

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20687012
 研究課題名（和文） 細胞移動先端における重層的アクチン細胞骨格制御の研究
 研究課題名（英文） Multiple layers of regulatory machineries for actin cytoskeleton at the leading edge
 研究代表者
 末次 志郎 (SUETSUGU, SHIRO)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
 研究者番号：70345031

研究成果の概要（和文）：IRSp53は、そのIMD/I-BARドメインが立体構造上の凸面で膜突起の管構造の内側に局在することで脂質膜の形態を形成する。pacsin2は、そのEFC/F-BARドメインの立体構造上の凹面で脂質膜に結合する。凹面に対応する膜曲率は突起構造の根本の部分に見られ、EFC/F-BARドメインは、突起の根本の膜構造を形成することで、突起形成に関わっている。がん細胞などに見られる突起構造であるポドソームにおいても、この機構が働いていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The I-BAR domain of IRSp53 deforms plasma membrane into protrusion through its binding of its convex surface to the inner surface of tubular protrusions. In contrast, the F-BAR domain of pacsin2 deforms plasma membrane at the neck of the protrusions, where orthogonal membrane curvature is formed by the concave surface of the F-BAR domain. These two modes of plasma membrane deformation are thought to be important for cellular protrusions including podosome for cancer cell invasion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	14,000,000	0	14,000,000
21年度	1,900,000	570,000	2,470,000
22年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	20,300,000	1,890,000	22,190,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格、細胞膜、細胞運動、細胞内情報伝達、浸潤

1. 研究開始当初の背景

生物の構成要素である細胞は、多細胞生物においてはさまざまに分化し、さまざまな形態を持っている。細胞の形態は、細胞骨格と細胞膜により規定されると考えられている。細胞の形態は静的なものではなく、動的に変化し、

その中でも最もはやいものが外界から細胞に与えられる刺激に応じて生じる細胞運動において見られる。細胞運動は多細胞生物の発生において分化した細胞が機能する場所に移動する場合に見られるほか、細胞運動の過剰な活性化はがん細胞に見られるような転移を

引き起こす。細胞運動は多くの場合、細胞が移動する方向に向かって出す突起構造と、その反対側の収縮の繰り返しによって行われる。したがって、突起構造の形成メカニズムを理解することは非常に重要である。これらの突起構造形成において最初期に動員されるのはアクチン細胞骨格であるとこれまで考えられてきた。細胞の移動する先端でアクチン重合が起こり、アクチンフィラメントの束である糸状仮足(フィロポディア)や枝分かれしたアクチンフィラメントの集積である葉状仮足(ラメリポディア)といった細胞の外側に突き出る突起構造を作る。

私はこれまでの研究において WAVE1、WAVE2、WAVE3 からなる WAVE ファミリータンパク質を同定することに成功した(Suetsugu et al, 1999)。WAVE ファミリーは WASP ファミリータンパク質のサブファミリーを形成し、WASP、N-WASP と同じく Arp2/3 複合体を活性化することによりシグナル依存的なアクチン重合を引き起こすと考えられている。我々および他のグループの WAVE1 ノックアウトマウス、WAVE2 ノックアウトマウス、および N-WASP ノックアウトマウス由来の繊維芽細胞の解析、さらには WAVE1 と WAVE2 の RNA 干渉法による発現抑制実験から、WAVE1、WAVE2、N-WASP の細胞運動における役割が明らかになった。WAVE1、WAVE2、N-WASP をそれぞれ欠損した細胞を比べると WAVE2 を欠損した細胞でのみ顕著に葉状仮足形成が阻害されていたことから、WAVE2 は葉状仮足形成に必要な不可欠な分子であり、細胞の突起形成を伴う方向性を持った細胞運動全てに重要であることがわかった(Suetsugu et al, 2003, Yamazaki et al, 2003)。葉状仮足は枝分かれしたアクチンフィラメントによって構成されている。アクチンフィラメントの枝分かれは Arp2/3 複合体によって誘導される。我々は、この Arp2/3 複合体のアクチンフィラメント形成、枝分かれ形成活性を活性化するタンパク質が WAVE2 であり、実際に *in vitro* および *in vivo* の両面で WAVE2 が Arp2/3 複合体を直接活性化することを見いだした。また、WAVE2 のタンパク質複合体の解明し、WAVE2 は複合体として機能すること、複合体形成は WAVE2 の細胞内で安定に存在するために必要不可欠であること、局在に関与していることを見出した(Suetsugu et al, 2006)。

