

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17081014

研究課題名（和文） トランスポートソームと細胞骨格の相互制御機構

研究課題名（英文） Interactions of transportsome and cytoskeleton

研究代表者

中西 宏之（NAKANISHI HIROYUKI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：80314318

研究成果の概要(和文):微小管結合タンパク質として SGIP1・と高い相同性を示す FCH01、FCH02 を同定した。SGIP1・と FCH02 は微小管のみならず細胞膜リン脂質に結合し、細胞膜をチューブ状に変形させる活性をもち、クラスリン依存性のエンドサイトーシスを制御していることを見出した。FCH02 は上皮性ナトリウムチャンネルのユビキチン化、エンドサイトーシスを制御していた。さらに、FCH02 は中心体に局在し、中心体蛋白質・-チュブリンのダウンレギュレーションに関わり、微小管の形成を制御していた。

研究成果の概要(英文): We have identified SGIP1・ and its homologous molecules, FCH01 and FCH02, as novel microtubule-binding proteins. They bound not only to microtubules but also to membrane phospholipids and deformed membranes to tubules. SGIP1・ and FCH02 were involved in clathrin-dependent endocytosis. FCH02 regulated the ubiquitination and endocytosis of epithelial sodium channel (ENaC). In addition, FCH02, which was also localized in centrosomes, regulated the organization of microtubules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,400,000	0	6,400,000
2006年度	16,200,000	0	16,200,000
2007年度	13,700,000	0	13,700,000
2008年度	12,100,000	0	12,100,000
2009年度	12,100,000	0	12,100,000
総計	60,500,000	0	60,500,000

研究分野：生化学・薬理学

科研費の分科・細目：

キーワード：微小管、細胞膜、クラスリン、エンドサイトーシス、上皮性ナトリウムチャンネル、中心体

1. 研究開始当初の背景

トランスポーターやチャンネルなどの輸送体分子の形質膜上における分子数は厳密にコントロールされており、形質膜への輸送やエンドサイトーシスに異常が生じると分子数が変化し、輸送体分子の機能の亢進や減弱となって種々の疾患を誘発することが知られている。輸送体分子の形質膜への輸送やエンドサイトーシスは、微小管やアクチン系の細胞骨格によって制御されている。一方、カチオンチャンネル polycystin-2 は微小管の特殊構造物である線毛に局在し、線毛の形成を制御していることが知られている。このように細胞骨格が輸送体を制御し、また輸送体が細胞骨格を制御しているが、これらの相互制御機構は不明である。

2. 研究の目的

輸送体分子による細胞骨格の制御ならびに細胞骨格による輸送体分子の制御を解析する。微小管共沈法ならびにチュブリン・プロット・オーバーレイ法を用いて新しい分子を同定し、輸送体分子の機能ユニット（トランスポートソーム）の構成分子ならびに微小管との関連を調べ、同定した分子が輸送体分子どのようにして輸送体分子の機能と局在を制御しているか、また輸送体からどのようなシグナルを受け、どのように微小管の構築を制御しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 分子レベルでの解析

分子の単離・同定：脳組織の微小管結合タンパク質を網羅的に解析する。具体的には微小管と共沈するタンパク質を収集し、電気泳動によって分画した後、それぞれのタンパク

バンドを質量分析によって解析する。また、チュブリン・プロット・オーバーレイ法を指標として、脳組織からカラムクロマトグラフィーによって微小管結合タンパク質を単離・同定する。

分子の性状解析：同定した分子の抗体を製する。この抗体を利用するとともに、蛍光タンパク質（GFP）との融合タンパク質を発現させて、単離した分子の局在を観察する。また、同定したタンパク質のリコンビナントタンパク質を作製して、微小管への作用や輸送体分子への作用などを生化学的に解析する。

他の分子との相互作用の解析：同定した分子と結合するタンパク質を yeast two hybrid 法や pull down 法を用いて検索する。

(2) 細胞レベルでの解析

細胞骨格の解析：同定した分子とその結合タンパク質の野生型や変異型の遺伝子を培養細胞に導入し、細胞骨格の変化を解析する。さらに、これらの分子を RNAi 法によって発現を抑制して、同様の解析を行う。

