

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780097

研究課題名（和文）細胞形態形成と細胞増殖とを連携制御する細胞極性ネットワーク

研究課題名（英文）Cell morphogenesis network regulates coordination between cell morphogenesis and cell growth

研究代表者

久米 一規 (KUME KAZUNORI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教

研究者番号：80452613

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、真核生物の単細胞モデル生物・分裂酵母を用い、細胞形態形成と細胞増殖との連携制御機構を明らかにすることを目的としている。細胞の機能発現に必須である細胞形態形成は、細胞周期と連動し適切に制御されるが、その詳細については不明である。そこで、酵母からヒトまで保存された細胞極性ネットワーク（MOR 経路）の解析から、分裂期から間期移行時の細胞極性制御機構を明らかにした。具体的には、細胞質分裂の制御に重要な SIN 経路が MOR 経路を阻害し、それにより、細胞質分裂の完了から分裂後の細胞極性の確立への順序が保証される機構の詳細を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to understand coordinated regulation between cell morphogenesis and cell growth in fission yeast. Although cell morphogenesis that has an essential role in expression of cellular function is properly regulated by cell cycle, the precise mechanism remains elusive. In fission yeast, the MOR pathway promotes actin polarization to cell tips in interphase, whereas the SIN pathway drives actomyosin ring assembly and cytokinesis. In this study, We show that the SIN pathway inhibits MOR pathway in mitosis and this regulation is important for completion of cytokinesis and coordination of cytoskeletal remodeling at the mitosis-to-interphase transition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学、細胞生物学

科研費の分科・細目：農学・応用生物化学

キーワード：細胞形態形成、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

細胞形態形成は、内外の多様なシグナルに応答し適切に制御され、それは細胞の機能発現にとって必須であり、かつ、生体の諸組織・各器官形成の基礎である。細胞形態形成は、

細胞増殖と連動し適切に制御されるが、その連携制御機構については、不明な点が多い。一方、チェックポイント機構は、細胞に異常が生じた際、その異常を解消するまで自身の増殖を遅延させる生命維持機構である。両機

構の解明は、細胞癌化などの関連する疾病の分子機構の理解と薬剤開発の基盤研究として重要である。私は、遺伝学的手法が容易である真核生物の単細胞モデル生物・分裂酵母を用い、これまでに、進化上保存された、M025-like/Pmo25、GC kinase/Nak1、Furry-like/Mor2、NDR kinase/Orb6、Mob2が、細胞質分裂後の細胞分離と細胞極性制御に重要な細胞極性ネットワーク/MOR 経路 (Morphogenesis Orb6 Network) を構成することを発見した。さらに、細胞質分裂の開始を制御する SIN 経路 (Septation Initiation Network) が、MOR 経路の上流分子である Pmo25 の中心体への局在と、その下流分子の Nak1、Orb6 の kinase 活性を制御することを見いだした。MOR 経路を構成する分子は、酵母からヒトまで進化上保存されており、ヒトでは、M025-STRAD/GCK が、Peutz-Jegheres 癌症候群の原因分子である LKB1 kinase の活性を制御に、また、ハエの腫瘍抑制因子 Hippo/GCK、Warts/NDR が、器官のサイズの制御に重要である。さらに、ハエや線虫において、Furry/Mor2-NDRK/Orb6 経路が、神経細胞の突起形成に重要であることが明らかとされている。このように、MOR 経路は、種を越え、細胞極性制御のみならず細胞増殖制御 (癌化に関連) にも重要である。我々による解析から MOR 経路の全体像が明らかになりつつあるが、本経路による細胞極性制御機構および本経路が細胞周期と連動し適切に制御される分子機構については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、細胞形態形成と細胞増殖との連携制御機構を理解するために、(1)細胞形態形成ネットワーク/MOR 経路による細胞極性制御の分子機構の解明、(2)MOR 経路の破綻 (細胞極性異常) をモニターする新規チェックポイント機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) SIN 経路による MOR 経路の制御機構の解析: MOR 経路の最上流で機能する Pmo25 は、SIN 経路に依存して、M 期に中心体に局在し、その後、隔壁形成部位 (分裂後の極性の確立部位) へとダイナミックに局在変化する。また、MOR 経路の下流分子 Orb6 kinase は、細胞周期間期では、高い kinase 活性 (極性成長に重要) を示すが、分裂期では、その活性が低く抑えられる。しかしながら、分裂期での Pmo25 の中心体への局在と Orb6 の kinase 活性の低下が示す生理的意義については、不明である。そこで、我々は、分裂期で、活性化された SIN 経路が Pmo25 を中心体にリクルートすることにより、MOR 経路 (極性成長) の活性化を阻害しているのではないかと考え、その仮説を検証することにした。具体的には、