2. 研究の目的

背景で述べたように葉状仮足形成の分子機構はよくわかっているように見える。しかしな

がら大きな論理的な欠落がここに存在し、WAVE2 が駆動する Arp2/3 複合体によるアクチン重合が細胞の外向きに伸張し、葉状仮足となる必然は無い。なぜなら同じく細胞膜での Arp2/3 複合体の活性化は細胞膜に対して細胞の内側に向かって生じるエンドサイトーシスでも見られる。したがって、ここに未知の細胞膜と細胞骨格を結ぶインターフェイスとなる機構があると考えられる。このインターフェイスの解明は細胞膜直下で生じる Arp2/3 複合体の活性化によって生じるアクチン重合の方向を、内向きあるいは外向きに誘導し、陥入構造であるエンドサイトーシスあるいは突起構造である葉状仮足、糸状仮足の決定のために機能していると考えられる。

われわれは、WAVE2 結合タンパク質として SH3 ドメインを持つアダプター分子 IRSp53 を同定した。IRSp53 は、WAVE2 複合体の構成タンパク質ではないことから、WAVE2 の活性を動的に制御していると考えられる。興味深いことに、IRSp53 はリン脂質に結合することを見いだした。リン脂質との結合は、IRSp53 の N 末に存在する IMD/RCB/I-BAR ドメインによって、このドメインが、突起形成に対応する凸状の特定の細胞膜の形態を認識している可能性が示唆されている(Suetsugu et al, 2006)。

したがって、IRSp53 は WAVE2 を介して行うアクチン細胞骨格制御における細胞膜とのインターフェイスの分子実態であると考えられるが、この仮説をサポートするデータは十分に得られていない。

さらに、IRSp53 は WAVE2-Arp2/3 複合体を介して枝分かれしたアクチン繊維の葉状仮足形成を駆動するだけでなく、おなじく Arp2/3 複合体を活性化し、糸状仮足形成やエンドサイトーシスに関わる N-WASP にも結合することが知られている。さらに、IRSp53 は Ena/VASP や mDia のような直線的なアクチン繊維の形成すなわち糸状仮足形成にかかわる分子とも結合する (Yamagishi et al, 2004, Krugmann et al, 2002)。さらに、IRSp53 はリン脂質との結合ドメインを共通に持つタンパク質ファミリーを形成する。このタンパク質ファミリーは IRSp53 に代表される SH3 ドメインを持つものと、MIM に代表されるアクチン結合モチーフを持つものに分かれることが知られている。

すなわち、IRSp53 やその類縁分子を中心とするタンパク質相互作用、脂質タンパク質相互作用のネットワークが、アクチン繊維の伸張を陥入構造ではなく、突起構造形成に方向付

けるとともに、糸状仮足や葉状仮足のような突起構造を「作り分ける」分子実態である可能性を示唆する。SH3 ドメインを持つアダプタータンパク質は多数知られていて、IRSp53 のみがSH3 ドメインを介して WAVE2 と結合するとは考えにくい。このように細胞膜やさまざまなアダプタータンパク質を介した重層的な制御が細胞移動のためのアクチン細胞骨格再構成においてなされていると考えられる。本研究では、IRSp53 に代表される脂質膜結合タンパク質が、細胞移動先端において糸状仮足や葉状仮足を形成するためのアクチン細胞骨格を動員する仕組みを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) IRSp53 の脂質タンパク質相互作用ネットワークの解明。

