

エンドサイトーシスにおける細胞膜の形状制御機構

伊藤 俊 樹

多様な生命現象に関与するエンドサイトーシスは、細胞膜平面に微小な曲率変化を誘導することで開始される。そのメカニズムは長年で不明であったが、「生体膜変形活性」を持つタンパク質の発見によってその理解は急速に進んでいる。その中には生体膜曲率の「誘導」だけでなく、曲率の「感知」に関わるタンパク質も多数見出されており、生体膜の形状に基づく細胞の形態形成を支える未知の分子機構の存在を暗示している。エンドサイトーシス小胞の完成に至る「生体膜の切断 (fission)」も、膜融合と並んで重要かつ未解明の生命現象であり、近年の当該研究の発展は注目に値する。本総説ではこれら「生体膜の形状制御」をめぐる研究領域を俯瞰しながら、これまでに分かってきたこと、さらに今後の課題を抽出することを試みる。

1. はじめに

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タンパク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。

電子顕微鏡による観察から、細胞膜の裏側には高電子密度の被覆構造が存在することが古くから知られていたが、その実体であるクラスリンが発見されるとエンドサイトーシスの分子レベルでの理解が大きく進展し始めた¹⁾。その一連の研究から、膜貫通型の受容体タンパク質がその細胞質側領域を介してクラスリン重鎖およびアダプタータンパク質複合体 AP-2 と直接結合することが明らかにされる

と、この「サッカーボール」のようなクラスリン被覆構造がエンドサイトーシス小胞の形成メカニズムの全てを説明するように思われた。しかしその一方で、理論的考察から、細胞膜が直径 200 nm 程度の小胞を形成するために必要なエネルギーは、クラスリン被覆タンパク質と細胞膜リン脂質との表面的な結合エネルギーだけでは説明できないことも指摘されていた²⁾。

近年の生化学、構造生物学、分子生物学、細胞生物学、遺伝学を包含する諸研究の発展によって、このミッシングリンクを結ぶ因子として「生体膜変形活性」を有するタンパク質群が相次いで見出され、エンドサイトーシスにおける重要性が次々と明らかになってきた。通常は細胞質中に存在するこれらのタンパク質が、細胞膜リン脂質との可逆的な相互作用を通じてエンドサイトーシスにおける連続的な細胞膜の形態変化を遂行する。さらに、膜の形態変化のある種の「情報」として感知して小胞形成を遂行する分子メカニズムの存在など、エンドサイトーシス研究は「生体膜の形状」をめぐる新たな研究領域へと発展しつつある。

本稿では、生体膜を構成するリン脂質と細胞質タンパク質との可逆的な相互作用が、複雑な生体膜の形状変化を制御するメカニズムに焦点を当て、一連の研究から見えてきたエンドサイトーシスの分子機構について考察する。

神戸大学大学院医学研究科生化学・分子生物学講座膜生物学分野 (〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-1)
Mechanisms for the regulation of the plasma membrane curvature in endocytosis

Toshiki Itoh (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Division of Membrane Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan)

本総説は 2009 年度奨励賞を授賞した。

2. ENTH ドメイン

2.1 ENTH ドメインとイノシトールリン脂質の相互作用

EGF 受容体のチロシンキナーゼ基質タンパク質として同定された eps15 は、カルボキシル末端領域の Asp-Pro-Trp/Phe (DPW/F) モチーフを介して、クラスリン依存性エンドサイトーシスに参与するアダプタータンパク質 AP-2 の構成因子 α -adaptin および β -adaptin に結合する³⁾。一方で、eps15 のアミノ末端には三つの「EH ドメイン」と呼ばれる相同領域が存在し、Asn-Pro-Phe (NPF) モチーフを持ついくつかのタンパク質と相互作用することが知られていた⁴⁾。Yale 大学の De Camilli らのグループは、eps15 の EH ドメインを用いたラット脳細胞質画分に対する overlay 法により epsin 1 (eps15 interacting protein 1) を同定した⁵⁾。Epsin 1 は中央領域に DPW/F モチーフを複数もち、 α -adaptin に結合するとともに、カルボキシル末端領域の NPF モチーフを介して eps15 に結合することから、クラスリン依存性エンドサイトーシスの鍵分子であると考えられた。酵母における epsin ホモログである Ent1/2 の欠損株はエンドサイトーシスが不全となること⁶⁾、この機能不全を回復するためには Ent1/2 タンパク質のアミノ末端側約 140 残基程度の領域が必要であった。この領域は酵母から哺乳類に至るまで高度に保存されていることから「epsin N-terminal homology (ENTH) ドメイン」と名付けられ⁷⁾、エンドサイトーシスの進行に必須な何らかの活性を持つと考えられたが、その生化学的な機能は不明なままであった。

筆者らのグループは、epsin 1 ENTH ドメインが細胞膜を構成するイノシトールリン脂質である PtdIns(4,5)P₂ に強く結合することを見出した⁸⁾ (図 1A)。この相互作用は PtdIns(4,5)P₂ の最もよく知られた結合ドメインであるホスホリパーゼ C (PLC) δ 1 の PH ドメインに匹敵するものであり、その K_d は約 0.37 μ M と見積もられた。ENTH ドメインに高度に保存された 76 番目の Lys 残基が PtdIns

(4,5)P₂ との結合に必要であり、この残基を Ala に置換した epsin 変異体を過剰発現すると EGF 受容体のエンドサイトーシスが顕著に抑制された。これらの結果から、epsin 1 は ENTH ドメインを介して細胞膜に存在する PtdIns(4,5)P₂ を認識し、中央およびカルボキシル末端領域でクラスリン依存性エンドサイトーシスの中心因子である AP-2、eps15、さらにクラスリン重鎖そのものにも結合する⁹⁾ リンカータンパク質であると予想された⁸⁾。

2.2 ENTH ドメインの立体構造と細胞膜の陥入メカニズム

筆者らによって ENTH ドメインが脂質結合モジュールとして再発見される前年、ラット epsin 1 の ENTH ドメインの結晶構造が報告され、8本の α ヘリックスから成る球状の構造であることが示された¹⁰⁾ (図 1D 左)。しかしながら、この結晶構造においてはアミノ末端の約 15 残基に対する回折像が得られないことから、この領域が特定のコンフォメーションを取らない、いわゆる「天然変性状態」で存在すると考えられた。同様の結果は筆者らの NMR を用いた解析からも裏付けられたが (図 1D 中央)、ENTH ドメインと結合する PtdIns(4,5)P₂ の極性部位に相当する Ins(1,4,5)P₃ の添加によって、このアミノ末端の約 18 残基が大きく構造変化を起こすことが判明した⁸⁾ (図 1B)。さらに、この領域を欠損すると ENTH ドメインの PtdIns(4,5)P₂ に対する結合能が失われることから (図 1C)、この大きな構造変化が脂質結合に必須であることが強く示唆された。翌年、McMahon らのグループは ENTH ドメインと Ins(1,4,5)P₃ の共結晶構造を報告した¹¹⁾。それによれば、Ins(1,4,5)P₃ との結合に伴ってアミノ末端側領域は新たな α ヘリックス構造へと変換され、Ins(1,4,5)P₃ を包み込むように深い結合ポケットを形成する (図 1D 右)。この新たな α ヘリックスの片側には正電荷に富むアミノ酸が並んでおり、PtdIns(4,5)P₂ のリン酸基との静電的相互作用

図 1 ENTH ドメインと PtdIns(4,5)P₂ の相互作用

- (A) PE および PC をベースとしたリポソームに 0~0.5% の PtdIns (PI) または PtdIns(4,5)P₂ (PI(4,5)P₂) を添加し、ラット由来 epsin1 ENTH ドメインとの共沈アッセイを行った。PtdIns 添加では ENTH ドメインがほとんど結合画分 (P) に見られないのに対し、PtdIns(4,5)P₂ の添加に伴って結合が増加していることがわかる。
- (B) Ins(1,4,5)P₃ の添加による ENTH ドメインの化学シフト変化。主に 3ヶ所の構造部位 (site 1~3) に変化が認められるが、特にアミノ末端に相当する部位 (site 1) の変化が大きい。
- (C) ENTH ドメイン変異体に見られる PtdIns(4,5)P₂ 結合への影響。アミノ末端領域のうち、Arg8 を Ala に置換したもの (R8A) およびアミノ末端領域の 18 残基を欠損したもの (Δ N18) が結合能を失っている。
- (D) ENTH ドメインの立体構造。(左) ENTH ドメイン単独での結晶構造¹⁰⁾、(中央) ENTH ドメイン単独での NMR 像^{8,70)}、(右) ENTH ドメイン-Ins(1,4,5)P₃ 複合体の結晶構造¹¹⁾、を示している。赤~橙色で示したアミノ末端領域が Ins(1,4,5)P₃ との結合に伴って α ヘリックスを形成している。それぞれ CueMol2 ソフトウェアを用いて立体構造を表示した。(A-C: 文献 8 より転載)

