

アンフィファイジンと N-WASP のダイナミックな相互作用は、アクチン重合を制御する

山田 浩司^{a*}, Sergi Padilla-Parra^b, 朴 宣奏^{c,d}, 伊藤 俊樹^e, Mathilde Chaineau^{b,f},
Ilaria Monaldi^g, Ottavio Cremona^h, Fabio Benfenati^g, Pietro De Camilliⁱ,
Maïté Coppey-Moisan^b, Marc Tramier^b, Thierry Galli^{b,f}, 竹居 孝二^a

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生化学, ^bジャックモノ研究所, 神戸大学大学院医学研究科 ^c膜生化学, ^e膜生物学,
^d釜慶大学 化学, ^fフランス国立衛生医学研究所 神経と上皮の形態形成における膜輸送グループ, ^gジェノバ大学 実験医
学, 国立脳神経科学研究所, イタリア工業研究所 神経科学・脳工学, ^h国立神経科学研究所, Università Vita-Salute San
Raffaele 分子腫瘍学研究所, ⁱエール大学医学部 細胞生物学・神経生物学

キーワード：アクチン細胞骨格, シナプス, エンドサイトーシス, アンフィファイジン

Dynamic interaction of amphiphysin with N-WASP regulates actin assembly

Hiroshi Yamada^{a*}, Sergi Padilla-Parra^b, Sun Joo Park^{c,d}, Toshiaki Itoh^e, Mathilde Chaineau^{b,f}, Iliaria Monaldi^g,
Ottavio Cremona^h, Fabio Benfenati^g, Pietro De Camilliⁱ, Maïté Coppey-Moisan^b, Marc Tramier^b, Thierry Galli^{b,f},
Kohji Takei^a

^aDepartment of Neuroscience, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^bInstitut Jacques Monod, Université Paris-Diderot and
Université Pierre et Marie Curie, Divisions of ^cLipid Biochemistry, ^eMembrane Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, ^dDepartment of Chemistry, Pukyong
National University, ^fMembrane Traffic in Neuronal and Epithelial Morphogenesis, INSERM, ^gDepartment of Neuroscience and Brain Technologies, The Italian Institute of
Technology, Genova and Department of Experimental Medicine, University of Genova and Istituto Nazionale di Neuroscienze, ^hFIRC Institute of Molecular Oncology (IFOM),
Università Vita - Salute San Raffaele and Istituto Nazionale di Neuroscienze (INN), ⁱDepartment of Cell Biology and Neurobiology, Howard Hughes Medical Institute, Yale
University School of Medicine

緒 言

細胞骨格を形成するアクチンのダイナミクスは、細胞の形態変化、細胞移動や細胞内膜輸送を含む細胞機能に非常に重要である¹⁾。アクチン重合反応は、様々なアクチン制御タンパクによって促進されている。主に WASP ファミリーに属するタンパクが活性化し、この活性化したタンパクが Arp 2/3 複合体を活性化

し、アクチン重合核形成を促進する²⁾。N-WASP は自身の分子内結合により Arp 2/3 の結合部位である VCA ドメインをマスクし不活化しているが、N-WASP に他のタンパクが結合すると、その分子内結合が開放される。その結果、VCA ドメインと Arp 2/3 の相互作用が可能になる。この活性化は、N-WASP の PRD ドメインに SH3 ドメインを持つ多くのタンパクが結合することによって起こる。

我々は、最近になり、SH3 ドメインを持つタンパクである Amphiphysin 1 (Amph 1) が精巣セルトリ細胞の食作用の際のアクチン重合を促進することを発見した。その促進効果には、Amph 1 の SH3 ドメインが必須である³⁾。Amph 1 は、エンドサイトーシスに働く

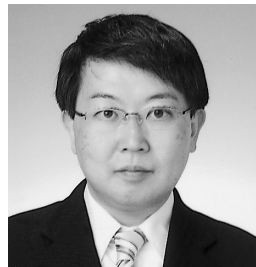
平成22年12月受理

*〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

電話：086-235-7125 FAX：086-235-7126

E-mail：hiroshima@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



山田 浩司

昭和42年4月20日生

平成3年3月 大阪大学工学部卒業

平成5年3月 大阪大学大学院工学研究科博士前期課程修了

平成9年3月 広島大学大学院理学研究科博士後期課程修了 (理学博士)

平成5年4月 サンスター株式会社 研究員

平成9年4月 日本学術振興会博士研究員 (PD) 大阪大学産業科学研究所

平成11年4月 岡山大学大学院自然科学研究科 研究生

平成11年11月 岡山大学大学院自然科学研究科 非常勤講師

平成12年5月 岡山大学医学部助手 (生化学講座)

平成13年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 助手

平成17年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 助手

平成18年9月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 講師

現在に至る

アダプタータンパクとして知られており、神経シナプス及び精巢セルトリ細胞に高発現している^{4,5)}。Amph 1 は、GTPase であるダイナミン及びホスホイノシチド脱リン酸化酵素であるシナプトジェニンと結合する C 末に存在する SH3 ドメイン⁶⁾に加えて、N 末に BAR ドメインを持っている。このドメインは曲がった構造をしている。Amph 1 は、この性質により脂質二重膜に結合すると BAR ドメインの曲がり方に応じて脂質膜を曲げる性質を持つ、また、BAR ドメインは脂質膜の曲がり方（曲率）を認識するセンサーとしても働く^{7,8)}。他にもクラスリン及び AP-2 が結合する CLAP ドメインがある⁹⁾。従って、Amph 1 は、主にエンドサイトーシスのクラスリン被覆ピットに集合して、細胞膜が陥入してできた頸部にダイナミンと共に巻き付いて小胞化する過程に働くタンパクとして研究されてきた^{10,11)}。これまでに、Amph 1 のアクチン制御に関わる可能性が、神経の成長円錐¹²⁾、Amph 1 の酵母のホモログである Rvs167 の研究より示唆されていた¹³⁻¹⁵⁾。我々は、Amph 1 がどのような機構でアクチン重合を促進するのかについて調べた。その結果、Amph 1 は、N-WASP に直接結合し、N-WASP を活性化することを見いだした。また、この活性化が生細胞で起こることを実証した。

材料と方法

1. 動物と細胞培養

本研究に使用した抗体、試薬は市販品の生化学用グレードを用いた。野生型のマウスは、清水実験動物より購入した。Amph 1 ノックアウトマウスは、胚幹細胞をジーンターゲットングすることにより作成した¹⁶⁾。ラットセルトリ細胞株 (Ser-W3) の培養は、以前の我々の方法に準じた³⁾。

