

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23890162
 研究課題名（和文）FCH02 による膜変形を介した EGF 受容体の制御機構
 研究課題名（英文）Regulatory mechanism of EGF Receptor endocytosis by membrane deforming protein FCH02
 研究代表者
 坂本 泰久 (SAKAMOTO YASUHISA)
 熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
 研究者番号：20613392

研究成果の概要（和文）：EGF 受容体のエンドサイトーシスは細胞内シグナル伝達と受容体の分解・リサイクルの過程に必須である。よってエンドサイトーシスの素過程を解明することは EGF 受容体の制御機構を理解する上で重要である。我々は F-BAR ドメインを持つ FCH02 によるエンドサイトーシスの調節機構について研究を進め、FCH02 がユビキチン化酵素 Nedd4L の活性制御に関わっていることを明らかにしてきた。本研究では FCH02 と Nedd4L によるエンドサイトーシスの制御機構に Nedd4L のアダプター分子 ARRDC1 が関与するかについて解析した。その結果、Nedd4L の活性制御に必要なとなる細胞膜への局在は ARRDC1 と FCH02 によって協調的に制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Endocytosis plays a critical role in the signal transduction, degradation, and recycling of EGF receptor. It is thus important to elucidate the basic process of endocytosis. We have studied the molecular mechanisms of F-BAR domain containing protein FCH02 in the regulation of endocytosis and recently found its role in the activation of ubiquitin ligase Nedd4L. Here we studied about the involvement of adaptor molecule ARRDC1 in the FCH02/Nedd4L mediated endocytosis process and revealed that the localization of Nedd4L on plasma membrane, which is essential for its activation, is regulated by ARRDC1 and FCH02 cooperatively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：EGF 受容体、エンドサイトーシス、ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼの上皮成長因子(EGF)受容体は細胞外ドメインへのリガン

ド結合によって細胞内領域のチロシンキナーゼが活性化して細胞内シグナル伝達を開始する。従来この反応は細胞膜直下で起こる

と考えられてきた。しかし近年、EGF 受容体による細胞内シグナル伝達はリガンド結合型 EGF 受容体がエンドサイトーシスを経てエンドソームに局在することが重要であると報告された。これまでに明らかにされてきた受容体の分解、リサイクルという経路だけでなく細胞内シグナル伝達においてもエンドサイトーシスの重要性が再認識された (Science, 274: 2086-9, 1996)。

Bin-Amphiphysin-Rsv (BAR) ドメインをもつタンパク質スーパーファミリーは BAR ドメインを介して細胞内リン脂質に結合し生体膜を変形することで様々な細胞内イベントを制御する。これまでに F-BAR ドメインを持つ FCH02 は細胞膜を細胞内に陥入させクラスリン型のエンドサイトーシスを誘導することが明らかになった (Science, 328: 1281-4, 2010., Genes to Cells, 16: 868-78, 2011.)。FCH02 は F-BAR ドメインを介して生体膜を特定の曲率のチューブ状に変形する。しかし様々な BAR タンパク質が特定の曲率を持つ生体膜を形成する意義は不明であった。

私どもは FCH02 によるエンドサイトーシスの制御機構について研究を進め、これまでにユビキチン化酵素 Nedd4L の細胞膜への局在化と活性化には FCH02 が形成する細胞膜チューブが必要であることを明らかにした。しかし *in vitro* の再構築系において FCH02 と膜チューブだけでは Nedd4L の完全な活性化が起こらないことから、Nedd4L の活性化にはさらに他の因子が関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、Nedd4L のアダプター分子としてアレスチン様分子 ARRDC1 に着目し、細胞内での局在化、特に細胞膜との結合様式について検討した。

3. 研究の方法

(1) ARRDC1 のクローニング

HeLa 細胞 cDNA から PCR によって ARRDC1 をクローニングした。

(2) ARRDC1 の細胞内局在

市販の ARRDC1 抗体を購入し、細胞染色によって ARRDC1 の細胞内局在を確認した。また ARRDC1 の C 末端に GFP タグを付加した融合タンパク質を発現するプラスミドを HeLa 細胞に導入し、固定細胞または生細胞における ARRDC1 の細胞内局在を共焦点蛍光顕微鏡によって観察した。さらに ARRDC1-GFP と Nedd4L、FCH02 の F-BAR ドメインを COS7 細胞に共発現させ、3 者の細胞内局在を確認した。

