

令和 3 年 10 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07351

研究課題名(和文) 脂質膜突起形成I-BARタンパク質による新規分泌小胞形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of novel secretory vesicle formation by lipid membrane binding I-BAR proteins

研究代表者

末次 京子(埴京子)(Hanawa-Suetsugu, Kyoko)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：40391990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外小胞にはDNA、RNA、タンパク質などが含まれており、離れた細胞同士がコミュニケーションするための重要なツールとなっている。しかし細胞外小胞が作られる分子メカニズムはエクソソーム以外、ほとんど明らかとなっていない。本研究により、細胞膜表面に細胞膜の突起構造を作るI-BARタンパク質は、単に突起膜形態を作るだけでなく、細胞膜を切断し細胞外小胞を作っていることを示唆する結果を得ることが出来た。その結果、新規細胞外小胞形成メカニズムを提唱することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外小胞が離れた細胞に融合し、細胞外小胞体の含有成分が融合先の細胞内に入り機能することが明らかになってきた。そのことによりがん転移などに見られるように細胞外小胞を受け入れた細胞はそれまでの細胞の性質を変えるなど、細胞外小胞体が細胞間の情報伝達の一端を担っていることも明らかになってきている。しかし細胞外小胞が作られる分子メカニズムは、明確にはエクソソームしかわかっていない。本研究により、細胞膜表面の突起部分が切断され細胞外小胞が作られる、という新しい細胞外小胞体形成分子メカニズムを提唱し、細胞間クロストークに新たな知見を与えることが出来た。

研究成果の概要(英文)：The extracellular vesicles (EVs) include DNA, RNA, Protein and etc.. EVs are transferred and transmit signals between cells. However, It is unclear how EVs are produced from cell. The inverse Bin-Amphiphysin-Rvs (I-BAR) domain proteins are membrane binding proteins and lead to protrude structure on the cell membrane surface in filopodia. In this study, I found that I-BAR proteins have potential to make the filopodia-derived vesicles(FDVs), by its membrane vesiculation activity in filopodia. I propose that FDVs by I-BAR proteins are the new EVs models for cell-cell communications.

研究分野：細胞生物学

キーワード：I-BAR 細胞膜 細胞外小胞 脂肪酸 糸状仮足

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs161/167) タンパク質は、基本構造として三本のヘリックスを持つ BAR ドメインを持つタンパク質の総称であり、酵母からヒトまで広く見られるタンパク質である。X線結晶構造解析により BAR ドメインは水溶液中では安定な二量体を形成しバナナ状の立体構造を持つことが明らかとなった。この二量体同士は重合しチューブ構造を形成することが出来る。BAR ドメインによるチューブ構造の内側、もしくは外側にプラスの電荷をもつアミノ酸が並んでおり、電気的に生体膜と結合する。その結果、BAR タンパク質は脂質膜をチューブ構造に導く鋳型タンパク質として働く。BAR タンパク質は屈曲の角度と電荷の極性の違いにより3つサブファミリー (BAR, F-BAR, I-BAR) に分けられる。チューブ構造の外側に正電荷を持つ I-BAR は細胞膜を棘のような凸のチューブ構造に導き、ラメリポディアやフィロポディアの形成を通じて、がん細胞の浸潤転移などを含む細胞運動に関わっている。

最近になり I-BAR とは逆に脂質膜を凹のチューブ構造に誘導する BAR タンパク質の一つであるエンドフィリンには、BAR タンパク質の表面に両親媒性ヘリックスの突出部位があり、その突出部位が脂質膜に挿入されることが報告された。エンドフィリンはその突出部位の存在により、脂質膜を切断する活性があることを示唆された。また I-BAR タンパク質にはタンパク質表面と脂質膜が接触するもの (IRSp53) と、脂質膜接触面に両親媒ヘリックスを持ち脂質膜に深く刺さるように結合しているもの (MIM) があるとの報告が出た。このことから、申請者は I-BAR タンパク質も脂質膜切断活性をもつ可能性があるのではないかと考えた。

細胞は内外からの刺激に応じて細胞表面は絶えず突起や凹み構造が作られている。もし I-BAR タンパク質が脂質膜切断活性をもち、I-BAR タンパク質により作られた細胞膜表面にある突起構造が切断されたら、細胞内の内容物を取り込んだ細胞膜表面由来の細胞外小胞が放出されることになる。現在、細胞外小胞はその内容物として DNA、RNA、タンパク質などを含んでいることが明らかになっている。さらに細胞外小胞は遠く離れた細胞にその内容物を運び、細胞と融合することにより細胞に取り込まれ、内容物が元とは異なる細胞で機能することも確認されている。つまり、細胞外小胞は遠く離れた細胞へシグナル伝達する重要な手段である。実際にがんの転移に細胞外小胞が寄与していることも報告されている。しかし細胞外小胞が作られるメカニズムは、現在のところエキソサイトーシスしか分子機構が明らかになっていない。現在、エキソサイトーシス以外にも細胞外小胞が作られるメカニズムがあるはずだと考えられているが、実際のところ明確にわかっているものはない。従って、I-BAR タンパク質が細胞表面の細胞膜突起切断機構を持ち、細胞膜表面から細胞外小胞が放出されていることを明らかにすることが出来たら、これは新しい細胞外小胞形成メカニズムの解明へと繋がる。さらにこれは細胞内の内容物を取り込み細胞外へ放出する仕組みであることから、よりリアルな細胞内の状態を他の細胞に直接伝達するという新しい細胞間クロストーク概念を提唱することが出来る。