細胞周期間期に SIN 経路を構成的に活性化させ、その状態で、Pmo25-GFP の局在および、その下流分子の Orb6 kinase 活性について調べた。細胞周期間期に SIN 経路を活性化させる方法を、以下に示す。まず、SIN 経路の負の調節因子/Cdc16 の変異により、SIN 経路が、細胞周期に関わらず、常に活性化状態になり隔壁形成が繰り返される。その変異に、隔壁ができない *cdc15* 変異、さらに、G2 期遅延を誘導する *cdc25* 変異を加えることにより、細胞周期間期で SIN 経路を構成的に活性化することができる。この三重変異体を用いて、Pmo25-GFP の局在、Orb6 kinase 活性について調べた。さらに、分裂期において、MOR 経路の活性が低く維持される生理的意義を明らかにするために、細胞質分裂に欠損を示す SIN 経路の変異体と MOR 経路の変異体との二重変異体を構築し、その表現型を詳細に調べた。

(2) MOR 経路と機能関連する新規 GCK の同定・機能解析: MOR 経路の上流分子/Pmo25 は、SIN 経路と MOR 経路の 2 つの GCK (Sid1, Nak1) と相互作用し、両経路を連結するコネクタールとして機能することが示唆されている。分裂酵母には、機能未解明の第 3 の GCK/Ppk11 が存在することから、Ppk11 の機能および MOR 経路との機能関連性について解析を行った。具体的には、*ppk11* 機能欠損株の表現型、Ppk11 の細胞周期における細胞内局在、タンパク量の変化、MOR 経路との相互作用および機能的上下関係について調べた。

(3) MOR 経路の破綻 (極性異常) により誘導される Wee1 依存的 G2 期遅延機構に重要な kinase の探索: MOR 経路の破綻により誘導される Wee1 依存的 G2 期遅延機構を解明するためには、MOR 経路構成分子の変異体が示す細胞極性異常をモニターし、その異常シグナルを伝達する分子の同定が重要である (新規チェックポイント機構)。既知のチェックポイント機構のシグナル伝達経路には、タンパク質リン酸化反応 (kinase) が関与する場合が多く、MOR 経路の破綻 (極性異常時) による Wee1 の活性化機構にも、kinase が関与する可能性が高い。もし、そのような kinase が存在すれば、MOR 経路構成分子の変異体との二重変異体では、細胞周期遅延が誘導できず、死滅する (合成致死性を示す) ことが予想される。そこで、この仮説をもとに、MOR 経路構成分子のそれぞれの変異体と非必須 kinase 破壊体 (89 株) の二重変異体により合成致死性を示す kinase を探索した。材料としては、分裂酵母のすべての protein kinase (106 個) の中で、非必須 kinase (86 個) を欠損させた non-essential kinase library (シンガポール大学の Mohan 博士よ

り分与) を用いた。

4. 研究成果

(1) SIN 経路による MOR 経路の制御機構の解析: 分裂期での Pmo25 の中心体への局在と Orb6 の kinase 活性の低下が示す生理的意義を明らかにするために(図 1a)、細胞周期間に SIN 経路を構成的に活性化できる *cdc15cdc16cdc25* 三重変異体を用いて、Pmo25-GFP の中心体への局在、および、Orb6 kinase の活性を調べた。*cdc15cdc16cdc25* 三重変異体において、Pmo25-GFP は、細胞周期間期にも関わらず、ほぼ全ての細胞で、中心体に局在した。また、MOR 経路の下流分子 Orb6 の kinase 活性は、SIN 経路が構成的に活性化された変異体において、顕著な減少がみられ、アクチンが分散し、細胞の極性成長も阻害された(図 1b, ①)。この結果を受け、なぜ分裂期に SIN 経路が MOR 経路を阻害する必要があるかについてさらなる解析を進めた。細胞質分裂に欠損を示す SIN 変異と MOR 変異との二重変異体の解析から、SIN 変異が示す分裂リングの収縮・隔壁形成異常が MOR 変異により抑圧された(図 1b, ②)。つまり、本来 MOR 経路は、分裂リングの収縮・隔壁形成を阻害する機能があり、分裂期での SIN 経路による MOR 経路の阻害は、細胞質分裂(分裂リングの収縮・隔壁形成)を促進する上で重要であることが示唆された。