2. タンパク精製

N-WASP は、昆虫細胞発現系を用いて発現精製を行った^{17,18)}。Arp 2/3 は豚の脳から精製した¹⁹⁾。Actin は、うさぎ骨格筋より精製した。以上は、朴らの方法に従った。Amph 1 の変異体、1-306 アミノ酸 (N-BAR-PRS)、1-626 アミノ酸 (Δ SH3)、226-695 アミノ酸 (Δ N-BAR)、248-601 アミノ酸欠損 (N-BAR-SH3) は PCR にて増幅後、pGEX-6p にクローニングした。SH3 ドメインは pGEX-2T にクローニングした⁸⁾。これらの遺伝子配列はシーケンシングにより確認した。GST 融合タンパクの発現精製は、以前の我々の方法に

準じた^{8,9)}。

3. 発現用 cDNA コンストラクトの構築

EcoRI と BamHI の制限酵素認識配列を含む全長 Amph 1、1-626 アミノ酸 (Δ SH3) 断片を PCR にて増幅後 pEGFP-C1 もしくは mCherry-C1 にクローニングした。mCherry-C1 は、Dr. Tsien (Howard Hughes Medical Institute, University of California, San Diego) より供与を受けた。XhoI 及び EcoRI を含む Amph 1 を PCR にて増幅後、mCherry-N1 にクローニングした。pEF-BOS-myc-N-WASP 及び pEGFP-N-WASP は、朴らが作成した²⁰⁾。XhoI 及び EcoRI 制限酵素認識配列を含む全長の N-WASP 及び 265-391 アミノ酸 (PRD ドメイン) を PCR にて増幅し、mCherry-C1 にクローニングした。これらの遺伝子配列はシーケンシングにより確認した。発現用プラスミドは、lipofectamine 2000 を用いて細胞に導入した。遺伝子を細胞に導入後、24 から 48 時間後に、実験に使用した。

4. リポソームの作成

Ser-W3 を刺激しラッフル膜形成を誘導する場合に用いたリポソームは、70%PC/30%PS を含む脂質混合液をクロロホルムに溶解し、以前に我々が行った方法に準じて調製した³⁾。アクチン重合反応を刺激する場合に用いたリポソームは、以下に調製した。50%PS/50%PC、50%phosphatidylethanolamine/50%PC、50%PI/50%PC、50%phosphatidic acid/50%PC、10%PI(4, 5)P₂/90%PC を含む脂質混合液をクロロホルムに溶解し、以前に我々が用いた方法に準じて、直径 100nm のリポソームを調製した²¹⁾。

5. ラッフル膜形成の定量化

カバーガラス上で培養した Ser-W3 (1×10^4 cells/coverslip) に、血清を含まない DMEM 液に希釈した 0.25mM の PS-リポソームを加え、37°C、10 分間刺激した。刺激した細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定後、蛍光ラベルしたファロイジンを用いアクチン線維を染色した。ラッフル膜形成は、細胞膜辺縁部でアクチン線維の集積している特徴的な膜構造体であることを利用し同定した³⁾。細胞に、ラッフル膜が一つ以上あれば、ラッフル膜を形成した細胞と見なした。計測した細胞中で、ラッフル膜を形成した細胞の割合を % にて示した。異なった領域で、100 個以上の細胞を計測してグラフ化した。以上の方法は、以前の我々の方法に準じた³⁾。

6. 蛍光顕微鏡観察

4%パラホルムアルデヒドにて固定した Ser-W3 を定法に従い，細胞膜の透過処理後，蛍光間接抗体法を行った．サンプルは，共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した²²⁾．

7. 脳細胞質，シナプトソームの調製

脳細胞質は，Lebensohn らの方法に準じて調製した²³⁾．シナプトソームは，Dunkley らの方法に従って調製した²⁴⁾．

8. シナプトソームにおけるアクチン線維，単量体アクチンの定量

単量体アクチン/アクチン線維の形成サイクルの測定法は，Bernstein らの方法に従った²⁵⁾．

9. In vitro アクチン重合測定

脳細胞質を用いたアクチン重合測定は，Ma らの方法に準じた²⁶⁾．N-WASP 依存性の Arp 2/3 の活性化は，Park らの方法に準じた²⁰⁾．

10. FRET-FLIM 法 (Fluorescent Energy Transfer-Fluorescent Life Time Imaging Microscopy)

FRET-FLIM 法は，Padilla-Parra らの方法に準じた²⁷⁾．GFP-Amph 1 のみを発現させた Ser-W3 における GFP の蛍光寿命をネガティブコントロールとした．この値を基準に，GFP-Amph 1 と Amph 1-mCherry もしくは，mCherry-N-WASP を発現させた細胞における GFP の蛍光寿命を計測し，基準と比較して減少の割合が大きいときに FRET を起こしているとした．

結 果

1. Amphiphysin 1 は，N-WASP 依存性のアクチン重合に関与する

脳細胞質に ATP 存在下，PS を含んだりポソーム (PS-リポソーム) を加えるとアクチン重合を惹起できる．この重合量は，ピレンラベルしたアクチンを反応系に共存させておくと，ピレンの蛍光強度変化を指標として定量可能である^{3,28)}．N-WASP の阻害剤である Wiskostatin²⁹⁾ はアクチン重合を強く阻害した (図 1 A)．Amph 1 のノックアウトマウス (Amph 1 (-/-)) 脳細胞質では，PS-リポソームで惹起されるアクチン線維形成量が野生型の約 40% (刺激後 1,000 秒後) に減少していた．この減少は，Amph 1 タンパクを Amph 1 (-/-) 脳細胞質に添加することにより，野生型のそれと同程度に回復した (図 1 B)．これらの結果は，Amph 1 が PS-リポソーム依存性のアクチン重合に関

与し，N-WASP もこの経路に関与することを示唆している．Amph 1 と N-WASP はシナプスに高濃度に存在するため^{30,31)}，Amph 1 の欠失によりシナプスのアクチン線維形成に変化があるのかどうかを調べた．野生型と Amph 1 (-/-) 脳細胞質中の単量体アクチン量は同じであったが，Amph 1 (-/-) シナプトソーム画分の単量体アクチン量が減少していた (図 1 C)．また，Amph 1 (-/-) シナプトソームの脱分極刺激による単量体アクチン/アクチン線維形成サイクルは，野生型と同じであった (図 1 D)．これらの結果は，Amph 1 がシナプスのアクチンダイナミクスに関与することを強く示唆している．

2. Amphiphysin 1 は，直接 N-WASP 依存性 Arp 2/3 アクチン重合核形成を促進する

Amph 1 は，N-WASP と SH3 ドメインを介して直接結合した (図 2)．さらに，Amph 1 は，N-WASP 及び Arp 2/3 依存性のアクチン重合を濃度依存的に促進し，この作用には，Amph 1 の BAR ドメインと SH3 ドメインの両方が必要であった (図 3)．

