

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

細胞膜形態決定の動作原理の解明

### 2. 氏名

末次 志郎

### 3. 研究のねらい

細胞は機能にあわせた特定の形態を持っているが、細胞の形態を決める基本原理は明らかではない。細胞の最も外層を構成している細胞膜は、脂質二重膜により構成されている。脂質二重膜はそれ自体では形をとることができず、別のものによって支えられることで形態を保っていることが知られている。本研究では、細胞の骨組みである細胞骨格と細胞膜をつなぐインターフェイスとなる分子群の同定、機能解析を行うことで、特定の細胞が特定の形態を形成するための分子基盤の解明を目指す。

### 4. 研究成果

細胞膜は脂質二重膜により構成されている。脂質二重膜は、それ自体では水溶液中では球体をとると考えられる。しかし、実際の細胞の形態はさまざまであり、細胞全体の形が球体でないものが多く存在するだけでなく、細胞表面も様々な微細構造が存在している。これらの微細構造は大きく分けて突起構造と陥入構造の2種類に分類される。突起構造の代表的な例は、繊維芽細胞や上皮細胞などの細胞移動先端や神経細胞の成長円錐で見られる糸状仮足(フィロポディア)や葉状仮足(ラメリポディア)である。これらの突起構造はともに3大細胞骨格の一つであるアクチン繊維の形成過程として知られるアクチン重合を駆動力として形成されると考えられている。細胞がアポトーシスを起こすときにはブレビングという突起形成を伴う現象が見られるが、こちらは細胞膜や裏打ち蛋白質が破綻することによって生じると考えられている。陥入構造にはエンドサイトーシスなどの輸送に関わるもの、コレステロール輸送やシグナル伝達の場とも考えら得るカベオラと呼ばれる構造が代表的である。エンドサイトーシスにおいては生じた陥入構造は、切断されて小胞となり輸送される。ある種の細胞に見られる構造としては、筋肉には T tubule (骨格筋横行細管)と呼ばれる長い陥入構造が細胞膜に存在し、カルシウムチャネルなどが集積している。

BAR ドメインは amphiphysin などのタンパク質の N 末端に多く見いだされるドメインである。Amphiphysin は骨格筋において細胞膜の陥入により形成される T 管に局在している。ショウジョウバエにおける amphiphysin 変異体解析により、T 管の陥入が正常に起こらないために、T 管のネットワーク構造が破綻し、T 管と筋小胞体の連携による筋収縮に異常を来すことが明らかにされた。Amphiphysin は N 末端に Bin-Amphiphysin-Rvs167 (BAR)ドメイン、C 末端に SH3ドメインを持つアダプター分子である。BAR ドメインは脂質結合ドメインであり、SH3 はタンパク質-タンパク質相互作用を担うドメインである。興味深いことに BARドメインは *in vitro* で人工脂質二重膜を変形し、tubule を作ることができる。2004 年に McMahon らのグループによって BARドメインの立体構造が明らかにされた。興味深いことに BAR ドメインはバナナ型の構造をとるダイマーであった(図2)[9]。変異体の解析の結果、バナナ型のカーブの内側の正電荷と細胞膜の負電荷が相互作用し、膜を変形して tubule を作るかと推察された。バナナ型の BARドメインの内側に膜が結合することから、BARドメインが、膜に巻き付くことで、tubule を形成するのではないかと考えられている。興味深いことに、立体構造から予想されるバナナ型のカーブの内側の半径と、*in vitro* でみられる tubule の半径はだいたい相関していると考えられている。

BARドメインは多数のタンパク質に見いだされる。私たちは BARドメインに弱い相同性を持つドメインとして、EFC (Extended FCH)あるいは F-BARドメインが見いだした。FCHドメインは、微小管結合ドメインとして見いだされたが、タンパク質ファミリー間の保存領域は FCHドメイン直

