

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570216

研究課題名(和文)新規膜変形ドメインによるエンドサイトーシスの分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of endocytosis by a novel membrane-bending domain

研究代表者

伊藤 俊樹 (ITO, TOSHIKI)

神戸大学・学内共同利用施設等・教授

研究者番号：30313092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規イノシトールリン脂質結合モジュールSYLFドメインを有する蛋白質ヒトSH3YL1が、EGF受容体のエンドサイトーシスの進行過程に關与することを見出した。試験管内においてSH3YL1は人工小胞膜(リボソーム)に結合するだけでなく、相互に結合、凝集させる活性を持つことが示唆された。膜リン脂質結合に關与するSYLFドメインの新たな正電荷アミノ酸を同定したことから、今後の機能解析への基盤を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：It was found that human SH3YL1, which contains a novel phosphoinositide-binding domain named the SYLF domain, is involved in endocytosis of epidermal growth factor receptor. In vitro, SH3YL1 not only bound to liposomes, but also mediated interactions between liposomes that it resides, promoting aggregation of membrane vesicles. This study also succeeded in obtaining a knowledge about the positively-charged residues in the SYLF domain that participate in lipid-binding, therefore will provide a novel molecular basis of endocytosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エンドサイトーシス イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは細胞膜受容体、チャネル、トランスポーターなどの膜貫通型蛋白質の機能制御と品質管理、細胞外環境からの栄養物質の取り込み、神経伝達物質やホルモンの分泌に伴う細胞内膜小胞の補充など、多彩な生理現象に関与する。また、ウイルスやバクテリアなどの感染現象は、これらの病原体が宿主細胞に備わるエンドサイトーシス機構を巧妙にハイジャックする過程に他ならない。この過程において最も重要かつ未解明の課題は、細胞膜を細胞質側に引き込み、湾曲させ、引き伸ばし、縊り取る、という非常にダイナミックな生体膜の変形機構の実体である。近年、このミッシングリンクを結ぶ因子として「生体膜の変形活性」を有する蛋白質群が見出され、エンドサイトーシスにおける重要性が多く注目を集めている。我々は「ENTH ドメイン」、「F-BAR ドメイン」などの生体膜変形ドメインを相次いで発見し、エンドサイトーシスにおける細胞膜の陥入、伸長を引き起こすことを明らかにした (Itoh et al. Science 2001, Itoh et al. Dev. Cell 2005)。また、Fer チロシンキナーゼに保存された生体膜結合モジュール「FX ドメイン」を見出すなど (Itoh et al. Science Signaling 2009)、生体膜と相互作用しその形状を制御する蛋白質の発見と機能解析に一貫して取り組んできた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞増殖、免疫機構、細胞極性の形成など多様な生命現象において重要な役割を担うエンドサイトーシスの制御機構を分子レベルで明らかにすることである。本研究では、我々が近年見出した新規生体膜結合モジュール「SYLF ドメイン」を有するタンパク質 SH3YL1 に着目して、エンドサイトーシスにおける細胞膜の形態変化を誘導す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、ヒト SH3YL1 の全長および各種欠損変異体、点変異体の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 融合蛋白質および His タグ付加蛋白質として発現し、GSH-sepharose および Ni-agarose (ナカライテスク) または TALON® Metal Affinity Resin (Clontech) 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) あるいはブタ脳由来 polar lipids (Avanti polar lipids) とホスファチジルセリン、イノシトールリン脂質混合画分を乾固した後、静置水和法によってリポソームを形成し、ボルテックスにて懸濁、ある

いはソニケーション処理したものを用いた。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。

【In vitro リポソーム観察】上記の方法によるリポソーム作成において 0.5% rhodamine-PE (ローダミン標識ホスファチジルエタノールアミン) を添加し、リポソーム膜を可視化した。同時に、リポソームに 1% biotin-PE を添加しておくことで、ガラス上にコートしたビオチン化 BSA (bovine serum albumin) と streptavidin とのサンドイッチ法により、リポソームをカバーガラス上に固定した。各種リコンビナント蛋白質を添加前後で蛍光顕微鏡下にて画像を取得し、リポソームの動態を観察した。

