

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891017

研究課題名(和文)細胞質分裂における膜ダイナミクスの時空間制御機構の解明

研究課題名(英文)Spatial and temporal regulation of membrane dynamics during cytokinesis

研究代表者

竹田 哲也(Takeda, Tetsuya)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30302368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：F-BARドメイン蛋白質シンダピンは、細胞質分裂における膜動態に重要な機能を持つ。シンダピンはリン酸化により機能制御されるが、その制御を行うキナーゼとホスファターゼは不明であった。本研究では、シンダピンの脱リン酸化にPP1ホスファターゼが必要であることを、ショウジョウバエ培養細胞におけるPP1のRNAiにより明らかにした。一方、シンダピンがポロ様キナーゼPlk1によってリン酸化されることを、in vitroリン酸化実験により明らかにした。以上の結果より、細胞質分裂におけるシンダピンの機能が、PP1ホスファターゼおよびポロ様キナーゼによって時空間的に制御される可能性を世界に先駆けて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：F-BAR domain protein Syndapin is essential for membrane dynamics during cytokinesis. Syndapin is phosphoregulated in cytokinesis but responsible kinases and phosphatases remained unclear. In this study, we identified PP1 phosphatases are required for Syndapin localisation to the cleavage furrow during cytokinesis. Furthermore, one of the essential mitotic kinases Plk1 directly phosphorylated Syndapin in vitro. These results suggested that Syndapin function during cytokinesis is spatially and temporally phosphoregulated by counter action of PP1 phosphatases and Polo-like kinase.

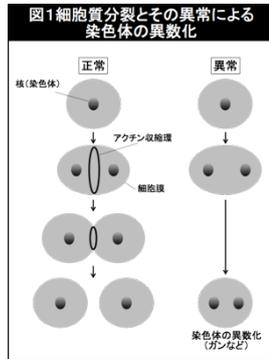
研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞質分裂 F-BAR

1. 研究開始当初の背景

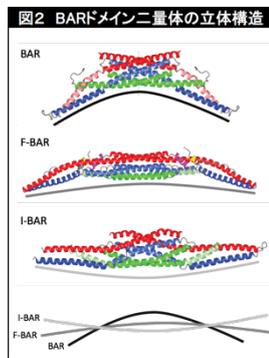
(1) 細胞質分裂における膜動態の機能

細胞分裂の最終段階である細胞質分裂は、アクチン収縮環の収縮力によって細胞をくぶり切り、染色体を娘細胞に均等に分配する上で重要な機能を担う。細胞質分裂の異常は、染色体の異数化(aneuploidy)を引き起こし、ガンなどの原因になる(図1)。近年の研究で、細胞質分裂の正常な進行には、アクチン収縮環だけではなく、細胞膜の変形や切断といったダイナミックな膜動態が重要な機能を持つことが明らかになってきた。しかし細胞質分裂における膜動態の機能およびその制御機構の解明は進んでおらず、細胞生物学におけるフロンティアになっている。



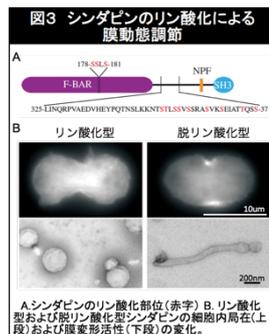
(2) 細胞質分裂における BAR ドメイン蛋白質の機能

BAR ドメイン蛋白質は、膜の曲面形成と曲率感知に働く蛋白質で、エンドサイトーシス、細胞運動、細胞分化など、膜動態に関わる多様な生命現象において重要な機能を持つ。BAR ドメイン蛋白質の膜結合モジュールである BAR ドメインは、異なった曲率の曲面を持つ二量体を形成し、その曲率に基づいて BAR ドメイン、F-BAR ドメイン、I-BAR ドメインに分類される(図2)。F-BAR ドメイン蛋白質は、分裂酵母や動物細胞の細胞質分裂に必須の機能を持つことが明らかになっている(文献①、②、③)が、その時空間的な制御の仕組みは全く明らかになっていなかった。



