

機関番号：13901

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370077

研究課題名（和文）細胞表層におけるセプチン重合・脱重合機構の解析

研究課題名（英文）Mechanism of cortical septin heteropolymerization/dissociation

研究代表者

木下 専 (KINOSHITA MAKOTO)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：30273460

研究成果の概要（和文）：

セプチン系は重合性 GTP 結合蛋白質が構成する普遍的な細胞骨格系であるが、アクチン系・微小管系などに紛れがちなこと、遺伝子重複、適当な阻害剤がないことなどからその全貌は謎に包まれている。セプチンの重合・脱重合機構に残された問題を解明すべく、FRAP および電子顕微鏡技術を駆使して時空間的解析を行い、以下の結果を得た。1) セプチンのターンオーバー率はサブユニットごとに異なる。これはヘテロポリマー内の位置や他の細胞骨格分子との会合によるものと想定される。2) 平均的なセプチンサブユニットのターンオーバー率は平均的なアクチン膜骨格のそれよりも 2～3 倍遅い。3) セプチンを RNAi で枯渇させてもアクチンのターンオーバーには影響しないが、作用機序の異なる 2 種のアクチン阻害剤はいずれもセプチンのターンオーバーを著明に遅延させた。この *unilateral* な関係は代表者らが以前報告した、アクチンストレスファイバー上での両者の相互依存性とは全く異なる。4) 以上のメカニズムを解析するため、急速凍結レプリカ免疫電子顕微鏡法を用いて細胞表層のセプチンを標識したところ、アクチン膜骨格上で一様に分布してはおらず、特に分岐部、末端部、結節部、束化部に集積する傾向が見られた。これは代表者らが以前報告したように、アクチンとセプチンは直接相互作用せず、ミオシンやアニリンなどのアクチン会合分子を介して間接的にリクルートされることと符合する。5) 細胞表層のセプチンは膜蛋白質 GLAST のカルボキシル末端の 29 アミノ酸残基と相互作用することによってターンオーバー率を低下させた。以上を総合すると、アクチン膜骨格の中で相対的に安定な構成成分であるセプチンがスカフォールドないし側方拡散バリアとして機能する際の普遍的な作用メカニズムの概要を解明できた。

研究成果の概要（英文）：

Despite the cortical localization of septin heteropolymers *in vivo* and their direct interaction with phospholipid membranes *in vitro*, their behavior and roles remain elusive. In this project, we characterized the major cortical septin assembly found in mammalian tissue culture cells by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis. GFP-tagged septin subunits exhibited slower turnover compared with other cortical proteins analyzed. Perturbation of actin turnover retarded the cortical septin turnover, while septin depletion by RNAi did not affect cortical actin turnover. These phenomena are interpreted by septins' selective association with a subset of actin-based membrane skeleton, as revealed by quick-freeze deep-etch immunoelectron microscopy. We applied the assay system to test septins' presumptive scaffold function on their physiological binding partners. Septin filament destabilization by RNAi-mediated subunit depletion facilitated the turnover of GLAST, while a septin-stabilizing drug forchlorfenuron restrained more GLAST in the unexchangeable fraction. Thus, cortical septin heteropolymers are components of the actin-based membrane skeleton, providing scaffolds for their interacting partners by impeding their lateral diffusion. We predict that diverse submembranous septin clusters found

in vivo may serve as scaffolds or reserve pools for specific membrane-bound proteins.
 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	7,100,000	2,130,000	9,530,000
21年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
22年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：細胞骨格、蛍光イメージング、拡散障壁、電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ヒトセプチン系の異常が悪性腫瘍、神経変性疾患(AJP 1998; JBC 2003; Neuron 2007)、精子無力症(Dev Cell 2005)等の医学的課題と密接に関連することが明らかとなり、細胞生物学的解析によって未解決課題を解決する必要性が増してきた。哺乳類セプチン遺伝子の単離・解析を始め(Genes Dev 1997)、複合体の再構成・解析(Dev Cell 2002)、個体レベルでの生理機能解析(Dev Cell 2005; Neuron 2007)に世界に先駆けて成功してきた申請者は、残された課題の解決に取り組むべく、本研究を計画・施行した。

2. 研究の目的

セプチン系は重合性 GTP 結合蛋白質が構成する普遍的な細胞骨格系である。しかし、アクチン系・微小管系・膜骨格系などに紛れがちなことや阻害剤がないことなどから、その全貌は謎に包まれている。アクチン系では 1 種類、微小管系では 2 種類のヌクレオチド結合性サブユニットが規則正しく集合するのに対し、セプチン系では 3 種類以上のサブユニットが複雑多様な複合体や高次集合体を構成する。特に哺乳類ではサブユニット間の機能重複が遺伝学的機能解析を困難にしている。セプチンの重合・脱重合機構に残された問題を解明すべく、FRAP および電子顕微鏡技術を駆使して時空間的解析を行う。