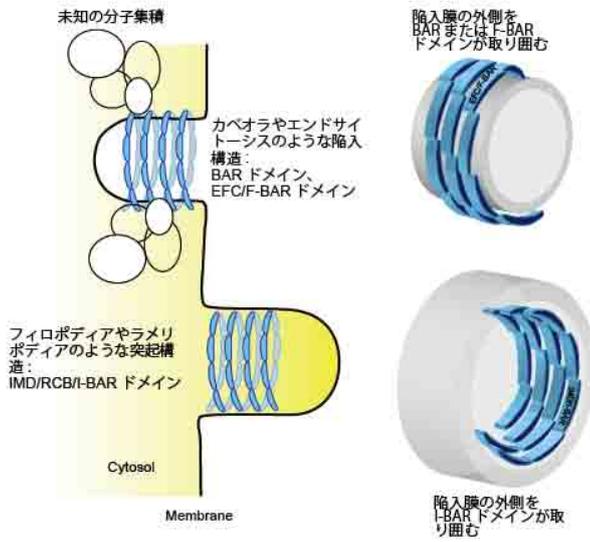
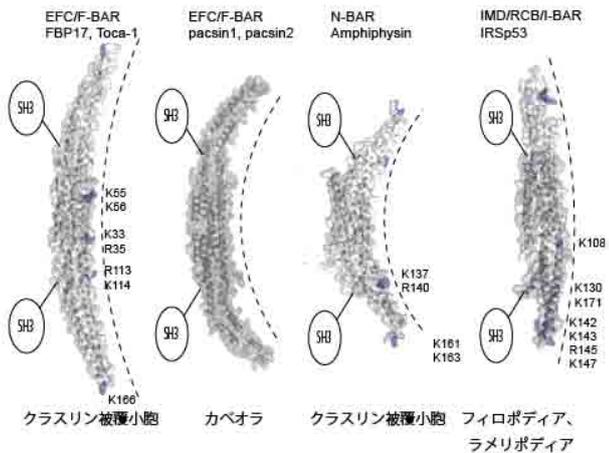
後に共通して見いだされる Coiled-coil 領域を含むことがわかった。この FCH+Coiled-coil 領域は、BAR ドメインと同じく、膜結合活性および膜変形(tubule 形成)活性を持っていた。従って、この領域全体で、EFC/F-BAR ドメインと名付けられた。しかしながら、膜変形の結果生じる tubule の半径は異なっていて、BAR と EFC ドメインは異なる膜形態に準拠して機能すると考えられる。タンパク質の局在は in vitro ではリポソーム(人工脂質二重膜)の外側であるのに対し、細胞においては細胞内(リポソームの内側)であるので過剰発現細胞ではチューブ形成が見られる。

EFC/F-BAR ドメインの立体構造を共同研究により明らかにしたところ、EFC/F-BAR ドメインも BAR ドメインと同様な  $\alpha$  ヘリックスからなる二量体でバナナ型の構造を取っていて、しかもバナナの内側の凹面は負に帯電していた。従って変異導入結果をあわせると立体構造上の凹面で膜に結合すると考えられる。EFC/F-BAR ドメインには、N-BAR ドメインで見られるような疎水性アミノ酸の膜への挿入はなさそうで、静電的相互作用によってのみ膜の変形が誘導されるようである。EFC/F-BAR ドメインは結晶中で、鎖を形成していた。しかも、鎖の部分の結合を担うアミノ酸に変異を導入すると膜変形能が消失することから、EFC/F-BAR ドメインはポリマーを形成しポリマーが膜を取り囲むようにして、膜変形を誘導するモデルが示唆された。このモデルは最近発表された膜に結合した状態の EFC/F-BAR ドメインの立体構造から支持される。膜変形に際して最初に平面膜に EFC/F-BAR ドメインが結合する際、立体構造上の凹面ではなく、側面が結合し、膜上でポリマー形成を行った後に膜が変形されると考えられている。

興味深いことに EFC および BAR ドメインを持つタンパク質のうち、FBP17、Toca-1、CIP4 や Pacsin/Syndapin など多数のタンパク質が SH3 ドメインを持ち、従って、Amphiphysin と同じようなドメイン構造を持っている。FBP17 などの SH3 ドメインもまた Amphiphysin の SH3 ドメインと同等のように、脂質膜チューブを切断するタンパク質である dynamin とアクチン重合を制御するタンパク質である N-WASP に結合する。EFC ドメインを持つタンパク質のうち FBP17 や CIP4 は EFC ドメインと SH3 ドメインを持ち、エンドサイトーシスに関わっている。しかしながら、結合する膜の曲率の違いから Toca-1 や FBP17 などの EFC/F-BAR ドメインタンパク質はエンドサイトーシスの初期に、BAR ドメインタンパク質である amphiphysin などは、エンドサイトーシスの後期の小胞切断のあたりに関わると考えるのが自然である。

