

## 論文の内容の要旨

論文題目 Coordination Between Actin Cytoskeleton and Membrane Deformation by a Novel Membrane Tubulation Domain of PCH proteins is Involved in Endocytosis

(エンドサイトーシスにおけるアクチン細胞骨格と細胞膜変形の協調的役割)

氏名 辻田 和也

FCH ドメインは真核生物において高度に保存されており、FBP17, CIP4, Toca-1, Syndapins/PACSINs, cdc15, PSTPIPs などの PCH タンパク質ファミリーにおいて見ついている。これらのタンパク質はエンドサイトーシスやアクチン細胞骨格制御に関与していることが知られている。例えば、FBP17 と Syndapins はエンドサイトーシスにおいて必須なタンパク質である Dynamin と結合する。また Toca-1 は N-WASP/Arp2/3 複合体依存的なアクチン重合過程に必須なタンパク質である。

現在 FCH ドメインの機能は不明である。興味深いことに PCH タンパク質において FCH ドメインを超えたアミノ酸配列相同性の高い領域が存在し、私は FCH ドメインを含めたこの領域を extended FC(EFC)ドメインと名づけた。EFC

ドメインは BAR ドメインに弱い相同性を示す。FBP17 の EFC ドメインは細胞膜脂質であるホスファチジルセリンとホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸に強く結合することが分かった。また EFC ドメインを細胞に発現すると細胞膜を強く変形することが分かった。さらに他の EFC ドメインも同様にこれらの脂質に結合し細胞膜を変形することが分かった。この結果より EFC ドメインは新規膜変形ドメインであり、その機能は進化上保存されていることを示している。次に EFC ドメインが直接膜を変形するのか確かめるために *in vitro* の実験を行った。*in vitro* において EFC ドメインと人工リポソームを加えたところ、EFC ドメインのみで人工リポソームをチューブ状に変形することが分かった。そして、EFC ドメイン内に保存されている塩基性アミノ酸残基がリポソームの結合と変形に必要であった。この結果から、EFC ドメインは直接膜を変形し、これらの塩基性アミノ酸残基が酸性脂質との直接的な結合と変形に重要であることが明らかとなった。

FBP17 はエンドサイトーシスに関わっていることが示唆されている。そこで FBP17 とエンドサイトーシスについてより詳しく調べた。FBP17 の強発現は EGF のエンドサイトーシスを強く阻害した。興味深いことにこの効果は EFC ドメイン依存的であった。また弱い発現の場合、FBP17 は細胞膜において EGF と共局在することから、FBP17 はエンドサイトーシスの初期段階において何らかの機能を果たしていると推測される。さらに内在性の FBP17 と CIP4 をノックダウンすることにより、EGF のエンドサイトーシスが阻害された。よってこれらのタンパク質は生理的にエンドサイトーシスに必要であることが示唆された。

多くの PCH タンパク質は Dynamin と N-WASP に結合することが知られている SH3 ドメインを持っている。重要なことに、FBP17 は N-WASP を細胞膜

にリクルートすることが分かった。SH3 ドメインを欠いた変異体ではこの効果は見られなかったことから、FBP17 は SH3 ドメインを介して N-WASP を細胞膜にリクルートすることが明らかとなった。さらに *in vitro* において FBP17 は N-WASP-Arp2/3 複合体依存的なアクチン重合を促進することが分かった。よって FBP17 はエンドサイトーシスにおいて、N-WASP を細胞膜にリクルートし、そこでアクチン重合を促進することが示唆された。

これまでにいくつかの PCH タンパク質の SH3 ドメインが Dynamin や WASP/N-WASP に結合することが報告されている。さらに免疫沈降法により、FBP17 はエンドサイトーシスの初期段階において、N-WASP, Dynamin-2 と複合体を形成することが示された。また細胞内においても FBP17 と Dynamin-2, N-WASP は細胞膜が陥入している場所で複合体を形成していることが分かった。

次に FBP17 は細胞膜の変形とアクチン重合を促進することから、両者の関係を調べた。アクチン重合を強く促進することが予想される FBP17 と N-WASP の共発現は FBP17 依存的な細胞膜の変形を阻害した。同じく、latrunculin B 処理によりアクチン重合を阻害すると、これらの細胞膜変形は増加した。これらの結果は FBP17 の下流に位置するアクチン重合が細胞膜の変形に重要な役割を果たすことが示唆される。

本研究により、私は新規膜変形ドメインである EFC ドメインを同定した。FBP17 は EFC ドメインを介して直接細胞膜に局在し、この直接的な相互作用により、エンドサイトーシスに必要な細胞膜の変形、陥入を誘導すると考えられる。次に FBP17 はそこに N-WASP と Dynamin をリクルートする。Dynamin は膜を切るタンパク質として確立されている。そして N-WASP によるアクチン重合は陥入している膜を切る力に寄与していると示唆される。よってこれらの力と Dynamin による膜を切る作用が協調的に働いて、エンドサイトーシスにおける

効率よい小胞の発生に寄与していることが示唆される。以上の結果から FBP17 はエンドサイトーシスの初期段階において協調的に細胞膜の陥入、細胞膜の分裂、アクチン重合を結びつけるタンパク質であることが示唆された。