図 2 両親媒性 α ヘリックスによる細胞膜の変形モデル

- (A) ENTH ドメインに見られる両親媒性 α ヘリックス形成。図 1D に示す各立体構造解析の結果から、ENTH ドメインのアミノ末端領域は細胞質中において特定の立体構造を取らないが、PtdIns(4,5)P₂ との結合に伴って両親媒性の α ヘリックスを形成する (黄色: 疎水性残基, 青色: 正電荷残基)。それぞれ CueMol2 ソフトウェアを用いて立体構造を表示した。
- (B) 両親媒性 α ヘリックスの形成により、その疎水性残基が細胞膜中のリン脂質分子の脂肪酸部分と疎水的相互作用を行う。その結果として、細胞膜内層のみ面積が増大して膜の変形に至る。(文献 40 より書式変更後転載)

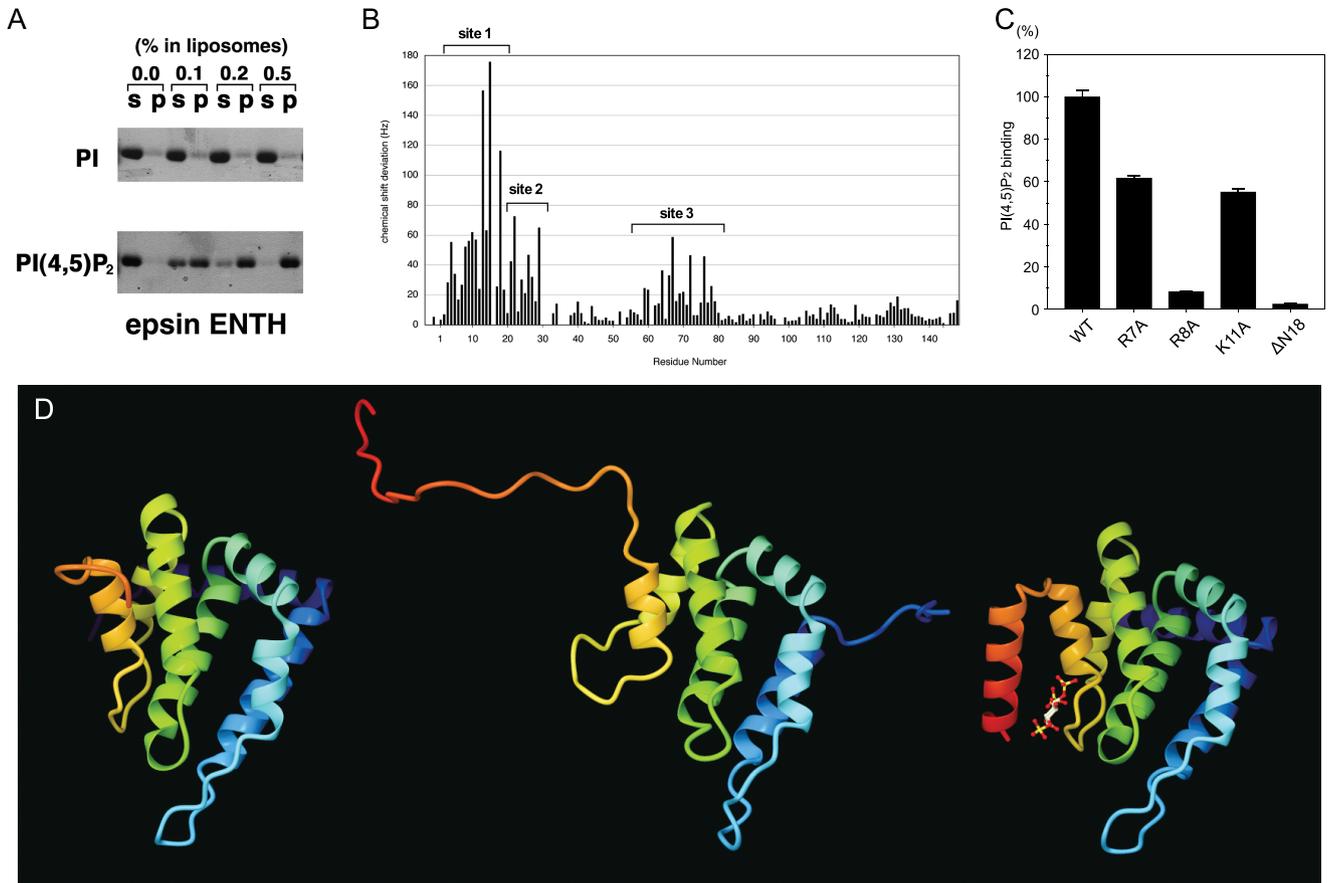


図 1

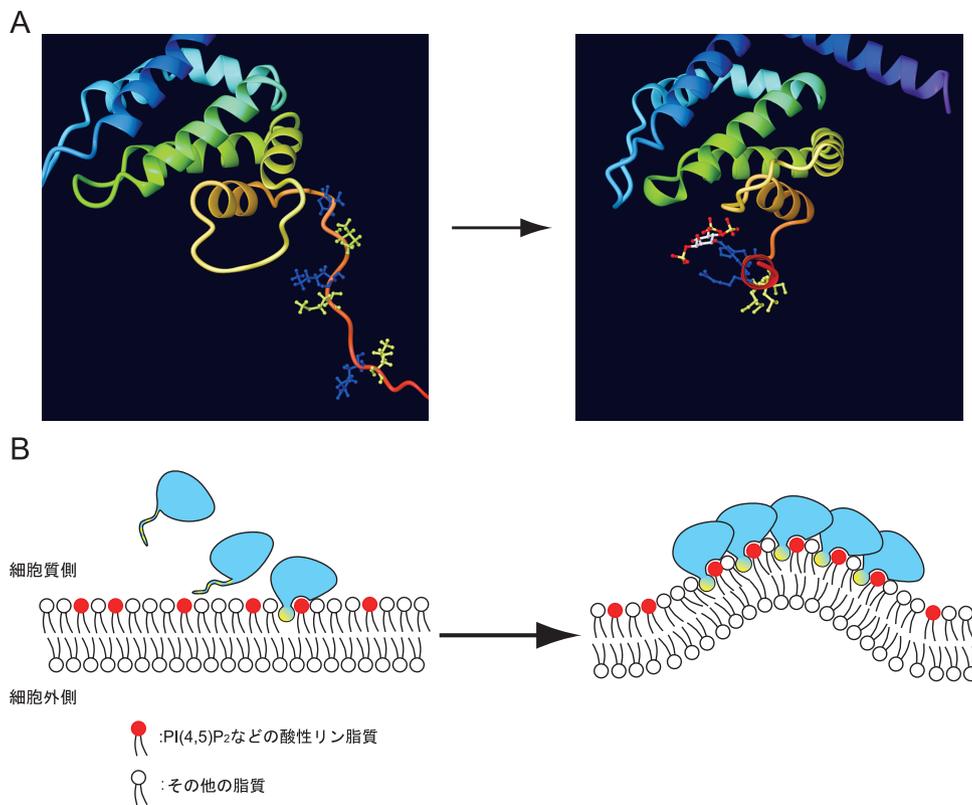


図 2

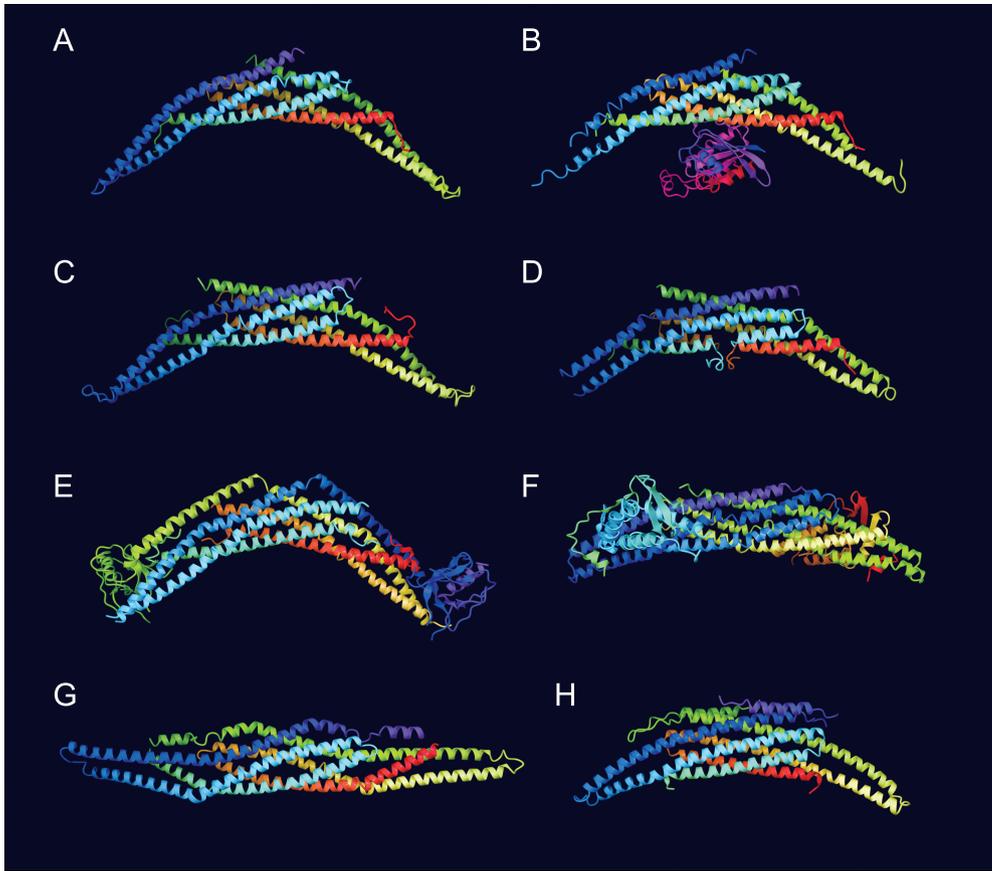


图 3

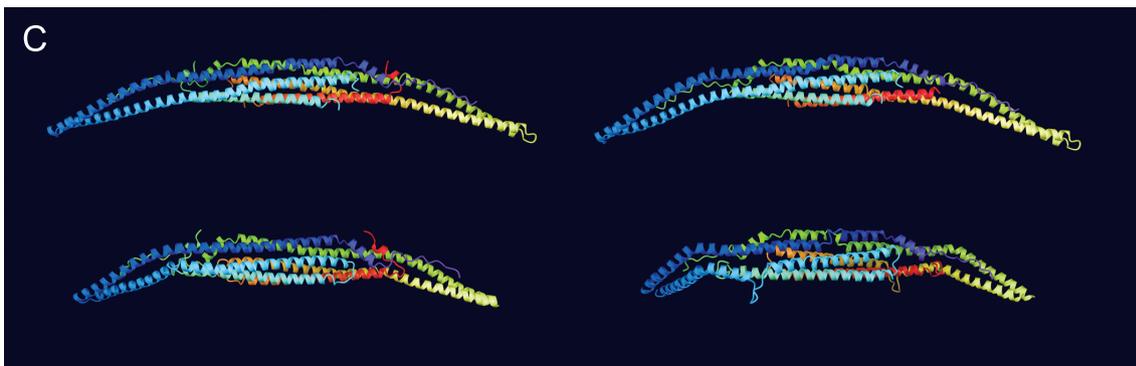
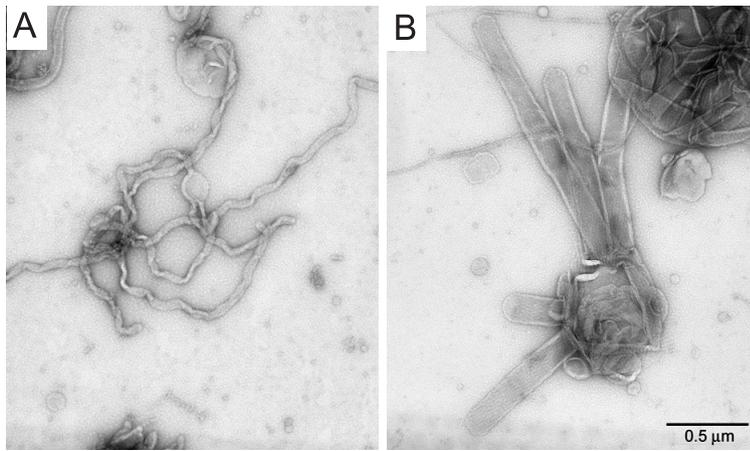


图 4

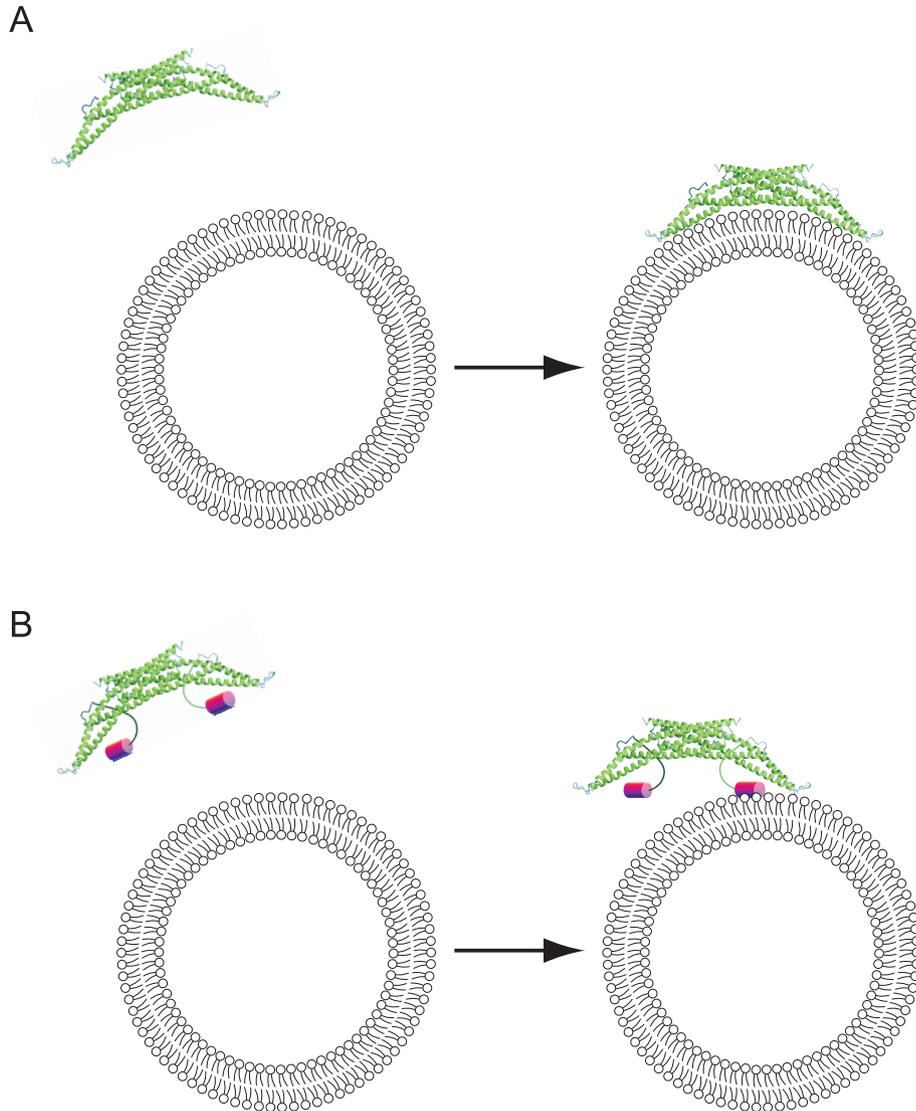


図 5

図 3 BAR ドメインの立体構造

(A) ヒト arfaptin (PDB 1I49), (B) ヒト arfaptin と活性型 Rac1 複合体 (PDB 1I4T), (C) ショウジョウバエ amphiphysin BAR ドメイン (PDB 1URU), (D) マウス endophilin A1 BAR ドメイン (PDB 1ZWW), (E) ヒト APPL1 BAR-PH ドメイン (PDB 2ELB), (F) ヒト SNX9 PX-BAR ドメイン, (G) ヒト IRSp53 MIM/I-BAR ドメイン (PDB 1Y2O), (H) 出芽酵母 Lsp1 BAR ドメイン (PDB 3PLT). それぞれ CueMol2 ソフトウェアを用いて立体構造を表示した.

図 4 F-BAR ドメインによる膜チューブ化と立体構造

(A) マウス endophilin3 BAR ドメイン (左) およびヒト FBP17 F-BAR ドメイン (右) をウシ脳由来酸性リン脂質画分 (Folch fraction I) にて作製したリボソームと混和し, ネガティブ染色後, 透過型電子顕微鏡にて観察した. BAR ドメインは細く柔軟な膜チューブを形成するのに対し, F-BAR ドメインは太く真っ直ぐな膜チューブを誘導することがわかる.

(B) これまでに解明された F-BAR ドメインの立体構造の例. (左上) ヒト FBP17 F-BAR ドメイン (PDB 2EFL), (右上) ヒト CIP4 F-BAR ドメイン (PDB 2EFK), (左下) ヒト Fcho2 F-BAR ドメイン (PDB 2V0O), (右下) ヒト Pacsin 1 F-BAR ドメイン (PDB 3HAH). それぞれ CueMol2 ソフトウェアを用いて立体構造を表示した.

図 5 膜曲率認識を説明する二つの異なるモデル

(A) BAR ドメインが被覆として膜曲率を認識するモデル. BAR ドメインが持つバナナ形の分子構造は, その凹面に正電荷に富むアミノ酸を多数持っている. これらとリン脂質との静電的相互作用を介して, 生体膜に表面的な相互作用を行う. この時, バナナ形構造の凹面側の曲率が生体膜の曲率と合致した場合にのみ効率的な相互作用が可能となり, 結果として曲率センサーとして機能する.

(B) 両親媒性 α ヘリックスによって膜曲率を認識するモデル. 一部の BAR ドメインはアミノ末端に両親媒性 α ヘリックスを取る領域を有している. このヘリックスの疎水性面が高度に湾曲した (大きな曲率を持つ) 生体膜の脂質分子の隙間に入り込み, 脂質分子の脂肪酸部分との疎水的な相互作用を行うことで, 曲率センサーとして機能する.