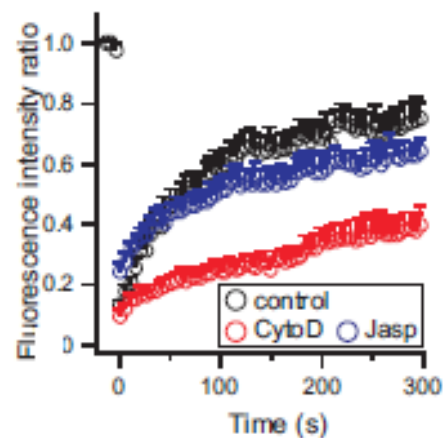
3. 研究の方法

セプチン系の分子動態解析のため、培養神経細胞の細胞膜直下に集積した GFP-septin など一連の融合蛋白質に対する FRAP (光退色後

蛍光回復) 法によるタイムラプス解析を行った。一方、急速凍結レプリカ免疫電子顕微鏡法を用いて細胞表層のセプチン分子を金粒子で標識し、その分布を高い空間分解能で詳細に解析した。

4. 研究成果

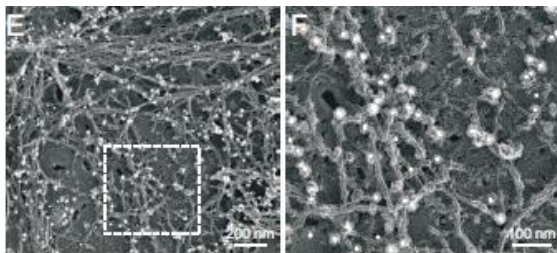
膜蛋白質分子や細胞膜直下のアクチン分子に比べてセプチン分子のターンオーバーは緩慢であり、細胞膜直下のセプチン集合体の安定性が示唆された。この特性は細胞膜形状の保持や、膜蛋白質のスカーフォールドないし拡散障壁としての役割に適したものと考えられた。



興味深いことに、作用機序の異なる 2 種のアクチン阻害剤はいずれもセプチンのターンオーバーを著明に遅延させた (上図)。

逆に、RNAi でセプチンを枯渇させた細胞で関連分子の動態を調べたところ、表層アクチ

ンのターンオーバーに有意な変化が見られない条件で、GLAST のターンオーバーが有意に促進した。したがって、細胞膜直下のセプチン系がこれらの分子のスカフォールドないし拡散障壁として局在や安定化に寄与する可能性が支持された。このような分子機構は、Sept4 欠損マウスの下ドパミン神経末端において syntaxin-1 や DAT が減少すること (Neuron 2007) の理由の1つと考えられる。急速凍結レプリカ免疫電子顕微鏡法では



セプチンがアクチン膜骨格上で一様に分布しておらず、特に分岐部、末端部、結節部、束化部に集積する傾向が見られた (下図)。これは上記のダイナミクス解析や従来の生化学的解析の結果と符合する大変興味深い所見であり、今後二重染色法・自動パターン認識法などを組み合わせて詳細なメカニズムを解明していきたい。

以上を総合すると、細胞表層のセプチンはアクチン膜骨格の中で相対的に安定な構成成分であり、特定の膜蛋白質と相互作用することによって膜蛋白質ターンオーバー率を低下させる。これがセプチンがスカフォールドないし側方拡散バリアとして機能する際の普遍的な作用メカニズムであると想定される (Hagiwara et al., Cytoskeleton in press)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

(英文原著論文：全て査読あり)

Akari Hagiwara, Yasuhiro Tanaka, Rie Hikawa, Nobuhiro Morone, Akihiro Kusumi, Hiroshi Kimura, and Makoto Kinoshita. Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. **Cytoskeleton** *in press*.

Atsuko Yanagida, Keiko Iwaisako, Etsuro Hatano, Kojiro Taura, Fumiaki Sato, Masato Narita, Hiromitsu Nagata, Hiroyuki Asechi, Shinji Uemoto, and Makoto Kinoshita. Downregulation of the Wnt antagonist Dkk2 links the loss of Sept4 and

myofibroblastic transformation of hepatic stellate cells. **BBA-Molecular Basis of Disease** *in press*. 2011

Mostowy S, Bonazzi M, Hamon MA, Tham TN, Mallet A, Lelek M, Guin E, Demangel C, Brosch R, Zimmer C, Sartori A, Kinoshita M, Lecuit M, Cossart P. Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. **Cell Host & Microbe** 8, 433-444, 2010.