3. Amphiphysin 1 と N-WASP の相互作用は細胞辺縁部で起こる

Amph 1 が N-WASP と細胞内で結合するののかどうか調べるために，内在性に Amph 1 を発現している Ser-W3 を用いた．アクチン重合は，ラッフル膜を形成する際に活発に起こる．Ser-W3 は，PS 刺激により PS 受容体依存的にラッフル膜を形成する．その際に Amph 1 はラッフル膜に局在する³⁾．N-WASP の阻害剤 Wiskostatin は，ラッフル膜の形成を顕著に阻害した (図 4 A)．さらに，mCherry と融合した N-WASP の PRD ドメインを Ser-W3 に強制発現させ，Amph 1 と N-WASP の結合を阻害したところ，ラッフル膜形成が 50% 以下に低下した (図 4 B)．同様な効果は，Amph 1 の SH3 ドメインを強制発現させた細胞においても観察された (図 4 C)．以上の結果から，Amph 1 と N-WASP は少なくとも一部は PS 依存性のラッフル膜形成に関与していると考えられた．

続いて，ラッフル膜を形成する際に Amph 1 と N-WASP が実際に結合することを実証するために FRET-FLIM 法を用いた^{27,32)}．まず，FRET-FLIM 法が Amph 1 と N-WASP の結合検出に適用可能であるのかどうかを確認した．これまでに in vivo 及び in vitro でホモダイマーの形成が報告されている Amph 1³³⁾ について，そのダイマー形成を FRET-FLIM 法に

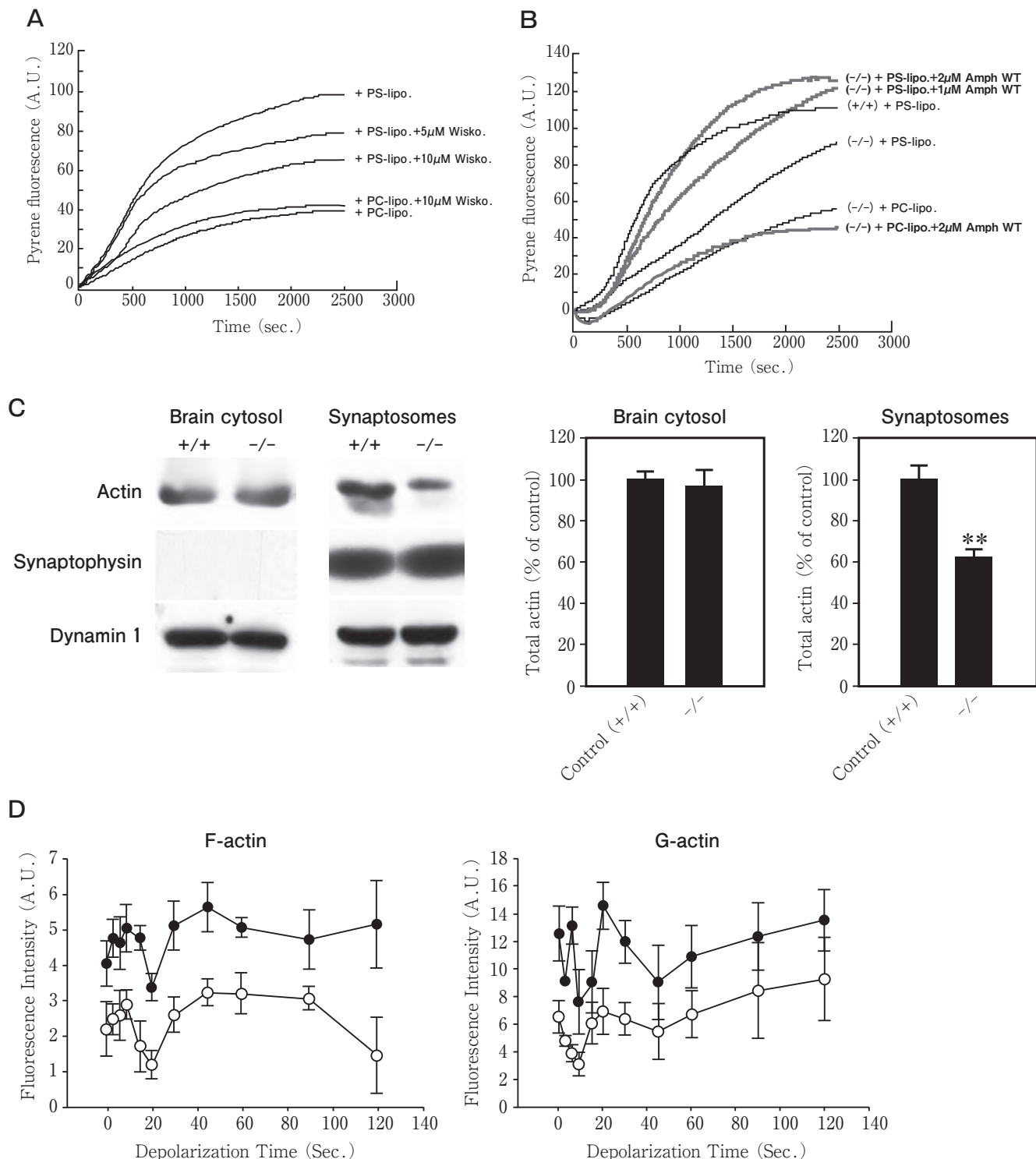


図1 Amph1 (-/-) のシナプスと脳細胞質ではアクチンダイナミクスが低下している

A : Wiskostatin は, PS 依存性アクチン重合活性を阻害する。

B : Amph1 (-/-) 脳細胞質の PS 依存性アクチン重合活性は低下している。Amph1 (-/-) 脳細胞質における PS 依存性アクチン重合は, 野生型に比べて約40%に低下している。この細胞質に精製した Amph1 タンパクを加えると PS 依存性アクチン重合活性が野生型と同程度まで回復する。

C : Amph1 (-/-) シナプトソームでは, 単量体アクチン量が減少している。Amph1 (-/-) 脳細胞質の単量体アクチン量は減少していないが, シナプトソーム画分の単量体アクチン量が減少している。コントロールである Synaptophysin 及び Dynamin 1 量の変化はない。