FLAG タグ付の IRSp53 の免疫沈降などの手法により、IRSp53 を含むタンパク質複合体を検討した。その結果、新規な未知の結合タンパク質を見出すことができなかった。しかしながら、IRSp53 と類似の SH3 ドメインを持つタンパク質の探索から、新たな突起構造に関わる IRSp53 の類縁タンパク質 pacsin2 を見出すことに成功した。

(2) IRSp53 が葉状仮足という特定の限局された細胞膜に結合、局在する機構の解明。

IRSp53 や pacsin2 あるいは、その類縁分子は N 末部に脂質結合ドメインである IMD/I-BAR あるいは F-BAR ドメインが存在する。IMD ドメインのアミノ酸に変異を入れた GFP タグ付きの全長発現系を用いて、IMD の脂質結合に必要なアミノ酸が IRSp53 の局在化に必要なかどうか、TIRF 顕微鏡を用いて検討した。どのように F-BAR ドメインの脂質結合に必要なアミノ酸が pacsin2 の局在化に必要なかどうか検討した。

(3) IRSp53、pacsin2 および結合タンパク質の局在(分子動態)と突起形成の時空間的解析。

これまでのタンパク質分子動態/局在の解析では、タンパク質の局在した場所において、突起伸展が生じるかどうか、また突起の伸展速度と分子の局在強度との相関関係はそれほど調べられてこなかった。したがって、IRSp53、pacsin2、MIM、WAVE2 などのタンパク質が本当に突起伸展部位に伴って局在するかどうか調べる必要があった。TIRF および共焦点顕微鏡を用いて、これらのタンパク質およびアクチンの葉状仮足および糸状仮足における局在と動態を解析した。

(4) IRSp53、pacsin2 のリン酸化

IMD ドメインの中のチロシン残基がリン酸化されることを予備的な実験により見出していた。変異の導入により17番目のチロシンがリン酸化されることを同定した。また、pacsin2 に関して、311番目のセリンがリン酸化されることを同定した。その意義は現在解析中である。

(5) IRSp53 および pacsin2 の RNAi

人為的に細胞膜の形態を変形し、分子の局在を観察することは当初想定した磁性ビーズによる方法では、私たちの検討した範囲では、IRSp53 や pacsin2 の局在化は見られず困難であった。したがって、人工的に活性化型 Src を導入し形成させた、浸潤突起であるポドソームを用いて、解析を行った。がん細胞に重要な浸潤突起であるポドソームの形成に対する IRSp53 と pacsin2 の役割を、RNAi により検証した。どちらの RNAi においてもポドソーム形成の障害が観察された。

4. 研究成果

平成20年度の研究では細胞の移動先端において、アクチン細胞骨格の再構成がどのような分子機構によって細胞膜の形態変化につながり、移動先端にみられる特徴的な細胞形態を形成する機構に注目している。私たちが見いだした IRSp53 は、細胞膜に対する結合能を持ちさらに細胞膜の突起構造をアクチン細胞骨格の再構成によらず誘導することができる。IRSp53 は細胞膜の中でも突起構造に限局して局在する。本年度の研究では、IRSp53 が突起構造に局在する様子を計時的に観察した。その結果 IRSp53 は細胞の突起構造が形成されるより早い時間に将来の突起構造が形成される位置に局在することを見いだした。さらに IRSp53 の局在に関する時空間解析を開始し、IRSp53 の局在と突起形成の時間相関の解析を試みている。粒子状の局在を示す場合に関しては2種類のタンパク質の局在の時間相関をとることに成功している。さらに、IRSp53 の膜結合能に関する変異体を検討し、細胞膜への局在が障害されていることを見いだした。また、IRSp53 とよく似た IMD ドメインを持つ MIM は IRSp53 とは異なり、IRSp53 の後から細胞移動先端に動員されることを見出した。このことは IRSp53 がまず膜形態を形成し、WAVE2 を介してアクチン細胞骨格を再編する過程において、MIM がアクチン結合モチーフによって局在化されることを示唆している。また、突起構造に局在し、かつ、膜変形能を持つタンパク質 pacsin2 を新たに見いだした。

