

## 受賞対象論文

Takeda T, Kozai T, Yang H, Ishikuro D, Seyama K, Kumagai Y, Abe T, Yamada H, Uchihashi T, Ando T, Takei K : Dynamic clustering of dynamin-amphiphysin helices regulates membrane constriction and fission coupled with GTP hydrolysis. *Elife* (2018) 7, pii : e30246.

## 竹田 哲也

Tetsuya Takeda

## 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生化学

Department of Biochemistry, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences



## &lt;プロフィール&gt;

昭和44年生まれ

平成4年3月 筑波大学第二学群生物学類卒業

平成10年3月 筑波大学大学院博士課程生物科学研究科修了

平成10年4月 筑波大学 遺伝子実験センター 助手

平成13年4月 コロンビア大学 微生物学部 Postdoctoral Research Fellow/Scientist

平成17年4月 ケンブリッジ大学 遺伝学部 Research Associate

平成25年2月 MRC 分子生物学研究所 神経生物学部門 Career Development Fellow

平成26年1月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生化学 助教

現在に至る

## 研究の背景と経緯

エンドサイトーシスは、細胞外の物質を小胞として細胞内に取り込む経路で、神経伝達や細胞内シグナル伝達、細胞運動など、さまざまな生命現象において重要な機能を持つ。エンドサイトーシスでは、細胞膜が細胞質側に陥入、切断されて小胞が形成される。エンドサイトーシスにおけるダイナミックな膜のリモデリングには、多くの蛋白質が関与するが、特にダイナミン (dynamin) は膜切断において中心的な役割を果たす。ダイナミンは高分子量のGTPアーゼで、膜の切断部位にらせん状に重合し、GTPの加水分解に伴う構造変化を起こして膜を切断する。X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡による解析から明らかになったダイナミンの立体構造に基づき、これまでに様々な膜切断モデルが提唱されていたが、実際のメカニズムは不明であった。

## 研究成果の内容

私たちは、ダイナミンによる膜切断機構の解明には、膜切断過程をナノスケールで「直接見る」ことが不可欠であると考えた。そこで、ダイナミン-アンフィファイジン (dynamin1-amphiphysin) 複合体による膜切断

過程を *in vitro* で再現し、電子顕微鏡と高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いて直接観察、解析した。アンフィファイジンは膜の曲率形成に機能する BAR (Bin-AMPH-Rvs) ドメインをN末に、またSH3 (Src homology 3) ドメインをC末に持ち、SH3ドメインを介してダイナミンのPR (proline rich) ドメインに結合し、リング状の複合体を形成する。さらにアンフィファイジンはダイナミンに結合し、そのGTP活性や小胞形成量を増加させることが知られていた。

まず *in vitro* 再構成系に大型単層リポソームを用い、精製ダイナミンおよびアンフィファイジンと混合すると、複合体により被覆された膜チューブが形成された。次にGTP添加後の膜切断過程を経時的に調べると、GTP添加5秒後には膜チューブに複数の狭窄が形成され、1分後には多数の小胞が形成された。さらに膜チューブの狭窄、切断とGTP加水分解との相関を解析したところ、GTP $\gamma$ SやGMP-PNPなどの非加水分解性GTPアナログでは狭窄は見られなかったが、GDP $\cdot$ Pi遷移状態の模倣条件 (GDP + vanadate) では、深く狭窄した部位が複数観察された。以上より、ダイナミン複合体による膜切断には、GTPの加水分解と加水分解産物 (GDP および Pi) の遊離が必要であることが明らかになった。

