

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460362

研究課題名(和文)細胞質分裂を制御する新たなシグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文)Analysis of novel signaling pathways that regulate mammalian cell cytokinesis

研究代表者

足立 誠(adachi, makoto)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30335244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：IQGAP3による細胞質分裂制御に関わる直接のエフェクターとしてAnillinを同定した。AnillinとIQGAP3は直接結合し、分裂期細胞の分裂溝で共局在した。そしてIQGAP3はAnillinの局在を制御することで細胞質分裂を制御していることを明らかにした。またIQGAP1はAnillinとは結合せず分裂溝への局在も認められなかったが、IQGAP3とは異なる分子メカニズムで細胞質分裂に関与することを明らかにした。IQGAP1,3のノックアウト細胞を新たに作成し表現型の検討中である。IQGAP3の新規結合因子を同定し、その機能解析を行なっている。

研究成果の概要(英文)：We have found that anillin acts as an effector of IQGAP3 and mediates the function of IQGAP3 to regulate the process of mammalian cell cytokinesis. Anillin was found to directly interact with IQGAP3 and co-localize with IQGAP3 at the cleavage furrow in mitotic cells. It was shown that IQGAP3 is responsible for mammalian cell cytokinesis because of its ability to regulate the localization of anillin at the cleavage furrow. In addition, we have found that IQGAP1, another member of IQGAP family proteins, is also responsible for cytokinesis in mammalian cells, but it did so utilizing a molecular mechanisms distinct from that of IQGAP3. We have established IQGAP1- and IQGAP3-null cultured cells and are analyzing their phenotype in detail. Also, we have found a novel binding partner of IQGAP3 and are analyzing its molecular function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞質分裂

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者らは以前、上皮細胞間接着装置の裏打ちに局在する新規因子として IQGAP3 を同定した。この分子は IQGAP ファミリー(哺乳類では IQGAP1,2,3 からなる)に属するが、IQGAP1,2 について細胞接着・細胞骨格の制御への関与が知られていた一方で、IQGAP3 については神経細胞の突起伸長へ関与を示唆する報告があったものの、その分子機能はほとんど未知であった。しかし本研究代表者らは IQGAP3 が G₁/S(G₂/M)期の制御を行なうことで細胞の増殖に重要な機能有することを明らかにした(Nojima H., Adachi M., et al. (2008) *Nat.Cell.Biol.* 10:971-978)。さらにその後の研究で、IQGAP3 が細胞質分裂の制御にも関わっていることが明らかになった。すなわち IQGAP3 は metaphase の細胞の分裂溝に強く濃縮し、telophase には2娘細胞の離脱に必要な midbody に局在する。そして IQGAP3 の RNAi によって分裂溝陥入異常が引き起こされた。これまで酵母や線虫で IQGAP ホモログ分子の細胞質分裂への関与を示唆する報告はあったが、哺乳類の細胞質分裂における IQGAP の機能的関与が明らかになったのは初めてである。しかし、本研究課題開始以前までには IQGAP3 が具体的にどのような分子機構でこの過程を制御しているのかは明らかにできていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題においては上述の点を踏まえ、下記の4つの側面から研究を行いたいと考えた。

課題1: IQGAP3による細胞質分裂制御の直接のエフェクターの同定とその作用機構の解明

本研究代表者らは本研究課題開始までの研究で、哺乳類培養細胞における IQGAP3 の siRNA が細胞質分裂に異常を引き起こすことを初めて明らかにしていた。しかしながら、IQGAP3 が具体的にどのような分子メカニズムで細胞質分裂過程を制御しているのかは明らかにできていなかった。本研究代表者は本研究課題開始までに免疫沈降・質量分析法などを用いて分裂期の細胞で IQGAP3 と結合する分子を探索し、その結果機能未知の分子を含め、IQGAP3 のエフェクターとなり得る分子の候補を複数同定した。更に、これらの中には実際にその siRNA が IQGAP3 の場合と同様に細胞質分裂異常を引き起こすものが複数含まれていた(以下、便宜上これらを新規因子群と呼称する)。しかしながら、これらが実際に IQGAP3 の制御を受けて機能している(エフェクターである)可能性は低いと見ていた(IQGAP3 の siRNA でこれらの分子の挙動(局在・発現量・リン酸化レベル・電気泳動パタ