2. 研究の目的

I-BAR タンパク質は細胞表面に細胞膜突起を形成し、それが切断されることにより細胞外小胞を放出するという新たな細胞外小胞形成メカニズムを明らかにし、これまでにない細胞間のクロストークの仕組みを提唱することを目的とする。その為、精製 I-BAR ドメインタンパク質と人工脂質膜との結合および I-BAR ドメインタンパク質による脂質膜切断活性の有無を調べる。また、I-BAR ドメインタンパク質と脂質膜との結合および切断活性に必要な脂質成分を検討する。さらに、培養細胞を用いて I-BAR ドメインタンパク質依存的に細胞外小胞が作られるかを

調べる。最後に、マウスを用いて個体レベルで I-BAR ドメインタンパク質依存的に作られている細胞外小胞がないかを探索する。これら分子レベルから個体レベルまで調べた結果を総括し、I-BAR タンパク質依存的細胞外小胞形成があるかを明らかにする。

3. 研究の方法

ヒトの I-BAR タンパク質は IRSp53, IRTKS, Pinkbar, MIM, ABBA-1 の 5 種類が存在している。これらの I-BAR ドメインタンパク質を大腸菌において大量発現し精製を行う。精製された I-BAR ドメインタンパク質と人工脂質膜を invitro の系において、I-BAR ドメインと脂質膜の結合能および脂質膜切断活性を、人工脂質膜共沈法により調べる。同時にタンパク質の立体構造を鋳型とする脂質膜チューブ構造や、I-BAR により脂質切断が起き人工脂質膜の小胞化が起きたかを、電子顕微鏡を用いて検証する。さらに培養に FBS を必要と HEK293 free style cell を用いて GFP を融合させた I-BAR ドメイン を過剰発現させることにより、I-BAR ドメイン依存的に細胞外小胞の産生が誘発されているか検証する。IRSp53 ノックアウトマウスを用いて、個体レベルで実際に血液中に含まれる細胞外小胞を超遠心法により精製しタンパク質量解析を行うことにより、IRSp53 依存的にどのようなタンパク質が細胞外小胞に含まれ運ばれているのかを調べる。

4. 研究成果

タンパク質大量発現精製に成功した IRSp53 と MIM を用いて調べたところ IRSp53 と MIM のどちらにおいても I-BAR ドメインのみで人工脂質膜と結合し、人工脂質膜をチューブ状態にし、さらに人工脂質膜を小胞化することが出来ることを明らかにした。また脂質との電化的結合が出来なくなるような I-BAR 変異体タンパク質を用いた場合、人工脂質膜はチューブ状態に誘導されることも、人工脂質膜を小胞化されることもなかった。このことから I-BAR タンパク質は脂質膜と結合し、細胞をチューブ化し、さらに切断することが出来ることが示唆された。さらに I-BAR と人工脂質膜の結合および小胞化において、人工脂質膜の組成に着目し研究を行ったところ、人工脂質膜にはフォスファチジルセリン等のマイナスの電化を持ったリン脂質が一定以上含まれていなくてはならないことも明らかにした。IRSp53 と MIM の大きな違いは MIM の I-BAR ドメイン内に両親媒ヘリックス構造が存在することがあげられる。この両親媒ヘリックスが脂質膜切断に参与しているのではないかと考え、MIM の両親媒ヘリックス欠損変異体を作成して実験を行った結果、両親媒ヘリックスは脂質膜切断に寄与していないことがわかった。

さらに細胞内で I-BAR タンパク質が実際に細胞外小胞形成を行なっているかを調べるため、培養に FBS を必要と HEK293 free style cell を用いて GFP 融合の I-BAR タンパク質を大量発現させたところ、IRSp53 と MIM の両方において I-BAR ドメインのみで大量の細胞外小胞が産生されることがわかった。また脂質膜と結合できない変異型 I-BAR ドメインの大量発現では細胞外小胞が大量産生されなかった。これにより細胞においても I-BAR ドメイン依存的に細胞外小胞が作られることを明らかにした。以上のことから、I-BAR タンパク質は、細胞表面に突起構造を作り、それが切断されることにより、細胞外小胞を産生しているのではないかという仮説を強くサポートする結果を得ることができた。

