

平成 22 年 4 月 9 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770150
 研究課題名 (和文) アクチン細胞骨格とメンブレントラフィックを統合する細胞極性シグナルの実体の解明
 研究課題名 (英文) Investigation of cell polarity signal controlling organization of the actin cytoskeleton and membrane traffic
 研究代表者
 中野 賢太郎 (NAKANO KENTARO)
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師
 研究者番号：50302815

研究成果の概要 (和文)：細胞の極性は、細胞の形態形成や細胞運動を中心とする細胞の機能発現や機能分化において重要な情報であり、酵母のような単細胞真核生物の生存からヒトにおける高次生命システムの構築や維持に至るまで不可欠である。本研究では、極性情報の下で、細胞骨格の分布や配向が制御され、方向性を伴った細胞内の物質輸送 (メンブレントラフィック) が促されるためのしくみについて研究を行った。その結果、2つの新しいシグナル伝達経路を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要 (英文)：Cell polarity is the most fundamental cue for controlling cellular function including cell morphogenesis and cell migration. Molecular mechanism engaged in this system is indispensable for the cell activity in not only high order life phenomenon such as human development and brain but also survival of unicellular organisms including yeast and protozoa. In this project, I aimed to reveal the molecular mechanism how cytoskeleton organization is established, how membrane transport is spatiotemporally regulated, and how those two important events are related under cell polarity signal. Finally, I have succeeded to find two novel signaling pathways controlling and connecting cytoskeleton organization and membrane traffic in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格、細胞内輸送、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

神経軸索では方向性を伴った細胞の極性成長が、その活動に不可欠である。また細胞極性情報をもとに上皮細胞は組織を形成することができる。このように細胞極性は、細胞の形づくりや細胞運動などを介して細胞機能や機能分化に不可欠な情報であり、酵母のような単細胞真核生物の生存からヒトにおける高次生命システムの構築や維持に至るまで重要である。極性情報の下では、細胞骨格の分布や配向が制御され、方向性を伴った細胞内の物質輸送（メンブレントラフィック）が促される。この過程において低分子量GTPaseを介在したシグナル伝達経路が、特に、Rho GTPaseは細胞骨格に、Rab GTPaseはメンブレントラフィックの制御において、極めて重要な役割を果たすことが分かっている。しかし、これらのシグナルがどのように統合されて、そして細胞が極性を示すのかについては不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞形態が最もシンプルで細胞骨格の細胞内分布がよく調べられている分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を研究対象に用いて、細胞極性情報の発信と、その下流での細胞形態の形成機構について研究を行うことにした。これまでに、研究代表者は細胞の形態形成や細胞質分裂におけるエキソサイトーシスの役割とその制御機構を明らかにするため、分裂酵母の細胞周期や細胞骨格の変化と結び付けてエキソサイトーシスの素過程を調べた。まず、Rabの1種であるYpt2がエキソサイトーシスに必須なことを確認し、細胞の成長端や分裂面などの細胞表層におけるYpt2の細胞内挙動を顕微鏡下で捉えた。そして、Ypt2の細胞内の挙動にはアクチン細胞骨格が必要であることを突き止めた。さらに、この過程におけるフォルミン様蛋白質For3とV型ミオシンMyo4の役割を明らかにしてきた。また、For3の細胞内局在性はRho GTPaseのシグナルの制御下にあることを以前に示している。本研究においては、細胞内のRho GTPase極性情報の機能発現プロセスとメンブレントラフィックを統合するしくみを解明するため、以上のタンパク質とそれらの機能関連因子の分子構造と機能、細胞内動態を中心に研究を進めることにした。

3. 研究の方法

まず、分裂酵母のRho GTPaseとその活性制御因子のうち、Rga4がCdc42のGTP加水分解活性を促進することに着目した。この解析は、米国カルフォルニア大学の塩崎研究室の建部恒博士らとの共同研究である。

次に、Rho GTPaseのシグナル伝達経路の

下流で機能するアクチン繊維束化活性をもつIQGAPの分裂酵母ホモログであるRng2の機能解析を行った。IQGAPはエキソサイトーシスにExocyst複合体の細胞内局在性を制御して関与することが報告されている。そのため、この因子がアクチン細胞骨格の制御下で細胞の極性部位に物質をターゲティングさせる可能性が十分に期待されたからである。

そして、分裂酵母の細胞成長端に局在するPob1の機能について着目した。分裂酵母の野生型の細胞形態は円筒状であるのに対し、この遺伝子の突然変異株では、その細胞形態がレモン型になる。このことは、細胞極性は保たれているものの、極性に従った細胞の成長を正しく行うことができなくなった可能性を示唆する。重要なことに、この *pob1* 変異株の表現型はRho GTPaseの活性を人為的に増強することで回復可能である。つまり、Pob1は極性情報を細胞成長に変換するプロセスに強く関わっていることが期待される。