ーンなど)に有意な変化が認められない。またこれらの分子の siRNA の表現型の現れる時期および形質が詳しく見ると IQGAP3 のそれとは異なっている)。また、複数の既知の細胞質分裂制御因子および IQGAP3 結合因子についても同様に調べたが、エフェクターの候補となり得る分子は見つかっていなかった。そこで本研究課題においては、以下の3つの側面からエフェクターの同定を試みることを考えた。(1)免疫沈降・質量分析法の手法の改善を行い、新たなエフェクターの候補を探索する。具体的には、免疫沈降に用いる細胞の細胞周期の同調時期を変更、また免疫沈降の手法を改良する。(2) yeast two-hybrid 法を用いて IQGAP3 の新規結合分子を同定する。(3)本研究代表者が以前行なったマイクロアレイ解析において、IQGAP3 の発現を抑制した時に発現量が顕著に低下する遺伝子が複数見ついている。細胞内における蛋白質同士の結合が両者の安定化に寄与している場合が多く見られることを考えると、これらの中に IQGAP3 の直接のエフェクターが含まれている可能性が考えられる(ただし、発現量低下の見られた分子の多くは直接の相互作用の無いものであると考えられること、また結合の不安定化に伴う蛋白発現量低下が必ずしも遺伝子発現の低下を伴うものでない可能性があることは予め考慮が必要)。この点を検証する。

課題2: IQGAP3 ノックアウト細胞の作成および解析

IQGAP3 の RNAi による発現抑制では比較的に弱い影響しか見られていない。本研究代表者は本研究課題開始までに複数の手法 (siRNA, shRNA, lentivirus-shRNA) を使い、各々条件の至適化を行なった上で10種類以上のターゲット配列で IQGAP3 の RNAi を試みてきたが、最も効率が良かった場合でも発現抑制効率が50%を超えることは無かった。これはホモログである IQGAP1 に対して同様の手法で行なった3つのターゲット配列による RNAi において、そのいずれもが 90%以上の抑制効率を示したことから非常に対照的だった。すなわち IQGAP3 は何らかの理由で RNAi による発現抑制を非常に受けにくい性質を持っているものと推察され、このことが弱い表現型しか見られないことの一因になっていると思われた。本研究代表者は以前に、今回と同様 RNAi ではその機能解明が困難だった細胞内シグナル分子に対し、哺乳類培養細胞での遺伝子ノックアウトを行なうことで初めてその機能を明確に示すことに成功している(Adachi et al. (2006) *Mol.Cell.Biol.* 26:9003-9015)。そこで本研究においてもこの経験を生かし、IQGAP3 遺伝子のノックアウト細胞を作成し、その表現型を解析することで IQGAP3 の機能をより正確に解明したいと考えた。

課題3:適切なフォールディングを持つ IQGAP3の組換え蛋白質の発現と精製

IQGAP3の制御・機能を生化学的に明らかにする上で組換え蛋白質を用いた *in vitro* の実験系は必要不可欠であるが、IQGAP1の組換え蛋白質が容易に得ることができている一方で、IQGAP3では様々なコンストラクトを検討し、また大腸菌・昆虫細胞などの発現系の選択、バッファー条件の改良などを試みてきたにもかかわらず、ほぼ全ての例で発現した蛋白質が不溶性画分へ落ちてしまい、適切な組換え蛋白質が得られていなかった。このことはIQGAP3の研究の進展を阻害する大きな要因になっている。唯一、哺乳類培養細胞での過剰発現系においてのみ機能的な蛋白質が得られていると考えているが、発現量が低く(収量は培養液 1L あたり多くて数十 μg 程度)、また精製過程でのロスが激しいことから、活性測定などの生化学的アッセイに十分な量・質を有する組換え蛋白質を得るのが困難な状況にあった。そこで本研究課題においては、哺乳類培養細胞系での組換え蛋白質の多量発現・精製系の確立を目指したい。

課題4:細胞質分裂制御機構の新たな側面の解明(発展的課題1、2)