に参与している。さらに特徴的なのは、反対側のカラム表面には疎水性のアミノ酸が並んだ、いわゆる「両親媒性」を有していることであった(図2A)。興味深いことに、ENTHドメインは試験管内において球状の人工膜小胞(リポソーム)を細長いチューブ状に変形すること、またこの「膜変形活性」は、アミノ末端の両親媒性ヘリックスに存在する疎水性残基(Leu)をGlu残基へ置換することで失われてしまうことが観察された¹¹⁾。さらに、脂質単層膜(lipid monolayer)を用いた再構成実験から、epsin 1はクラスリンと協働してクラスリン被覆ピットの膜陥入構造を形成することが観察された¹¹⁾。これらの結果から、epsin 1がENTHドメインとPtdIns(4,5)P₂との相互作用を介して、エンドサイトーシスにおける最初のステップである「細胞膜の陥入」を引き起こすモデルが提唱されている(図2B)。

3. BARドメイン

3.1 生体膜変形モジュールとしてのBARドメイン

ニワトリ前脳のシナプス膜画分に対するモノクローナル抗体を用いた発現スクリーニングによって、分子量約75 kDaのタンパク質がクローニングされた。このタンパク質の一次構造は高度に親水性であるにも関わらず、シナプス小胞マーカーであるsynaptophysinと共局在するなど、シナプス小胞膜への強固な結合能を持つことから「amphiphysin」と名付けられた¹²⁾。Amphiphysin 1のアミノ末端側約250残基は出芽酵母Rvs161/167、およびMyc結合タンパク質として同定されたBIN1(amphiphysin 2)と相性を示すことから、「Bin1/Amphiphysin/Rvs167(BAR)ドメイン」と呼ばれるようになった¹³⁾。この領域は、アミノ酸配列からcoiled-coil構造を取ると予想され、amphiphysin 1および2のホモおよびヘテロ二量体の形成を媒介することが知られていた^{14,15)}。また、amphiphysin 1, 2はカルボキシル末端のSH3ドメインを介してdynaminやsynaptojaninなどのエンドサイトーシス関連タンパク質に結合すること^{16,17)}、脳シナプスに豊富に存在すること^{12,18)}などから、エンドサイトーシスに参与すると予想された。実際に、酵母Rvs161/167もアクチンパッチに局在し、哺乳類と同様にエンドサイトーシスやアクチン細胞骨格制御に必須の機能を持つ^{19,20)}。

エンドサイトーシス小胞の形成に参与する機械化学酵素(mechanochemical enzyme)であるdynamin GTPaseは、in vitroおよびin vivoで細胞膜を細長いチューブ状に引き伸ばすこと、さらにそのGTPase活性に依存してチューブ状膜を切断する活性を持つことが知られていた^{21,22)}。De Camilliらのグループは、dynaminと協調して働くamphiphysin 1の機能解析を行う中で、dynamin非存在下においてamphiphysin 1が単独で強力な膜チューブ化活性を持つことを報告した²³⁾。また、この膜のチューブ化にはアミ

ノ末端のBARドメインに相当する領域が必要かつ十分であった。さらに、同じくdynaminおよびsynaptojaninに結合するSH3ドメインタンパク質endophilin^{24,25)}においても、同様に膜のチューブ化活性が認められた²⁶⁾。EndophilinについてはそれまでBARドメインを持つとは考えられていなかったが、この発見によって初めて両者に機能的、構造的な相同性が見出された。一体、この強力な膜チューブ化活性が引き起こされる原因は何であろうか? それまでもタンパク質と膜脂質の静電的な相互作用がチューブ状の膜を作り出すことは知られていたが²⁷⁾、BARドメインによって誘導される膜の形状変化は、はるかに高効率で起こる現象である。同グループは、amphiphysin, endophilin BARドメインのアミノ末端側約20-30残基がhelical modelingによって「両親媒性」を持ちうることを見出した。実際、endophilinの10番目のPhe残基をGluに置換すると、膜チューブ化活性は失われた²⁶⁾。これらの結果は前章で述べたENTHドメインによる膜変形モデルに先行するものであり、両親媒性 α ヘリックスが脂質二重層の形状を制御する概念を初めて提出する重要な発見となった。

3.2 BARドメインの立体構造

「BARドメインによる膜チューブの形成」という新たな現象の理解は、本ドメインの立体構造が明らかになることによって大に進んだが、同時により多くの謎を生み出すことになった。ショウジョウバエamphiphysin(dAmph)のBARドメインの結晶構造は主に3本の α ヘリックスから構成される細長い形状を呈すること、各単量体が一定の角度を保持しながら二量体を形成することが明らかとなった²⁸⁾。その形状は三日月形(crescent)あるいはバナナ形(banana-shaped)と呼ばれる、特徴的な構造を示す(図3)。リン脂質との結合に参与する正電荷を持つアミノ酸はこのバナナ形構造の凹面側に集中しており、結果として、湾曲した生体膜の凸面に結合するのに適しているように思われた²⁸⁾。計算上、このBARドメインの凹面側の曲率は直径約22 nmの膜チューブ表面に一致すると予想され、実際、(アミノ末端の両親媒性ヘリックスを欠損して)この凹面構造部分だけを持つラットamphiphysin 1のBARドメインは、小さな直径を持つリポソームに選択的に結合することが観察された²⁸⁾。このモデルは、生体膜表面をコートするように結合するタンパク質が、その相互作用表面の形状に依存して生体膜の曲率を感知するという、新たな概念を提案している。しかしながら、後述するように本来BARドメインが持つアミノ末端の両親媒性 α ヘリックスの存在がこの現象の理解を困難にしているのに加え、コートタンパク質のバナナ形の形状が湾曲した生体膜表面を安定化している可能性もあり、まだ十分な結論が出ているとは言えない状況である。

3.3 BARドメインファミリー

このような問題点の一方で、BARドメインの立体構造の解明によって、このドメインファミリーがより多くのタンパク質に存在することが明らかになった。それまでBARドメインとは無関係と思われていたArf1結合タンパク質の一種arfaptinの立体構造もまた、バナナ形の二量体であることが報告されていたからである²⁹⁾(図3A, B)。データベース探索によって、BARドメインに低い相同性を持つタンパク質として、arfaptin以外にもRhoGEFドメインを持つP-Rex1やTuba、RhoGAPやArfGAPドメインを持つOligophrenin、Centaurin β やASAP1、さらにはPXドメインを持つ一群のsorting nexinファミリータンパク質にもBARドメインが存在することが判明した^{28,30)}。これらのタンパク質は一次構造上の相同性は低いものの、立体構造が極めて類似しており、*in vitro* および *in vivo* において生体膜をチューブ状に変形する、あるいは生体膜の曲率に依存した結合能を示すことが確認されている^{28,30,31)}。この事実は、生体膜の変形・曲率感知モジュールであるBARドメインが、Rhoサブファミリーの制御を介した細胞骨格制御や細胞内小胞輸送と機能的な関連性を持つことを強く示唆している。一方、BARドメインがPXドメインやPHドメインなどのイノシトールリン脂質結合ドメインと隣り合って配置されている例が数多く見られることから(図3E, F)、特定のオルガネラ膜への局在化と形状制御がイノシトールリン脂質代謝酵素によってコントロールされると考えられる。

その後も新たなBARドメインファミリータンパク質の「再発見」が続いている。出芽酵母の細胞膜において、深さ約50 nm、長さ約200–300 nmに渡る「溝」状の陥入構造が見出され、eisosomeと名づけられた³²⁾。その機能の多くはまだ不明であるものの、おそらくはエンドサイトーシスに参与する細胞膜上のマイクロドメインではないかと考えられている³³⁾。ごく最近、eisosomeの主要因子であるPil1およびLsp1の立体構造が報告され、これらは新たなBARドメインファミリータンパク質であることが明らかになった³⁴⁾(図3H)。さらにアミノ酸配列の高感度相同性探索から、同じくeisosome形成に参与するSlm1/2およびRgc1/2が次節で述べるF-BARドメインを持つことが見出されており³⁵⁾、このドメインファミリーの機能がさらなる広がりを見せる展開となっている。

4. F-BARドメイン

4.1 F-BARドメインの発見

BARドメインがこれまで知られている以上に広範なタンパク質に保存されているという事実から、筆者らはさらなる相同性探索を行い、ある一群のタンパク質に保存された領域がBARドメインと近縁であることを見出した³⁶⁾。

この一群のタンパク質は、アミノ末端側にCdc42結合タンパク質であるCIP4や、チロシンキナーゼFerおよびFesなどに保存された「Fes/CIP4 homology (FCH) ドメイン」を共通して持っていた。しかしながら、約90残基から成るFCHドメインに対して、BARドメインとの相同性を示す領域はカルボキシル末端側の約200残基も含まれていた。さらに、Jnetアルゴリズムによる二次構造予測の結果から、両者を含んだ約300残基から成る領域がBARドメインと同様に3本の長い α ヘリックスから構成されることが示唆された。そこで、“FCHドメインを含むBARドメイン様のモジュール”という意味を込めて「FCH and BAR (F-BAR) ドメイン」と名付けることにした³⁶⁾。F-BARドメイン内におけるFCHドメイン相当領域は、各タンパク質間でアミノ酸配列上の相同性がやや高いものの、二次構造においては1番目のヘリックスから2番目のヘリックスの途中までしかカバーしておらず、機能的・構造的な意義はほとんどないものと考えられる。

F-BARドメインがBARドメインに機能的に類似したモジュールである可能性は、Kamiokaらの発見から示唆されていた。それによれば、F-BARドメインを持つ代表的なタンパク質であるFBP17をCOS7細胞に過剰発現すると、BARドメインタンパク質において報告されていたもの³⁷⁾とよく似た、細胞膜がチューブに陥入した構造が多数観察された³⁸⁾。FBP17もまたamphiphysinやendophilinと同じくカルボキシル末端にSH3ドメインを持ち、dynaminに結合および共局在する。これを裏付けるように、F-BARドメインをもつFBP17、CIP4、syndapin 1/pacsin 1のリコンビナントタンパク質は、*in vitro* で球状のリボソームをチューブ状に変形することが明らかとなった³⁶⁾(図4B)。F-BARドメインによって形成される膜チューブはBARドメインのそれに比べて直径が大きく(～200 nm; BARドメインは50 nm以下)、見かけ上の剛性も高い、まっすぐな形状を取る傾向が認められた^{36,39)}(図4A, B)。COS7細胞内でBARおよびF-BARドメインを同時に過剰発現すると、両者は同一のチューブ状陥入膜に局在するが、それぞれのドメインは決して混ざり合わずに別々のコンパートメントを形成することが観察される^{39,40)}。これらの事実から、F-BARドメインはBARドメインとは異なる膜変形活性を持ち、エンドサイトーシスにおいて両者が特異的かつ協調的な役割を担う可能性が示唆されている。実際に、transferrin受容体のエンドサイトーシスにおいて、FBP17とCIP4などのF-BARドメインタンパク質はBARドメインタンパク質とは異なるタイミングでクラスリン被覆ピット/小胞にリクルートされることが観察されており⁴¹⁾、この考えを指示している。

4.2 F-BAR ドメインの立体構造と膜チューブ形成の分子機構

F-BAR ドメインの発見から間もなく、FBP17 および CIP4⁴²⁾ および FCHo2 の F-BAR ドメイン⁴³⁾ の立体構造が相次いで報告された。予想されたとおり、F-BAR ドメイン または BAR ドメインと同様に、細長い単量体が特定の角度を持って会合した「バナナ形」の二量体構造を形成していた (図 4C)。一次構造の長さの違いに伴って (BAR は約 250 残基、F-BAR は約 300 残基)、F-BAR ドメインは BAR ドメインに比べて各単量体が細長い形状を有している。また、F-BAR ドメインの方が二量体の相対的な角度が開いており、バナナ形の凹面の曲率が低くなっている。理論上、F-BAR ドメインの凹面は直径~60 nm の膜曲面に合致するものであり、「F-BAR ドメインによって *in vitro* で形成される膜チューブの直径が BAR ドメインのものよりも大きい」という観察に見事に合致している³⁶⁾。さらに特徴的なことは、F-BAR ドメイン二量体どうしが、細長い分子構造の先端部分および側面部分を介して互いに相互作用していることである。これは電子顕微鏡によるネガティブ染色像においても、繊維状構造や膜表面上の被覆構造として観察することが出来る^{36, 39, 42)}。また、FBP17 において Phe276 を Asp へ置換することで「バナナ側面」を介した相互作用が消失すると、同時に膜チューブ化活性も失うことが示されている³⁹⁾。ただし、この F-BAR ドメインの側面部分は膜上の被覆構造の形成だけではなく、細胞膜の陥入現象そのものに関与する可能性が示唆されている。それによれば、膜脂質の融点 (Lo 状態から Ld 状態へ遷移する温度) を下回る低温条件において、F-BAR ドメインはバナナ側面の疎水性残基を介して膜上に並ぶように結合している。これはいわばエンドサイトーシスの初期状態に相当すると考えられ、この膜結合が徐々に凹面側の残基に引き継がれるに従って F-BAR ドメインどうしの側面を介した相互作用が回復し、結果的に平面膜をチューブ状に引き伸ばすと考えられている³⁹⁾。実際、SH3 ドメインを持たない F-BAR タンパク質である FCHo2 はクラスリン依存性エンドサイトーシスの初期に作用する eps15 や intersectin, AP-2 と複合体を形成し、この過程における最初の細胞膜陥入を誘導する、というモデルが提唱されている⁴⁴⁾。

5. 細胞外からの膜変形によるエンドサイトーシス

これまで述べて来た細胞膜の変形メカニズムは、いずれも細胞質側に存在するタンパク質が細胞膜の内層と相互作用し、タンパク質との接触面の方向に対して凸となる曲率 (positive curvature) を誘導するものであった。このような、いわばタンパク質が細胞膜を「引っ張り込む」活性とは正反対に、膜を「押しやる」活性によってエンドサイトーシス小胞を形成する過程が報告されている。赤痢菌や腸管出

血性大腸菌 (EHEC, enterohaemorrhagic *E. coli*) が産生する志賀毒素 (ペロ毒素) は、細胞膜外層に局在する糖脂質の一種 Gb3 に結合して細胞内へ侵入する。毒素を構成する B サブユニットを培養細胞の外部から添加すると、チューブ状の細胞膜陥入構造が多数誘導された⁴⁵⁾。同様の現象は巨大リポソーム (giant unilamellar vesicle : GUV) を用いても観察されたことから、この膜変形は微小管モーターなどのエネルギーを必要としない、毒素タンパク質との相互作用のみによるものと考えられた。この時、毒素タンパク質がクラスター化して膜上に集積すること、また膜脂質として不飽和脂肪酸を持つ分子種が必要であることなどから、①5量体を形成する毒素 B サブユニットが持つ本来の分子形状 (突出した膜結合表面を持つと考えられる) と②コーン形を有する脂質分子の集積現象が協同して、タンパク質接触面を凹面とするような「押しやる」作用を可能にするものと考えられている。この現象は、同じく5量体の糖脂質 (GM1) 結合部位を持つコレラ毒素 B サブユニット (CTxB) や、サルノボリオーマウイルス SV40 のキャプシドタンパク質においても観察され⁴⁶⁾、多様な病原体の感染に共通するメカニズムの一端である可能性が示唆されている。

6. 生体膜の曲率認識機構

6.1 両親媒性 α ヘリックスによる生体膜の曲率認識 ~ALPS モチーフ~

生体膜を構成する脂質二重層が持つ立体的な構造、すなわち二次元平面ではなく三次元曲面としての形態は、随時移り変わる細胞内における状態量の一つとして捉えることができる。本稿で述べて来た、エンドサイトーシスに関与する多くのタンパク質が持つ機能モジュールは生体膜平面を湾曲させ三次元曲面へと変換するが、この過程が順序正しく進行するためには「生体膜の立体的な状態に依存した制御機構」が必要だろう。

このような「生体膜の曲率センサー」の存在が Antonny らのグループにより初めて報告された⁴⁷⁾。彼らは、ArfGAP1 と呼ばれる低分子量 G タンパク質 Arf1 の不活化因子がジアシルグリセロール (DG) により活性化されること、さらに、飽和脂肪酸よりも不飽和脂肪酸を持つ DG の方が高い活性化能を持つことを見出して⁴⁸⁾。この結果を、ArfGAP1 が脂質二重層中に存在する DG 分子の脂肪酸鎖部分との疎水的な相互作用を行うためと考えた同グループは、これを直接的に検証した。即ち、リポソームの直径を変えることによってさまざまな生体膜の曲率を再現し、ArfGAP1 の活性に与える影響を調べたのである。その結果、ArfGAP1 は直径の小さなリポソーム、即ち曲率の大きな生体膜に選択的に結合すること、この曲率依存的な生体膜結合によって有意に活性化されることが明らかと

なった⁴⁷⁾。さらにこの曲率依存的な活性化を担う ArfGAP1 の領域が狭められ、分子中央の約 40 アミノ酸から成るフレキシブルなリンカー様の配列であることが突き止められた⁴⁹⁾。ArfGAP1 Lipid Packing Sensor (ALPS) モチーフと名付けられたこの領域は、いくつかの保存された疎水性アミノ酸を保持しており、これらの Ala 置換変異体ではいずれも曲率依存的な膜結合能が失われた。ここで Antony らは非常に鋭い洞察を行っている。この ALPS モチーフの配列を眺めると、膜結合に関与するのに重要と思われる疎水性アミノ酸が規則的な間隔を置いて出現するのである。重要なことに、この配列が α ヘリックス構造を取るようなモデリングを行うと、ヘリックスの片側にこれらの疎水性アミノ酸がきれいに配置する「両親媒性」を示す。実際、円偏光二色性スペクトル測定によって、特定の構造を取らなかった ALPS モチーフが、曲率の大きな(直径の小さい)リポソームとの結合に伴って高度に α ヘリックスに富む構造へと変換されることが観察された⁴⁹⁾。これらの結果から、ALPS モチーフは細胞質中では特定の構造を取らないものの、高度に湾曲した生体膜と出会うことによって両親媒性 α ヘリックスへと構造変化を遂げ、その疎水面が脂質分子の間隙に入り込むようにして脂肪酸鎖と疎水的な相互作用を行う、と予想される。同グループによって開発されたアルゴリズム「Heliquest」によって、任意のアミノ酸配列から ALPS モチーフの特徴となるセリン、スレオニン残基に富む両親媒性 α ヘリックスの候補領域を抽出することが可能になっている⁵⁰⁾。このアルゴリズムを用いた探索によって、ALPS モチーフを介した生体膜の曲率認識機構は Arf1 の活性制御にとどまらず、Golgin タンパク質による異なる曲率を持つオルガネラ膜の係留、核膜の再構成やステロール輸送など、多様な現象への関与が示唆されている^{51,52)}。

6.2 BAR ドメインのバナナ形構造は本当に生体膜の曲率センサーなのか？

前章 3.2 で述べたように、生体膜変形モジュールである BAR ドメインの立体構造から、そのバナナ形構造の凹面を介した生体膜の曲率センサーとしての機能が提唱されている²⁶⁾。このバナナ形の構造は、上述した ALPS モチーフとは根本的に異なる分子機構で生体膜の曲率を認識すると言える。すなわち、ALPS モチーフが高度に湾曲した生体膜において脂質分子の間隙から露出する疎水性部分を認識しながら点状に相互作用するのに対して、バナナ形構造は脂質分子の極性部分の曲面的な配置に沿って面状に結合する。前者はいわば脂質二重層に突き刺さる楔 (wedge) であり、後者は膜表面を覆うコート (coat) に例えることができるだろう (図 5)。

Stamou らのグループは、従来のリポソーム共沈法に代

わる膜結合評価法を考案し、BAR ドメインの曲率認識機構についてこれまでの報告を覆す結果を導いた。彼らは、球形を保ったままリポソームをガラス表面上に固定する方法を確立し、蛍光標識したタンパク質を用いて一つ一つのリポソームに結合したタンパク質を個別に定量した (Single Liposomes of different diameters and therefore Curvature (SLiC) 法と命名)⁵³⁾。この方法によっても、amphiphysin の BAR ドメインが確かに高い曲率を持つリポソームに選択的に結合することが確認されたが、この結合にはアミノ末端の両親媒性 α ヘリックスだけで十分であった⁵⁴⁾。さらに、バナナ形の凹面に保存された正電荷残基の変異体 (3KE) が野生型と同じ曲率依存性を示す一方で、アミノ末端領域の両親媒性を失う F10E 変異体では逆に曲率認識が失われた。これらの結果から、BAR ドメインの立体構造から想起されたバナナ構造凹面との静電的相互作用は曲率認識に必要ではなく、アミノ末端の両親媒性ヘリックスこそが真に重要である、という結論が導かれた⁵⁴⁾。これは上述の ALPS モチーフと極めて類似した機構であり、膜の湾曲に伴う脂質分子間の充填に隙間が開くこと (packing defect) によって露出する、脂肪酸鎖との疎水的な相互作用が生体膜の曲率認識の共通項であることを示唆している。

7. エンドサイトーシス小胞の完成 ～膜切断の分子機構

様々な生体膜変形タンパク質および曲率センサータンパク質によって形作られた細胞膜の陥入構造が、球形のエンドサイトーシス小胞として完成するためには、「生体膜の切断」という活性が不可欠である。これは通常、クラスリン被覆ピットが球状に発達する過程で形成される狭窄構造 (頸部) や、チューブ状に伸びた陥入膜の不特定の箇所に対して課せられる物理的なストレスに基づくものと考えられる。これを担うタンパク質として dynamin が最もよく知られているが、意外にも、その膜切断の基本原則はまだ十分明らかになっていない。本章では、エンドサイトーシスの最も動的な現象である「膜切断」の理解をめぐる一連の研究を概説する。

7.1 膜切断酵素としての dynamin の発見

Richard Vallee らのグループは、分子量約 100 kD の新たな微小管結合タンパク質を発見し、dynamin と命名した⁵⁵⁾。Kinesin や dynein などの微小管モータータンパク質と同様に、ATP の添加によって微小管から外れてくることから、dynamin もまたモータータンパク質の一種と考えられた。実際この時 dynamin は微小管を束化しており、位相差顕微鏡による経時観察からも、ATP の添加によって微小管が互い違いに動く「スライディング」運動が認められた。特

微的なことに、この時の様子を電子顕微鏡下でのネガティブ染色法によって観察すると、微小管束の周囲には特徴的な横紋構造を示して dynamin が「巻き付く」様子が観察される⁵⁵⁾。これは dynamin が単量体ではなく、繊維状の多量体として機能することを端的に示唆していた。Dynamin が *in vitro* で示すこれらの活性は、微小管の動的安定性に関わる一部の報告があるものの⁵⁶⁾、現時点においてその生理的な意義はまだ未解明の部分が多く残されている。

その一方で、dynamin の cDNA がクローニングされると、出芽酵母の液胞輸送に関わる Vps1 や、抗ウイルスタンパク質 Mx に相同性を示すなど、微小管動態よりもむしろ膜輸送現象に関わることが予想された⁵⁷⁾。さらに、ショウジョウバエの *shibire* 変異体が示す麻痺性の表現型は、シナプス前膜からのエンドサイトーシスの不全によってシナプス小胞が枯渇することに起因するが^{58,59)}、この原因遺伝子が dynamin ホモログであることが明らかになった^{60,61)}。特に後者においては、シナプス前膜が陥入して小胞構造を形成する最後のステップで停止したことを示す「オメガ形の膜構造」が多数観察され、dynamin が膜の切断 (fission) に関与することが示唆された。De Camilli らは GTP γ S 処理を施したラットシナプトソーム画分の電子顕微鏡観察によって、*shibire* 変異体の表現型に酷似した膜陥入構造が形成されることを発見した²²⁾。免疫電顕観察から dynamin がこの陥入膜の頸部に高度に集積していることが確認され²²⁾、また *in vitro* において dynamin タンパク質はリポソームに巻き付いて細長い膜チューブを形成することから²¹⁾、dynamin がエンドサイトーシスにおける膜切断を行う酵素であることが提唱された。

7.2 Dynamin はどうやって膜を切断するのか？

～論争の歴史～

では dynamin はどのようにして生体膜を切断するのであるのか？ 最初のアプローチは電子顕微鏡レベルでの解析によって試みられた。まず、Hinshaw らは低温電子顕微鏡を用いて、GTP および GDP 存在下における膜チューブに巻きついた dynamin スパイラルの三次元構造を詳細に調べた^{62~64)}。それによると、GTP との結合に伴って dynamin スパイラルは高度に狭窄し、直径約 16 nm の膜チューブを約 8 nm にまで狭める (注：チューブ膜との接触面から dynamin の middle ドメインまでの距離が不変として筆者が算出)。脂質二重層の厚みを 3~5 nm とした場合、この膜チューブの直径は内側の脂質層が融合する「hemi-fission」状態を誘導するのに十分小さい値である。GTP との結合に伴って、dynamin の middle ドメインが屈曲した形状へと変化することが観察され、個々の dynamin の形状変化がスパイラル全体をひねるように狭窄させる、と考えられた (Corkscrew モデル)。このような dynamin スパイラルの

「ひねり」運動は、微分干渉顕微鏡を用いたライブ観察によっても確認されている⁶⁵⁾。

しかし、これらの観察結果では「GTP に結合した」dynamin スパイラルが膜を切断する、と解釈している点に問題がある。上述したように、GTP γ S 処理されたシナプトソームにおいて、dynamin が膜に巻きついたまま膜切断が阻害されるという事実は²²⁾、dynamin による「GTP 結合」という定常状態ではなく、「GTP の加水分解」という遷移過程が必要であることを明確に示している。事実、dynamin の GTPase 活性を失う変異体 (T65A) はトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスを阻害する⁶⁶⁾。すなわち、dynamin は GTP の加水分解エネルギーを利用して、膜の切断という物理的作用を行う機械酵素であると考えられる。McMahon らのグループは少し異なる解釈を行うことで、dynamin の GTPase 活性の役割を説明している。彼らは、糖脂質である GalCer を多く含む人工膜が自然にチューブ状の形態を取ることを利用して、これを鋳型として dynamin スパイラルが巻きついた様子を電子顕微鏡で観察した。GTP、GDP 存在下でその形状を比較したところ、GTP 存在下での dynamin スパイラルのピッチ (縞模様の間隔) が約 11 nm であるのに対し、GDP 存在下では約 20 nm に広がることを見出した⁶⁷⁾。すなわち、GTP の加水分解過程において、dynamin のスパイラル型重合体はまるで「バネが伸びるような」構造変化を起こす。その結果、膜の頸部を一気に引き伸ばしながら切断し、エンドサイトーシス小胞を細胞質空間へと「弾き出す」というのである。これは魅力的なモデルではあるが、やはり問題点もはらんでいる。すなわち、dynamin スパイラルのピッチの大きな変化は、GalCer を多く含む「固い」膜上で、dynamin 重合体がこれ以上狭窄できない膜表面上を「すべった」結果を反映している可能性がある。その証拠に、より柔軟な膜組成を用いた実験では GTP 結合状態で 9.4 nm、GDP 結合状態で 10.6 nm というスパイラルピッチの値が報告されており⁶²⁾、小胞を弾き出すほどの大きな構造変化を起こすとは考えられていない。

