、共に大腸菌無細胞タンパク質合成系により別個に調製した。その後、既存の方法に従って Cdc42 を GTP の非加水分解アナログである GMPPNP に結合させた後、HR1 ドメインと Cdc42 の精製タンパク質をモル数が等しくなるように混合し、結晶化に使用した。複合体の結晶化は市販のスクリーニングキットにより行った。結晶は、抗凍結剤を沈殿剤に加えて凍結し、放射光施設 SPring-8 のビームライン BL41XU で X 線回折データ収集を行った。得られたデータから構造因子を求め、CIP4 の HR1 ドメインと Cdc42 の複合体の立体構造をサーチモデルとした分子置換法により結晶構造を決定した。

また、等温滴定カロリーメトリーにより CIP4 や FBP17 の HR1 ドメインと Cdc42 の正確な結合定数を決定した。さらに、この手法を用いて HR1 と Cdc42 の結合のヌクレオチド依存性や変異の導入による結合強度の変化を定量的に解析した。

また、全反射蛍光顕微鏡を用いて CIP4 のクラスリン被覆ピットへの局在の様子と局在のタイミングを解析し、CIP4 のクラスリン被覆ピットへの局在の Cdc42 依存性を、Cdc42 の RNAi によるノックダウン実験や、構造に基づきデザインした Cdc42 に結合しない CIP4 変異体を用いた実験により解析した。

(3) PACSIN2/Syndapin II の構造機能解析

PACSIN2/Syndapin II は、クラスリン依存性エンドサイトーシスに関与することが報告されているタンパク質であり、CIP4 や FBP17 と同様に EFC/F-BAR ドメインを保持している。PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメインと CIP4 や FBP17 の EFC/F-BAR ドメインの一次構

造の相同性は 18%以下と低いことから、PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメインは CIP4 や FBP17 とは異なる機能を発現するための特有の構造を有している可能性が高いと考えられた。そのため、エンドサイトーシスにおいてこのタンパク質が果たす役割を解明するため、PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメインの構造機能解析を行った。PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメインは、大腸菌無細胞タンパク質発現系により調製した。また分子置換法では構造決定出来なかったため、メチオニンをセレノメチオニンに置換したセレノメチオニン化タンパク質を無細胞タンパク質発現系により調製し、SAD 法により構造決定を行った。初期結晶化スクリーニングは、市販のスクリーニングキットを用いて行った。結晶が得られた条件について pH の検討や添加剤の添加などにより結晶化条件の最適化を行った。このようにして得られた結晶に抗凍結剤を加えて凍結し、放射光施設フォトンファクトリーのビームライン BL-5A で X 線回折データの収集を行い、SAD 法により構造を決定した。

(4) WAVE2 複合体の構造機能解析

クラスリン依存性エンドサイトーシスの膜陥入ステップと小胞分離ステップにはアクチン重合が付随し、エンドサイトーシスの進行に重要な役割を果たしていることが知られている。

このアクチン重合は従来、N-WASP を介した Arp2/3 複合体の活性化が担っていると考えられてきたが、最近、WAVE1 複合体や WAVE2 複合体がこのアクチン重合に関与する可能性が指摘された。そこで、エンドサイトーシスにおけるアクチン重合機構の理解を深めるため、WAVE2 複合体の構造機能解析を行った。WAVE2 複合体は、WAVE2, Abil, HSPC300, Nap1, Sra1 の 5 つのタンパク質から構成される大きな複合体であり、そのうち WAVE2, Abil, HSPC300 はコア複合体を形成することが知られている。WAVE2 複合体の機能発現機構を解明するために、まずこのコア複合体のうち、WAVE2 の WAVE homology ドメイン (WHD) と HSPC300 の複合体の構造解析を行った。

WAVE2 の WHD と HSPC300 は、無細胞タンパク質発現系を用いて共発現し、複合体として精製および結晶化を行った。結晶は抗凍結剤を沈殿剤に加えて凍結し、放射光施設 SPring-8 のビームライン BL26B2 で X 線回折データ収集を行い、得られたデータから構造因子を求め、HSPC300 のセレノメチオニン化タンパク質を用いて SAD 法により構造を決定した。

4. 研究成果

(1) synaptojanin の構造機能解析

ヒト synaptojanin 1 と synaptojanin 2 の

フラグメントに関して、GST 融合タンパク質として大腸菌での発現を行い、SAC ドメインの一部を含む領域が可溶性画分に発現することを示唆する結果を得たが、大量発現精製には成功しなかった。

一方、無細胞タンパク質合成系を用いた発現では、これらのタンパク質の SAC ドメインと 5-phosphatase ドメインを含む複数のフラグメントに関して可溶性画分への発現に成功した。このうち、synaptojanin 2 の 5-phosphatase ドメインについては単独で可溶性画分への大量発現精製に成功したため、結晶化を行ったが、結晶は得られなかった。

また synaptojanin 2 の SAC ドメインを無細胞タンパク質発現系を用いて発現したところ、単独では発現量が少なかったが、5-phosphatase ドメインとの共発現により、SAC ドメインの発現量が改善することを見出した。このことを利用して、SAC ドメインと 5-phosphatase ドメインの複合体の大量発現精製に成功し、結晶化スクリーニングを行ったが、結晶は得られなかった。

さらに、synaptojanin 2 の SAC ドメインと 5-phosphatase ドメインを含む約 1000 残基の比較的大きなフラグメントに関しても、無細胞タンパク質発現系を用いて、可溶性画分への発現に成功した。しかし、可溶性画分に発現する量が少なく、結晶化スクリーニングに十分な量のタンパク質試料は調製出来なかった。

このように、synaptojanin の構造機能解析に関しては、複数のフラグメントについて、結晶化に用いることが出来る精製標品を得ることに成功しており、今後はこれらのフラグメントに関して、リガンドの添加などの結晶化スクリーニング条件の検討を行い、結晶化を目指したい。さらに、SAC ドメインと 5-phosphatase ドメインを両方含むような長いフラグメントに関しても、安定な可溶性タンパク質として精製可能であることを確認しており、今後は、無細胞反応系へのシャペロンの添加などの条件検討を行うことにより、発現タンパク質の可溶性を高めるなどして、結晶化スクリーニングを行えるだけの量の試料の調製および構造決定を目指す。

(2) CIP4 と Cdc42 および FBP17 と Cdc42 の複合体の構造機能解析

FBP17 の HR1 ドメインと Cdc42 の複合体の構造解析の結果、FBP17 の HR1 ドメインは、CIP4 の HR1 ドメインと類似した様式で、GTP 結合型 Cdc42 のエフェクター領域に結合することが判明した。エフェクター領域はヌクレオチドの結合状態により構造の大きく変化する領域であり、CIP4 の HR1 ドメインと FBP17 の HR1 ドメインは、GTP 依存的に Cdc42 に結合することが示唆された。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ーメトリーにより決定した。これにより、これまで生化学的手法では確認されていなかった FBP17 と Cdc42 の結合を確認するとともに、CIP4 と FBP17 の HR1 ドメインと Cdc42 が比較的弱く結合することを明らかにした。また、HR1 ドメインと Cdc42 の結合がヌクレオチドの結合状態に依存することを確認した。

さらに、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、RNAi による Cdc42 のノックダウン実験や、Cdc42 に結合しない CIP4 の変異体を用いた細胞生物学的実験により証明した。また興味深いことに、Cdc42 と CIP4 は、特に比較的広い範囲を陥入させるようなクラスリン依存性エンドサイトーシスを担うことを示唆する細胞生物学的知見を得た。

Cdc42 の関与する細胞内シグナル伝達経路は、アクチン細胞骨格の再編成、細胞極性の決定、細胞のがん化などにおいて重要な役割を果たすことが知られているが、今回、Cdc42 のエンドサイトーシスにおける重要な役割が解明されたことで、これまで Cdc42 のシグナル伝達経路に関して行われてきた細胞生物学的実験の解釈や、がんなどの疾患への Cdc42 の関与のメカニズムに関して、エンドサイトーシスという視点を踏まえて、再考する必要があることが判明し、この知見は今後、関連分野の進展に大きく貢献すると考えられる。

(3) PACSIN2/Syndapin II の構造機能解析

PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメインについて結晶構造の決定に成功し、このドメインが、主として α ヘリックスから構成された二量体であり、横から見るとゆるやかなカーブを保持しているが、上から見ると S 字型をしている、これまでに報告された EFC/F-BAR ドメインの構造とは異なる構造を保持していることが判明した (図 1A-1C)。