(和文総説：全て査読なし)

木下 専 「ドーパミン神経伝達と変性におけるセプチン細胞骨格系の役割」日本神経精神薬理学会誌 印刷中

藤原敬広、木下 専「トランスポートソームの組織化における細胞骨格系の役割」トランスポートソームの世界—膜輸送研究の源流から未来へ— (金井好克、竹島浩、森泰生、久保義弘 編集) 380-386, 2011.

猪原匡史、木下 専「セプチン細胞骨格系の機能とドーパミン神経伝達における役割」BRAIN and NERVE (神経研究の進歩) 61 巻 4 号「大脳基底核—分子基盤から臨床まで」(川島隆太 企画、高田昌彦 編集) 4 月号, 419-428, 2009.

木下 専「セプチン細胞骨格の変幻自在な高次集合性と多彩な生理機能」蛋白質核酸酵素 54 巻 9 号 Review (6 月 22 日発刊) 1150-1158, 2009.

猪原匡史、木下 専「パーキンソン病関連遺伝子 Sept4」日本臨床 2009 年増刊号「パーキンソン病—基礎・臨床研究のアップデート」(6 月 28 日発刊) 75-78, 2009.

[学会発表] (計 14 件)

June 2-5, 2008, Tanaka-Takiguchi Y, Takiguchi K, Kinoshita M. Septin-mediated uniform bracing of phospholipids membrane. International Symposium on Non-Equilibrium Soft Matter (Kyoto, Japan).

June 30, 2008, Kinoshita M. Metastability and function of cortical septin polymers. Membrane dynamics and cytoskeleton. The 60th annual meeting of Japan Society for Cell biology. (Yokohama)

November 26-27, 2008, Kinoshita M. Septin cytoskeleton restrains membrane shape and the diffusion of solute carriers. French-Japanese workshop on Water in

Biological Systems (Kyoto)

December 17, 2008, Iwaisako K, Hatano E, Uemoto , Kinoshita M. Loss of a septin subunit exacerbates liver fibrosis through the dysregulation of hepatic stellate cells. The 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (San Francisco, USA).

March 22-25, 2009, Kinoshita M. Probing submembranous septin functions in vitro and in vivo. Janelia Conference "Structure and Function of Septins" (Ashburn, USA)

April 6-7, 2009, Kinoshita M. Septins as a determinant of dopamine metabolism and alpha-synuclein aggregation. International Conference "Protein folding and neurodegenerative disease" (Kyoto, Japan)

September 15, 2009, Yamakado H., Hikawa R., Kinoshita M. Presynaptic septin scaffold as a determinant of dopamine metabolism. The 4th MCCS-Asia Symposium "Unraveling Higher Brain Functions: Recent Progress with Animal Models III" "Neuro2009 Satellite Symposium" (Nagoya, Japan)

December 5-9, 2009, Yasuhiro Tanaka, Kinoshita M. ASCB Session 3 - Cytoskeletal Organization II. "Coupling of the dynamic property of septins with their enzymatic activities" (San Diego, USA)

January 21-24, 2010, Kinoshita M. Flexible higher-order assembly of septin GTPases and their pathophysiological implications. 4th Annual Symposium of Japanese-French Frontiers of Science (Poitiers, France)

January 27-29, 2010, Kinoshita M. Assembly of the septin cytoskeleton in vitro and in vivo. The 13th Membrane Research Forum. (Kyoto, Japan)

March 24, 2010, Kinoshita M. Keynote Lecture: Implications of septins in neuropsychiatric disorders. The First International Mini-Symposium on Brain Disease&Septin Research (Philadelphia, USA).

March 24, 2010, Kinoshita M. Involvement of septins in neural development and neurotransmission. The 1st International

Mini-Symposium on Brain Disease&Septin Research (Philadelphia, USA)

December 11-15, 2010, Ageta-Ishihara N, Tomonaga T, Yamazaki M, Abe M, Morita T, Kurita H, Itohara S, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M. Dissection of the mammalian CDC42-septin pathway with a CDC42 effector protein. The 50th ASCB Annual Meeting (Philadelphia, USA)

March 6-9, 2011, Kinoshita M. What is the Physiological Role of the Cdc42-Borg/Cdc42ep-Septin Pathway? EMBO Workshop/The 4th International Septin Workshop. (St. Goar, Germany)

〔図書〕 (計 1 件)

Makoto Kinoshita. Chapter 14. Role of the septin cytoskeleton for the functional organization of the plasma membrane. In Water: The Forgotten Biological Molecule (eds. D. Le Bihan and H. Fukuyama), Pan Stanford, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/seminar/mbl.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者

木下 専(KINOSHITA MAKOTO)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号 : 30273460

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号 :

(3)連携研究者
()

研究者番号 :