N-WASP は Arp2/3 の活性化を経てアクチン重合を促進することが知られているが、FBP17 や Toca-1 の存在下での膜の曲率とアクチン重合の関係性はこれまで議論されてこなかった。そこで、膜の曲率によるアクチン重合の制御機構を明らかにするため、FBP17 または Toca-1 と N-WASP をリポソームに作用させ、pyrene 標識アクチンによる actin polymerization assay を行

立体構造と結合膜の形状(点線で示す)の対応。結合に必要な塩基性アミノ酸も示す。



った。N-WASP とリポソーム、あるいは N-WASP と FBP17 の組み合わせでは、それほどアクチン重合の変化はもたらされなかったが、FBP-17 または Toca-1 を N-WASP 存在下で直径が  $0.5-1 \mu\text{m}$  の比較的大きなリポソームに作用させることで、アクチン重合の速度が大きく増加したのに対し、 $0.1-1 \mu\text{m}$  を作用させた場合ではほとんど変化しなかった。したがって、EFC/F-BAR タンパク質は細胞膜の形態に応じてアクチン重合を調節している可能性が示唆された。この知見は、FBP17 などはクラスリン被覆小胞の陥入膜の形態と N-WASP によるアクチン細胞骨格制御を結ぶ分子であることを示すと考えられる。

私たちはさらに IRSp53-Mim-homology domain (IMD)ドメインと呼ばれる、IRSp53 や MIM などのタンパク質の N 末に見いだされるドメインを解析した。IRSp53 には C 末に SH3ドメインを持ち、MIM の場合は C 末部に単量体アクチンに結合する WH2ドメインを持つ。IRSp53 の SH3ドメインもまた、N-WASP や類似のタンパク質である WAVE2 に結合する。IRSp53 などの SH3ドメインを持つ分子に中にも WH2 様のモチーフを持つものもある。IMDドメインは、BAR や EFC と同じく  $\alpha$ ヘリックスで構成されるダイマーを形成するが、形はバナナ型でなく、ゆるい逆曲率を持った直線上で非常に興味深い。IMDドメインもまた膜に結合する。詳細な膜結合アミノ酸マッピングから、IMDドメインもまた塩基性アミノ酸を介して膜に結合する。塩基性アミノ酸の配置から IMDドメインは凸型の膜結合面をタンパク質の立体構造表面におくことができ、この凸型の面を介して膜に結合することで BAR や EFC/F-BAR のような細胞における陥入構造、*in vitro* におけるチューブ構造ではなく、細胞における突起構造、*in vitro* における陥入構造を形成する。すなわちタンパク質の脂質結合面が凸型か凹型によって膜の変形の向きが決定されていると考えられる。また IRSp53 は突起構造において細胞膜と細胞骨格制御タンパク質である N-WASP や WAVE を結び付けていると考えられる。

本研究では、細胞膜結合タンパク質である IMD/I-BARドメインおよび EFC/F-BARドメインタンパク質について共同研究による立体構造の解明と膜への相互作用の機序を明らかにした。両ドメインは立体構造上の正電荷で形成される負電荷を持った細胞膜との相互作用面を持つことを見いだした。脂質作用面は、I-BARは凸面であり、F-BARは凹面であって、それぞれの形成する細胞膜構造であるフィロポディア、ラメリポディア(I-BAR)およびはクラスリンおよびカベオラのエンドサイトーシス(F-BAR)で機能していることを見いだした。これらのタンパク質の立体構造から予測される脂質作用面の形態は、それぞれの細胞構造の持つ細胞膜の形態に、鋳型の様に対応していることを示すことができた。従ってこれらのタンパク質ドメインは、脂質膜の形態をそれぞれの細胞微細形態に応じて形成させる、あるいは、形成された後にその形態を認識するドメインであることを証明できた。さらに細胞膜の形態がこの BARドメインスーパーファミリータンパク質を経由して直接的にアクチン重合のようなシグナル伝達を制御することを見だし、形態そのものがシグナルの鍵となることを証明した。BARドメインスーパーファミリータンパク質は、このようにアクチン細胞骨格形成とフィロポディアやクラスリン被覆小胞などの細胞膜をそれぞれの形態学的な構造において結びつけるインターフェイスであることを示すことができた。