【RNA 干渉実験】COS1 細胞を培養皿に播種、培養後、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いてヒト SH3YL1 に対する特異的 siRNA をトランスフェクトした。約 48 時間後に常法に従って ウェスタンブロット法によるノックダウンの確認、及び 免疫細胞染色を行った。

4. 研究成果

まず、蛍光顕微鏡下におけるリポソームの動態観察系を用いて、ヒト SH3YL1 の SYLF ドメインの生体膜形状制御活性を詳細に解析した。その結果、SYLF ドメインのアミノ末端に存在する両親媒性 α ヘリックス構造が生体膜への結合だけでなく、形状制御活性にも必須であることが明らかとなった。その一方で、SH3YL1 の全長蛋白質の添加により、リポソーム小胞同士が互にくっつき合って凝集することが観察された。この現象は SYLF ドメインのみでは観察されないことから、SYLF ドメインのカルボキシル末端側に分子間相互作用を介して小胞同士をつなぎとめる活性が存在することが示唆された。細胞レベルでのノックダウン実験においても、初期エンドソームの局在が分散することが観察された。SH3YL1 の結合因子であるイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素 SHIP2 のノックダウンによっても、同様の現象が観察されたことから、SH3YL1 を含む蛋白質複合体がエンドソームの輸送と分解経路への進行において、小胞どうしの凝集に関与する可能性が考えられた。実際に、ノックダウン細胞においては EGF 受容体の後期エンドソームへの輸送と、蛋白質分解が遅延することが観察された。

次に、SH3YL1 の内在性タンパク質の生理的機能を明らかにするため、特異的抗体を用いた各種培養細胞株およびマウス臓器に対するウェスタンブロットングを行った。その結果、いくつかの高発現細胞株を見出すことに成功した。これらの細胞株は特徴的なエンドサイトーシス経路を有することが考え

られたため、機能的に関連する因子を同定することとした。タンデムアフィニティータグを持つ発現ベクターを用いた免疫沈降アッセイ系を確立し、SH3YL1 に対する相互作用因子を探索した。幾つかの上皮細胞株を用いて、安定的発現細胞を取得することに成功したが、免疫沈降アッセイにより現時点では新規の相互作用因子の同定には至っていない。引き続き検討課題として推進していく必要がある。

最後に、SH3YL1 とイノシトールリン脂質との結合に関与する SYLF ドメインの構造機能相関に関する新たなデータを取得することが出来た。すなわち、SYLF ドメイン内に保存された正電荷アミノ酸をアラニン残基に置換すると、人工膜リポソームへの結合が著しく減弱することが観察された。今後はこの成果を踏まえて、上記ロックダウン実験における機能回復(レスキュー)を指標に、エンドサイトーシス過程における SH3YL1 の役割を分子レベルで理解することが期待される。

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. Tsujita, K., Takenawa, T., Itoh, T.
Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-bending proteins organizes cell polarity during leading edge formation.
Nat. Cell Biol. (2015) in press
2. Tsujita, K. & Itoh, T.
Phosphoinositides in the regulation of actin cortex and cell migration.
Biochim. Biophys. Acta 1851 (6), 824-831 (2014)
3. Tokuda, E., Itoh, T., Hasegawa, J., Ijuin, T., Takeuchi, Y., Irino, Y., Fukumoto, M., Takenawa, T.
Phosphatidylinositol 4-phosphate in the Golgi apparatus regulates cell-cell adhesion and invasive cell migration in human breast cancer.
Cancer Res. 74(11), 3054-3066 (2014)
4. Li, C., Kita, A., Hashimoto, Y., Ihara, M., Kato, A., Ogura, N., Doi, A., Oku, M., Itoh, T., Sakai, Y., Sugiura, R.
Functional link between Rab GTPase-mediated membrane trafficking and PI4,5P2 signaling.
Genes Cells. 19(3), 177-197 (2014)
5. Yamazaki, D., Itoh, T., Miki, H., Takenawa, T.
srGAP1 regulates lamellipodial dynamics and cell migratory behavior by modulating Rac1 activity.
Mol. Biol. Cell, 24(21), 3393-3405 (2013)
6. Tsujita, K., Kondo, A., Kurisu, S., Hasegawa, J., Itoh, T.*, Takenawa, T.*
Antagonistic regulation of F-BAR protein assemblies controls actin polymerization during podosome formation.
J. Cell Sci. 126 (Pt 10), 2267-2278 (2013)
*corresponding authors
7. Tanaka-Takiguchi, Y., Itoh, T., Tsujita, K., Yamada, S., Yanagisawa, M., Fujiwara, K., Yamamoto, A., Ichikawa, M., Takiguchi, K.
Physicochemical analysis from real-time imaging of liposome tubulation reveals the characteristic of individual F-BAR domain proteins.
Langmuir 29(1), 328-336 (2013)
8. Lee, H. C., Inoue, T., Sasaki, J., Kubo, T., Matsuda, S., Nakasaki, Y., Hattori, M., Tanaka, F., Udagawa, O., Kono, N., Itoh, T., Ogiso, H., Taguchi, R., Arita, M., Sasaki, T., Arai, H.
LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice.
Mol. Biol. Cell 23(24), 4689-4700 (2012)
9. Kato, K., Yazawa, T., Taki, K., Mori, K., Wang, S., Nishioka, T., Hamaguchi, T., Itoh, T., Takenawa, T., Kataoka, C., Matsuura, Y., Amano, M., Murohara, T., Kaibuchi, K.
The inositol 5-phosphatase SHIP2 is an effector of RhoA and is involved in cell polarity and migration.
Mol. Biol. Cell. 23(13), 2593-2604 (2012)
10. Hasegawa, J., Tsujita, K., Takenawa, T., Itoh, T.*
ARAP1 regulates the ring size of circular dorsal ruffles through Arf1 and Arf5.
Mol. Biol. Cell. 23(13), 2481-2489 (2012)
*corresponding author
11. Itoh, T.* & Hasegawa, J.
Mechanistic insights into the regulation of circular dorsal ruffle formation.
J. Biochem.(Tokyo) 153 (1), 21-29 (2012)
12. Irino, Y., Tokuda, E., Hasegawa, J., Itoh, T., Takenawa, T.
Quantification and visualization of phosphoinositides by quantum dot-labeled specific binding-domain probes.
J. Lipid Res. 53(4), 810-819 (2012)

〔学会発表〕(計14件)

1. 第37回 日本分子生物学会年会
ポスター発表
小倉尚也、李 翠芳、喜多綾子、加藤彩香、水野稜子、佐藤亮介、奥 公秀、阪井康能、伊藤俊樹、杉浦麗子
「イノシトールリン脂質代謝に関わる新規因子群の機能解析」
パシフィコ横浜
2014年11月27日
2. 第87回 日本生化学会大会
口頭発表
伊藤俊樹、辻田和也
「F-BAR ドメインタンパク質による細胞運動の制御」
京都国際会館
2014年10月15日
3. 第56回 日本脂質生化学会
口頭発表
伊藤俊樹、山本光、辻田和也
「細胞質型チロシンキナーゼ Fer と生体膜との相互作用の解析」
近畿大学東大阪キャンパス
2014年6月6日
4. 第56回 日本脂質生化学会
口頭発表
辻田和也、伊藤俊樹
「F-BAR タンパク質による細胞膜の張力を介した極性形成機構」
近畿大学東大阪キャンパス
2014年6月6日
5. 第56回 日本脂質生化学会
口頭発表
栗栖修作、伊藤俊樹、竹縄忠臣
BAR ドメインの膜変形活性による腎刷子縁の形成メカニズム」
近畿大学東大阪キャンパス
2014年6月6日
6. 第86回 日本生化学会大会
口頭発表
伊藤俊樹
「脂質結合モジュールによる生体膜の形状制御」
パシフィコ横浜
2013年9月11日
7. 第86回 日本生化学会大会
口頭発表
辻田和也、伊藤俊樹
「Self-organization of FBP17 responds to membrane tension required for polarized actin polymerization」
パシフィコ横浜
8. 第36回 日本分子生物学会年会
ポスター発表
李 翠芳、橋本 佑香、井原 美沙子、加藤 彩香、小倉 尚也、奥 公秀、伊藤 俊樹、阪井 康能、杉浦 麗子
「低分子量 G タンパク質 Rab GTPase によるイノシトールリン脂質シグナル伝達経路の空間的制御機構」
神戸ポートアイランド
2013年12月4日
9. 第36回 日本分子生物学会年会
ポスター発表
小倉 尚也、李 翠芳、喜多 綾子、橋本 佑香、井原 美沙子、加藤 彩香、奥 公秀、伊藤 俊樹、阪井 康能、杉浦 麗子
「PH ドメインタンパク質 Sio1 とイノシトールリン脂質シグナルの関わり」
神戸ポートアイランド
2013年12月4日
10. 第65回 日本細胞生物学会
ポスター発表
滝口 陽子、伊藤 俊樹、辻田 和也、柳澤 美穂、藤原 慶、山本 暁久、市川 正敏、山田 駿介、滝口 金吾
「F-BAR 蛋白質による膜突起形成反応のリアルタイムイメージング解析」
ウインクあいち(名古屋市)
2013年6月19-21日
11. 第65回 日本細胞生物学会
ポスター発表
徳田 恵美、伊藤 俊樹、竹縄 忠臣
「乳がん細胞株においてゴルジ体のイノシトールリン脂質が細胞間接着と細胞運動・浸潤能を制御する」
ウインクあいち(名古屋市)
2013年6月19-21日
12. 日本ペプチド学会 第16回ペプチドフォーラム
口頭発表
伊藤俊樹
「生体膜の形状変化を誘導、感知するタンパク質の機能」
京都大学宇治キャンパス宇治おうばくプラザ
2012年12月21日
13. 第85回 日本生化学会大会
口頭発表
伊藤俊樹
「Membrane curvature regulation by lipid-binding proteins」
福岡国際会議場
2012年12月14日

14. 第 54 回 日本脂質生化学会
口頭発表
伊藤俊樹
「生体膜の形状制御に関するタンパク質の機能」
九州大学医学部百年講堂
2012 年 6 月 8 日

〔図書〕(計 3 件)

1. 伊藤俊樹
「脂質二重層の曲率を認識する分子機構」
医学のあゆみ・生命を支える脂質~最新の研究と臨床~ Vol. 248, No.13 (医歯薬出版株式会社) p1069-1074 (2014)
2. 伊藤俊樹
「エンドサイトーシスにおける細胞膜の形状制御機構」
生化学 第 84 巻、第 1 号、p 5-17(2012)
3. 伊藤俊樹
リップンコットシリーズ イラストレイテッド細胞分子生物学 水島昇監訳 (第 3,4 章 分担翻訳) 丸善出版 2012 年 ISBN978-4-621-08503-5

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-itoh/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 俊樹 (ITOH Toshiki)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環バ

イオシグナル研究センター・教授
研究者番号： 3 0 3 1 3 0 9 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

辻田 和也 (TSUJITA, Kazuya)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環バ

イオシグナル研究センター・助教

研究者番号： 1 0 4 5 7 0 5 4