

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430118

研究課題名(和文)Girdinによるダイナミン識別・活性化と癌細胞の浸潤・転移機構の解明

研究課題名(英文)Investigation of discrimination and activation of Dynamin 2 GTPase by Girdin

研究代表者

三好 洋(Miyoshi, Hiroshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：80322519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：GirdinによるダイナミンGTPaseの活性化機構を、GirdinとのX線共結晶構造解析などによって検討した。

Girdinのエンドサイトーシスおよび膜リモデリングへの影響とその機構については、TIRF顕微鏡でのエンドサイトーシスの動態観察により検証し、これまでに真核細胞中の様々な輸送に特有のアダプターこそ同定されていたものの、完全には理解されてはいなかった選択的なクラスリン依存性エンドサイトーシス(CME)のためのメカニズムが新規のdynamin GTPase結合タンパク質Girdinによってコントロールされることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The activation mechanism of dynamin GTPase by Girdin was investigated by X-ray crystallography and confocal laser scanning microscopy.

We showed that the actin-binding protein girdin is a regulator of cargo-selective CME. Girdin interacts with dynamin 2, a GTPase that excises endocytic vesicles from the plasma membrane, and functions as its GTPase activating protein. Interestingly, girdin depletion leads to the defect in clathrin-coated pit formation in the center of cells. Also, we find that girdin differentially interacts with some cargoes, which competitively prevents girdin from interacting with dynamin 2 and confers the cargo selectivity for CME.

研究分野：分子生物学

キーワード：ダイナミン Girdin エンドサイトーシス 浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

アクチン細胞骨格は腫瘍細胞の浸潤・転移などを制御しており、アクチン細胞骨格とエンドサイトーシス形質細胞膜の輸送との関係が重要であることが明らかにされつつある。

ダイナミン (dynamin) は、エンドサイトーシスの基盤として、1 から 3 の三つのアイソフォームが知られており、動的な膜構造に局在して機能し、膜状仮足や circular dorsal ruffles など細胞内の膜構造を積極的に変化させ、運動や浸潤を制御することを示唆していた。さらに、circular dorsal ruffles などにクラスリンやそれに結合するアダプタータンパク質の局在が観察されないことを考えると、ダイナミン複合体は、エンドサイトーシスだけではなく、形質膜を変形や切断 (リモデリング) することで膜状仮足の前方への進展や細胞の接着に関わっている可能性も推測されていた。この様にダイナミンが膜の変形や切断などに重要な働きをしていることは容易に推定されていたものの、その詳細はこれまで不明であった。一方、Akt の活性化と癌の浸潤・転移 (細胞運動能) の促進との関係を探ることは依然として重要な課題であり、研究分担者は Akt の基質としてアクチン結合分子 Girdin (Girders of actin filament) を発見し、Girdin のノックダウンにより、癌細胞の転移能が著しく低下することを見出し、血管新生には VEGF (血管内皮細胞増殖因子) による Akt 活性化とそれに誘導される Akt による Girdin のリン酸化が重要であることなども指摘していた。これらは、癌が浸潤・転移し増殖するには、新たな腫瘍血管の形成が不可欠であり、Akt の基質である Girdin が腫瘍細胞の運動能と血管新生の両者を制御することで、腫瘍の進展に重要な役割を演じていることを意味していた。

2. 研究の目的

前述の背景のもと、ダイナミンと Girdin の関係について調査した結果、両者の直接

的な相互作用がダイナミンの GTPase 活性を促進することを見出し、その活性化がアイソフォームの中でもユビキタなダイナミン 2 選択的であることを明らかにした。そこで本研究課題では、(1)Girdin のダイナミン GTPase の活性化機構、(2) Girdin のエンドサイトーシスおよび膜リモデリングへの影響とその機構を検証し、さらに (3)Girdin によるダイナミン 2 の識別機構の解析を行って、癌の浸潤・転移機構解明への展開を計ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)Girdin のダイナミン GTPase の活性化機構を、ダイナミン 2 と Girdin との相互作用領域の探索、Girdin の X 線共結晶構造解析によって検討した。(2)Girdin のエンドサイトーシスおよび膜リモデリングへの影響とその機構については、各種顕微鏡でのエンドサイトーシスの動態観察により検証した。

4. 研究成果

(1)Girdin のダイナミン GTPase の活性化機構

まず、Girdin とダイナミンの局在を検討したところ、非刺激下では細胞質のドット状の構造物においてのみ共局在したが、EGF 刺激下では膜状仮足における両者の共局在が確認された (図 1)。

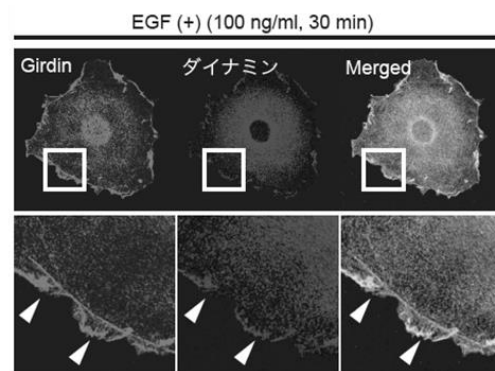


図1 Girdinとダイナミンの局在
細胞周囲のラフリングに共局在が認められる。

そこで、Girdin のダイナミン GTPase 活性への影響を調査したところ、Girdin の NT はユビキタスなダイナミン 2 を選択的に活性化し、組織特異的なダイナミン 1 については活性化しなかった (図 2)

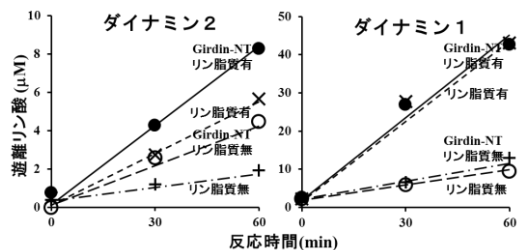


図2 GirdinのNTによるダイナミン2 GTPaseの活性化
リン脂質の有(●)無(○)にかかわらず、
GirdinのNTはダイナミン2 GTPaseを活性化し、ダイナミン1
GTPaseは活性化しない。

これらの現象の構造生物学的な理解を行うために、Girdin のダイナミンとの相互作用領域である N 末端に関して発現・精製から再現性よく結晶化する条件を確立し、放射光施設による回折実験を行ない、分解能 4.0 Å のデータを収集した。現在、Girdin の NT 領域のモデルを構築し精密化を進めている (図 3、4)。



図3 Girdinの一次構造
相互作用蛋白質とその相互作用領域。

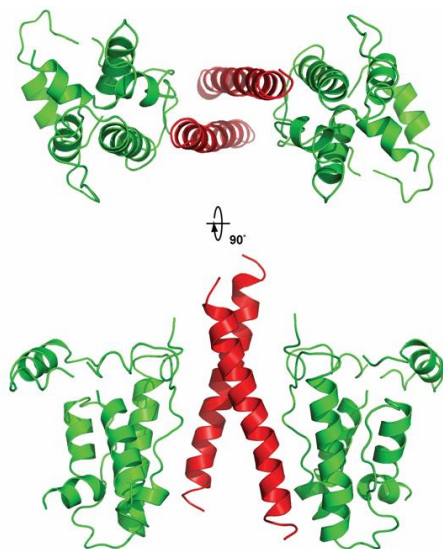


図4 GirdinのNTの構造(精密化前)
二量体として表示。中央にあるα-ヘリックス
(赤)が図3のコイルドコイル領域のN末端に相
当する。他がNT領域(緑)の構造。

(2)Girdin のエンドサイトーシスおよび膜リモデリングへの影響

Girdin 遺伝子のノックダウンによるエンドサイトーシスの影響を観察することにより、Girdin の N 末端ドメインとエンドサイトーシス関連 GTPase であるダイナミンの相互作用が、様々な輸送物の取り込みに重要なクラスリン依存性エンドサイトーシスを制御していることを明らかにした (図 5)。

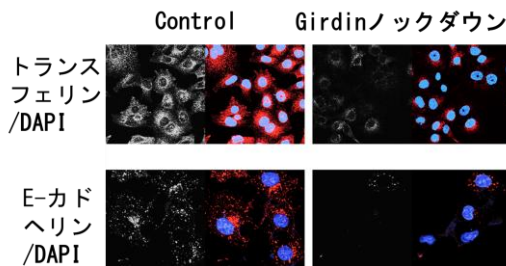


図5 Girdinノックダウンによる取り込みの抑制

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 1 件)

- ① Weng, L., Enomoto, A., Miyoshi, H., Takahashi, K., Asai, N., Morone, N., Jiang, P., An, J., Kato, T., Kuroda, K., Watanabe, T., Asai, M., Ishida-Takagishi, M., Murakumo, Y., Nakashima, H., Kaibuchi, K., Takahashi, M. Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. *EMBO J.* 33: 2098-112, 2014. (査読有)

[その他]

ホームページ等

<http://www.marianna-u.ac.jp/houjin/staff/univ/bisei.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 洋 (MIYOSHI Hiroshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：80322519

(2)研究分担者

榎本 篤 (ENOMOTO Atsushi)

名古屋大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20432255

(3)研究分担者

湯澤 聡 (YUZAWA Satoru)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80322519

(3)連携研究者

なし