D : Amph1 (-/-) シナプトソームの脱分極刺激によるアクチン重合脱重合サイクルは, 野生型のそれと比較して変化はない。

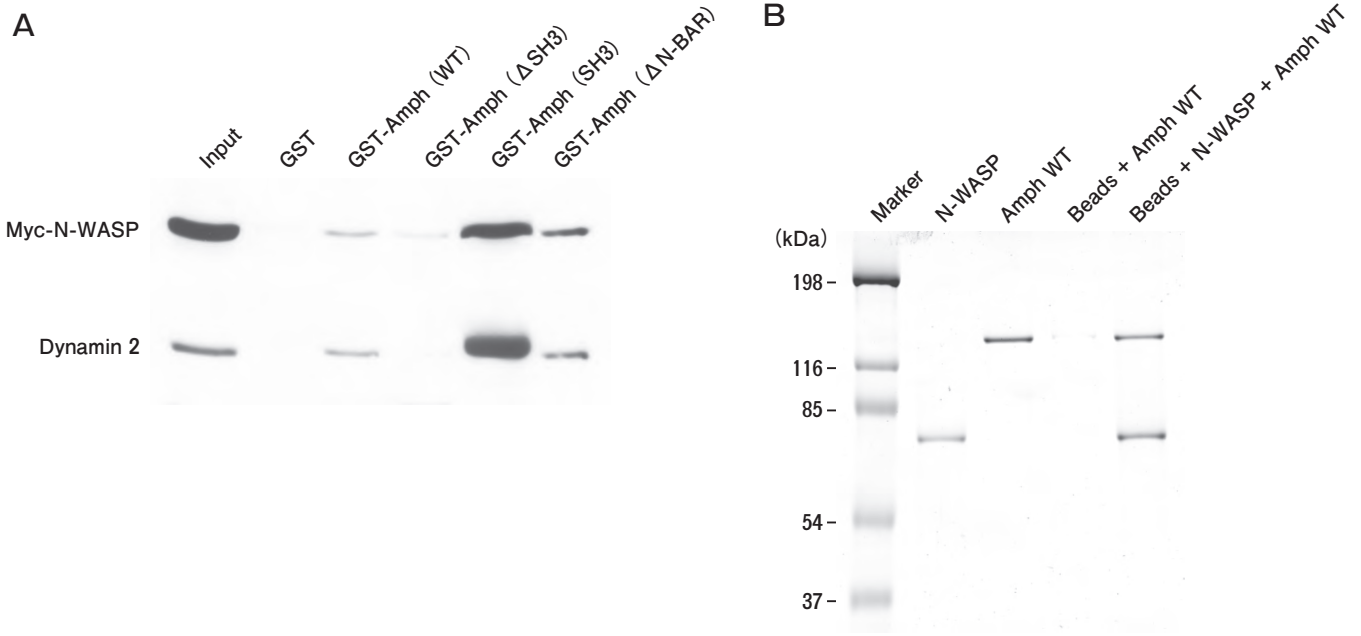


図2 Amph 1 は直接 N-WASP と結合する
 A：セルトリ細胞に発現させた N-WASP-myc を GST-Amph (WT), GST-Amph (ΔSH3), GST-Amph (SH3), GST-Amph (ΔN-BAR), GST を用いてプルダウンした。Amph 1 は、Dynamin 2 と共に N-WASP とも結合する。
 B：Amph 1 と His-N-WASP の両精製タンパクは、直接結合する。

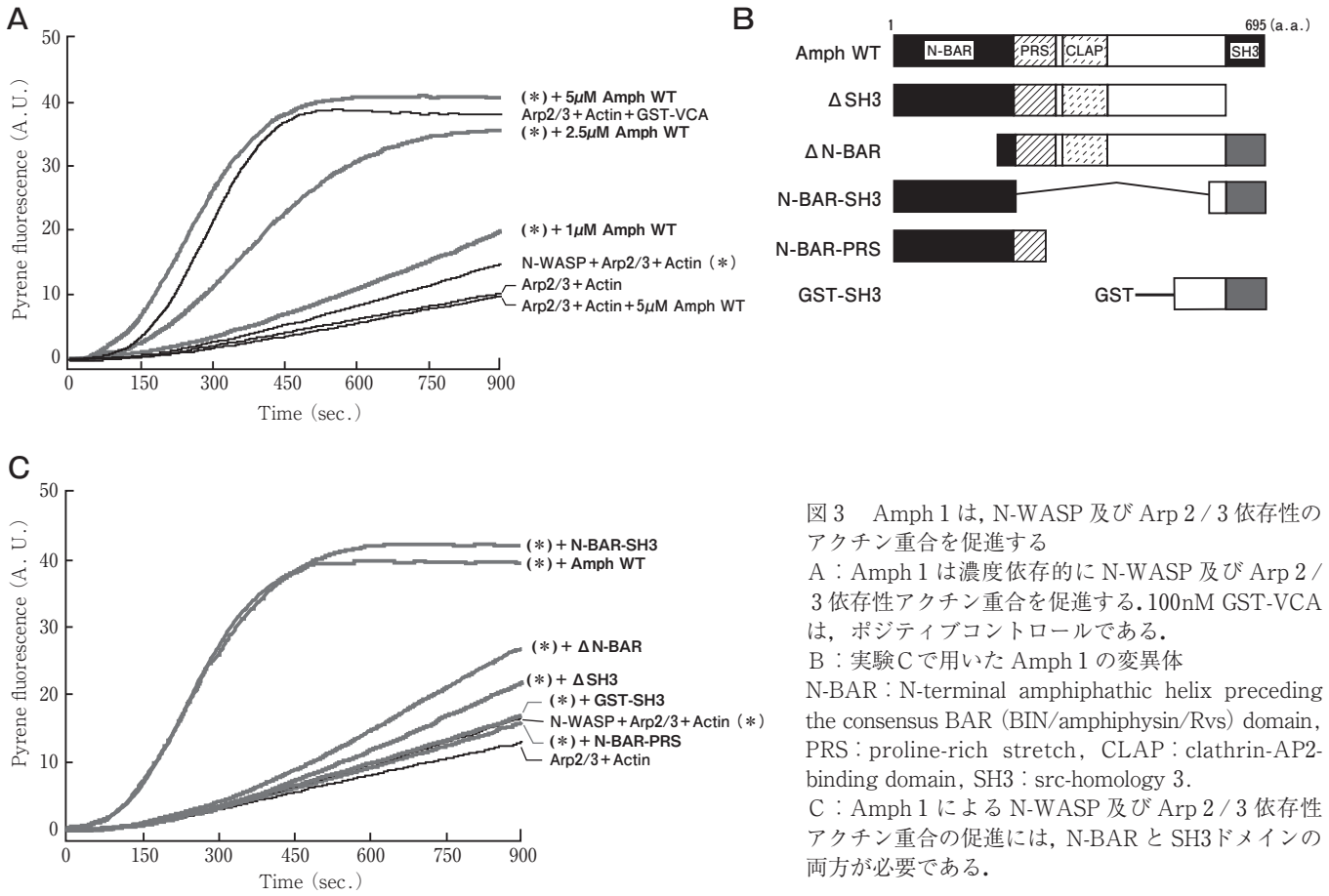


図3 Amph 1 は、N-WASP 及び Arp 2 / 3 依存性のアクチン重合を促進する
 A：Amph 1 は濃度依存的に N-WASP 及び Arp 2 / 3 依存性アクチン重合を促進する。100nM GST-VCA は、ポジティブコントロールである。
 B：実験Cで用いた Amph 1 の変異体
 N-BAR：N-terminal amphiphathic helix preceding the consensus BAR (BIN/amphiphysin/Rvs) domain, PRS：proline-rich stretch, CLAP：clathrin-AP2-binding domain, SH3：src-homology 3.
 C：Amph 1 による N-WASP 及び Arp 2 / 3 依存性アクチン重合の促進には、N-BAR と SH3ドメインの両方が必要である。