(1)上述の新規因子群の中にはこれまで細胞質分裂との関与が全く報告されていなかったものが複数存在する(全く新規の分子も存在した)。これらの分子の機能をIQGAP3との関連の有無(IQGAP3の上流因子として機能している、他のIQGAPファミリー分子と相互作用している、IQGAP3と分裂溝で間接的に結合している、などの可能性が考えられる)を含めて詳しく解析する。これら新規因子が既知の制御因子の作るシグナル伝達ネットワークの中で、あるいは全くその外部で、どのように機能しているかを明らかにすることで、細胞質分裂制御の新たな側面が見出せるのではないかと考えている。

(2)様々なアレイのデータベースを解析したところ、IQGAP3の発現異常と複数の癌種との間に正または負の相関があることが見出された。しかしながら、その基となる分子メカニズムは不明である。一方、細胞質分裂の異常が癌化を引き起こす要因となることが知られており(ゆえに実際、分裂制御因子に対する阻害剤が制癌剤として現在複数開発されている)、このことは本研究代表者の見出したIQGAP3の発現阻害による細胞質分裂の異常が癌化に関わっている可能性を強く示唆する。そこで本研究においてこの仮説を注意深く検証したい。またこの際、IQGAP3の発現上昇と癌との関連についても、IQGAP3の細胞周期制御に関わる機能との関連が疑われることから、IQGAP3の分子機能の理解という観点から、併せて検討したい。

3. 研究の方法

[平成25年度]

課題1:細胞分裂期にIQGAP3と相互作用する分子を同定する。(1)分裂期のHeLa細胞から細胞懸濁液を調製して抗IQGAP3抗体で免疫沈降し、精製画分をSDS-PAGEする。IQGAP3の免疫沈降に特異的なバンドを切り出し、質量分析によって同定する。この際、より明確なバンドを得るため以前はノコダゾール処理によってprometaphaseに同調した細胞を用いていたが、今回はIQGAP3が実際に機能する時期(RNAiによって表現型が現れる時期)であるanaphase~telophaseに同調した細胞を用いる、免疫沈降時の非特異的吸着を減らすため、懸濁液を粗分画する、懸濁液を予めDNAase処理することでDNA結合蛋白質の非特異的な回収を抑える、などの工夫をする。(2)IQGAP3の複数の領域をbaitとして、分裂細胞を多く含むと考えられる小腸などの組織のライブラリーを用いてyeast two-hybridスクリーニングを行なう。(3)以前行なったマイクロアレイデータを解析し、IQGAP3のsiRNAによって発現低下が見られた遺伝子の中で、その予想される機能や細胞内局在が分裂溝と関連深いものを見つけ出す。

課題2:Tet-offシステムによってDox(doxycycline)非存在下で外来のGFP-IQGAP3を内在性のIQGAP3と同量程度発現できるHeLa細胞株を作製・選択し、発現誘導・抑制がDoxによって厳密に調節できることを確認する。このHeLa細胞(TofG3-HeLa)のkaryotypeを確認し、IQGAP3遺伝子のある1番染色体の本数が正常に2本である細胞株を選択する。1st,2ndの2つのターゲティングベクターを作製する(HeLa細胞のゲノムDNAを鋳型としてPCRで各アームを増幅する)。なおIQGAP3遺伝子の開始コドンは1st exon上にあり、1stベクターと2ndベクターは5'側のアーム配列は共通だが、3'アーム配列は全くオーバーラップの無い別々の領域を使用する。1stベクターをTofG3-HeLa細胞に導入し(理由は後述)、neomycin耐性クローン約1000コロニーをPCRにてスクリーニングし、相同組換えによって一方のアリルがノックアウトされたシングルノックアウト細胞を得る。最終的にサザンブロットングによっても確認する。

課題3:CO₂供給装置の付いた哺乳類培養細胞用震盪培養装置にて293F細胞もしくはCHO細胞を大量培養し、IQGAP3の発現コンストラクトをリポフェクションによって一過的に多量発現する。コンストラクトにはTEVプロテアーゼで切り離し可能なflagタグもしくはGST-Hisタンデムタグを付加しておく。前者は比較的精製が容易だが精製に使用する抗体・担体が高価、後者は精製に手間がかかり収率も若干落ちるが、担体が何度

も再利用可能で安価な精製が行なえる。いずれかの方法で粗精製後 TEV プロテアーゼによってタグを切り離し、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムなどを組み合わせて精製する。コンストラクトの種類、バッファー条件、精製方法の組み合わせ方、などを検討して最適な精製条件を確立する。