4. 研究成果

先行研究から、Rho GTPaseのひとつであるCdc42は極性成長をしている細胞端に強く集積することが確かめられた。同時に、Rga4は細胞の胴体部分に集積し、細胞端への局在性が排除されていることが観察された。このRga4の局在様式にはPom1キナーゼが関わる可能性が示唆されている。以前から、*pom1* 遺伝子変異株では分裂酵母の両極性の成長が単極生成長に置き換わることが知られていたが、この原因は不明であった。興味深いことに、建部博士との研究により、*pom1* 遺伝子変異株においてRga4の活性を抑制するとCdc42の局在が単極性から両極性に回復することが判明した。つまり、Pom1はRga4の局在性を制御することでCdc42の細胞端への局在様式を調節していたと考えられた。Pom1は微小管細胞骨格系の支配下でその局在様式が決定されること、Cdc42はアクチン細胞骨格の形成制御に中心的な役割を果たすことを併せると、本研究成果は微小管からアクチン細胞骨格へ、細胞内の空間的構造を配置化する分子機構の一端を解明した点で重要である。この成果は、外国の専門誌に報告した。

一方、Rng2については、科学研究費補助金にて特別研究員として高稲正勝博士を雇用し、生化学的な解析を中心に行った。その結果、Rng2にはアクチン束化活性に加えて、新たにアクチン重合活性があることを見いだすことに成功した。既知のアクチン重合因子であるフォルミンはアクチン繊維のプラス端からの重合を強く促進するのだが、Rng2によるアクチン重合活性は両極性のものであり、細胞内でマイナス端からのアクチン重合が生じる可能性とその細胞学的意義につ

いて論じることができた。特にこの実験結果は、細胞が分裂する際に形成されるアクチン細胞骨格からなる収縮環構造の形成のメカニズムの解明に大きく貢献したといえる。この研究成果は、外国の専門誌に発表した。しかし、IQGAPはエキソサイトーシスに Exocyst 複合体の細胞内局在性を制御して関与することが報告されているが、Rng2 については同様の活性をもつことを示唆する実験結果は得られなかった。

Pob1 の解析については大変に興味深い研究成果を得ることができた。この成果については論文にまとめて、現在、外国の専門誌に投稿している。以下にその概要を記す。まず Pob1 は、その SAM ドメインと周辺領域を介してアクチン重合促進因子である For3 に直接的に結合した。For3 は細胞内のメンブレントラフィックにおける小胞輸送のルールとなるアクチンケーブルの形成に不可欠な因子である。Pob1 の機能は、For3 の細胞内局在の決定に必須であった。確かに、*pob1* 変異株では細胞内のアクチンケーブルが消失していた。しかし、Pob1 の活性は細胞成長に極めて重要であるが、*for3* 遺伝子破壊株では多少の支障は生じるものの細胞は極性成長を継続可能である。そこで、Pob1 の働きはその他にあることを考えた。詳しい経緯は省略するが、Pob1 は Exocyst 複合体の細胞内局在性の制御にも重要であることを発見した。Exocyst 複合体は、細胞膜に位置し、輸送小胞の極性部位へのターゲティングを正に制御する。分裂酵母の場合、Exocyst 複合体の機能を欠損してもしばらくは細胞の極性成長は継続する。そこで、For3 と Exocyst 複合体の活性を同時に消失した細胞株を作製し、表現型を調べた。その結果、この変異株は *pob1* 変異株と同様にレモン型の細胞形状を呈し、増殖を継続することはできなかった。この結果から、Pob1 は Rho GTPase のシグナル伝達経路において2つの重要な因子、すなわちアクチンケーブルをつくる For3 と輸送小胞のターゲティングに重要な Exocyst 複合体、の細胞内機能を統合することで適切な極性成長を促していると考えられた。分裂酵母の細胞体は 15 ミクロン程度と小さいため、細胞内にしっかりとしたアクチンケーブルなどの物質輸送基盤がなくても、ある程度は拡散で成長に必要な物質の供給は最低限可能なのかもしれない。今後、分裂酵母よりもサイズの大きい細胞などで、Pob1 と同様の機能を果たす因子の役割を検証することが興味深いと考えられる。また、Pob1 による Exocyst 複合体の局在制御機構における分子レベルでのメカニズムについてはいくつかのアプローチは行ったものの、未だ体系立てて説明できるような実験結果はえら得ていない。この課題については今後も継続して取

り組みたいと考えている。

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 2 件)

- ① Masak Takaine, Osamu Numata and Kentaro Nakano (2009) Fission yeast IQGAP arranges actin filaments into the cytokinetic contractile ring. EMBO J. vol. 28, 3117-3131. 査読あり
- ② Hisashi Tatebe, Kentaro Nakano, Rachel Maximo, and Kazuhiro Shiozaki (2008) Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. Curr. Biol., vol. 18, 322-330. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

① 中野 賢太郎

「細胞質分裂におけるアクチン細胞骨格の制御機構」

BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) 2008 年 12 月 10 日神戸ポートアイランドにて (兵庫県、国内)

② Kentaro Nakano

Functional analysis of a novel ADF/cofilin-super family protein involved in the organization of actin cytoskeleton in fission yeast.

Asia-Pacific Regional S. pombe Meeting. 2008 年 7 月 26 日 TEMASEK ライフサイエンス研究所およびシンガポール国立大学にて (シンガポール、国外)

[その他]

ホームページ等

<http://www.sbs.life.tsukuba.ac.jp/Nakano/Nakano.html>

及び

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/organelle/index.htm>

をご参照ください。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 賢太郎 (NAKANO KENTARO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：50302815