次に、*in vitro* 再構成系に脂質ナノチューブを用い

てダイナミン-アンフィファイジン複合体の動態を観察した。脂質ナノチューブは直径約50nmの桿状リポソームで、これを足場としてダイナミンがらせん状に重合するが、脂質膜が強固なためにGTP存在下でもダイナミンによる切断が起こらない。このため脂質ナノチューブはダイナミンの分子動態観察に頻用されている。ダイナミン-アンフィファイジン複合体は、脂質ナノチューブの周囲に規則的ならせん状重合体を形成したが、GTP添加直後からクラスターを形成し、その後、時間経過とともに消失した。また、ダイナミン-アンフィファイジン複合体は、GTP $\gamma$ SやGMP-PNPを添加しても変化しなかったが、GDP $\cdot$ Pi遷移状態(GDP + vanadate)ではクラスター形成が顕著であった。以上より、ダイナミン-アンフィファイジン複合体は、GTP加水分解依存的に狭窄し、GDP $\cdot$ Pi遷移状態で過渡的にクラスター化することが示された。

次に、高速AFMにより、ダイナミン-アンフィファイジン複合体による膜切断プロセスをリアルタイム観察した(図A)。膜チューブ上のダイナミン-アンフィファイジン複合体は、ほぼ等間隔のピッチ(平均約

22nm)をもつらせん状構造として観察された。興味深いことに、GTPを添加すると複合体が膜チューブに沿って動き、らせん2~3周分から成るクラスターを形成した(クラスター部分の平均ピッチ約16nm)。すなわち、GTP加水分解に伴うダイナミン複合体の動きは、膜チューブを狭窄する周方向だけでなく、長軸方向にもダイナミックに動く事が明らかになった。ダイナミン複合体のクラスター化により、膜チューブには複合体による被覆部分と非被覆部分が生じるが、後者が強く狭窄していたことから、膜の切断は非被覆部分で起こることが示唆された。

### 研究成果の意義

以上の結果に基づき、ダイナミンによる新規の膜切断モデルを提唱した(図B)。ダイナミン複合体が脂質膜の付近に存在すると、ダイナミンの自己重合能とPHドメインを介した脂質結合能により脂質膜上でらせん状に重合し、膜チューブを形成する。次に、GTPが存在するとダイナミン複合体はらせん2~3周分ず