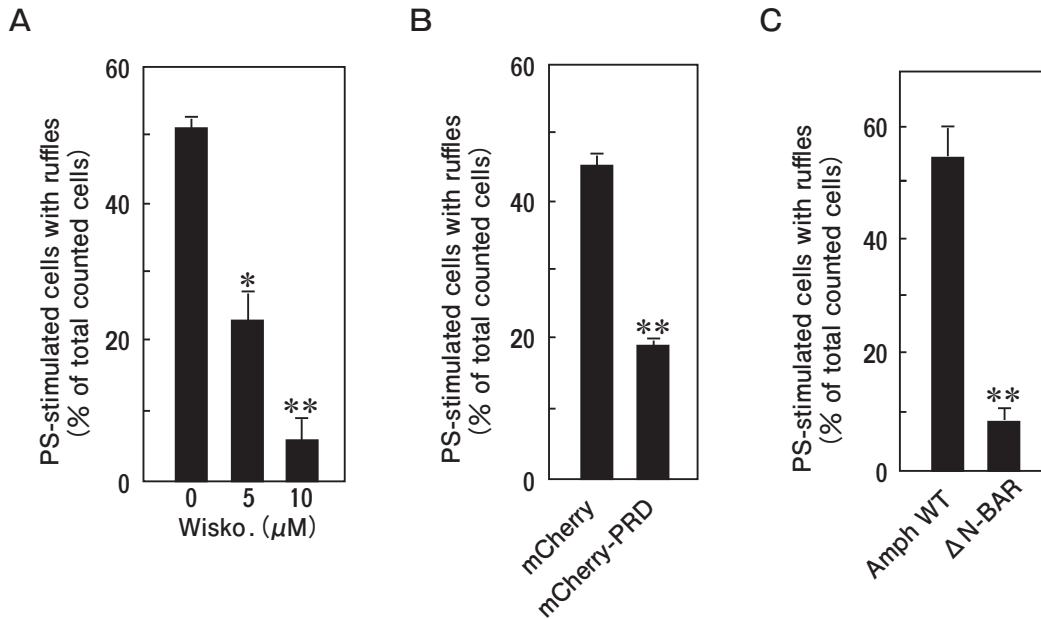


図4 Amph 1-N-WASP 複合体は、PS 依存性ラッフル膜形成に参与する
 A : N-WASP 阻害剤 Wiskostatin の PS 依存性ラッフル膜形成阻害
 B : N-WASP の PRD ドメインの強制発現による PS 依存性ラッフル膜形成阻害
 C : Amph 1 ΔN-BAR の強制発現による PS 依存性ラッフル膜形成阻害

て調べた。Ser-W3にGFP-Amph 1 及び Amph 1-mCherry を共発現させ、PS 刺激の後、FRET-FLIM 解析を行った。両タンパクを強制発現させた場合、GFP の蛍光寿命が $2.48 \pm 0.01\text{ns}$ から $2.40 \pm 0.03\text{ns}$ ($n = 14$) に減少した (図5)。従って、FRET-FLIM 法により、細胞内で Amph 1 のホモダイマーの形成が検出可能であることを確認した。

GFP-Amph 1 と mCherry-N-WASP を共発現させた Ser-W3 を用いて FRET-FLIM 法を行った。GFP-Amph 1 と Amph 1 とは結合しない mCherry を共発現させた細胞の GFP の蛍光寿命は、 $2.47 \pm 0.01\text{ns}$ であり、非特異的に FRET が起こらないことを確認した。GFP-Amph 1 と mCherry-N-WASP を共発現させた Ser-W3 において、刺激なしでは、25% の細胞が FRET を示していたのに対し、PS 刺激により 89% の細胞が FRET を示した (図6)。さらに、GFP-Amph 1 と mCherry-N-WASP の結合を経時的に観察した。GFP-Amph 1 と mCherry-N-WASP は、PS 刺激後 1 分以内で、最初に結合し、その結合は細胞辺縁部で観察された。経時とともにその結合は減少するが、3 分後に再度結合した (図6 C, D)。これらの結果は、我々が以前に発見した Amph 1 (-/-) のセルトリ細胞では、食作用とラッフル形成が著しく低下するという作

用機序を説明するものである。

考 察

本研究以前に、Amph 1 とアクチンとの機能的な関与が報告されていたが、その作用機序は不明であった¹²⁻¹⁵。我々は、SH3ドメインを持つタンパク Amph 1 が、N-WASP の活性化分子として働くことを明らかにした。他の間接的にアクチンに働く分子も関与している可能性がある。これまでに、Amph 1 を含む BAR ドメインを持つスーパーファミリーの中で、SH3ドメインを持ついくらかのタンパクが、*in vitro* で N-WASP を活性化し Arp 2/3 経路でアクチンの重合を促進することが報告されている³⁴⁻³⁷。さらに、我々は FRET-FLIM 法を用いて Amph 1 と N-WASP の結合が外部刺激に応じて形成されるラッフル膜近傍でおこることを実証した。N-WASP の活性化を制御する分子は多くの異なった状況で働くのだろう。本研究で示したシナプトソームとセルトリ細胞³の解析では、Amph 1 による高いアクチン重合核形成活性が観察されている。おそらく、この現象は、これら細胞における Amph 1 の発現量を反映していると考えられる。Amph 1 (-/-) マウスは、空間認知力が不足している¹⁶。アクチンを制御するタンパクの中で、BAR と

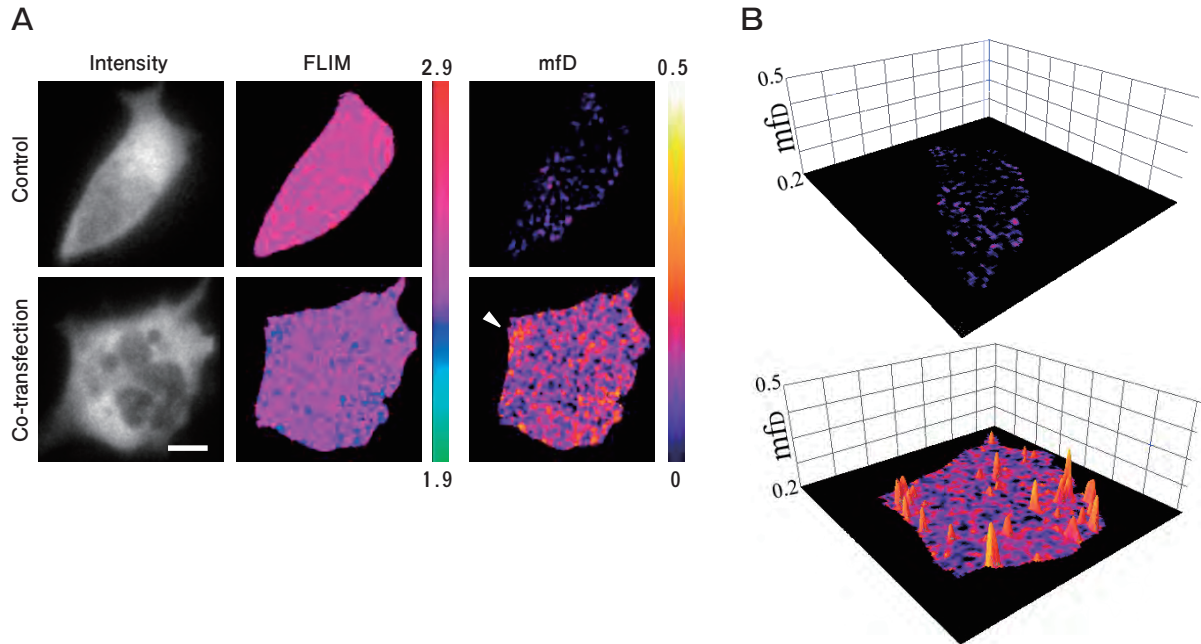
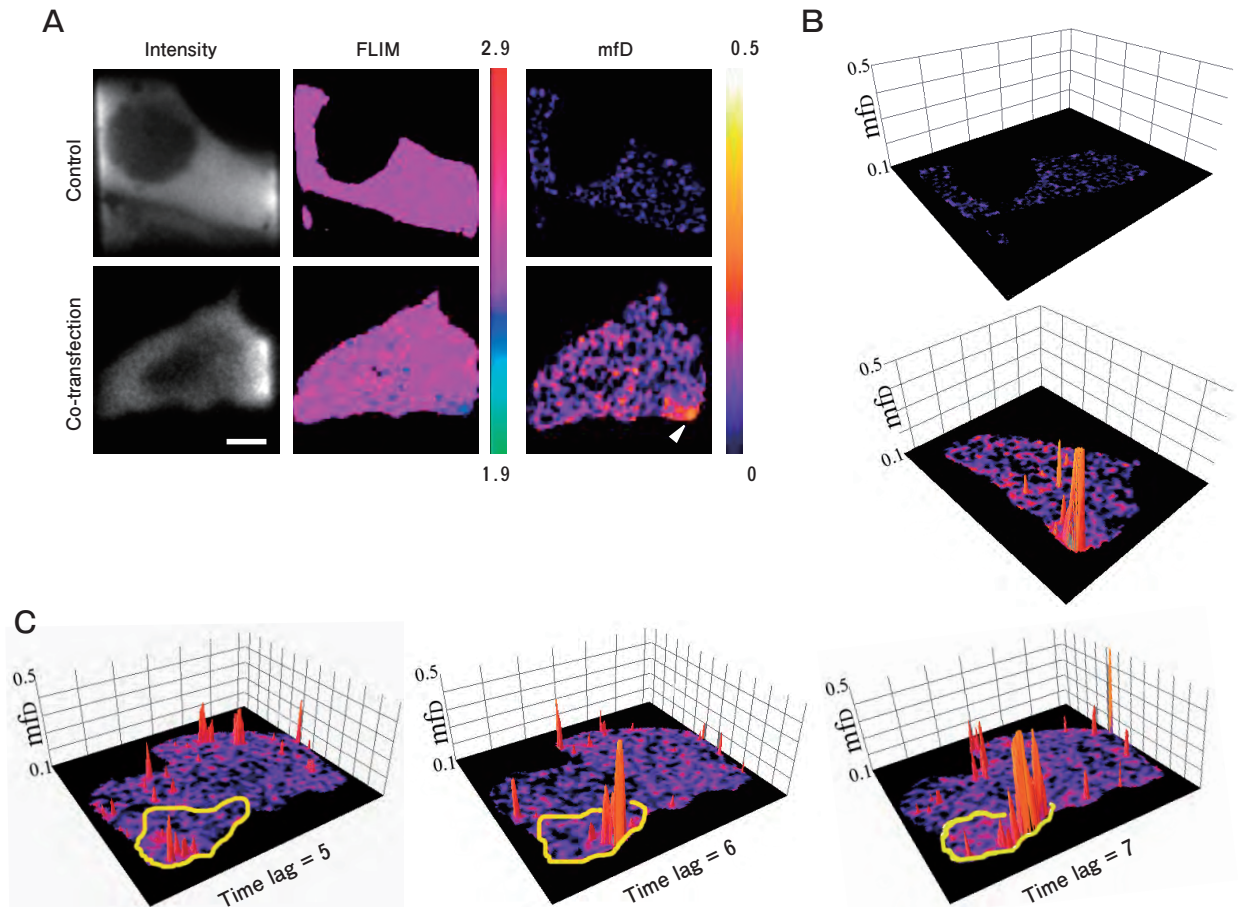


図5 FRET-FLIM法による Ser-W3 における Amph 1 のダイマー化の検出

A：GFP-Amph 1 のみを発現させた細胞をコントロールとした（図上）. GFP-Amph 1 と Amph 1-mCherry（図下）を共発現させた細胞では、GFP の蛍光寿命の減少が画像解析より判明した（矢印）. スケールバー；10 μ m

B：mf_D（結合量の指標）の細胞内 3 D 分布図. GFP-Amph 1 と Amph 1-mCherry を共発現させた細胞では、mf_Dは 0 から0.11に増加し、細胞の全体でその結合が観察される（図下）.



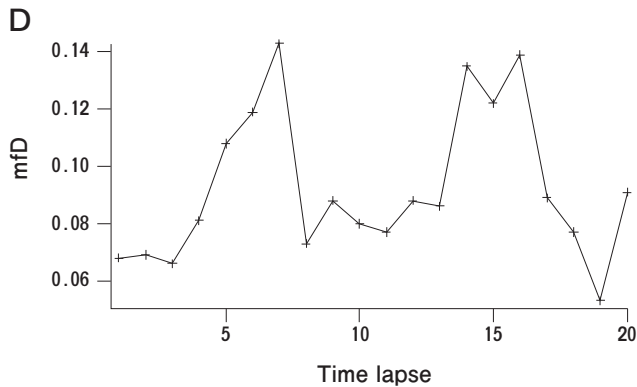


図6 Amph1とN-WASPの時空間的な結合
 A: GFP-Amph1のみを発現させた細胞をコントロールとした(図上). GFP-Amph1とmCherry-N-WASP(図下)を共発現させた細胞では, GFPの蛍光寿命の減少が画像解析より判明した(矢印). スケールバー: 10 μ m
 B: mf_D(結合量の指標)の細胞内3D分布図. GFP-Amph1とmCherry-N-WASPを共発現させた細胞では, mf_Dは0から0.09に増加し, 細胞辺縁部でその結合が観察された(図下).
 C: GFP-Amph1とmCherry-N-WASPの結合の時間変化.
 D: Cにおけるmf_D値の時間変化. 12秒間隔で, 丸で囲まれている部分のmf_D値の平均をグラフ化した.