(3) ARRDC1 変異体の細胞内局在

PCR によって異種生物間でも保存性の高い

ARRDC1 の 82 番目のグリシン残基をアラニン残基に置換した点変異体を作製した。さらに PCR によって ARRDC1 の 1-150aa、151-284aa、285-433aa、1-285aa をカバーする欠損変異体を作製した。これら ARRDC1 変異体と Nedd4L、FCH02 を HeLa 細胞、または COS7 細胞に共発現させ各々の細胞内局在を確認した。

(4) ARRDC1 の細胞膜結合様式の検討

ARRDC1 の C 末端側にグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) を付加した組み換えタンパク質を大腸菌に発現させた。大腸菌抽出液からグルタチオンセファロースと陰イオン交換体によって ARRDC1-GST タンパク質を精製した。1ug の ARRDC1-GST タンパク質と 20ug の合成リポソームを混合した後、リポソームを 100000g の遠心によって沈殿させ、ARRDC1-GST タンパク質のリポソームへの結合を検証した。

4. 研究成果

(1) ARRDC1 のクローニング

全長 1302 塩基、433 アミノ酸の遺伝子がクローニングされた。N 末端から順に二つのアレスチンドメイン、Tsg101 に結合する PSAP モチーフ、WW ドメインに結合する二つの PPXY モチーフからなる。



図 1 ARRDC1 の分子構造

(2) ARRDC1 の細胞内局在

Abcam より購入した ARRDC1 抗体を用いた細胞染色では有意なシグナルを確認できなかった。ARRDC1-GFP を HeLa 細胞に発現させると細胞膜に局在した。さらに ARRDC1-GFP と Myc-Nedd4L を HeLa 細胞に共発現させると両者は細胞膜上に共局在した。ARRDC1-GFP と Myc-FCH02 F-BAR ドメインを COS7 細胞に共発現させると ARRDC1 は FCH02 の形成する細胞膜チューブに局在した。また ARRDC1 と Nedd4L は FCH02 によって形成される細胞膜のチューブに共局在した。