(3) F-BAR ドメイン蛋白質の細胞質分裂における膜動態制御の発見

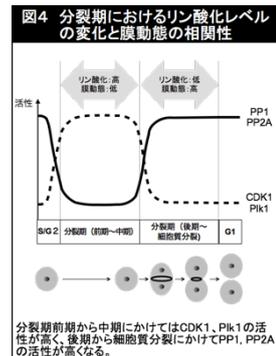
私は先行研究において、分裂酵母の F-BAR ドメイン蛋白質 Cdc15p が、アクチン収縮環形成だけでなく、細胞質分裂における膜ドメイン形成にも重要であることを明らかにした(文献②)。さらにショウジョウバエの F-BAR 蛋白質シンダピンの解析から、F-BAR ドメイン蛋白質が動物細胞の細胞質分裂にも必須の機能をもつことを世界に先駆



けて明らかにした(文献③)。シンダピンは細胞質分裂における膜動態調節に必要であり、その機能はリン酸化制御を受け、膜変形活性を持つ脱リン酸化型シンダピンが細胞質分裂での機能をもつ(図3;文献③)。しかし、細胞質分裂におけるシンダピンのリン酸化制御に関わるキナーゼやホスファターゼは明らかになっていなかった。

(4) 細胞質分裂における膜動態の時空間制御の必要性

細胞質分裂では、染色体分離が起こるタイミングで、分離される染色体の間の限定された領域の細胞膜が陥入することが、染色体の異数化を防ぐために不可避である。このような時空間的に制御された膜動態には、リン酸化のような迅速かつ可逆的な調節機構が必要であると考えられるが、その機構は不明である。既に知られているように、細胞分裂期(M期)前期から中期にかけては、サイクリン依存性キナーゼ(CDK1)、ポロ様キナーゼ(Plk1)などのM期キナーゼが活性化し、細胞分裂の開始や進行を司る。一方、細胞分裂期後期から細胞質分裂にかけては、M期キナーゼのプロテアソームによる分解と、M期キナーゼと拮抗して働くホスファターゼ(PP1やPP2A)の活性化が起こることで、細胞質分裂が進行する(図4)。シンダピンのリン酸化制御は細胞分裂時の膜動態活性のスイッチとして働く可能性があり、その機構を明らかにすることは、細胞質分裂時の膜動態制御機構の全体像を解明する上でのブレークスルーになると考えた。



2. 研究の目的

本研究では、シンダピンのリン酸化に関わるキナーゼ、ホスファターゼを同定し、リン酸化によるシンダピンの機能制御機構を明らかにするとともに、高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いたライブイメージングによって、膜変形におけるシンダピンの分子動態を明らかにし、未解明であった細胞質分裂における膜ダイナミクスの調節機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シンダピンの機能調節に関わるキナーゼおよびホスファターゼの同定

シンダピンのリン酸化調節に関わるキナーゼとホスファターゼを、ショウジョウバエ培養細胞における網羅的機能阻害スクリーニングによって同定する。機能阻害には RNAi や特異的阻害剤を用い、シンダピンの局在やダイナ

ミクスを指標に、その機能調節に必要なキナーゼ・ホスファターゼを特定する。

(2) シンダピンのリン酸化・脱リン酸化の時空間調節の解明

シンダピンの細胞質分裂での機能調節に必要なリン酸化部位を同定し、リン酸化特異的抗体を用いて、シンダピンが細胞分裂過程の「いつ」「どこで」リン酸化修飾を受けるのか、その時空間分布を明らかにする。さらにリン酸化変異体を細胞に導入し、リン酸化の細胞質分裂における機能を *in vivo* において解析する。

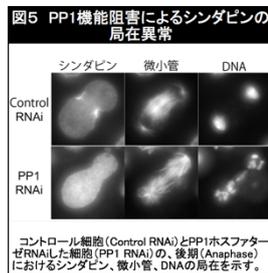
(3) シンダピンのリン酸化による機能制御機構の高速 AFM 解析

in vitro でシンダピンが膜変形(チューブ化)を起こす過程を高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)でライブイメージングし、膜の変形に相関した分子動態を明らかにする。さらにその分子動態が、シンダピンのリン酸化によってどのように調節されるのかを解析し、シンダピンの機能制御を分子構造レベルで解明する。

4. 研究成果

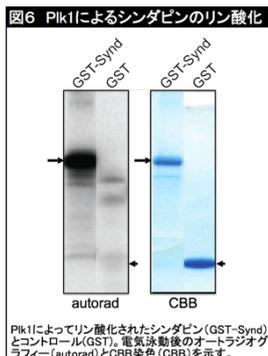
(1) シンダピンの機能調節に関わるキナーゼおよびホスファターゼの同定

先行研究より、シンダピンの脱リン酸化には PP1 ホスファターゼが関与する可能性が高いことがわかっていた(文献③)。ショウジョウバエには、4種類の PP1 ホスファターゼ触媒サブユニット