SH3ドメインをもつタンパクの変異はどのような表現型を示すのか興味深い, 例えば, 人での遺伝性精神遅滞に関与するoligophreninタンパクの変異である^{7,38,39}. 驚いたことに, N-WASP依存性のアクチン重合の活性化には, Amph1のSH3ドメインだけでなくN-BARドメインも必要である. BARドメインは, Amphのホモあるいはヘテロオリゴマー形成³³及び脂質膜への結合に働いている^{7,8}. Amph1はリポソームの非存在下でN-WASP依存性のアクチン重合を活性化する. これらの結果は, BARドメインが細胞膜への結合ではなく, ダイマー化に必要であり, このダイマー化がN-WASPの活性化に重要であることを強く示している. Amph1のダイマー化は, 後に続くクラスター化とN-WASPのダイマー化を促進する. 最近の研究では, N-WASPが完全に活性化するためには, N-WASPがダイマー化し, そのダイマー化に続いて, SH3ドメインを持つタンパクの結合による分子内抑制の解除が起こるといった活性化機序が示唆されている. そして, ダイマー化したタンパクのSH3ドメインはモノマーよりもさらに強くN-WASPを活性化する⁴⁰. どの場合においても, 完全なN-WASPの活性化には, 細胞膜のPIP₂にN-WASPが結合することが必要であ

るので, これらが相互作用し生理的に機能するところは, 細胞皮質である. これまで, Amph1は, 主にエンドサイトーシスへの機能に関して研究がなされてきた. 現行のモデルでは, Amph1のN-BARドメインの細胞膜を曲げる性質及び細胞膜の曲率を認識する性質が, エンドサイトーシスピットの頸部へのAmph1の集積を仲介していると考えられている. エンドサイトーシスでは, Amph1はクラスリン依存性の細胞膜陥入部形成とその切断による小胞形成, クラスリンの脱殻過程に働いている. 前者では, Amph1はクラスリンとクラスリンアダプタータンパクであるAP-2と結合する. 後者では, SH3ドメインを介してDynaminとPI(4,5)P₂脱リン酸化酵素であるシナプトジェニンと結合する^{6,11}. クラスリン依存性エンドサイトーシス過程に関わることが示唆されていたアクチンとエンドサイトーシスが密接に相互に関与していることが今回, 明らかになった. そして, アクチンもまた, 少なくともクラスリン被覆ピットの頸部で, 集積し機能するのだろう(図7)^{15,41}.

このように, Amphは, SH3ドメインを持つ他のBARファミリータンパクと協同的に働きエンドサイトーシスピットの頸部で曲率依存性のアクチン重合を誘導する³⁴⁻³⁷. 本研究で明らかにしたラッフル膜形成におけるAmphの役割とクラスリンやAP-2と結合する部位を持たないAmphのイソフォームの存在のように, エンドサイトーシスに依存しないアクションも起こりうる^{42,43}. 我々が報告した細胞膜への結合とは別のAmphのBARドメインの役割は, これらの可能性を支持するものである. Amph1がアクチン重合反応の重要な制御因子であり, N-WASPと相互作用することによって起こる. その相互作用は, 時空間的に制御されていると結論した.

This research was originally published in Journal of Biological Chemistry. Hiroshi Yamada, Sergi Padilla-Parra, Sun Joo Park, Toshiki Itoh, Mathilde Chaineau, Ilaria Monaldi, Ottavio Cremona, Fabio Benfenati, Pietro De Camilli, Maïté Coppey-Moisan, Marc Tramier, Thierry Galli, and Kohji Takei, J. Biol. Chem., 284, 34244-34256, 2009© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

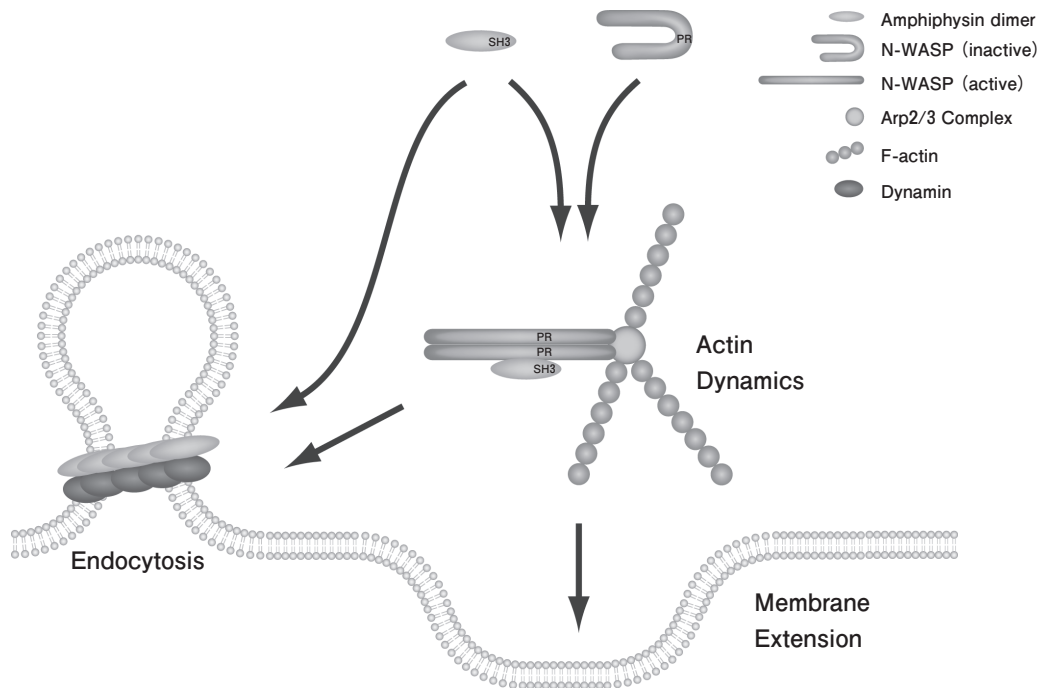


図7 細胞内でのアクチン重合におけるAmph 1とN-WASPの働き

N-WASPはダイマー化したAmph 1が結合することにより活性化される。その後Arp 2/3を介してアクチン重合が促進される。これら相互作用は、細胞膜の直近で起こり、重合したアクチン線維は、Dynamin依存性のエンドサイトーシスやラッフル膜の形成を助ける。簡略化するために、他のアクチン関連タンパクやエンドサイトーシス被覆タンパクは、省略してある。