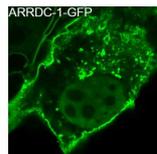


図 2-1 HeLa 細胞内での ARRDC1 の局在

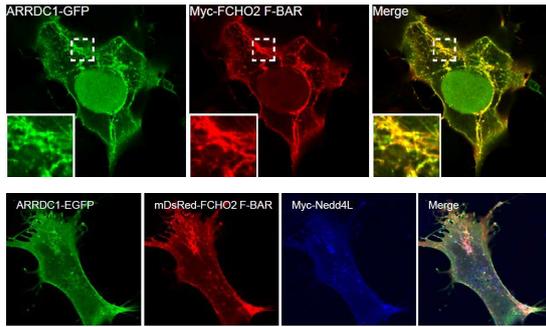


図 2-2 COS7 細胞における ARRDC1 の細胞膜チューブへの局在

(3) ARRDC1 変異体の細胞内局在

ARRDC1-GFP の各種欠損変異体、点変異体と Myc-FCHO2 F-BAR を COS7 細胞に共発現させた。

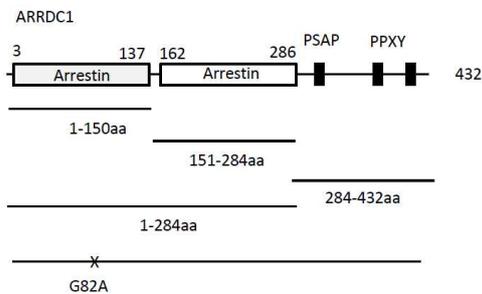


図 3-1 ARRDC1 変異体

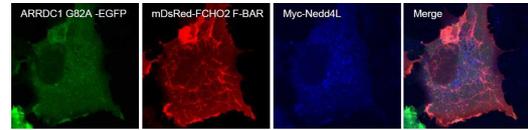
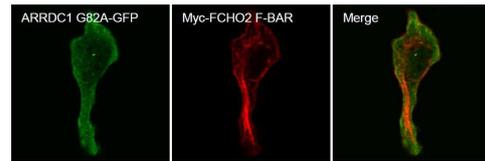
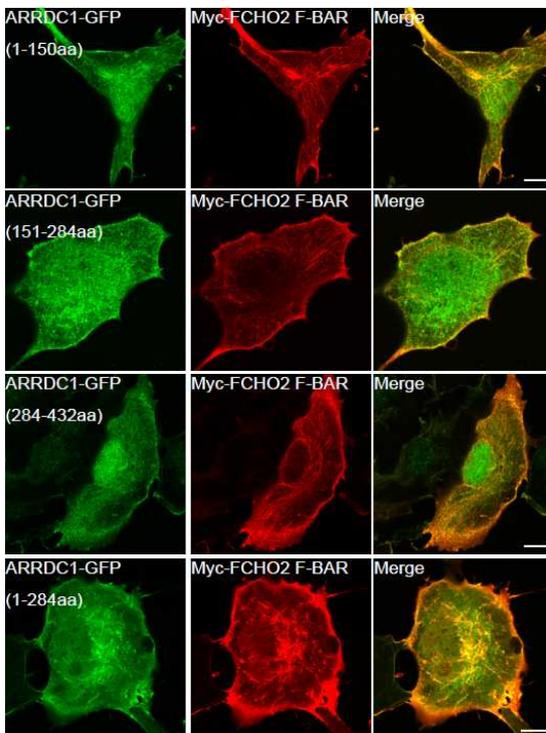


図 3-2 COS7 細胞における ARRDC1 変異体の細胞膜チューブへの局在

欠損変異体 ARRDC1 (1-150aa)、ARRDC1 (151-284aa)、ARRDC1 (284-432aa)、G82A 点変異体は FCHO2 F-BAR が形成する細胞膜チューブへの局在能力を失った。

ARRDC1 (1-284aa) は細胞膜チューブに局在した。このことから二つのアレチンドメインが細胞膜チューブへの局在に重要であり、アレチンドメインにおける保存性の高いアミノ酸配列への点変異は細胞膜局在を阻害することが明らかになった。さらに G82A 変異体と Myc-Nedd4L、FCHO2 F-BAR を共発現させると、Myc-Nedd4L は FCHO2 F-BAR が形成する細胞膜チューブへの局在能力を失った。このことから Nedd4L が細胞膜チューブに局在するためには ARRDC1 が必要であることが示唆された。

(4) ARRDC1 の細胞膜結合様式の検討

in vitro のリポソーム結合実験で ARRDC1 はフォスファチジルセリン依存的にリポソームに直接結合し、FCHO2 によって形成されるものと同サイズのリポソーム (直径約 50nm) への結合力が高いことが明らかになった。この性質は Nedd4L と類似していた。

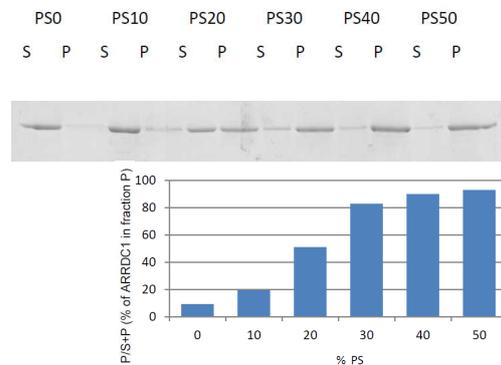


図 4-1 フォスファチジルセリン依存的な ARRDC1 のリポソームへの結合

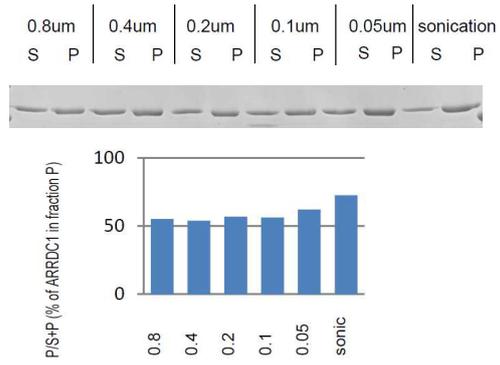


図 4-2 異なる大きさのリボソームへの ARRDC1 の結合

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 泰久 (SAKAMOTO YASUHISA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20613392