(flw, Pp1 α -96A, Pp1-87B, Pp1-13C)が存在する。そこでショウジョウバエ培養細胞

(D, Mel-2)においてこれらのPP1をRNAiによって発現抑制すると、シンダピンが分裂面に局在できなくなり、さらに細胞質分裂が異常になることが明らかになった(図5)。一方、シンダピンはリン酸化されると、膜変形活性が不活性化されることが明らかになっていた(文献③)。そこでシンダピンのリン酸化に関わるM期キナーゼを *in vitro* リン酸化系を用いてスクリーニングしたところ、ヒトポロ様キナーゼ P1k1 がシンダピンを直接リン酸化することが明らかになった(図6)。これらの結果は、シンダピンのリン酸化状態がPP1とポロ様キナーゼによって調節され、細胞質分裂における膜動態が時空間



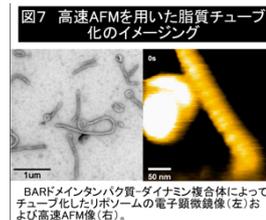
的に制御される可能性を世界に先駆けて示した。

(2) シンダピンのリン酸化・脱リン酸化の時空間調節の解明

PP1 およびポロ様キナーゼによってリン酸化制御を受ける部位を同定し、リン酸化特異的抗体やリン酸化変異体などを用いて、シンダピンリン酸化の時空間的分布や、リン酸化によるシンダピンの機能におよぼす影響を調べることを計画していたが、本研究期間中に実施できなかった。本実験については、今後実施していきたいと考えている。

(3) シンダピンのリン酸化による機能制御機構の高速 AFM 解析

シンダピンによる膜変形機構を構造生物学的に明らかにするため、高速 AFM による解析を計画していたが、期間中に実施できなかった。しかし、BARドメイン蛋白質である、アンフィファイジンによって *in vitro* で形成される脂質チューブについて、高速 AFM によるイメージングに成功した(図7)。今後はこの系を用いて、シンダピンが膜をチューブ化する際の分子動態、さらにそのリン酸化による影響を明らかにしていく予定である。



<引用文献>

- ① Fankhauser et al., *Cell* 1995
- ② Takeda et al., *Nat. Cell Biol.* 2004
- ③ Takeda et al., *Open Biol.* 2013

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① 竹田 哲也、細胞質分裂における膜ダイナミクスの機能、生物物理、査読あり、56(1)、2016年、013-017
- ② Yamada, H., Kikuchi, T., Masumoto, T., Fan-Yan Wei, F-Y., Abe, T., Takeda, T., Nishiki, T., Tomizawa, K., Watanabe, M., Matsui, H. and Takei, K., Possible role of cortactin phosphorylation by protein kinase C α in actin-bundle formation at growth cone, *Biol. Cell*, 査読あり、107、2015、1-12

[学会発表] (計4件)

- ① 竹田 哲也、熊谷 祐介、背山 佳穂、楊 惠然、山田 浩司、田岡 東、内橋 貴之、竹居 孝二、安藤 敏夫 ダイナミン複合体による膜リモデリングの高速原子間力顕微鏡解析 2016年生体運動合同班会議、2016年1月8日、キャンパスプラザ

京都（京都市下京区）

- ② 山田 浩司、菊池 達也、増本 年男、魏 范研、阿部 匡史、竹田 哲也、西木 禎一、富澤 一仁、渡部 昌実、松井 秀樹、竹居 孝二、成長円錐における PKC α のコルタクチンリン酸化によるアクチン制御の可能性、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日、神戸国際展示場（神戸市中央区）
- ③ 橘 洋美、竹田 哲也、山田 浩司、小川 大輔、竹居 孝二、腎糸球体ポドサイト分化におけるダイナミンGTPアーゼの役割、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月3日、神戸国際展示場（神戸市中央区）
- ④ 竹田 哲也、熊谷 祐介、背山 佳穂、楊 惠然、山田 浩司、田岡 東、内橋 貴之、竹居 孝二、安藤 敏夫、ダイナミンによる膜切断メカニズムの高速 AFM イメージング解析、第53回日本生物物理学会年会、2015年9月13日、金沢大学（金沢市角間町）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 哲也 (TAKEDA, Tetsuya)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30302368

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

① 竹居 孝二 (TAKEI, Kohji)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40322226

② 内橋 貴之 (Uchihashi, Takayuki)
金沢大学・数物科学系・教授
研究者番号：30326300