平成21年度の研究では、新たに見出された pacsin2 の解析を集中して行った。pacsin2 の過剰発現が膜の変形によって突起構造を誘導することを見いだした。IRSp53 の場合は IMD/I-BARドメインがその立体構造上の凸面で膜突起の管構造の内側に局在することで脂質膜の形態を形成する。これに対し、pacsin2 は EFC/F-BAR ドメインを持ち、EFC/F-BAR ドメインの立体構造上の凹面で脂質膜に結合する。凹面に対応する膜曲率は突起構造の根本の部分に見られる。従って pacsin2 の EFC/F-BAR ドメインは、突起の根本の膜構造を形成することで、突起形成に関わっていると考えられる。Pacsin2 は N-WASP を介してアクチン重合を誘導することから、N-WASP を介したアクチン重合が突起構造を形成する機構を説明できると考えられる。また、pacsin2 は他の EFC/F-BAR と同じく膜陥入構造も誘導できることから、EFC/F-BAR ドメインはその立体構造上の凹面で脂質膜と結合することによって多彩な細胞膜の微細構造を形成している可能性を示した。

平成22年度の研究では、本年度の研究では、IRSp53 および pacsin2 に焦点を絞り研究を行った。IRSp53 は I-BAR/IMD ドメインを持ち、I-BAR ドメインの凸部で膜と相互作用することから、突起膜の軸部、あるいは、先端の内側において膜の形態を制御すると考えられる。Pacsin2 は F-BARドメインを持ち、F-BARドメインの凹部で膜と相互作用することから、突起膜の基部(細胞膜の突出が開始される部分)で機能すると想像される。平成22年度は、がん細胞の浸潤に関わる突起構造であるポドソームにおける IRSp53 と pacsin2 の機能を検討した。ポドソームは活性化型 Src でトランスフォームした NIH-3T3 細胞に見られる、その形成は Src 依存的である。IRSp53 と pacsin2 の細胞内局在を詳細に検討したところ、IRSp53 と pacsin2 はともにポドソームに局在したがポドソーム内での局在部位は異なっていた。さらに、IRSp53 や pacsin2 のノックダウンを行ったところ、いずれの場合にもポドソームの消失が観察された。さらに、Src の自己リン酸化を認識する抗体で Src の活性を検討したところ、Src の自己リン酸化の減弱が IRSp53 や pacsin2 のノックダウン細胞で観察された。すなわち、ポドソームなどの膜の形態形成が Src の活性制御に関わっている可能性が示唆された。このことは、膜の形態と細胞移動装置の形成が細胞内シグナル伝達と関連していることを示唆している。

さらに pacsin2 がカベオラに局在し、接着斑のターンオーバーを通じて、細胞運動を制御

している可能性を見出した。

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 12 件)

1. Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S., and Suetsugu, S., Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 12): p. 2032-40.
2. Horikoshi, Y., Hamada, S., Ohno, S., and Suetsugu, S., Phosphoinositide binding by par-3 involved in par-3 localization. *Cell Struct Funct*, 2011. **36**(1): p. 97-102.
3. Takano, K., Watanabe-Takano, H., Suetsugu, S., Kurita, S., Tsujita, K., Kimura, S., Karatsu, T., Takenawa, T., and Endo, T., Nebulin and N-WASP cooperate to cause IGF-1-induced sarcomeric actin filament formation. *Science*, 2010. **330**(6010): p. 1536-40.
4. Suetsugu, S., Toyooka, K., and Senju, Y., Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. **21**(4): p. 340-9.
5. Suetsugu, S., The proposed functions of membrane curvatures mediated by the BAR domain superfamily proteins. *J Biochem*, 2010. **148**(1): p. 1-12.
6. Shimada, A., Takano, K., Shirouzu, M., Hanawa-Suetsugu, K., Terada, T., Toyooka, K., Umehara, T., Yamamoto, M., Yokoyama, S., and Suetsugu, S., Mapping of the basic amino-acid residues responsible for tubulation and cellular protrusion by the EFC/F-BAR domain of pacsin2/Syndapin II. *FEBS Lett*, 2010. **584**(6): p. 1111-8.
7. Taniguchi, K., Takeya, R., Suetsugu, S., Kan, O.M., Narusawa, M., Shiose, A., Tominaga, R., and Sumimoto, H., Mammalian formin fhod3 regulates actin assembly and sarcomere organization in striated muscles. *J Biol Chem*, 2009. **284**(43): p. 29873-81.
8. Suetsugu, S., The direction of actin polymerization for vesicle fission suggested from membranes tubulated by the EFC/F-BAR domain protein FBP17. *FEBS Lett*, 2009. **583**(21): p. 3401-4.

9. Takano, K., Toyooka, K., and Suetsugu, S., EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J*, 2008. **27**(21): p. 2817-28.
10. Suetsugu, S. and Takano, K., [Molecules that regulate morphology of the plasma membrane]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2008. **53**(11): p. 1326-36.
11. Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P., and Suetsugu, S., IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(2): p. 52-60.
12. Higashida, C., Suetsugu, S., Tsuji, T., Monypenny, J., Narumiya, S., and Watanabe, N., G-actin regulates rapid induction of actin nucleation by mDia1 to restore cellular actin polymers. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 20): p. 3403-12.
- [学会発表] (計 10 件)
1. 定量生物学の会 第3回年会
東京大学駒場 II キャンパス H22. 11/27
細胞の形態形成における脂質膜とアクチン細胞骨格の形態制御機構
 2. 第48回日本生物物理学学会年会
東北大学川内北キャンパス H22. 9/21
Dynamics of actin filaments for subcellular membrane structures
 3. 第 62 回 日本細胞生物学会年会
大阪国際会議場 (グランキューブ大阪)
H22. 5/20
カベオラにおける pacsin2/Syndapin II の機能
 4. The second conference on F-BAR proteins (ストックホルム) H21. 10/2
"The EFC/F-BAR protein that is involved in caveolae formation"
 5. IUPS2009
京都国際会議場: H21. 7/31
Proteins that remodel the membrane shape and their physiological functions.
 6. 第 61 回 日本細胞生物学会
名古屋国際会議場: H21. 6.3

- EFC/F-BAR domain super family
7. the 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (San Diego):
H21. 12/7
Membrane tubulation and actin polymerization induced by the EFC/F-BAR domain protein pacsin2 for caveolae formation
 8. the 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology
Moscone Center (San Francisco):
H20. 12/17
EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex bind to membranes to induce membrane-curvature dependent actin polymerization.
 9. 第 31 回分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008)
神戸国際会議場: H20. 12/10
EFC/F-BAR ドメインタンパク質 FBP17 および Toca-1 と N-WASP-WIP 複合体による膜曲率依存的アクチン重合の誘導
 10. 第 60 回 日本細胞生物学会
パシフィコ横浜: H20. 7/1
膜曲率によるアクチン重合の制御
- [図書] (計 1 件)
- Actin-based Motility
Carlier, Marie-France (Ed.)
1st Edition., 2010, XII, 300 p.
2010, Part 1, p35-57, Coupling Membrane Dynamics to Actin Polymerization
Shiro Suetsugu and Tadaomi Takenawa
- [その他]
ホームページ等
<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/suetsugu/>
<http://www.suetsugulab.net>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
末次 志郎 (SUETSUGU, SHIRO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
研究者番号: 70345031
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし