



BAR ドメインと細胞膜の相互作用

1. はじめに

一般的に、細胞とは「外界を隔離する膜構造に囲まれ内部に自己再生能を備えた遺伝情報とその発現機構を持つ生命体」とされる。細胞の内外を仕切る細胞膜の形は、細胞の形、形態そのものである。その形態は細胞の機能に応じて様々であり、実際、神経細胞と繊維芽細胞の形態は大きく異なる。全体的な形態だけでなく、細胞膜上には様々な微小形態が存在し、イオンチャネルやトランスポータ、受容体などの生理機能に重要であると考えられている。しかしながら、細胞膜の微小形態の形成機構はほとんど明らかではなかった。近年の研究は、BAR ドメインスーパーファミリーに属するタンパク質が細胞膜の曲率を制御し、さらにその膜曲率が細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしている可能性を示している。

2. 細胞膜の様々な微細形態

細胞膜は脂質二重膜である。生体膜を構成する脂質は水中で中空の球体状に集合し、球体の表面に二重膜を形成する。しかし、実際の細胞の形態は球体と異なるものが多く、さらに細胞表面には様々な微細構造が存在している。これらの微細構造には突起構造と陥入構造の2種類があり^{1,2)}、前者の代表例は、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）と葉状仮足（ラメリポディア）である。後者では、小胞輸送を担うクラスリン被覆小孔、コレステロール輸送やシグナル伝達の場合あるいは膜の伸長に対する緩衝構造とも考えられるカベオラが代表的である。いずれの構造体もアクチン細胞骨格を伴っている。また、特定の細胞に見られる陥入構造として、筋肉の骨格筋横管（T管）

が挙げられる。脂質膜の形態を形成する機構は、脂質膜の組成変化の他、タンパク質を介したものが挙げられる。タンパク質を介したものには、両親媒性 α ヘリックスの挿入に代表されるタンパク質の脂質膜への部分的な挿入により、脂質二重膜に「くさび (wedge)」を入れるように脂質膜を変形させる機構と、可溶性タンパク質の形態（立体構造）を「足場 (scaffold)」として、つまり、脂質膜がタンパク質に結合することにより脂質膜の形態がタンパク質の形態に変化する（変形される）機構の二つが代表的である。

3. BAR ドメインスーパーファミリー

Bin-amphiphysin-Rvs167 (BAR) ドメインは、動物の amphiphysin と Bin, および対応する酵母タンパク質 Rvs167 と Rvs161 の N 末端に同定された保存性ドメインで、後に多数のタンパク質に存在することが明らかになった。BAR ドメインは脂質結合ドメインであり、*in vitro* で人工の脂質二重膜を変形し、細長い管状構造 (tubule/チューブ) を作るができる。2004年にMcMahonらのグループによって amphiphysin の BAR ドメインの立体構造が明らかにされた³⁾。BAR ドメインの α ヘリックス束はバナナ型の立体構造をもち、その内側の脂質膜結合面の立体構造に基づくカーブ内側の半径と、*in vitro* でみられる tubule の半径はだいたい一致していた。このため、脂質膜の形態形成においてはバナナ型の立体構造が重要であると考えられ、タンパク質の立体構造と脂質膜の形態の関連性が示唆された (図1)。すべての BAR タンパク質は二量体を構成し、二量体であわせて6本の α ヘリックスが束を形成している。

構造解析技術の発展に伴い、BAR ドメインに類似したドメインが arfaptin をはじめとした多数のタンパク質に存在することが判明した。また、これらのドメインは脂質膜への結合という共通の機能を持っており、その一群は BAR ドメインスーパーファミリーと呼ばれている。BAR ドメインスーパーファミリーは、後述するように、 α ヘリックス束の片側の面の静電的な相互作用により脂質膜に結合することが基本である。しかし、BAR ドメインスーパーファミリーの中には静電的相互作用に加えて、 α ヘリックス束の外に突き出した脂質膜へ挿入される両親媒性 α ヘリックスなどを持ち、その脂質膜への挿入が膜結合に寄与するものもある。BAR ドメインスーパーファミリーに含まれると考えられるタンパク質は、ヒトにおいては10個前後のグループから成る74種類のメンバーが知られ

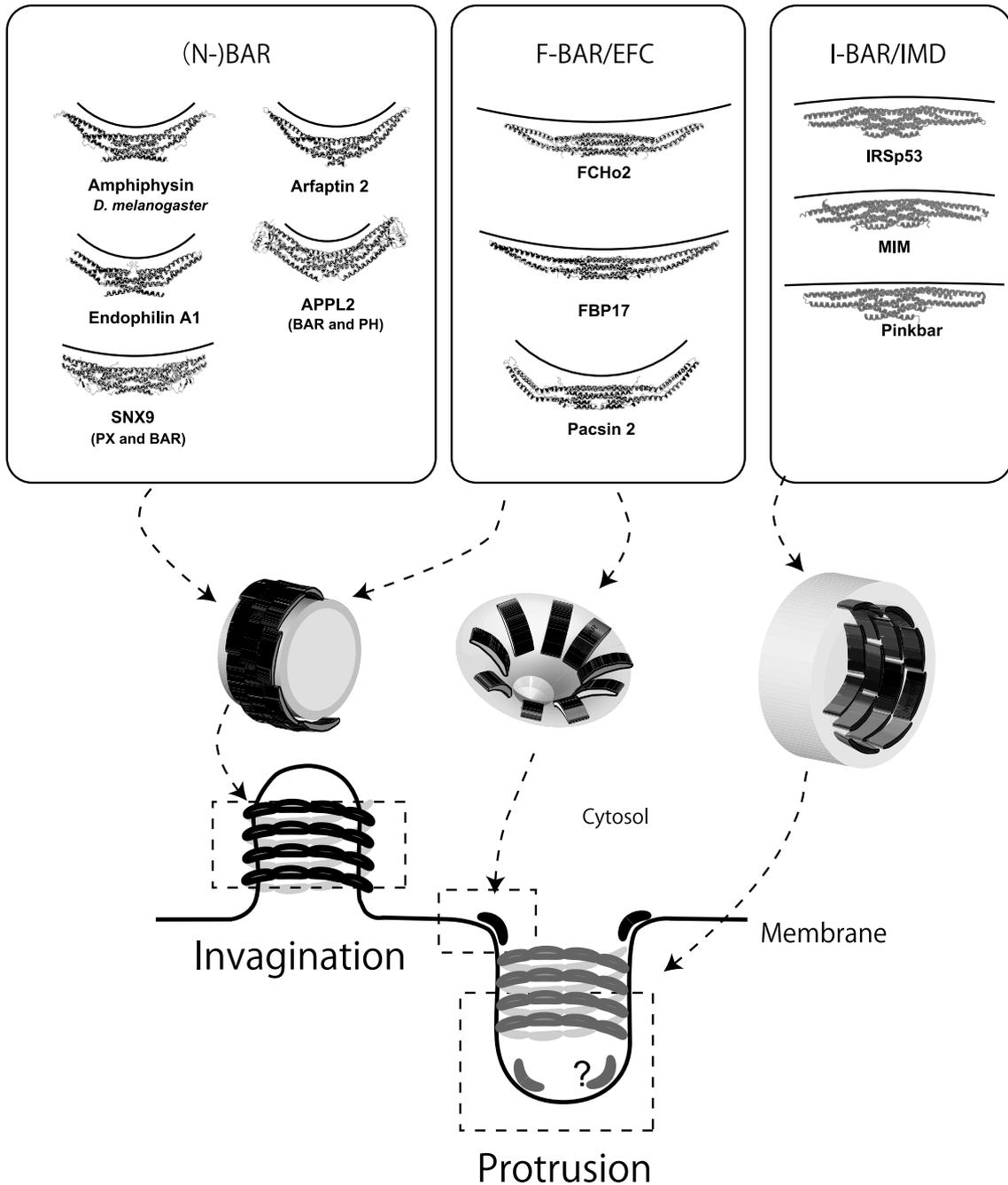


図1 BARドメイン、F-BARドメイン、I-BARドメインの立体構造
 BARドメイン、F-BARドメイン、I-BARドメインの立体構造のリボンモデルを表示し、結合する脂質膜を便宜的に線で示す。Sorting nexin 9 (SNX9) と adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 2 (APPL2) の立体構造については、それぞれPXドメインとPHドメインをBARドメインと共に表示している。これらのタンパク質ドメインは細胞質に存在し、脂質二重膜に相互作用すると考えられる。脂質二重膜と相互作用する面の曲率を考えると、凹面の脂質結合面を持つドメインはチューブ上の脂質二重膜の外側に結合し、凸上の膜結合面を持つドメインはチューブ上の膜の内側に結合すると考えられる。凹面による膜との相互作用はエンドサイトーシスなどで見られる膜の陥入構造に対応し、凸面による相互作用は膜の突起構造に対応すると考えられる。凹面による相互作用は突起形成の根元の部分で見られる可能性がある。

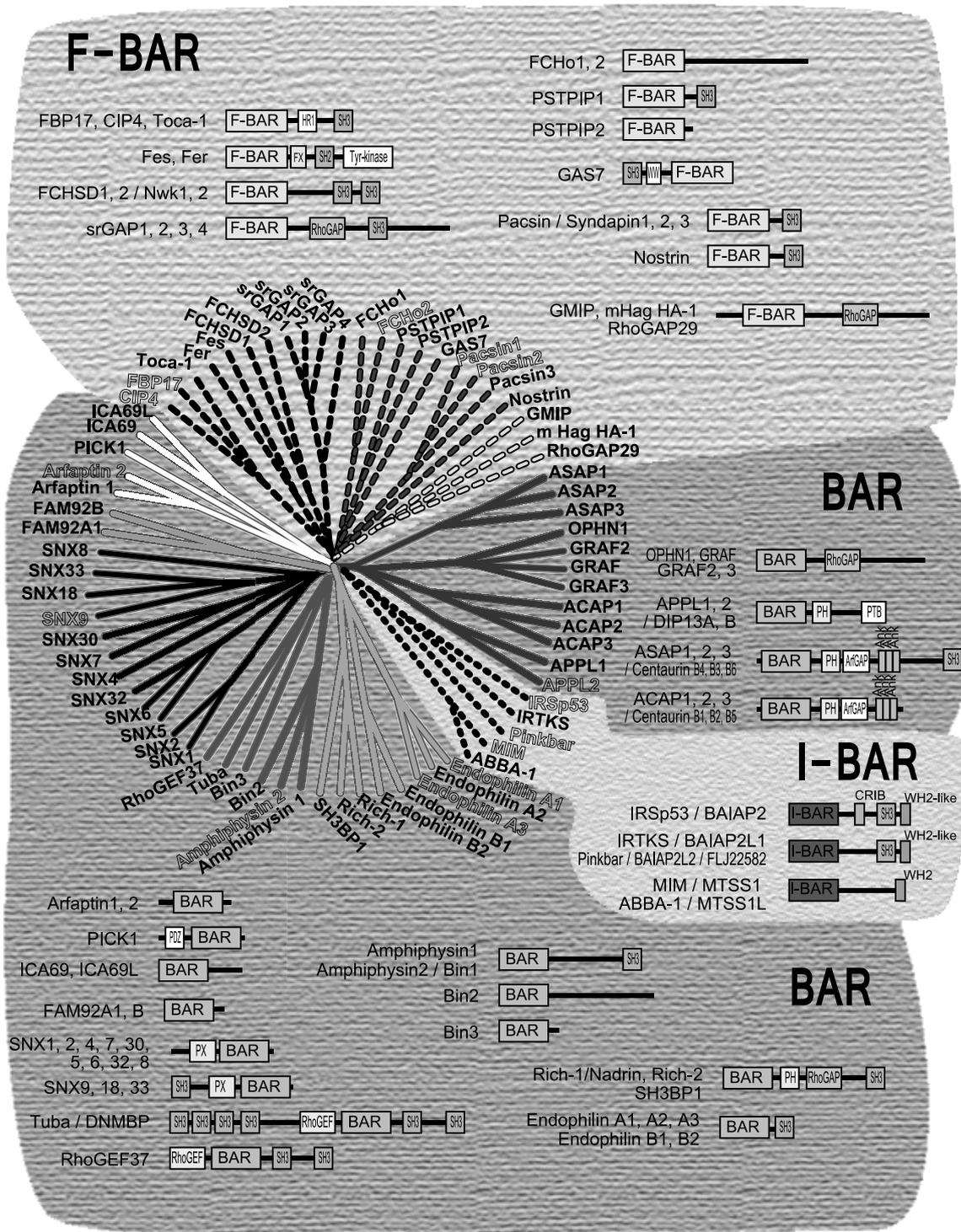


図2 BARドメインスーパーファミリーの系統関係とドメイン構成
 ヒトのBARドメイン、F-BARドメイン、I-BARドメインのアミノ酸配列に基づく系統樹を示す。白抜きのは立体構造が報告されているものである。太線は、BARドメイン、点線はF-BARドメイン、2重点線はI-BARドメインを示す。線の濃淡はそれぞれのアミノ酸配列から見たサブグループを示す。さらにBARタンパク質のドメイン構成を示す。

ており、グループ間の配列保存性は低いものの、解明された立体構造は互いに類似している (図 1, 2)。これらのメンバーは、BAR ドメイン群、F-BAR ドメイン群、I-BAR ドメイン群の三つのファミリーに便宜的に分けられる。脂質膜への挿入部位の有無はこれらの三つのファミリーへの分類には関係ない。BAR ドメイン群に関しては、互いに配列相同性が低いものも含まれる。

興味深いことに、ドメインの立体構造を比較すると α ヘリックス束のバナナ型のカーブの曲率に多様性があることが確認できる (図 1)。この構造上の曲率は *in vitro* で形成する tubule の半径、さらに細胞内で規定する膜曲率に対応していると考えられている。また、これらのドメインを有するタンパク質 (BAR タンパク質) のドメイン構成も多様である (図 2)。SH3 ドメイン、G タンパク質の GTPase を活性化する GAP ドメインのほか、BAR ドメインと共に脂質に結合する PX ドメインや PH ドメインが多く見られる。また、GEF ドメイン、PDZ ドメイン、チロシンキナーゼドメインなど、特徴的なものも存在する。このような多様な曲率と多様なドメイン構成は、膜の種類 (即ち細胞膜と、小胞体、ゴルジ体、エンドソームなどの内膜) および膜上の微細形態の多様性に対応し、微細形態の制御や機能の発揮を担っていると考えられる。

3-1. BAR ドメインタンパク質 amphiphysin

前述のように amphiphysin は BAR タンパク質として最初に脂質膜の結合が立体構造との関連において解析されたタンパク質である。Amphiphysin の BAR ドメインでは、BAR ドメインの静電的相互作用、および、一部の領域の脂質膜中での両親媒性 α ヘリックス形成の二つの機構が膜の結合および変形に関与していると考えられている³⁾。両親媒性 α ヘリックスの部分は、結晶中で固定されていないため立体構造は不明である。脂質膜への挿入部位は、endophilin の BAR ドメインでも見られる⁴⁾。amphiphysin は N 末端に BAR ドメイン、C 末端に SH3 ドメインを持つアダプタータンパク質である (図 2)。筋肉以外の細胞では amphiphysin はエンドサイトーシスに関わると報告されている。哺乳動物の細胞や酵母を用いた解析により、dynamitin と Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) など、SH3 ドメインの結合相手が多数特定されている。Dynamitin は GTP 依存的に膜を切断する酵素で、N-WASP はアクチン重合を誘導するタンパク質である。つまり amphiphysin が規定した曲率の膜に N-WASP や dynamitin が呼び寄せられ、アクチン重合の誘導や dynamitin の活性化がocこり、エ