文 献

- Pollard TD, Borisy GG: Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* (2003) 112, 453-465.
- Takenawa T, Suetsugu S: The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2007) 8, 37-48.
- Yamada H, Ohashi E, Abe T, Kusumi N, Li SA, Yoshida Y, Watanabe M, Tomizawa K, Kashiwakura Y, Kumon H, Matsui H, Takei K: Amphiphysin 1 is important for actin polymerization during phagocytosis. *Mol Biol Cell* (2007) 18, 4669-4680.
- De Camilli P, Thomas A, Cofield R, Folli F, Lichte B, Piccolo G, Meinck HM, Austoni M, Fassetta G, Bottazzo G, Bates D, Cartledge N, Solimena M, Kilimann MW: The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* (1993) 178, 2219-2223.
- Watanabe M, Tsutsui K, Hosoya O, Tsutsui K, Kumon H, Tokunaga A: Expression of amphiphysin I in Sertoli cells and its implication in spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 287, 739-745.
- Cestra G, Castagnoli L, Dente L, Minenkova O, Petrelli A, Migone N, Hoffmüller U, Schneider-Mergener J, Cesareni G: The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *J Biol Chem* (1999) 274, 32001-32007.
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT: BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* (2004) 303, 495-499.
- Yoshida Y, Kinuta M, Abe T, Liang S, Araki K, Cremona O, Di Paolo G, Moriyama Y, Yasuda T, De Camilli P, Takei K: The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J* (2004) 23, 3483-3491.
- Slepnev VI, Ochoa GC, Butler MH, De Camilli P: Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J Biol Chem* (2000) 275, 17583-17589.
- Schmid SL, McNiven MA, De Camilli P: Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol* (1998) 10, 504-512.
- 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.
- 12) Mundigl O, Ochoa GC, David C, Slepnev VI, Kabanov A, De Camilli P : Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* (1998) 18, 93-103.
 - 13) Sivadon P, Bauer F, Aigle M, Crouzet M : Actin cytoskeleton and budding pattern are altered in the yeast *rvs161* mutant : the Rvs161 protein shares common domains with the brain protein amphiphysin. *Mol Gen Genet* (1995) 246, 485-495.
 - 14) Munn AL, Stevenson BJ, Geli MI, Riezman H : end5, end6, and end7 : mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* (1995) 6, 1721-1742.
 - 15) Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG : A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* (2005) 123, 305-320.
 - 16) Di Paolo G, Sankaranarayanan S, Wenk MR, Daniell L, Perucco E, Caldarone BJ, Flavell R, Picciotto MR, Ryan TA, Cremona O, De Camilli P : Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin I knockout mice. *Neuron* (2002) 33, 789-804.
 - 17) Miki H, Miura K, Takenawa T : N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP₂-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J* (1996) 15, 5326-5335.
 - 18) Suetsugu S, Miki H, Takenawa T : The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J* (1998) 17, 6516-6526.
 - 19) Egile C, Loisel TP, Laurent V, Li R, Pantaloni D, Sansonetti PJ, Carlier MF : Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* (1999) 146, 1319-1332.
 - 20) Park SJ, Suetsugu S, Takenawa T : Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. *EMBO J* (2005) 24, 1557-1570.
 - 21) Kinuta M, Yamada H, Abe T, Watanabe M, Li SA, Kamitani A, Yasuda T, Matsukawa T, Kumon H, Takei K : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate stimulates vesicle formation from liposomes by brain cytosol. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99, 2842-2847.
 - 22) Kamitani A, Yamada H, Kinuta M, Watanabe M, Li SA, Matsukawa T, McNiven MA, Kumon H, Takei K : Distribution of dynamins in testis and their possible relation to spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 294, 261-267.
 - 23) Lebensohn AM, Ma L, Ho HY, Kirschner MW : Cdc42 and PI(4, 5)P₂-induced actin assembly in *Xenopus* egg extracts. *Methods Enzymol* (2006) 406, 156-173.
 - 24) Dunkley PR, Heath JW, Harrison SM, Jarvie PE, Glenfield PJ, Rostas JA : A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction : homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res* (1988) 441, 59-71.
 - 25) Bernstein BW, Bamberg JR : Cycling of actin assembly in synaptosomes and neurotransmitter release. *Neuron* (1989) 3, 257-265.
 - 26) Ma LE, Cantley LC, Janmey PA, Kirschner MW : Corequirement of specific phosphoinositides and small GTP-binding protein Cdc42 in inducing actin assembly in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* (1998) 140, 1125-1136.
 - 27) Padilla-Parra S, Audugé N, Coppey-Moisan M, Tramier M : Quantitative FRET analysis by fast acquisition time domain FLIM at high spatial resolution in living cells. *Biophys J* (2008) 95, 2976-2988.
 - 28) Ho HY, Rohatgi R, Lebensohn AM, Ma LE, Li J, Gygi SP, Kirschner MW : Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* (2004) 118, 203-216.
 - 29) Peterson JR, Bickford LC, Morgan D, Kim AS, Ouerfelli O, Kirschner MW, Rosen MK : Chemical inhibition of N-WASP by stabilization of a native autoinhibited conformation. *Nat Struct Mol Biol* (2004) 11, 747-755.
 - 30) Bauerfeind R, Takei K, De Camilli P : Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* (1997) 272, 30984-30992.
 - 31) Wegner AM, Nebhan CA, Hu L, Majumdar D, Meier KM, Weaver AM, Webb DJ : N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem* (2008) 283, 15912-15920.
 - 32) Tramier M, Gautier I, Piolot T, Ravalet S, Kemnitz K, Coppey J, Durieux C, Mignotte V, Coppey-Moisan M : Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells. *Biophys J* (2002) 83, 3570-3577.
 - 33) Wigge P, Kohler K, Vallis Y, Doyle CA, Owen D, Hunt SP, McMahon HT : Amphiphysin heterodimers : potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* (1997) 8, 2003-2015.
 - 34) Otsuki M, Ito T, Takenawa T : Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is recruited to rafts and associates with endophilin A in response to epidermal growth factor. *J Biol Chem* (2003) 278, 6461-6469.
 - 35) Kessels MM, Qualmann B : The syndapin protein family : linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J Cell Sci* (2004) 117, 3077-3086.
 - 36) Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL : SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is

- required for membrane remodeling during endocytosis. *Dev Cell* (2007) 13, 43-56.
- 37) Takano K, Toyooka K, Suetsugu S : EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J* (2008) 27, 2817-2828.
- 38) Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Roest Crollius H, Carrié A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J : Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* (1998) 392, 923-926.
- 39) Itoh T, De Camilli P : BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1761, 897-912.
- 40) Padrick SB, Cheng HC, Ismail AM, Panchal SC, Doolittle LK, Kim S, Skehan BM, Umetani J, Brautigam CA, Leong JM, Rosen MK : Hierarchical regulation of WASP/WAVE proteins. *Mol Cell* (2008) 32, 426-438.
- 41) Merrifield CJ, Perrais D, Zenisek D : Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell* (2005) 121, 593-606.
- 42) Gold ES, Morrissette NS, Underhill DM, Guo J, Bassetti M, Aderem A : Amphiphysin II_m, a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis. *Immunity* (2000) 12, 285-292.
- 43) Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa GC, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P : Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* (2002) 297, 1193-1196.
- 44) Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW : The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* (1999) 97, 221-231.