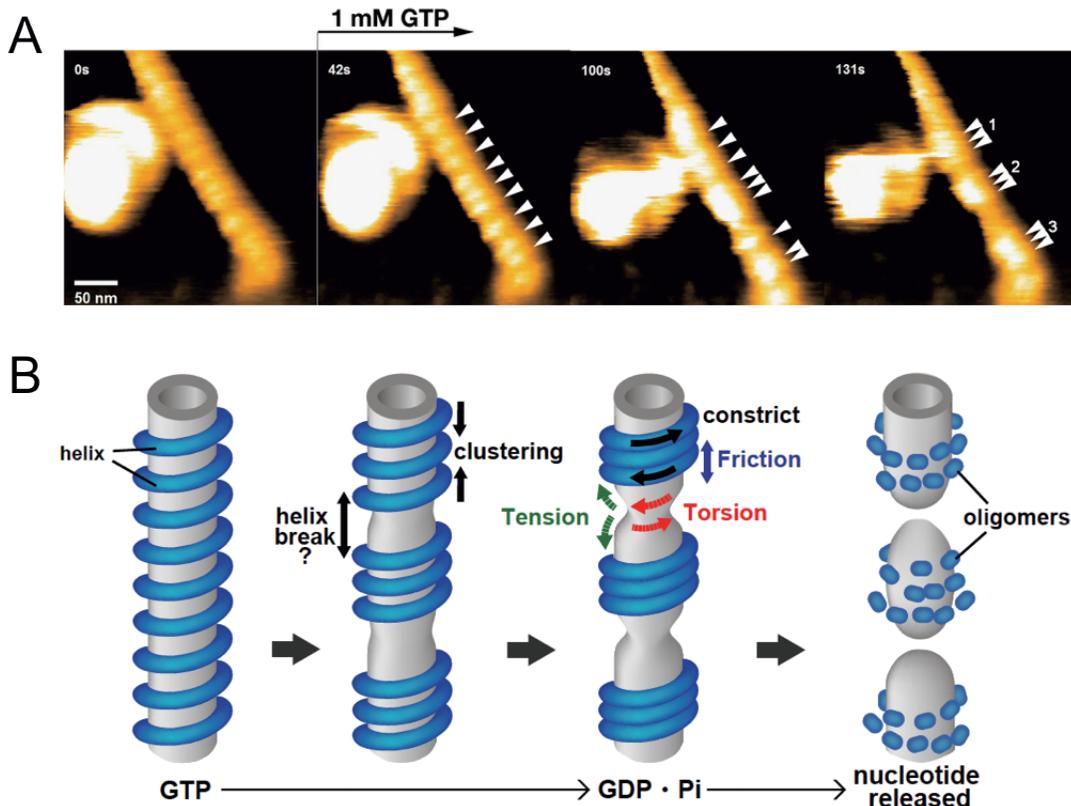


図 ダイナミン-アンフィファイジン複合体による膜切断過程の高速AFM像(A)とダイナミンによる新規膜切断メカニズム「Clusterase Model」(B)

つクラスタ化する。GTP $\gamma$ S や GMP-PNP などの非加水分解性 GTP アナログではクラスタが形成されないことから、クラスタ化は GTP 加水分解に伴う構造変化により起こると考えられる。複合体がクラスタ化するとクラスタ間にタンパク質が存在しない非被覆膜領域が生じ、その領域で膜切断が起こる。この膜切断メカニズムはまだ明らかではないが、クラスタ形成により非被覆膜領域に生じる、さまざまな物理的な力によるものであると考えている。例えば、複合体がクラスタを形成する際に膜チューブに沿って移動すると、非被覆領域には「張力 tension」が発生し、複合体が狭窄すると、非被覆領域の膜チューブには周方向に「ねじれ力 torsion」が生じる。さらに、被覆領域ではダイナミン複合体との相互作用によって膜脂質の流動性が低下し、非被覆領域の膜脂質分子の動きが障害されて「摩擦力 friction」が発生する。これらの力の統合的な作用により、膜切断に至ると考えられる。このモデルの特徴は、ダイナミン複合体のコンフォメーション変化による機械的な動きが、周方向の「狭窄」だけでなく、チューブの長軸方向にも起こり、クラスタ形成をもたらす点である。ダイナミンらせん状重合体の膜チューブに沿った移動は、脂質ナノチューブを用いた *in vitro* 再構成系の電顕観察や高速 AFM 観察でも報告されていることから、このダイナミクスはダイナミンの本質的な性質であると考えられる。ダイナミン複合体のクラスタ化が膜切断の鍵となることから、我々はこのモデルをクラスタラーゼ・

モデル (clusterase model) と名付け、ダイナミンによる膜切断機構の新規モデルとして提唱した。

## 今後の展開や展望

ダイナミンは、年齢依存性てんかん性脳症、シャルコー・マリー・トゥース病、先天性ミオパチーなど、神経や筋肉におけるさまざまな難治性疾患の原因遺伝子として知られている。本研究の成果は、エンドサイトーシスにおける膜切断メカニズムの解明だけでなく、ダイナミンが関与するさまざまな難治性疾患の発症機序を分子レベルで解明する上で、重要な足がかりになることが期待される。

## 文 献

- 1) Ando T, Uchihashi T, Kodera N : High-speed AFM and applications to biomolecular systems. *Annu Rev Biophys* (2013) 42, 393-414.
- 2) Antonny B, Burd C, De Camilli P, Chen E, Daumke O, et al. : Membrane fission by dynamin : what we know and what we need to know. *EMBO J* (2016) 35, 2270-2284.
- 3) Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P : Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* (1999) 1, 33-39.

---

平成30年12月25日受稿  
〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1  
電話 : 086-235-7125 FAX : 086-235-7126  
E-mail : ttakeda@okayama-u.ac.jp