トランスポートソームの解析：同定した分子とその結合タンパク質の野生型や変異型の遺伝子を培養細胞に導入し、輸送体分子の局在と機能の変化を調べる。さらに、これらの分子を RNAi 法によって発現を抑制して、同様の解析を行う。

4. 研究成果

(1) SGIP1・の発見とその機能解析

脳組織からチュブリン・プロット・オーバーレイ法によって分子量約 100kD の微小管結合タンパク質を同定し、SGIP1・と命名した。SGIP1・の・末端側は微小管のみならず、リ

ン脂質のホスファチジルセリンとホスファチジルイノシトール 4,5 二リン酸に強く結合し、リポソームをチューブ状に変形させることを見出した。さらに SGIP1・を細胞に過剰発現させると、細胞膜がチューブ状に変形した。一方 SGIP1・の C 末端側は、クラスリン被覆ピットと小胞のコンポーネントである Eps15 と結合することを明らかにした。また、SGIP1・を細胞に過剰発現させると、EGF 受容体やトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスが抑制された。微小管は、初期のエンドサイトーシスにおいてクラスリン被覆小胞のソーティングに関わっていることが報告されている。したがって、SGIP1・はクラスリン被覆ピットや小胞の形成に関わり、さらに小胞のソーティングに機能していると考えられる。また、SGIP1・の細胞内局在を解析し、SGIP1・はクラスリン被覆小胞のみならず初期エンドソームにも局在することを明らかにした。SGIP1・の過剰発現によって、初期エンドソームが変形し、SGIP1・のノックダウンによって、初期エンドソームでの EGF 受容体のソーティングが障害された。したがって、SGIP1・はクラスリン依存性のエンドサイトーシスと初期エンドソームでのソーティングを制御していると考えられる。また私共は、SGIP1・と高い相同性を示す新しい分子の FCH01 と FCH02 を見出し、SGIP1・がファミリーを形成していることを明らかにした。

(2) 新しい微小管結合タンパク質の発見
ラット脳より微小管に結合するタンパク質を一括して精製し、それらを質量分析によって網羅的に解析しており、新しい分子(p180、p110、p90)を発見した。p180 は培養細胞の一次線毛に局在した。この分子が脳、肺、精巣に高い発現を示し、脳上衣細胞や気管支上皮細胞の線毛に局在すること、直接微小管と結

合しないことを見出した。P180 は何らかの分子を介して微小管と連結していると考えられる。p110(Brelin と命名)は、濁度法とローダミン-チュブリンを用いた解析より微小管形成を促進することを明らかにした。また p110 は、サイクリン依存性タンパク質リン酸化酵素 5 (CDK5) によって少なくとも 2 カ所リン酸化され、このリン酸化によって微小管結合活性が抑制された。さらに、Brelin を siRNA によってノックダウンさせると、神経突起の形成が障害されることを見出した。p90(centlein と命名)は微小管非依存的に中心体に局在した。

(3) FCH02 によるエンドサイトーシスの制御

FCH02 は、普遍的に発現しており、SGIP1・と同様に微小管、リン脂質、Eps15 に結合し、トランスフェリンのエンドサイトーシスを制御していた。さらにインテグリンのエンドサイトーシスを制御していること、この過程でインテグリンがユビキチン化されること、FCH02 がこのユビキチン化をコントロールしていることを明らかにした。また、インテグリンのユビキチン化に関わる酵素(E3)として Nedd4L を見出した。FCH02 が Nedd4L を介して上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)のエンドサイトーシスを制御していることも見出した。

(4) ユビキチンリガーゼ Nedd4L の活性制御機構

FCH02 は細胞膜に直径約 50nm の膜チューブを形成し、Nedd4L はこの膜チューブにリクルートされた。一方、Nedd4L は他のリン脂質結合タンパク質が形成する 150nm や 25nm の膜チューブにリクルートされなかった。また、FCH02 の強制発現は Nedd4L を活性化したが、他のリン脂質結合タンパク質は活性化しなかった。さらに、Nedd4L と様々な直径のリポ