合わせて個体レベルで検証を行う為、マウスを用いて実験を行った。当初の計画では生体内での IRSp53 による発がんの影響を見るため、ルシフェラーゼ発現グリオーマ腫瘍細胞(発光細胞: U-251-MG-Luc)を準備し、RNAi を施したグリオーマ腫瘍細胞とコントロールのグリオーマ腫瘍細胞をヌードマウスに移植し、ルシフェラーゼの蛍光をモニターすることでマウス個体内での

んの成長と定着場所を調べる予定であった。しかし、この実験に必須の大学共通機器であった測定装置IVISが故障のため使用不能となり実験を行うことが出来なくなった。そこで、IRSp53ノックアウトマウスを用いて、血液中に含まれる細胞外小胞を精製し、比較定量可能なiTRAQによる質量分析を行った。その結果、野生型マウスと比較してIRSp53ノックアウトでは血中に含まれる補体の量とアポリタンパク質の量が異なることがわかった。補体もアポリタンパク質もその重要性から成分や生理活性はよく調べられているが、補体とアポリタンパク質がどのように産生され血中内に放出されているかは不明な点が多い。IRSp53のどのような機能により補体とアポリタンパク質の量に変化をもたらしたのかは不明である。しかし、本研究の結果から新たに得られたI-BARタンパク質による新規細胞外小胞産生機構の知見を踏まえて考察することにより、補体とアポリタンパク質の産生メカニズムの理解に新しい視点を提供できるのではないかと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

Tachikawa M, Morone N, Senju Y, Sugiura T, Hanawa-Suetsugu K, Mochizuki A, Suetsugu S., Measurement of caveolin-1 densities in the cell membrane for quantification of caveolar deformation after exposure to hypotonic membrane tension., Sci Rep., 査読あり、vol.10, No.7, 2017, p.7794

DOI: 10.1038/s41598-017-08259-5.

Itoh Y, Kida K, Hanawa-Suetsugu K, Suetsugu S., Yeast Ivy1p Is a Putative I-BAR-domain Protein with pH-sensitive Filament Forming Ability in vitro., Cell Struct Funct., 査読あり、vol.41, No.1, 2016, pp.1-11.

DOI: 10.1247/csf.15014

Takemura K, Hanawa-Suetsugu K, Suetsugu S, Kitao A., Salt Bridge Formation between the I-BAR Domain and Lipids Increases Lipid Density and Membrane Curvature., Sci Rep. , 査読あり、vol.7, No.1, 2016, p.6808

DOI: 10.1038/s41598-017-06334-5

〔学会発表〕（計 13 件）

M.Ab Fatah, Kyoko Hanawa, Shiro Suetsugu, The assembly of GAS7 in cells and in vitro., ASCB/EMBO2018meeting, 2018

M.Ab Fatah, 埴京子, 末次志郎, F-BAR タンパク質 GAS7 の細胞内高次構造形成、第 91 回日本生化学会大会、2018

Manabu Kitamata, Hanawa Kyoko, Kohei Maruyama, Shiro Suetsugu, Membrane vesiculation by ANKHD1 protein regulates enlargement of the early endosome. 第 70 回日本細胞生物学会 第 51 回日本発生生物学会合同大会、2018

木田 和輝, 北又 学, 埴 京子, 末次 志郎, りん脂質組成に依存する Endophilin A2 の膜切断活性、第 60 回日本脂質生化学会、2018

埴京子, 末次志郎, 脂肪酸に依存した BAR ドメインの脂質膜形態形成、第 40 回日本分子生物学会年会、2018

K. Kida, M. Kitamata, Kyoko Hanawa, Shiro Suetsugu, Membrane scission activity of Endophilin A2 depending on phospholipid composition., ASCB/EMBO 2017 meeting, USA, 2017

塙京子、大山拓也、末次志郎、I-BAR タンパク質による小胞形成、第 91 回日本生化学会大会、2017

Yuzuru Itoh, Kazuki Kida, Hanawa Kyoko, Shiro Suetsugu, Yeast Ivy1p Is a Putative I-BAR-domain Protein with pH-sensitive Filament Forming Ability in vitro., American Society for Cell Biology, USA, 2016

多羅尾賢斗、塙京子、末次志郎、カドヘリンの局在化における I-BAR タンパク質 IRSp53 の役割、第 68 回日本細胞生物物理学会大会、2016

木田和輝、末次志郎、塙京子、北又学、BAR タンパク質エンド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

磯野早織、久保田悟、中原明香、塙京子、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

大山拓也、木田和輝、北又学、塙京子、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

久保田悟、塙京子、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

〔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〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

-

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：末次志郎、矢倉加代子、木田 和輝、北又 学、多羅尾賢斗、M.Ab Fatah、大山拓也、磯野早織、久保田悟、

ローマ字氏名: Suetsugu Shiro, Yakura Kayoko, Kida kazuki, Kitamata Manabu, Tarao Kento, M.Ab Fatah, OyamaTakuya, Isono Saori, Kubota Satoru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。