PACSIN2 は、細胞内に過剰発現すると、細胞膜が内向きに陥入したチューブ状の膜構造と、細胞膜が外向きに突出した膜突起構造を同時に形成する (雑誌論文①)。興味深いことに、これらの異なるトポロジーを持った膜構造の形成に重要なアミノ酸残基は共通しており、膜に挿入される疎水性アミノ酸を含むループ領域と、二量体分子のカーブの内側の正電荷を帯びた塩基性アミノ酸クラスター領域に存在することが判明した (図 1D-1G; 雑誌論文①)。PACSIN2 は、膜陥入構造上では全体に渡って局在するが、膜突起構造上では、突起の根元に局在している。膜突起構造の根元には、膜陥入構造と同様に、PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメインのカーブの内側に沿って相互作用するのに都合の良い曲

率の脂質膜が存在することから、PACSIN2は、同じ相互作用面で脂質膜と相互作用することにより、異なるトポロジーを持った膜構造の形成に関与するというメカニズムが示唆された(雑誌論文①)。

また PACSIN2 は、クラスリン依存性エンドサイトーシスへの関与が報告されていたが、最近の研究では、別のエンドサイトーシス経路である、カベオラ依存性エンドサイトーシスのプラットフォームとなるカベオラの形成にも関与することが報告されており、今後カベオラの構成タンパク質との複合体の構造解析などにより、カベオラ形成の機構の理解もさらに進展すると考えられる。

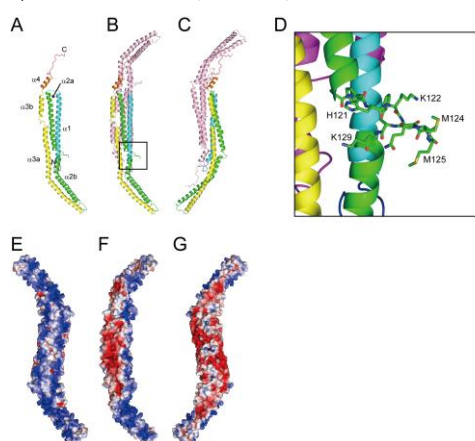


図1. PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメインの結晶構造

(A) PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメインの単量体の構造. (B, C) PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメインの二量体の構造. (D) 脂質膜に挿入される PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメイン特異的なループ構造. (E, F, G) PACSIN2 の EFC/F-BAR ドメイン二量体表面の静電ポテンシャル図. 青は正電荷を帯びた領域, 赤は負電荷を帯びた領域をそれぞれ示す. 雑誌論文①より引用.

(4) WAVE2 複合体の構造機能解析

WAVE2 複合体の部分複合体のうち、HSPC300 と WAVE2 の WHD の複合体の立体構造を決定した. この複合体は、WAVE2 二分子と HSPC 一分子がそれぞれ α ヘリックスを一本ずつ出し合って平行3ヘリックスバンドル構造を形成していた.

構造決定後に、WAVE2 複合体の類似複合体である WAVE1 複合体の結晶構造が報告されたが、興味深いことに、WAVE1 複合体中では WAVE1, Abi2, HSPC300 が、我々の WAVE2 と HSPC300 から構成される3ヘリックスバンドルに類似した構造を保持しており、この構造では、WAVE2 の二本の α ヘリックス中の一本が Abi2 のヘリックスで置換されたような構造を取っていた. このことは、WAVE1 複合体や WAVE2 複合体の会合過程を考察する上で興味深い知見であると考えられる.

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1件)

- ① 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6件)

- ① Atsushi Shimada, Structural basis of Cdc42-mediated Cdc42-interacting protein 4 (CIP4) recruitment to clathrin-coated pits, The 21st Hot Spring Harbor Symposium jointly with 9th Global-COE International Symposium Cell Migration in Biology and Medicine -8th Young Investigators Forum-, 2012 年 1 月 21 日, 福岡県福岡市
- ② Atsushi Shimada, Structural basis of Cdc42-mediated Cdc42-interacting protein 4 (CIP4) recruitment to clathrin-coated pits, 10th Global-COE International Symposium and 7th Young Investigators Forum, 2011 年 12 月 22 ~23 日, シンガポール
- ③ 嶋田睦, Cdc42 による Cdc42-interacting protein 4 (CIP4) のクラスリン被覆ピットへの局在機構の構造的基盤, 日本生物物理学会九州支部例会, 2011 年 12 月 4 日, 福岡県飯塚市
- ④ 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
- ⑤ 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, 徳島県徳島市
- ⑥ 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, 兵庫県神戸市

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/vsb/index.html>

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：70391977

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし