

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790287

研究課題名(和文) 新しい中心体タンパク質の機能解析

研究課題名(英文)

Characterization of a novel centrosome-localized protein

研究代表者

梅田 一彰 (UMEDA KAZUAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：80444876

研究成果の概要(和文)：私共は、エンドサイトーシスに關与するタンパク質 SGIP1 $\alpha$  を以前に同定した。SGIP1 $\alpha$  はリン脂質結合活性を有し、細胞膜をチューブ状に変形させる活性を持つ。今回、SGIP1 $\alpha$  と相同性の高いタンパク質 FCH01, FCH02 を新たに見出し、機能解析を行った。FCH02 は、SGIP1 $\alpha$  のリン脂質結合・膜変形活性ドメインである MP ドメインとは異なる EFC/F-BAR ドメインを有していた。しかし、MP ドメインと同様 EFC/F-BAR ドメインは、リン脂質結合・膜変形活性を持っていることが知られている。実際、FCH02 の EFC/F-BAR ドメインもこれら活性を有していた。機能解析を行ったところ、FCH02 は Eps15 および  $\alpha$  adaptin と結合し、エンドサイトーシスに關与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have previously identified the endocytic protein SGIP1 $\alpha$ . This molecule through its MP domain binds to phospholipids and deforms the plasma membrane and liposomes into narrow tubes. We have found SGIP1 $\alpha$ -related proteins FCH01 and FCH02, which have EFC/F-BAR domains substitute for MP domain. We examined the function of FCH02, including tissue distribution, cellular localization and biochemical properties. Our results indicate that FCH02 is involved in clathrin-dependent endocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：FCH02、エンドサイトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

中心体は、主たる微小管形成中心 (MTOC) として機能し、間期では細胞の形態、運動、接着を制御し、分裂期では紡錘体を形成して染色体の分離に關与している。中心体は一对の中心小体とそれらを取り巻く中心小体周辺物質 (pericentriolar materials, PCM) から構成されている。PCM には、微小管形成

に關わるガンマ・チュブリンが濃縮している。染色体の分離に先立って、S 期から G2 期にかけて中心体が複製され、M 期になると PCM が「肥大化」して微小管形成活性を増大させて中心体成熟を起こす (Curr. Biol. 15: R880-882, 2005)。中心体は細胞の両極に移動し、紡錘体極を形成し、染色体を両極へ均等に分割する。それと同時に、肥大化した中

心体は縮小する。PCM 肥大はガンマ・チューブリン等の分子が細胞質プールから中心体へリクルートされることによって行われ、続いて集積した分子が離散、ダウンレギュレーションして中心体が縮小すると考えられている。しかし、その分子メカニズムには不明な点が多い。また、間期においてもガンマ・チューブリン等の分子が中心体と細胞質をサイクリングしているのかも未解決である。

## 2. 研究の目的

私共は、微小管と関連するタンパク質群を質量分析により同定・解析し、多数の微小管結合タンパク質を見出してきた (Genes Cells. 13: 295-312, 2008; Biochem. Biophys. Res. Commun. 366(4):958-62, 2008)。その中の一つ SGIP1 $\alpha$  はユビキチン結合タンパク質 Eps15 と結合し、細胞膜受容体のエンドサイトーシス (ダウンレギュレーション) を制御していることを明らかにしている (J. Biol. Chem. 282: 26481-9, 2007)。SGIP1 $\alpha$  を解析する過程で、SGIP1 $\alpha$  と相同性が高く、機能が不明な FCH02 タンパク質を見出し、FCH02 が中心体に局在することを明らかにした。また、SGIP1 $\alpha$  と同様、クラスリン被覆ピットにも局在することを見出した。

そこで本研究では、FCH02 の中心体、およびエンドサイトーシスにおける役割とその分子機構を明らかにすることを研究目的とし、各種実験を行った。

## 3. 研究の方法

(1) SGIP1 $\alpha$ 、FCH01 および FCH02 の分子構造を比較した。

(2) FCH01 および FCH02 の組織分布を、RNA レベル、タンパクレベルで調べた。

(3) FCH02 の生化学的性状 (リン脂質結合能・膜変形活性等) を調べた。

(4) FCH02 の結合タンパク質を調べた。

(5) FCH02 の細胞内局在を調べた。

(6) FCH02 のエンドサイトーシスへの関与を調べた。

## 4. 研究成果

(1) SGIP1 $\alpha$ 、FCH01 および FCH02 の分子構造を比較した (図 1)。SGIP1 $\alpha$  は、N 末端から順に MP ドメイン、プロリンリッチドメイン、 $\mu$  サブユニットホモロジドメインから

構成されている。MP ドメインは、マイナスの電荷を持つリン脂質に結合し、細胞膜やリポソームをチューブ状に変形させる活性を持つ。FCH01 および FCH02 共に、SGIP1 $\alpha$  と同様、リン脂質に結合し、膜をチューブ状に変形させる活性を持つ EFC/F-BAR ドメインを有している。EFC/F-BAR ドメイン以降、FCH01 および FCH02 は、プロリンリッチドメイン、 $\mu$  サブユニットホモロジドメインを有している。以上のことから、SGIP1 $\alpha$ 、FCH01 および FCH02 は同じ機能ドメインから構成されるファミリーを形成していると考えられる。

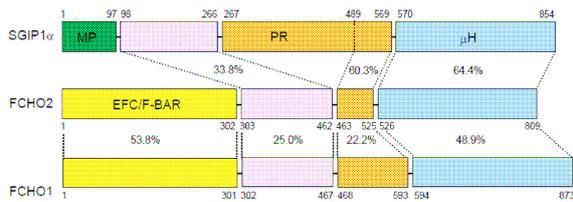


図 1 SGIP1 $\alpha$ 、FCH01 および FCH02 の分子構造比較

(2) 私共は、SGIP1 $\alpha$  は神経組織特異的に発現していることを明らかにしている。FCH01、FCH02 の組織分布を明らかにするため、ノザンブロットングを行った。FCH01 は脳と脾臓に特に多く発現しており、FCH02 は広範囲の組織 (心臓、脳、脾臓、小腸、肝臓、筋、腎臓、精巣) に亘って、ユビキタスに発現していることが明らかとなった。よって、FCH0 ファミリーの一般的機能を調べるべく、FCH02 について、以降は解析することとした。

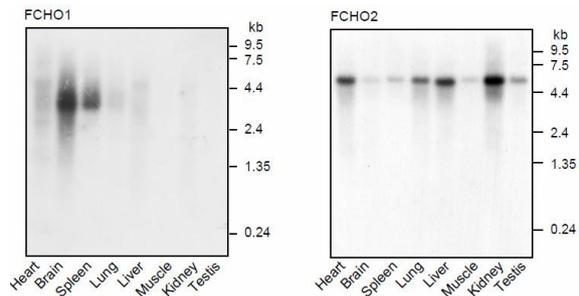


図 2-1 FCH01 と FCH02 の組織分布をノザンブロットング法により解析

FCH02 のポリクローナル抗体を作製し、タンパク質レベルでの発現を各種組織でウェスタンブロットング法により調べた。ノザン

ブロットイング同様、ほぼユビキタスに FCHO2 は発現していることが明らかとなった。

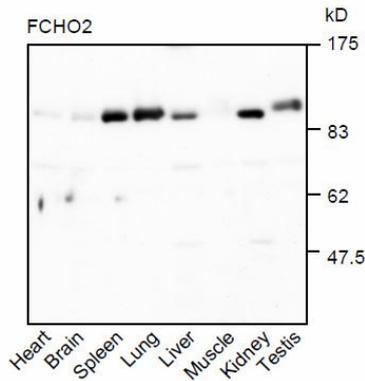


図 2-2 FCHO2 の組織分布をウェスタンブロット法により解析

(1) FCHO2 のリン脂質結合能および膜変形活性を調べるため、リポソーム共沈法を行った。リポソーム共沈法は、タンパク質-脂質間相互作用を検出する方法で、両成分の遠心操作後、相互作用がない場合は上清各分に、ある場合は沈殿画分に遠心分離される。FCHO2 においては、ホスファチジルセリンには結合したが (図 3-1)、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンには結合しなかった。

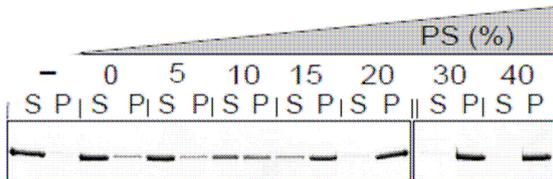


図 3-1 FCHO2 の F-BAR ドメインとホスファチジルセリンの結合

FCHO2 の膜変形能を、試験管および細胞レベルで調べた。FCHO2 の F-BAR ドメインは Folch リポソームをチューブ状に変形させる活性を有していた (図 3-2)。また、F-BAR ドメインを COS7 細胞に発現させると、リポソームの時と同じく、細胞膜がチューブ状に変形した構造物が観察された (図 3-3)。

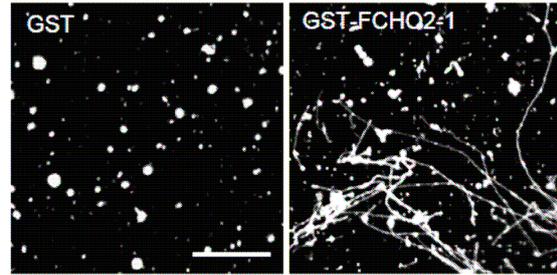


図 3-2 FCHO2 の F-BAR ドメインによる Folch リポソームの変形

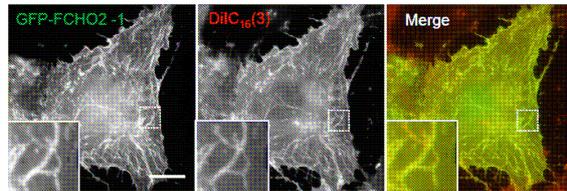


図 3-3 F-BAR ドメイン発現 COS7 細胞に見られる膜変形

(2) FCHO2 が Eps15 および  $\alpha$  Adaptin (AP-2 コンプレックスのコンポーネントの一つ) と結合するか否かを調べた。SGIP1  $\alpha$  はいずれのタンパク質とも結合することが分かっている。GST 融合 FCHO2 タンパク質を用い MBP-Eps15 との結合をプルダウンアッセイにより検証したところ、FCHO2 の  $\mu$  サブユニットホモロジドメインが Eps15 と結合することが明らかとなった (図 4-1)。また、 $\alpha$  Adaptin は FCHO2 抗体で免疫沈降すると、Eps15 と共に、共沈してきた (図 4-2)。よって、 $\alpha$  Adaptin は FCHO2 と直接あるいは Eps15 を介して間接的に結合していると考えられた。

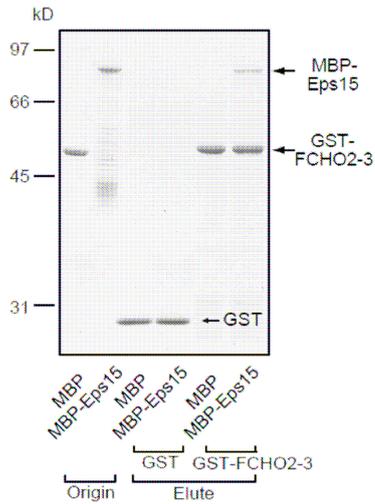


図4-1 FCH02 と Eps15 の結合 (プルダウンアッセイ法)

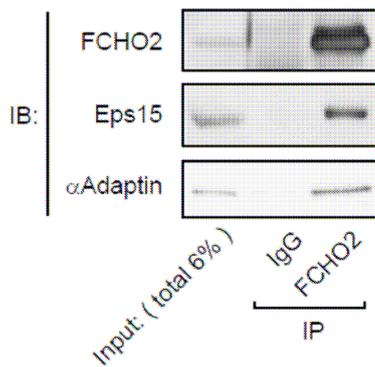


図4-2 FCH02、Eps15 および  $\alpha$  Adaptin の結合 (免疫沈降法)

(3) FCH02 の細胞内局在を調べるため、FCH02 を HeLa 細胞に発現させ、蛍光免疫染色を行った。Eps15、 $\alpha$  Adaptin とそれぞれ二重染色を行ったところ、FCH02 は Eps15 および  $\alpha$  Adaptin と共局在していた (図5)。また、GFP-FCH02 および DsRed-Clathrin を細胞に共発現させたところ、両融合タンパク質は共局在していた。以上の結果から考えると、FCH02 はクラスリン被覆ピットに局在し、Eps15 および  $\alpha$  Adaptin と結合して、エンドサイトーシスに関与していると推測された。

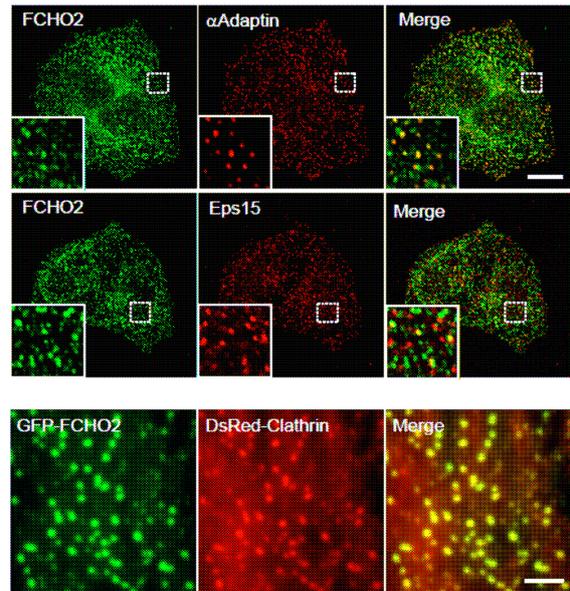


図5 FCH02 の蛍光免疫染色  $\alpha$  Adaptin との二重染色 (上段)。Eps15 との二重染色 (中段)。GFP-FCH02 および DsRed-Clathrin の共発現細胞 (下段)

(4) ノックダウン法を用い、細胞内へのトランスフェリンの取り込みを指標に、FCH02 のエンドサイトーシスへの関与を調べた。FCH02 をノックダウンした細胞では、トランスフェリンの取り込みがコントロールに比べ有意に減少していた (図6)。よって、クラスリン依存性エンドサイトーシスに FCH02 が関与していることが明らかとなった。

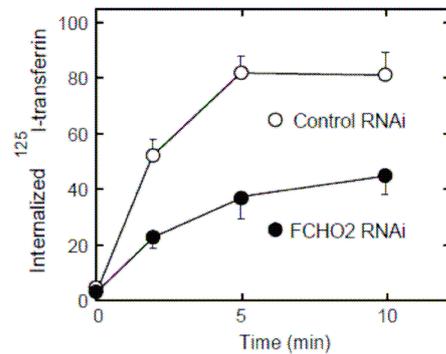


図6 クラスリン依存性エンドサイトーシスへの FCH02 の関与

## 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2件)

- ① 上江洲章吉、梅田一彰、辻田和也、末次志郎、竹縄忠臣、中西宏之、Characterization of the EFC/F-BAR domain protein, FCHO2, Genes to Cells、査読有、2011、in press
- ② 月田早智子、勝野達也、山崎裕自、梅田一彰、田村淳、月田承一郎、Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function、Annals of the New York Academy of Sciences、査読有、2009、107 巻、8011-8016

[学会発表] (計1件)

- ① 梅田一彰、上江洲章吉、菊池直也、中西宏之、リン脂質結合タンパク質 FCHO2 によるインテグリンのエンドサイトーシス制御、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成 21 年度第 1 回班会議、2009 年 8 月 26, 27 日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル (熊本県)

[図書] (計1件)

- ① 金井好克他、京都廣川出版、トランスポートソームの世界 -膜輸送研究の源流から未来へ、2011、387-394

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅田 一彰 (UMEDA KAZUAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：80444876