## 5. 自己評価

細胞膜結合タンパク質である IMD/I-BARドメインおよび EFC/F-BARドメインタンパク質について立体構造の解明と膜への相互作用の機序を明らかにした。両ドメインは立体構造上の正電荷で形成される負電荷を持った細胞膜との相互作用面を持つことを見いだした。脂質作用面は、I-BARは凸面であり、F-BARは凹面であって、それぞれの形成する細胞膜構造であるフィロポディア、ラメリポディア(I-BAR)およびはクラスリンおよびカベオラのエンドサイトーシス(F-BAR)で機能していることを見いだした。これらのタンパク質の立体構造から予測される脂質作用面の形態は、それぞれの細胞構造の持つ細胞膜の形態に、鋳型の様に対応していることを示すことができた。従ってこれらのタンパク質ドメインは、脂質膜の形態をそれぞれの細胞微細形態に応じて形成させるあるいは形成された後にその形態を認識するドメインであることを証明できた。さらに細胞膜の形態が直接的に細胞骨格の形成過程の一つであるアクチン重合のようなシグナル伝達を制御することを見だし、形態そのものがシグナルの鍵となることを証明した。このような研究は、細胞の形態形成に関して新しい概念的な要素を追加できたと考えら

れる。このように、本研究では BAR ドメインスーパーファミリータンパク質は、アクチン細胞骨格と細胞膜を結ぶインターフェイスであることを示すことができた。

## 6. 研究総括の見解

細胞膜結合タンパク質である IMD/I-BAR ドメインおよび EFC/F-BAR ドメインタンパク質について立体構造の解明と膜への相互作用の機序を次々に明らかにしてきた。脂質作用面は、I-BAR は凸面であり、F-BAR は凹面であって、それぞれの形成する細胞膜構造であるフィロポディア、ラメリポディア(I-BAR)およびはクラスリンおよびカベオラのエンドサイトーシス(F-BAR)で機能していることを見いだしており、これらのタンパク質の立体構造から予測される脂質作用面の形態は、それぞれの細胞構造の持つ細胞膜の形態に、鑄型の様に対応していることを示すことができたことは、評価できる。今後、この分野の大きな発展が期待できる。

## 7. 主な論文等

### 【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

#### ①論文

1. Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T. and Yokoyama, S. (2006). "The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation." *J Biol Chem* 281(46): 35347-58.
2. \*Shimada, A., \*Niwa, H., \*Tsujita, K., \*Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L., Liu, Z. J., Wang, B. C., Yamamoto, M., Terada, T., Miyazawa, A., Tanaka, A., Sugano, S., Shirouzu, M., Nagayama, K., Takenawa, T. and Yokoyama, S. (2007). "Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis." *Cell* 129(4): 761-72. (\*equal contribution)
3. Takano, K., Toyooka, K. and Suetsugu, S. (2008). "EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization." *EMBO J* 27(21): 2817-28.
4. Suetsugu, S. (2009). "The direction of actin polymerization for vesicle fission suggested from membranes tubulated by the EFC/F-BAR domain protein FBP17." *FEBS Lett* 583(21): 3401-4.
5. Shimada, A., Takano, K., Shirouzu, M., Hanawa-Suetsugu, K., Terada, T., Toyooka, K., Umehara, T., Yamamoto, M., Yokoyama, S., and Suetsugu, S. "Mapping of the basic amino-acid residues responsible for tubulation and cellular protrusion by the EFC/F-BAR domain of pacsin2/Syndapin II" *FEBS Lett* in press (2010)

#### ②招待講演

1. The second conference on F-BAR proteins (ストックホルム) "The EFC/F-BAR protein that is involved in caveolae formation" 2009年10月1日
2. Workshop on Cell Migration (ミラノ、Italy) "Connecting the membrane to the actin cytoskeleton by the BAR, EFC, and RCB domain proteins and WASP/WAVE proteins." 2007年5月

#### ③学会発表

1. 日本分子生物学会シンポジウム「細胞膜と細胞骨格をつなぐ細胞形態機構」2006年12月

2. 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会 合同大会(福岡)口頭発表、シンポジウムオーガナイザー2007年5月31日

3. BMB2007 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会「The rearrangements of actin cytoskeleton dependent on the shapes of the plasma membrane.」2007年12月12日