ンドサイトーシスにおける小胞の切断とその後の小胞輸送が可能になると考えられている。

3-2. F-BAR ドメインタンパク質 FBP17, CIP4, Toca-1

Fes/CIP4 homology-BAR (FCH-BAR/F-BAR) ドメイン (あるいは Extended FCH (EFC) ドメイン) は、BAR ドメインファミリーに弱い相同性を持つドメインとして formin-binding protein 17 (FBP17)、Cdc42-interacting protein 4 (CIP4)、Transducer of Cdc42 activation-1 (Toca-1)、FCH domain only protein 2 (FCHo2)、Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons / Synaptic, dynamin-associated protein (PACSIN/Syndapin) などに見いだされたものである (図 1)。このドメインは、BAR ドメインと同様に、膜結合能および膜変形 (tubule 形成) 活性を有している。amphiphysin 等の BAR ドメインが形成する tubule の半径に比べ、FBP17、CIP4、Toca-1 の F-BAR ドメインが形成する tubule の半径は遥かに大きい^{5,6)}。FBP17 と CIP4 の F-BAR ドメインの立体構造が決定され⁷⁾ (図 1)、BAR ドメインと同様に α ヘリックス束からなるバナナ型の二量体を形成することが明らかになった。変異体解析の結果と合わせるとカーブの内側、即ち凹面で膜に結合すると考えられる。amphiphysin 等の BAR ドメインと比べて F-BAR ドメインは脂質膜結合面のカーブの半径が大きく、Tubule の大きさの違いを反映すると考えられる。また脂質膜へ挿入されると考えられる両親媒性 α ヘリックスなどは存在しない。

結晶中の F-BAR ドメインは先端同士が結合して連なった鎖を形成しており、結合を担うドメイン先端のアミノ酸残基に変異を導入すると膜変形活性が消失することから、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、膜を変形するモデルが示唆された⁷⁾。このモデルは最近発表された膜に結合した状態の F-BAR ドメインの立体構造からも支持される。

FBP17、Toca-1、CIP4 は amphiphysin と同様、C 末端に SH3 ドメインを持っており、やはり dynamitin と N-WASP に結合し、エンドサイトーシスに関わっている^{5,6)}。結合する膜の曲率の違いから、大まかには、これらの 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、amphiphysin などの BAR ドメインタンパク質は、エンドサイトーシスの後期に働く⁸⁾。FBP17 または Toca-1 は、脂質膜の存在下で、N-WASP を活性化しアクチン重合を誘導するが、この活性は FBP17 や Toca-1 の脂質膜結合、すなわち、脂質膜の大きさに依存していて、また、アクチン重合の向きを制御する⁹⁻¹¹⁾。

3-3. F-BAR ドメインタンパク質 pacsin/syndapin

PACSIN2 (または Sydapin II) の F-BAR ドメインの立体構造を決定したところ、長い α ヘリックスが途中で折れており、上述の FBP17 や別の F-BAR ドメインタンパク質である FCHO2 に比べ脂質結合面であるところの凹面のカーブの半径が小さいことが明らかになった¹²⁾(図1)。細胞内では FBP17 や CIP4, FCHO2 よりも強い曲率の陥入膜に結合すると考えられる。また、pacsin は細胞突起の根元に存在する凹の曲率の膜を誘導することで、突起構造の誘導にも関与していると考えられる¹²⁾(図1)。さらに PACSIN2 は、クラスリンエンドサイトーシスの後期にも関与する⁸⁾。クラスリン被覆小孔だけでなく、PACSIN2 は、カベオラに局在し、カベオラの形態を制御していると考えられる^{13,14)}。PACSIN2 はカベオラの主要構成タンパク質である caveolin-1 と相互作用する¹³⁾。カベオラについては未解明な点が多いが、pacsin はカベオラのエンドサイトーシスを制御していると考え、研究を進めている。