課題4: (1)新規因子群の細胞質分裂における機能をより詳細に検討する。各因子の siRNA の表現型を、生細胞のタイムラプス顕微鏡観察、既知細胞質分裂制御因子の動態(細胞内局在、発現量およびリン酸化などの翻訳後修飾)の解析、既知制御因子との相互作用の解析、などで明確にする。また他の IQGAP ファミリー分子と相互作用するかを検討する。(2)様々なマイクロアレイデータベースを検討した結果、IQGAP3 遺伝子の発現に複数の癌種で正または負の相関があった。前者は IQGAP3 の持つ G₁/S 期(G₂/M 期)制御能との関連、後者は IQGAP3 阻害による細胞質分裂異常で引き起こされる多核化との関連が疑われる。そこでまず *in silico* 解析から IQGAP3 と関連が特に高いと推測される癌種について、当該癌細胞由来の RNA を、研究協力者からの供与を募るか、市販のものを購入して入手する。これらにおける IQGAP3 の発現量が正常臓器に対し有意に変化しているかを定量的 RT-PCR などで検討する。

[平成26年度以降]

課題1: 同定された新規結合分子の cDNA をクローニングして発現ベクターを作成し、各分子が IQGAP3 と結合するかを免疫沈降によって確認する。結合が確認出来たものは、抗体(必要に応じ自作)を用いてその分子挙動(細胞内局在・発現量・翻訳後修飾)が IQGAP3 の siRNA で変動しないかを検討する。また各分子の siRNA による細胞質分裂への影響を解析する。結果 IQGAP3 のエフェクターと判断できた分子は、その IQGAP3 との結合の制御機構を、各種欠損型コンストラクトを用いた結合部位の同定、細胞周期に伴う内在性分子間での結合の変動、翻訳後修飾の関与の有無、などを調べて明らかにする。また、各分子の siRNA が既知の細胞質分裂制御因子の分子挙動に与える影響を明らかにする。

課題2: もう一方のアリル上の IQGAP3 遺伝子を、2nd ベクターを用いて同様にターゲティングする(選択薬剤は hygromycin)。1st ベクターで組換えを起こしたアリル上には 2nd ベクター上の 3' 側ゲノム領域と相同な配列が無い(組換えによって取り除かれている)ので、2nd ベクターは組換えを起こしていないアリルにのみターゲティングし得る。このためスクリーニングする必要のあるクローン数を大幅に減らすことが可能になってい

る。得られたロックアウト細胞のゲノムの性状がサザンプロットングによって最終的に確認できたら、Dox を添加して外来の GFP-IQGAP3 の発現を完全に抑制し、その後の細胞の表現型を様々な詳細に記述する。なお、IQGAP3 の恒常的発現阻害は多核化を引き起こすため、tet-off システムによって通常時に IQGAP3 の発現を誘導しておくことが細胞株を安定して維持するために必要となる。

課題3: 目的に応じた IQGAP3 の組換え蛋白質のコンストラクトを作成し、発現精製する。エフェクターの組換え蛋白質(昆虫細胞系で発現精製。必要の場合は哺乳類培養細胞系を使用)との結合の解析においては Biacore X(所属研究科共通機器)を用いて両者の解離定数 Kd を求め、*in vivo* にて有意に生じ得る強度の結合であるかを確認する(Kd が nM オーダー程度)。リン酸化などの翻訳後修飾が関与すると想定された場合は、組換え蛋白質の *in vitro* リン酸化によって修飾を受けるアミノ酸残基を同定し(キナーゼ阻害剤などを用いた HeLa 細胞での細胞生物学的解析の結果と併せて検討する)、該当残基の変異もしくはリン酸化の影響を検討する。必要に応じ結合が他の制御因子と競合しないかについても検討する。

