

機関番号：14301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2010

課題番号：21687017

研究課題名（和文）細胞分裂期における小胞輸送の制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms for the membrane traffic during mitosis

研究代表者

豊島 文子 (TOYOSHIMA FUMIKO)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：40397576

研究成果の概要（和文）：細胞の中には生体膜で囲まれた様々な構造物が存在し、それらの間では膜の出芽と融合によって盛んに物質交換が行われている。細胞が分裂して二つの娘細胞に分かれる時には、これらの膜構造物を均等に分配しなくてはならない。そのため、細胞は分裂する際に膜融合を止めることによって膜構造物を小さくし、数多く分散させる戦略を持っている。本研究では、分裂期に働くことが知られているタンパク質リン酸化酵素 Plk1 が、分裂期において膜融合を阻害する機能を持つことを明らかにし、更にそのターゲットとなる分子の候補を同定した。

研究成果の概要（英文）：In the eukaryotic cells, many kinds of vesicular organelles which are composed of the lipid bilayer exchange their contents by a vesicle transport. In a vesicle transport, the budding and fusion of the membranes are tightly regulated. When a cell divides during mitosis, vesicular organelles should be separated equally into two daughter cells. To this end, cells actively inhibit the membrane fusion to make the vesicular organelles small and increase their number. In this work, we have shown that Plk1, a Ser/Thr kinase that is known to function during mitosis, is necessary for the inhibition of the membrane fusion during mitosis, and identified a candidate molecule for the target of Plk1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
年度			
総計	21,600,000	6,480,000	28,080,000

研究分野：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：細胞分裂、小胞輸送、膜融合、キナーゼ、Rabファミリー、Plk1

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂では、染色体、細胞骨格、膜などの細胞構造体が再編成されダイナミックに動く。個々の動きは、複数の分裂期制御因子により協調性が維持されており、この協調性が破綻すると細胞分裂は異常になり、細胞は

「細胞死」あるいは「がん化」の運命をたどる。近年、細胞—基質間接着を担うインテグリンが、紡錘体形成、細胞質分裂、分裂軸方向などの様々な分裂期の現象を制御することが明らかとなり、分裂期におけるインテグリンの動態および制御機構の解明が重要な

課題となっている。更に、インテグリンは分裂期において、方向性を持った細胞内輸送制御を受けており、この輸送は細胞質分裂の遂行に必要であることが報告された。しかしながら、分裂期におけるインテグリン小胞輸送の分子機構はほとんど不明である。

## 2. 研究の目的

インテグリンは細胞接着や細胞運動に必須の接着因子であり、その制御機構については数多くの研究がなされている。しかしながら、細胞分裂期におけるインテグリンの動態および制御機構は、ほとんど研究がなされていない。本研究では、主にヒト培養細胞であるHeLa細胞を用いて、分裂期の小胞輸送、特にインテグリン小胞の輸送制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

以下3つの項目について解析を行った。

1) 分裂期におけるインテグリン小胞の動態：細胞周期を分裂期で同調させたHeLa細胞を、インテグリンを認識する抗体でラベルし、その動きを固定サンプルと生細胞を用いたタイムラプスイメージングで解析する。また、分裂期に取り込まれたインテグリンがどのコンパートメントに局在するかを観察する。

2) 分裂期制御因子によるインテグリン小胞輸送の制御機構の解析：これまでの研究で、分裂期を制御するキナーゼが、分裂期のインテグリン小胞輸送を制御することを示す予備的結果を得た。本研究ではまず、そのキナーゼ活性の必要性について、siRNA耐性の変異体と阻害剤を用いて検討する。特に、分裂期初期でのインテグリンの取り込み、細胞質分裂期での分裂溝への輸送、インテグリンが局在する小胞の種類の変化等に注目して解析を行う。

3) インテグリン小胞輸送制御における、分裂期制御因子のターゲットの特定とその分子機構の解明：キナーゼのリン酸化コンセンサス配列を元に、インテグリン小胞の輸送に関わるキナーゼの基質の同定を行う。さらに、そのリン酸化の生理学的意義を解析する。

## 4. 研究成果

本研究では以下の4点が明らかとなった。

1) 分裂期においてインテグリンは初期エンドゾームに留まっている：分裂期に取り込まれたインテグリンは、初期エンドゾームのマーカであるEEA1と共局在することから、分裂中期までは初期エンドゾームに留まっていることが分かった。また、インテグリンだけでなく、EGFやトランスフェリンもエン

ドサイトーシスされた後、初期エンドゾームに留まっていた。

2) Polo-like-kinase1 (Plk1) はキナーゼ活性依存的に、分裂期の初期エンドゾームの融合を阻害する：分裂期に主要な役割を果たすセリン・スレオニンキナーゼであるPlk1が分裂期の小胞輸送を制御する可能性について検討した。Plk1の特異的阻害剤で細胞を処理し、抗インテグリン抗体で細胞染色したところ、M期においてインテグリン小胞の肥大化が観察された。同様の現象は、Plk1をsiRNAにより発現抑制した場合も観察され、かつsiRNA耐性のPlk1の発現によりレスキューされたことから、Plk1が分裂期におけるインテグリン小胞を制御することが分かった。また、インテグリンだけでなく、EGFやトランスフェリン小胞や初期エンドゾームのマーカであるEEA1でも肥大化が観察された(図1)。

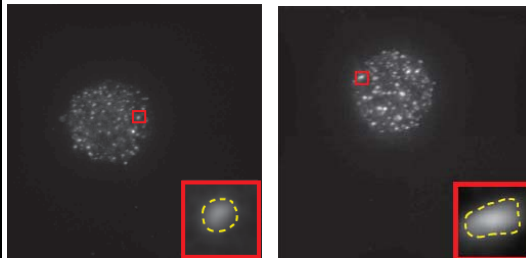


図1：コントロール細胞(左)とPlk1ノックダウン細胞(右)の分裂期における初期エンドゾーム。

これを定量化するため、分裂期の細胞の3次元画像を取得し、画像解析により各初期エンドゾームの体積をVoxel値で表した(図2)。その結果、Plk1の阻害により初期エンドゾームの体積が優位に上昇することを定量的に示すことができた。以上のことから、Plk1は分裂期において初期エンドゾームを制御することが分かった(図3)。

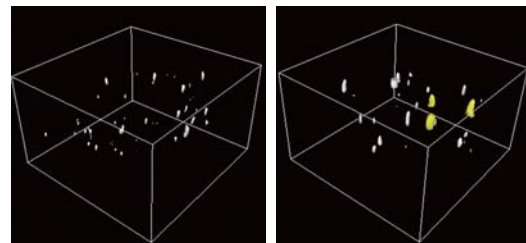


図2：コントロール細胞(左)とPlk1ノックダウン細胞(右)の分裂期における初期エンドゾームを画像解析により立体構築した。Plk1ノックダウン細胞では、コントロール細胞では見られないような肥大化したエンドゾームが検出された(右、黄色)。

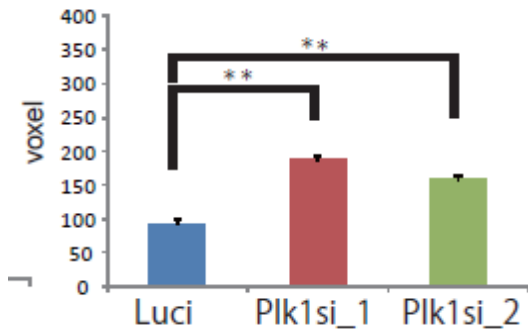


図3：コントロール細胞 (Luci) と Plk1 ノックダウン細胞 (Plk1si\_1, 2) での初期エンドゾームの体積を voxel で表した。

分裂期では、初期エンドゾームの膜融合が抑制されることが知られている。そこで、2種類の蛍光で標識した EGF を分裂期の細胞に時間差で取り込ませたところ、コントロールの細胞では2種の蛍光が混ざることはないが、Plk1 を阻害した場合は共局在を示した。このことから、Plk1 は分裂期における初期エンドゾームの融合を阻害することが示された。

次に、Plk1 のキナーゼ活性の必要性について検討するため、Plk1 をノックダウンした細胞にキナーゼ不能型の Plk1 を発現させ、分裂期の初期エンドゾームの肥大化を観察した。その結果、野生型の Plk1 では肥大化が抑制されるが、キナーゼ不能型では抑制されなかった (図4)。このことから、Plk1 による分裂期初期エンドゾームの融合阻害には、そのキナーゼ活性が必要であることが分かった。

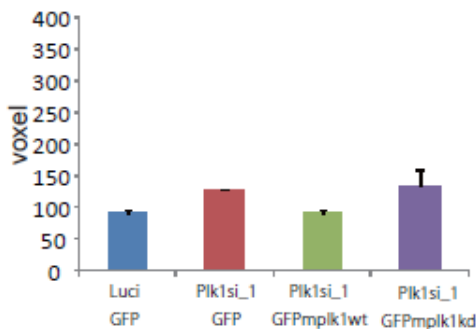


図4：Plk1 ノックダウン細胞へのレスキュー実験。GFPmpk1wt (siRNA 耐性の野生型マウス Plk1)。GFPmpk1kd (siRNA 耐性のキナーゼ不能型マウス Plk1)。

3) **Rab5 は分裂期に活性型が増加する**：初期エンドゾームの融合には低分子量 G タンパク質 Rab5 が必須であることが知られている。Rab5 は不活性型である GDP 結合型と活性化型である GTP 結合型として存在する。そこで、細胞周期の進行に伴う Rab の活性変

動を GST-pulldown アッセイで測定したところ、分裂期においては GTP-Rab5 (活性型) の量が増加することを見出した。このことは、分裂期では初期エンドゾームの融合が阻害される現象とは相反する現象である。従って GTP-Rab5 の機能を阻害する別の機構が分裂期には存在することが予想され、現在解析を進めている。

4) **Plk1 は分裂期における Rab5 の活性化に必要である**：分裂期で見られる GTP 結合型 Rab5 の増加に Plk1 が関与するかを検討した。Plk1 の特異的阻害剤や siRNA による機能抑制を行ったところ、分裂期での GTP-Rab5 の量が顕著に減少したことから、Plk1 は分裂期での GTP-Rab5 の増加に必要であることが分かった。さらに、Rab5 のアミノ酸配列上には Plk1 のリン酸化コンセンサス配列が4カ所存在することを見出した。現在、Plk1 が Rab5 を直接リン酸化する可能性とその生理学的意義について検討を行っている。

#### 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0件)

〔学会発表〕 (計3件)

1) 豊島文子、Polo-like kinase 1は細胞分裂期において初期エンドゾームの融合を阻害する

第2回細胞内ロジスティクス班会議

2010年6月30日-7月1日、札幌

2) 井川敬介、松村繁、福田光則、豊島文子、Polo-like kinase によるインテグリントラフィックの制御

第82回日本生化学会大会

2009年10月21-24日、神戸

3) 豊島文子、ポロキナーゼによるインテグリントラフィッキング制御とその破綻

第1回細胞内ロジスティクス班会議

2009年11月9-12日、沖縄

〔図書〕 (計0件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊島 文子 (TOYOSHIMA FUMIKO)  
京都大学・ウイルス研究所・教授  
研究者番号：40397576

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：