3-4. I-BAR ドメインタンパク質 IRSp53, MIM

さらに我々は、insulin receptor substrate of 53 kDa (IRSp53) や Missing in metastasis (MIM) などに存在する inverse BAR (I-BAR) ドメイン (または IRSp53-MIM-homology domain (IMD)) を解析した。I-BAR ドメインも膜結合ドメインであり、結晶構造解析により BAR ドメインや F-BAR ドメインと類似のフォールドであることが明らかになった。しかし、 α ヘリックス束に折れ曲がりが入り、BAR ドメインや F-BAR に比べて塩基性アミノ酸に富む脂質面のカーブが逆向きのゆるい凸型になっている^{15,16)}。したがって、全体的な立体構造はバナナ型ではない(図1)。膜結合面が凹面である上述の BAR ドメイン、F-BAR ドメインが膜の陥入構造で主に機能するのに対し、膜結合面が凸型である I-BAR ドメインの膜結合は、細胞の突起構造と関連する(図1)。planar intestinal- and kidney-specific BAR domain protein / Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 2 (Pinkbar / BAIAP2L2) の I-BAR ドメインの立体構造は、他の I-BAR ドメインより更に直線状であることが報告され(図1)、膜を屈曲させずに平面状の膜に結合して機能することが明らかになった¹⁷⁾。

IRSp53 と MIM は I-BAR ドメインの他、それぞれ SH3 ドメインと WASP-homology 2 (WH2) ドメインを C 末端側に持つ(図2)。WH2 ドメインは単量体アクチンに結合するドメインで、IRSp53 などの SH3 ドメインを持つもの

にも WH2 様のモチーフが存在する¹⁸⁾。IRSp53 の SH3 ドメインは葉状仮足においてアクチン重合を担う分子である WASP-family verprolin-homologous protein-2 (WAVE2) の他、同じく葉状仮足形成にかかわる mammalian Ena (MENA) などに結合することが知られている。IRSp53 と WAVE2 の結合は効率の良い葉状仮足の形成に必要な¹⁹⁾。

4. おわりに

ここまで述べてきたように、BAR ドメイン群の発見は生体膜の形態を直接規定するメカニズムの提唱を可能にした点で極めて重要である。一般に BAR ドメインは強い曲率の陥入構造、F-BAR ドメインは緩い曲率の陥入構造、I-BAR ドメインは突起構造の形成を担うことが報告されてきた。しかし、例外的なものの存在も明らかになりつつある。また、feline sarcoma oncogene (FES) や fps/fes related tyrosine kinase (FER) の F-BAR extension (FX) ドメイン、slit-robo GAP (srGAP) の F-BAR は膜の陥入構造ではなく、突起構造を形成することが報告されているが、いずれも立体構造は明らかではない^{20,21)}。これらの報告は膜曲率の規定が様々な多様性を含んでいることを示唆しており、今後の研究が期待される。また、SH3 ドメインなどを介した他のタンパク質の導入など、膜結合後の制御に関する研究も進行しているが、これと同時に、微小構造形成の最初期における BAR タンパク質の膜への導入メカニズムの研究も必要となっている。

謝辞

この研究は、現神戸大学、竹縄忠臣先生の研究室で開始され、理化学研究所、横山茂之先生および嶋田陸先生ら多くの方々との共同研究により進められました。この場を借りてお礼申し上げます。

- 1) Takenawa, T. & Suetsugu, S. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8 (1), 37-48.
- 2) Suetsugu, S. (2010) *J. Biochem.*, 148(1), 1-12.
- 3) Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R., & McMahon, H.T. (2004) *Science*, 303 (5657), 495-499.
- 4) Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki, T., Mori, H., Kamioka, Y., & Mochizuki, N. (2006) *EMBO J.*, 25 (12), 2889-2897.
- 5) Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., & De Camilli, P. (2005) *Dev. Cell*, 9(6), 791-804.
- 6) Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T., & Takenawa, T. (2006) *J. Cell Biol.*, 172(2), 269-279.

- 7) 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 (4), 761-772.
- 8) Taylor, M.J., Perrais, D., & Merrifield, C.J. (2011) *PLoS Biol.*, 9(3), e1000604.
- 9) Takano, K., Toyooka, K., & Suetsugu, S. (2008) *EMBO J.*, 27 (21), 2817-2828.
- 10) Suetsugu, S. (2009) *FEBS Lett.*, 583 (21), 3401-3404.
- 11) Collins, A., Warrington, A., Taylor, K.A., & Svitkina, T. (2011) *Curr. Biol.*, 21 (14), 1167-1175.
- 12) Shimada, A., Takano, K., Shirouzu, M., Hanawa-Suetsugu, K., Terada, T., Toyooka, K., Umehara, T., Yamamoto, M., Yokoyama, S., & Suetsugu, S. (2010) *FEBS Lett.*, 584(6), 1111-1118.
- 13) Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S., & Suetsugu, S. (2011) *J. Cell Sci.*, 124 (Pt 12), 2032-2040.
- 14) Hansen, C.G., Howard, G., & Nichols, B.J. (2011) *J. Cell Sci.*, 124 (16), 2777-2785.
- 15) Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T., & Yokoyama, S. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281 (46), 35347-35358.
- 16) Mattila, P.K., Pykalainen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V. O., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Lappalainen, P. (2007) *J. Cell Biol.*, 176(7), 953-964.
- 17) Pykalainen, A., Boczkowska, M., Zhao, H., Saarikangas, J., Rebowski, G., Jansen, M., Hakanen, J., Koskela, E.V., Peranen, J., Vihinen, H., Jokitalo, E., Salminen, M., Ikonen, E., Dominguez, R., & Lappalainen, P. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18(8), 902-907.
- 18) Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P., & Suetsugu, S. (2008) *Trends Cell Biol.*, 18(2), 52-60.
- 19) Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., & Takenawa, T. (2006) *J. Cell Biol.*, 173(4), 571-585.
- 20) Itoh, T., Hasegawa, J., Tsujita, K., Kanaho, Y., & Takenawa, T. (2009) *Sci. Signal*, 2 (87), ra52.
- 21) Guerrier, S., Coutinho-Budd, J., Sassa, T., Gresset, A., Jordan, N.V., Chen, K., Jin, W.L., Frost, A., & Polleux, F. (2009) *Cell*, 138(5), 990-1004.

末次 志郎, 伊藤 弓弦
(東京大学分子細胞生物学研究所)

The BAR domain superfamily proteins bind to the cellular membrane of various curvatures

Shiro Suetsugu and Yuzuru Itoh (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan)

がん細胞による浸潤突起形成の分子機構

1. はじめに

がんは日本人の死亡原因の1位であり、約3人に1人はがんで亡くなる。がん患者の命を奪う最も大きな要因は転移であるが、その制御は未だ非常に困難である。がん細胞が遠隔転移する主な様式は血行性転移であるが、その過程において基底膜の破壊と間質への浸潤、血管内侵入が不可欠である。しかし基底膜、間質、血管壁に存在する細胞外基質は物理的障害となるため、がん細胞はこれを分解し遊走する必要がある。従ってがん細胞による細胞外基質分解の分子機構の解析は、がん浸潤・転移の分子病態の解明と、それに基づく新たな治療法の開発に極めて重要である。最近になりがん細胞は浸潤突起 (Invadopodia) と呼ばれる構造を形成して細胞外基質を破壊し、浸潤・転移することが明らかになってきた。そこで本稿では浸潤突起に関するこれまでの研究の流れと最近の知見について概説したい。

2. 浸潤突起

浸潤突起は浸潤性がん細胞を生理的な基質上で培養した際に、細胞の底部に形成される細胞膜構造であり、細胞外基質を分解する活性を持つ (図1A)。1989年にChenによりv-Srcでトランスフォームした線維芽細胞が形成する構造として最初に報告され¹⁾、その後多くのヒトがん細胞株や腫瘍初代培養においても観察されている。マクロファージ、破骨細胞、樹状細胞などの単球由来細胞や血管内皮/平滑筋細胞などにより形成されるポドソーム (Podosome) も浸潤突起と良く似た分子構成を持ち細胞外基質を分解する^{2,3)}。これらの正常細胞は組織浸潤や細胞外基質リモデリングを行うことから、ポドソームは浸潤突起の生理的なカウンターパートだと考えられる。最近では浸潤突起とポドソームを合わせてInvadosomeと呼ぶこともある。

浸潤突起の中心構造はアクチン繊維であり、これを制御する様々なアクチン細胞骨格制御タンパク質が局在する⁴⁾。浸潤突起の検出には、蛍光標識した細胞外基質 (安価なゼラチンが良く用いられる) でカバーガラスをコートしてその上で細胞を培養し、アクチン繊維をファロイジン等で染色した後に蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で観察する