ソームとの結合を調べた結果、Nedd4L は直径約 50nm のリポソームに最も強く結合し、活性化されることを見出した。また、Nedd4L は FCH02 と同じくリポソームを直径約 50nm のチューブに変形させた。以上の結果から、FCH02 はエンドサイトーシスの過程で特定の曲径膜（直径約 50nm）を形成し、そこに Nedd4L がリクルートされ活性化されることが明らかとなった。

（5）FCH02 による中心体 微小管系の制御
FCH02 は微小管オーガナイズングセンターである中心体にも局在しており、この分子のノックダウンは中心体を増大させて微小管の分布異常と細胞分裂の障害を引き起こした。中心体のコンポーネントはユビキチン化されてダウンレギュレーションされることが知られており、FCH02 は細胞膜やエンドソームのみならず中心体からの Eps15-ユビキチンを介した分子の輸送を制御している可能性が考えられた。そこで、GFP と チュブリンの融合タンパク質を細胞に発現させ、チュブリンの中心体からのダウンレギュレーションを解析した。その結果、FCH02 のノックダウンは分裂終期の中心体の縮小を抑制することを見出した。また Dendra2 と チュブリンとの融合タンパク質を発現させた細胞株を樹立した。Dendra2 は、ある波長のレーザー光を照射すると、緑から赤に変わる蛍光タンパク質である。この細胞株を用いて、FCH02 のノックダウンが中心体からの チュブリンのダウンレギュレーションを抑制することを明らかにした。また、中心体における FCH02 と関連したユビキチン化酵素(E3)として WWP1 を見出した。WWP1 をノックダウンさせると、FCH02 のノックダウンの表現型と同じく、中心体を増大・増加させた。

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4件)

Makino, K., Umeda, K., Uezu, A., Hiragami, Y., Sakamoto, T., Ihn, H., and Nakanishi, H.: Identification and characterization of the novel centrosomal protein centlein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 366: 958-962, 2008.

Sakamoto, T., Uezu, A., Kawauchi, S., Kuramoto, T., Makino, K., Umeda, K., Araki, N., Baba, H., and Nakanishi, H.: Mass spectrometric analysis of microtubule-cosedimented proteins from rat brain. *Genes Cells* 査読有 13: 295-312, 2008

Nakanishi, H., and Takai, Y.: Frabin and its related Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factors couple the actin cytoskeleton with the plasma membrane. *J. Cell. Mol. Med.* 査読有 12: 1160-1176, 2008.

Uezu, A., Horiuchi, A., Kanda, K., Kikuchi, N., Umeda, K., Tsujita, K., Suetsugu, S., Araki, N., Yamamoto, H., Takenawa, H., and Nakanishi, H.: SGIP1・ is an endocytic protein that directly interacts with phospholipids and Eps15. *J. Biol. Chem.* 査読有 282: 26481-26489, 2007.

[学会発表](計7件)

上江洲章吉、新しいリン脂質結合タンパク質 SGIP1・による初期エンドソームでの EGF 受容体のソーティング機構. BMB2008, 2008年12月9-12日 神戸ポートアイランド

牧野公治、新しい中心体蛋白質の同定と機能解析、BMB2007, 2007年12月11-15日パシフィコ横浜

上江洲章吉、SGIP1・ is an endocytic protein that directly interacts with phospholipids and Eps15. BMB2007、2007年12月12日、パシフィコ横浜

菊池直也、Brel in; 神経突起の形成に関わる新しい微小管結合蛋白質. BMB2007、2007年12月11-15日パシフィコ横浜

牧野公治、新しい中心体蛋白質の同定と機能解析、日本研究皮膚化学会、2007年4月20-22日パシフィコ横浜

堀内綾香、SGIP1・による膜輸送の制御、第59回日本薬理学学会西南部会、2006年11月24日、沖縄(メルパルク沖縄)

坂本達彦、新しい微小管結合タンパク質
による中心体の機能制御、第65回日本癌
学会学術総会、2006年9月28-30日、パ
シフィコ横浜

〔その他〕

ホームページ等

[http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep
t/pharma1/pharma1.html](http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/pharma1/pharma1.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 宏之 (NAKANISHI HIROYUKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：80314318

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

上江洲 章吉 (UEZU AKIYOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：70363520

(H17 H19：研究分担者)

藤田 直之 (FUJITA NAOYUKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：50403192

梅田 一彰 (UMEDA KAZUAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：80444876