

機関番号：14501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770211

研究課題名 (和文) 細胞膜変形タンパク質群によるエンドサイトーシス制御機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis on regulatory mechanisms for endocytosis mediated by membrane-bending proteins

研究代表者

伊藤俊樹 (Toshiki Itoh)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30313092

研究成果の概要 (和文) : 細胞膜変形モジュール F-BAR ドメインを有するチロシンキナーゼにおいて、生体膜の曲率依存的な活性化が見出された。また、Fer の過剰発現およびノックダウン実験から、本キナーゼが膜ラッフル形成を伴うマクロピノサイトーシスおよびトランスフェリン受容体のクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Fer, a tyrosine kinase harboring membrane-bending F-BAR domain, was found to be activated in a manner dependent on membrane curvature. It was also revealed that Fer is involved in macropinocytosis mediated by membrane ruffle formation, as well as clathrin-mediated endocytosis for internalization of transferrin receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：生体膜、エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

申請者は ENTH ドメイン、F-BAR ドメインなどの新規リン脂質結合ドメインを相次いで発見、報告してきた。また申請者および海外のグループの研究により、これらのドメインは平坦な脂質二重層をチューブ状に変形するという、従来の脂質結合ドメインとは全く異なる活性を有し、エンドサイトーシスにおける細胞膜の陥入、伸長をおこす実体そのものであることを明らかにしてきた。しかしながら、これらのタンパク質のうち Epsin ファミリーや FBP17 ファミリーはエンドサイトーシスの基本マシーナリーであるクラスリンや AP-2、ダイナミンなどとの物理的

な相互作用が明らかになっているものの、どのようにして一連の細胞膜の形状変化を順序良く進行させるのか、という調節機構についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本申請課題の目的を達成するために、研究期間内においては F-BAR ドメインサブファミリーの中でもチロシンキナーゼ活性を有する Fer の機能解析を行う。これらのタンパク質の (A) エンドサイトーシスにおける基質タンパク質の同定、(B) チロシンキナーゼ活性と生体膜形状の協調作用の解析、(C) ノックダウン実験によるエンドサイトーシス

の評価を通じて、チロシンキナーゼによるエンドサイトーシスの制御機構を明らかにする。最終的には、エンドサイトーシス小胞を取り巻く巨大タンパク質複合体がアクチン細胞骨格の再編成やチロシンリン酸化などによる修飾を受けて、エンドサイトーシスの進行にしたがって複雑に膜構造を変化させるメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

【組換え蛋白質】大腸菌発現系により、F-BAR ドメインおよび隣接する新規脂質結合領域 (FX ドメイン) を含むリコンビナント蛋白質を発現・精製した。各コンストラクトは GST 融合蛋白質として発現し、GSH-sepharose を用いて精製を行った。GST タグは PreScission protease (GE) にて切断した。

【リポソーム結合実験】ウシ脳由来酸性リン脂質画分 (Folch fraction I) を乾固した後、静置水和法によってリポソームを形成した。ボルテックスにて懸濁したものを large multilamellar vesicles (LMVs)、ソニケーション処理したものを small unilamellar vesicles (SUVs) とした。リポソームを各種蛋白質と室温下で混和し、100,000×g、20 分間の超遠心処理によって結合画分を回収後、SDS-PAGE とクマシー染色にて結合量を評価した。

【RNA 干渉実験】HeLa 細胞を培養皿に播種、培養後、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いてヒト Fer に対する特異的 siRNA をトランスフェクトした。約 48 時間後に①ウエスタンブロット法によるノックダウンの確認、及び②エンドサイトーシスアッセイに供した。

【エンドサイトーシスアッセイ】HeLa 細胞を 3 時間血清飢餓条件下にて培養後、TexasRed ラベルしたトランスフェリン (Invitrogen, 50 µg/ml) を添加し 30 分間培養し細胞内への取り込みを行った。細胞をホルムアルデヒド固定後、コンフォーカルレーザー顕微鏡にて観察し、トランスフェリンの取り込み活性を評価した。

4. 研究成果

まず、in vitro kinase アッセイ系を確立し、Fer がアクチン調節蛋白質 cortactin を効率良くリン酸化することを見出した。さらに、このアッセイ系を用いて Fer のキナーゼ活性に対するリポソーム添加の影響を検討したところ、直径約 1-10 µm の LMVs (large multilamellar vesicles) では高濃度下でわずかに Fer を活性化したのに対し、50-200 nm の SUVs (small unilamellar vesicles) は 10 µg/ml という低濃度下で強い活性化能を有することを明らかにした。リポソーム結合アッセイから、Fer の F-BAR ドメインに隣接して存在

する「FX ドメイン」が SUVs に選択的に結合することが観察された。さらに、この生体膜の曲率を特異的に認識する機構の解明を試みたところ、FX ドメインのうち C 末端側に存在する約 50 残基の領域が、曲率認識に重要であることが明らかとなった。この領域は Heliquest アルゴリズムによって両親媒性の αヘリックスを形成することが予想されたため、モデリングに基づいて疎水性面に位置する Phe421 番、Ile428 番、Ile432 番をそれぞれ Glu 残基に置換したところ、曲率依存的な生体膜結合をほぼ完全に失った。これらの結果から、Fer の FX ドメインはこれまで知られている唯一の生体膜曲率認識モジュールである「ALPS モチーフ」と同様の機構によって、曲率依存的な膜結合を行っていることが示唆された。

次に COS7 細胞内に Fer を過剰発現したところ、マクロピノサイトーシスによるデキストランの取り込みが増大することが観察された。また Fer の F-BAR および FX ドメインを含む領域は、EGF 刺激に伴って細胞膜縁部から形成される dorsal ruffle の先端に局在することが明らかとなった。また、RNA 干渉法による内在性 Fer タンパクのノックダウンによって、トランスフェリンの細胞内取り込みが顕著に抑制された。これらのことから、細胞膜の曲率変化に依存した Fer チロシンキナーゼの活性化が、実際のエンドサイトーシスにおいて重要な役割を担うことが強く示唆された。

これまでの申請者らの解析によって、Fer の FX ドメインが PLD によって産生されるホスファチジン酸 (PA) に選択的に結合することが明らかになっている。また他のグループの研究によって、dorsal ruffle の形成とそれに伴うマクロピノサイトーシスに PA が必須の役割を担うことが知られており、我々の結果と併せて Fer が PA シグナルをアクチン重合促進へと変換し、エンドサイトーシスおよびマクロピノサイトーシスにおける膜動態を制御していることが示唆された。また、Fer の活性化が曲率の高い生体膜で特異的に誘導されることから、小胞が細胞膜から分離・切断される膜の狭窄部位においてアクチン重合を引き起こしている可能性が示唆された。

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 4 件)

- ① Tsujita, K., Itoh, T., Kondo, A., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Irino, Y., Hasegawa, J., Takenawa, T.,
Proteome of acidic phospholipid-binding

- proteins: Spatial and temporal regulation of coronin 1A by phosphoinositides.
J. Biol. Chem. 285 (9), 6781-6789 (2010)
- ② Takefuji, M., Asano, H., Mori, K., Amano, M., Kato, K., Watanabe, T., Morita, Y., Katsumi, A., Itoh, T., Takenawa, T., Hirashiki, A., Izawa, H., Nagata, K., Hirayama, H., Takatsu, F., Naoe, T., Yokota, M., Kaibuchi, K.,
Mutation of ARHGAP9 in patients with coronary spastic angina.
J. Hum. Genet. 55 (1), 42-49 (2010)
- ③ Yamada, H., Padilla-Parra, S., Park, S.J., Itoh, T., Chaineau, M., Monaldi, I., Cremona, O., Benfenati, F., De Camilli, P., Coppey-Moisan, M., Tramier, M., Galli, T. & Takei, K.,
Dynamic interaction of amphiphysin with N-WASP regulates actin assembly.
J. Biol. Chem. 284 (49), 34244-34256 (2009)
- ④ Itoh, T.*, Hasegawa, J., Tsujita, K., Kanaho, Y. & Takenawa, T.*,
The tyrosine kinase Fer is a downstream target of the PLD-PA pathway that regulates cell migration.
Sci. Signal. 2 (87), ra52 (2009)
*corresponding author

[学会発表] (計6件)

- ① 第61回日本細胞生物学会大会、ポスター発表、Toshiki Itoh, Junya Hasegawa and Tadaomi Takenawa、「Fer is a membrane curvature-dependent tyrosine kinase downstream of PLD-PA pathway essential for cell migration」、名古屋国際会議場、2009年6月4日
- ② 第10回日本蛋白質科学会年会、ワークショップ「細胞内及び細胞外における膜ダイナミクス」、口頭発表、伊藤俊樹、長谷川純矢、竹縄忠臣、滝口金吾、滝口陽子、脂質結合ドメインによる生体膜ダイナミクスの制御機構、札幌コンベンションセンター、
- ③ 2010年6月18日 5. International Symposium on Cellular Signaling ~ principles and functions ~、Toshiki Itoh、「Membrane curvature-dependent regulation of Fer tyrosine kinase」、筑波大学(日本、つくば市)、2009年11月18日
- ④ IBB Seminar、Toshiki Itoh、「Functional domain modules that generate and/or sense membrane curvature」、Pohang University of Science and Technology (韓国、浦項)、2010年3月24日

- ⑤ Seminar、Toshiki Itoh、「Functional domain modules that generate and/or sense membrane curvature」、Griffith University (Gold Coast, Australia)、2010年3月30日
- ⑥ 大阪大学医学部 緒方洪庵生誕200周年記念事業 グローバルCOEプログラム「オルガネラネットワーク医学創成プログラム」"International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology"、Toshiki Itoh、「Membrane sculpting by lipid-binding domains」、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)特別会議場(日本、大阪市)、2010年7月13日

[図書] (計2件)

- ① 「改訂タンパク質実験ハンドブック」竹縄忠臣、伊藤俊樹 (共同編集)、羊土社(2011) ISBN978-4-7581-0179-0
- ② 伊藤俊樹「脂質二重層の形状を制御する分子機構」実験医学増刊・分子から個体へと深化する脂質生物学(佐々木雄彦、横溝岳彦、竹縄忠臣 編)(羊土社) p75-78 (2010)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/membrane/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤俊樹 (Toshiki Itoh)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30313092

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者