7.3 膜切断の瞬間を捉える

ここまで述べてきた実験データとその解釈は、全て電子顕微鏡を用いた高精細観察による dynamin の分子形態に基づいており、実際に膜を切断する瞬間を捉えた研究はなされて来なかった。De Camilli のグループは微分干渉顕微鏡を用いて、ガラス基板上に形成した脂質二重層から dynamin が単独で長い膜チューブを形成し、GTP の添加によって無数の小胞へと切断される様子を初めて報告した⁶⁵⁾。一方 Schmid らは、樹脂ビーズ表面上に脂質リザーバを形成し、GTP が「恒常的に存在する」条件下で dynamin が次々と膜小胞を形成する様子を可視化することに成功し

た⁶⁸⁾。この時、De Camilli らが行ったように予め dynamin 単独で膜チューブを形成させておくと、その後 GTP を添加しても膜小胞は全く形成されなかった。さらに、この条件下で dynamin を蛍光標識してその挙動を追跡したところ、膜チューブ上に巻きついた dynamin が GTP の添加によって膜から解離する様子が観察されたのである。一方 GTP が「恒常的に存在する」条件下では、dynamin は膜切断部位に点滅するように局在と解離を繰り返していた⁶⁸⁾。このことは、GTP 型の dynamin が膜へ結合して重合すると、迅速な GTP の加水分解が起こると同時に、dynamin が迅速に膜から解離することを示している。この「重合依存的な GTPase 活性」は、dynamin の分子内に存在する GTPase Effector Domain (GED) の存在によって説明される^{69,70)}。すなわち、それまでの研究において「GTP 非存在下」で再構成していた dynamin による長い膜チューブは、「GTP が恒常的に存在する」条件下では形成されない。生理的な条件下ではむしろ、非常に「短い dynamin スパイラル」のみが形成され、同時に膜切断の機能を担っていることになる。エネルギー状態のシミュレーションから、このような「短い dynamin スパイラル」の形成が膜チューブ内腔の近接と、それに続く hemi-fission に有利であることが示された⁷¹⁾。この発見は、dynamin が GTP の加水分解によるエネルギーを利用して、膜上での重合と解離を繰り返すこと、その結果として形成される一過的な「短い」スパイラルの内側での膜結合とその解消が、確率的な膜切断へと至ることを予想している。ただし、このモデルには上述したような dynamin 自身の GTP 型から GDP 型への変換に伴う構造変化^{62,64)}や、amphiphysin や FBP17 などの dynamin 結合タンパク質の寄与は考慮されておらず、この過程の完全な理解にはさらなる検証が必要である。

7.4 膜の切断におけるアクチン細胞骨格の役割

細胞膜を密接に裏打ちする細胞骨格、特にアクチン細胞骨格が dynamin による膜切断に深く関与する可能性が、いくつかの報告から示唆されている。筆者らは dynamin-FBP17 複合体によって誘導されるチューブ状の細胞膜陥入構造の形成が、アクチン重合阻害剤である Latrunculin B (Lat B) 処理によって顕著に促進されることを見出した³⁶⁾。重要なことに、この時 Lat B を除去して再びアクチン重合を開始させると、陥入膜チューブがバラバラに切断される様子が観察され³⁶⁾、dynamin による陥入膜の切断にアクチンの重合が必要であることを裏付けている。また、dynamin ノックアウトマウスから樹立した胚線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast (MEF)) においては、シヨウジョウバエの shibire 変異体に酷似したクラスリン被覆小胞が切断されないオメガ型の陥入膜構造が蓄積するが、この構造は Lat B 処理によって消失する⁷²⁾。すなわち、dy-

namin の結合パートナーである BAR, F-BAR ドメインタンパク質である amphiphysin や FBP17 が、「dynamin 非依存的に」アクチン重合を介して細胞膜の陥入構造を形成するのである。おそらく、実際のエンドサイトーシスにおいてはまずアクチン重合と細胞膜変形マシナリー (BAR, F-BAR タンパク質) が共同して細胞膜の陥入を誘導し、そこへ dynamin が SH3 ドメインとの結合を介してリクルートされた結果、膜の切断が起こるのであろう。すなわち、アクチン重合は dynamin による膜切断が効率的に行われるために、予め dynamin が巻き付くための「鋳型」を提供していることになる。

一方で、膜切断におけるアクチン細胞骨格の重要性は dynamin 「非依存的な」エンドサイトーシスにおいても報告されている⁷³⁾。すでに述べたように、志賀毒素の B サブユニットは細胞膜外層に局在する Gb3 に結合することで、細胞膜を細胞質側へ押し込むように侵入する。この過程は dynamin のドミナントネガティブ変異体 (K44A) の過剰発現によっても抑制されないことから、dynamin に依存しない何らかの膜切断機構が存在することが示唆されていた。Johannes らのグループは、この膜切断がアクチン重合による「膜ドメイン形成」によるものと主張した⁷³⁾。彼らは、in vitro 及び in vivo においてアクチン重合は生体膜における Lo, Ld 相の分離を引き起こし、相境界において膜チューブの狭窄が起こることを示している⁷³⁾。アクチン重合がどのようにして膜脂質の相分離 (phase separation) を引き起こすのかはまだ全く不明であり、また dynamin 依存的な膜切断機構との関連性も十分には理解されていないが、上述した dynamin の反復的な重合と解離によって確率的に起こる膜切断のメカニズムとの関連性が示唆され、非常に興味深い。

8. おわりに

本稿で述べてきた生体膜の形状変化を誘導する ENTH ドメインや BAR, F-BAR ドメインは、生体膜曲率の誘導活性についてはかなり理解が進んでいるものの、その活性を制御する機構に関してはほとんど分かっていない。例えば、in vitro で見られる BAR, F-BAR ドメインによる膜チューブ化の過程では、球状のリポソームから無数の膜チューブが伸長したまま退縮することはない。すなわち、特定のタンパク質濃度、温度、脂質組成条件下においては、個々のタンパク質が生体膜とおそらく可逆的に相互作用しながらも安定的なチューブ構造を維持していると考えられる。一方で、これらのドメインを細胞内に発現した際に観察される細胞膜チューブは頻繁に伸長と退縮を繰り返す、あるいはドット状の点滅パターンを示す、非常に動的な構造体であることが見て取れる。これらの膜変形タンパク質の機能を正および負に調節する分子機構を理解するこ

とは今後の重要な課題と思われる。

このような「膜曲率を制御する」分子機構に加えて、「膜曲率によって制御される」分子機構の存在もまた興味深い。BAR, F-BAR ドメインを有するタンパク質ファミリーの一次構造から、これらの膜変形タンパク質のうち RhoGAP や ArfGAP, あるいはチロシンキナーゼ活性を持つものが数多く存在する。これらのタンパク質が細胞膜に集積し、その形状変化を誘導するとともに Rho や Arf, チロシンキナーゼの下流シグナリングを惹起するメカニズムが予想されるが、この魅力的な可能性についてはまだほとんど何も分かっていない。さらに、ノックアウトマウスを始めとした個体レベルでの解析においては、数多くの膜変形タンパク質の機能解析がまだ手つかずのままであり、今後の課題として残されている。

細胞の形態形成の最も基本的な因子の一つである「生体膜の形状」をめぐる研究領域は、今後も私たちの予想を裏切る新たな発見をもたらしてくれるものと期待される。

謝辞

本稿は筆者がこれまで携わって来た研究と、それを巡る国内外の研究成果に基づくものです。本研究領域を模索しながら推進する過程において、常に厳しくも温かいご指導とご助言を賜った竹縄忠臣先生に心より感謝申し上げます。また深見希代子先生を始め、竹縄研究室において励ましやコメントを頂いた多くのメンバーにも感謝いたします。