課題4: (1)他の IQGAP ファミリー分子と相互作用が認められた新規因子群については、両分子間の機能的関連、およびそれらが制御する経路の IQGAP3 の経路との関係を詳細に検討する。この点も併せ、今回明らかになった制御機構と既知の細胞質分裂制御のシグナル伝達経路とがどのようなネットワークを形作っているかを描いた時、これまで明らかにならなかったクロストークやフィードバック制御など、新たな制御機構の存在が浮かび上がってくる可能性がある。それを実験的に実証することを試みる。(2) IQGAP3 の発現減少(または発現増加)と有意な関連が認められた癌種のモデル細胞系が存在する場合、その形質(多核など)を詳しく観察し IQGAP3 の過剰発現(または RNAi による発現阻害)が癌の形質を抑制的するか検討する。また逆にその癌種に対応する正常組織由来の細胞に IQGAP3 を過剰に発現させた時(または発現を抑制した時)の細胞増殖・形質転換への効果をヌードマウスへの細胞移植、トランスジェニックマウスおよび培養細胞の *in vitro* コロニー形成アッセイ系などで検討する。これらによって IQGAP3 と癌とに機能的な関連があるのかを明らかにする。

4. 研究成果

課題1: 本研究代表者らは、IQGAP3 による細胞質分裂制御に関わる直接のエフェクターとして Anillin を同定することに成功した。Anillin は分裂

期の細胞の分裂溝においてIQGAP3と共局在し、また免疫沈降実験から両者がこのとき細胞内で複合体を作っていることを明らかにした。さらに組換え蛋白質を用いた in vitro アッセイから、両者は直接結合する能力があることが明らかになった。細胞内でIQGAP3の発現をRNAiによって抑制すると Anillin の分裂溝局在が低下したことから、IQGAP3 は分裂溝の構成分子の多くのスカフォールドとして働く Anillin の局在を制御することで細胞質分裂を制御していることが示唆された。なお IQGAP3 の分裂溝局在は逆に Anillin のRNAiによって強く阻害されたことから、両者の分裂溝局在は相互依存的であることが明らかになった。また、他の IQGAP ファミリー分子であるIQGAP1 もまたIQGAP3とは異なる分子メカニズムで細胞質分裂に関与することを明らかにした。IQGAP1 は Anillin とは結合せず分裂溝への局在も認められなかったが、その発現抑制はIQGAP3 のそれと類似した分裂以上を引き起こした。

課題2:当初は旧来のターゲティングベクターを用いた手法によるIQGAP3 ノックアウト HeLa 細胞株の樹立を目指していたが、CRISPR/Cas9 を用いた手法に切り替え、その細胞株の樹立に成功した。現在その表現型の検討を行っているが、理由は不明ながら、複数樹立した細胞株ごとの表現型に大きなばらつきがあり、正確な分子機能の記述ができない状況にある。現在あらためて各ノックアウト細胞における遺伝子の変異導入の性状を確認し直しているが、併せて異なる細胞種でのノックアウト細胞株の作成も並行して進めている。

課題3: IQGAP3 のさまざまなドメインの組換え蛋白質の発現精製を行なったが、昆虫細胞発現系を用いた条件検討の結果 MBP などの可溶性タグを付加することで十分な発現量を得ることができたドメインがあった一方、様々な改良を試みたものの全く発現の得られないドメインもあった。現在前者について生化学的解析を進めている。なお哺乳類細胞発現系も検討していたが、遺伝子導入法の問題(発現量が不安定・高額の費用が必要・など)および発現量が総じて低い問題点を克服できなかった。

課題4:(1)新規因子群について前述したような様々な側面から検討を行ったが、IQGAP3 による細胞質分裂制御との機能的な関連は認められなかった。またこれらの因子による細胞質分裂の制御機構について、それ以上の解析は現在まで進められていない。ただ、うち1つの因子について細胞質分裂以外の側面での IQGAP3 との機能的関連があると考えられたため、その点について解析を進めている。(2)IQGAP3 と癌との関連については、十分な解析を進めることが

できなかった。

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 1件)

Adachi, M., Kawasaki, A., Nojima, H., Nishida, E. and Tsukita, S. Involvement of IQGAP family proteins in the regulation of mammalian cell cytokinesis. *Genes Cells.* (2014) 19, 803-820

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gtc.12179/full>

[学会発表](計 1件)

足立 誠、河崎麻実、野島 久、西田栄介、月田早智子 Involvement of IQGAP family proteins in the regulation of mammalian cell cytokinesis. 2013年 第36回日本分子生物学会年会

[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

足立 誠(ADACHI, Makoto)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：3 0 3 3 5 2 4 4

(2)研究分担者

(3)連携研究者