文 献

- Pearse, B.M. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **73**, 1255–1259.
- Helfrich, W. (1973) *Z. Naturforsch. C*, **28**, 693–703.
- Benmerah, A., Gagnon, J., Begue, B., Megarbane, B., Dautry-Varsat, A., & Cerf-Bensussan, N. (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 1831–1838.
- Salcini, A.E., Confalonieri, S., Doria, M., Santolini, E., Tassi, E., Minenkova, O., Cesareni, G., Pelicci, P.G., & Di Fiore, P.P. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 2239–2249.
- Chen, H., Fre, S., Slepnev, V.I., Capua, M.R., Takei, K., Butler, M.H., Di Fiore, P.P., & De Camilli, P. (1998) *Nature*, **394**, 793–797.
- Wendland, B., Steece, K.E., & Emr, S.D. (1999) *EMBO J.*, **18**, 4383–4393.
- Kay, B.K., Yamabhai, M., Wendland, B., & Emr, S.D. (1999) *Protein Sci.*, **8**, 435–438.
- Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S., & Takenawa, T. (2001) *Science*, **291**, 1047–1051.
- Drake, M.T., Downs, M.A., & Traub, L.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 6479–6489.
- Hyman, J., Chen, H., Di Fiore, P.P., De Camilli, P., & Brunger, A.T. (2000) *J. Cell Biol.*, **149**, 537–546.
- Ford, M.G., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J., Evans, P.R., & McMahon, H.T. (2002) *Nature*, **419**, 361–366.
- Lichte, B., Veh, R.W., Meyer, H.E., & Kilimann, M.W. (1992) *EMBO J.*, **11**, 2521–2530.
- Sakamuro, D., Elliott, K.J., Wechsler-Reya, R., & Prendergast, G.C. (1996) *Nat. Genet.*, **14**, 69–77.
- Slepnev, V.I., Ochoa, G.C., Butler, M.H., Grabs, D., & De Camilli, P. (1998) *Science*, **281**, 821–824.
- Wigge, P., Kohler, K., Vallis, Y., Doyle, C.A., Owen, D., Hunt, S.P., & McMahon, H.T. (1997) *Mol. Biol. Cell*, **8**, 2003–2015.
- David, C., McPherson, P.S., Mundigl, O., & de Camilli, P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 331–335.
- McPherson, P.S., Garcia, E.P., Slepnev, V.I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W.S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y., & De Camilli, P. (1996) *Nature*, **379**, 353–357.
- De Camilli, P., Thomas, A., Cofield, R., Folli, F., Lichte, B., Piccolo, G., Meinck, H.M., Austoni, M., Fassetta, G., Bottazzo, G., et al. (1993) *J. Exp. Med.*, **178**, 2219–2223.
- Bauer, F., Urdaci, M., Aigle, M., & Crouzet, M. (1993) *Mol. Cell Biol.*, **13**, 5070–5084.
- Munn, A.L., Stevenson, B.J., Geli, M.I., & Riezman, H. (1995) *Mol. Biol. Cell*, **6**, 1721–1742.
- Hinshaw, J.E. & Schmid, S.L. (1995) *Nature*, **374**, 190–192.
- Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L., & De Camilli, P. (1995) *Nature*, **374**, 186–190.
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V., & De Camilli, P. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 33–39.
- Micheva, K.D., Kay, B.K., & McPherson, P.S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 27239–27245.
- Micheva, K.D., Ramjaun, A.R., Kay, B.K., & McPherson, P.S. (1997) *FEBS Lett.*, **414**, 308–312.
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S.R., Rose, K., & De Camilli, P. (2001) *J. Cell Biol.*, **155**, 193–200.
- Wilson-Kubalek, E.M., Brown, R.E., Celia, H., & Milligan, R. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 8040–8045.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R., & McMahon, H.T. (2004) *Science*, **303**, 495–499.
- Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P.A., Rittinger, K., Gambin, S.J., & Smerdon, S.J. (2001) *Nature*, **411**, 215–219.
- Habermann, B. (2004) *EMBO Rep.*, **5**, 250–255.
- Carlton, J., Bujny, M., Peter, B.J., Oorschot, V.M., Rutherford, A., Mellor, H., Klumperman, J., McMahon, H.T., & Cullen, P. J. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 1791–1800.
- Stradalova, V., Stahlschmidt, W., Grossmann, G., Blazikova, M., Rachel, R., Tanner, W., & Malinsky, J. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 2887–2894.
- Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantaja, C., & Walter, P. (2006) *Nature*, **439**, 998–1003.
- Ziolkowska, N.E., Karotki, L., Rehman, M., Huiskonen, J.T., & Walther, T.C. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 854–856.
- Olivera-Couto, A., Grana, M., Harispe, L., & Aguilar, P.S. (2011) *Mol. Biol. Cell*, **22**, 2360–2372.
- Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., & De Camilli, P. (2005) *Dev. Cell*, **9**, 791–804.
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O.A., Ochoa, G.C., Farsad, K., Wenk, M.R., & De Camilli, P. (2002) *Science*, **297**, 1193–1196.
- Kamioka, Y., Fukuhara, S., Sawa, H., Nagashima, K., Masuda, M., Matsuda, M., & Mochizuki, N. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 40091–40099.
- Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E.H., De Camilli, P., & Unger, V.M. (2008) *Cell*, **132**,

- 807–817.
- 40) Itoh, T. & De Camilli, P. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 897–912.
 - 41) Taylor, M.J., Perrais, D., & Merrifield, C.J. (2011) *PLoS Biol.*, **9**, e1000604.
 - 42) 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., & Yokoyama, S. (2007) *Cell*, **129**, 761–772.
 - 43) Henne, W.M., Kent, H.M., Ford, M.G., Hegde, B.G., Daumke, O., Butler, P.J., Mittal, R., Langen, R., Evans, P.R., & McMahon, H.T. (2007) *Structure*, **15**, 839–852.
 - 44) Henne, W.M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., & McMahon, H.T. (2010) *Science*, **328**, 1281–1284.
 - 45) Romer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegel, B., Tenza, D., Aly, M.R., Fraisier, V., Florent, J.C., Perrais, D., Lamaze, C., Raposo, G., Steinem, C., Sens, P., Bassereau, P., & Johannes, L. (2007) *Nature*, **450**, 670–675.
 - 46) Ewers, H., Romer, W., Smith, A.E., Bacia, K., Dmitrieff, S., Chai, W., Mancini, R., Kartenbeck, J., Chambon, V., Berland, L., Oppenheim, A., Schwarzmann, G., Feizi, T., Schwille, P., Sens, P., Helenius, A., & Johannes, L. (2010) *Nat. Cell Biol.*, **12**, 11–18; sup pp 11–12.
 - 47) Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S., & Antonny, B. (2003) *Nature*, **426**, 563–566.
 - 48) Antonny, B., Huber, I., Paris, S., Chabre, M., & Cassel, D. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 30848–30851.
 - 49) Bigay, J., Casella, J.F., Drin, G., Mesmin, B., & Antonny, B. (2005) *EMBO J.*, **24**, 2244–2253.
 - 50) Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008) *Bioinformatics*, **24**, 2101–2102.
 - 51) Drin, G., Casella, J.F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T. U., & Antonny, B. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 138–146.
 - 52) Drin, G., Morello, V., Casella, J.F., Gounon, P., & Antonny, B. (2008) *Science*, **320**, 670–673.
 - 53) Hatzakis, N.S., Bhatia, V.K., Larsen, J., Madsen, K.L., Bolinger, P.Y., Kunding, A.H., Castillo, J., Gether, U., Hedegard, P., & Stamou, D. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 835–841.
 - 54) Bhatia, V.K., Madsen, K.L., Bolinger, P.Y., Kunding, A., Hedegard, P., Gether, U., & Stamou, D. (2009) *EMBO J.*, **28**, 3303–3314.
 - 55) Shpetner, H.S. & Vallee, R.B. (1989) *Cell*, **59**, 421–432.
 - 56) Tanabe, K. & Takei, K. (2009) *J. Cell Biol.*, **185**, 939–948.
 - 57) Obar, R.A., Collins, C.A., Hammarback, J.A., Shpetner, H.S., & Vallee, R.B. (1990) *Nature*, **347**, 256–261.
 - 58) Kessell, I., Holst, B.D., & Roth, T.F. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 4968–4972.
 - 59) Koenig, J.H. & Ikeda, K. (1989) *J. Neurosci.*, **9**, 3844–3860.
 - 60) van der Blik, A.M. & Meyerowitz, E.M. (1991) *Nature*, **351**, 411–414.
 - 61) Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C., & Vallee, R.B. (1991) *Nature*, **351**, 583–586.
 - 62) Chen, Y.J., Zhang, P., Egelman, E.H., & Hinshaw, J.E. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 574–575.
 - 63) Zhang, P. & Hinshaw, J.E. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 922–926.
 - 64) Mears, J.A., Ray, P., & Hinshaw, J.E. (2007) *Structure*, **15**, 1190–1202.
 - 65) Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A., & De Camilli, P. (2006) *Nature*, **441**, 528–531.
 - 66) Marks, B., Stowell, M.H., Vallis, Y., Mills, I.G., Gibson, A., Hopkins, C.R., & McMahon, H.T. (2001) *Nature*, **410**, 231–235.
 - 67) Stowell, M.H., Marks, B., Wigge, P., & McMahon, H.T. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 27–32.
 - 68) Pucadyil, T.J. & Schmid, S.L. (2008) *Cell*, **135**, 1263–1275.
 - 69) Chappie, J.S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S.L., & Dyda, F. (2010) *Nature*, **465**, 435–440.
 - 70) Sever, S., Muhlberg, A.B., & Schmid, S.L. (1999) *Nature*, **398**, 481–486.
 - 71) Bashkurov, P.V., Akimov, S.A., Evseev, A.I., Schmid, S.L., Zimmerberg, J., & Frolov, V.A. (2008) *Cell*, **135**, 1276–1286.
 - 72) Ferguson, S.M., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., Destaing, O., Ko, G., Takasaki, J., Cremona, O., E, O.T., & De Camilli, P. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 811–822.
 - 73) Romer, W., Pontani, L.L., Sorre, B., Rentero, C., Berland, L., Chambon, V., Lamaze, C., Bassereau, P., Sykes, C., Gaus, K., & Johannes, L. (2010) *Cell*, **140**, 540–553.
 - 74) Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., & Yokoyama, S. (2002) *J. Struct. Funct. Genomics*, **2**, 1–8.
-