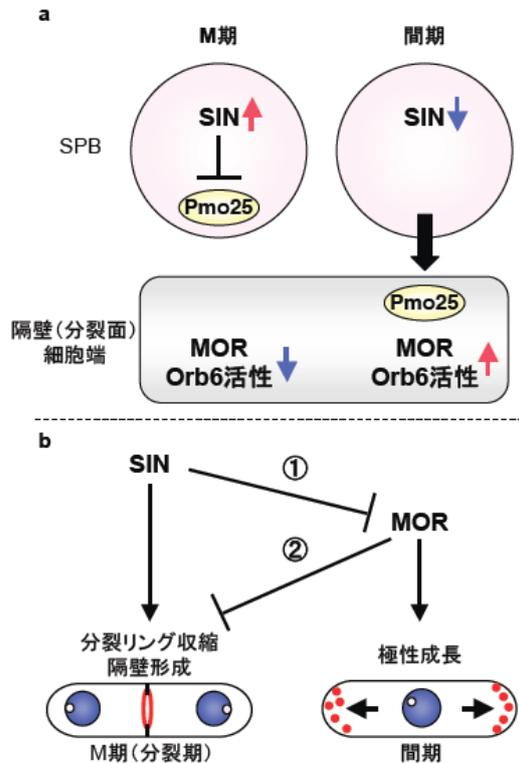


図 1

本解析から、SIN 経路と MOR 経路が、細胞質

分裂と細胞極性制御それぞれに対し、互いに拮抗的に作用することが明らかとなった。細胞質分裂の間に、SIN 経路は MOR 経路を阻害することにより、細胞質分裂を促進し、同時に極性成長を抑える。細胞質分裂完了後、SIN 経路の活性が低下すると MOR 経路が活性化し、極性成長を開始する。つまり、2 つの経路間のクロストークにより、分裂期から間期への移行が連携制御されていることが示唆された。類似のクロストークが高等生物にも存在するのか、その点において、強く関心がもたれる。

(2) MOR 経路と機能関連する新規 GCK の同定・機能解析: 分裂酵母の機能観解析の第 3 の GCK・Ppk11 に注目し、その機能を解析した。Ppk11 は、分裂期に細胞中央部分に形成される分裂面に局在する。さらに、その機能として、高温での細胞分離に重要で、細胞極性制御と細胞分離において、MOR 経路の補助的機能を担うことがわかった。さらに、Ppk11 は、他の 2 つの GCK (Sid1, Nak1) と同様、Pmo25 と相互作用し、Pmo25 の隔壁形成部位への局在に重要であることがわかった。本解析から、我々は、分裂酵母において、Pmo25 が 3 つの GCK と機能関連することを明らかにした。これは、MOR が、高等生物においても複数存在する GCK と相互作用する可能性を示唆しており、さらには、それぞれの GCK を含む経路間のクロストークを調節する因子としての新たな機能を示唆するものである。

(3) MOR 経路の破綻(極性異常)により誘導される Wee1 依存的 G2 期遅延機構に重要な kinase の探索: MOR 経路の破綻により誘導される Wee1 依存的 G2 期遅延の分子機構を解明するため、非必須 kinase 破壊体(89 株)と MOR 経路の構成分子の変異体 (*pmo25*, *nak1*, *orb6*, and *mor2*) との二重変異体を構築し、その表現型を調べた。その結果、二重変異により、合成致死性を示す kinase の取得には至らなかったが、MOR 経路構成分子の各変異体の高温感受性を促進する kinase を複数取得した。また、興味深いことに、高温感受性を抑圧する kinase を取得することができた。今後、取得した kinase による Wee1 依存的 G2 期遅延機構の詳細について、解析を進める予定である。これにより、チェックポイント機構が、細胞極性異常をいかにモニターし G2 期遅延を誘導するか、その解明につながるものが期待される。一方で、高温感受性を抑圧する kinase の解析を進めることにより、細胞極性制御における MOR 経路のターゲット分子の同定、さらには、細胞極性と細胞増殖の連携制御機構の理解につながるものが期待される。

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4件)

1. 久米一規, 五島徹也, 平田大, 分裂酵母の2つのHippo関連経路のクロストーク, 実験医学, 査読無, 29, 2011, 445-448,
2. Tetsuya Goshima, Kazunori Kume, Takayuki Koyano, Yoshikazu Ohya, Takashi Toda, Dai Hirata, Fission yeast germinal center (GC) kinase Ppk11 interacts with Pmo25 and plays an auxiliary role in concert with the morphogenesis Orb6 network (MOR) in cell morphogenesis, Journal Biological Chemistry, 査読有, 285・45, 2010, 35196-35205
3. Samridha Ray, Kazunori Kume, Sneha Gupta, Mohan Balasubramanian, Dai Hirata, Dannel McCollum, The mitosis-to-interphase transition is coordinated by cross talk between the SIN and MOR pathways *Schizosaccharomyces pombe*, Journal Cell Biology, 査読有, 190・5, 2010, 793-805
4. Takayuki Koyano, Kazunori Kume, Manabu Konishi, Takashi Toda, Dai Hirata, Search for kinases related to transition of growth polarity in fission yeast, Bioscience Biotechnology Biochemistry, 査読有, 74・5, 2010, 1129-1133

[学会発表] (計6件)

1. Kazunori Kume, The signaling pathway linking DNA replication to cell polarization, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日, パシフィコ横浜(神奈川県)
2. Kazunori Kume, The signaling pathway linking DNA replication to cell polarization, The 6th International Fission Yeast Meeting, 26 June 2011, Martin Conference Center U.S.A.
3. Kazunori Kume, Cross talk between SIN and MOR pathways in fission yeast, 6th UK-Japan Cell Cycle Workshop, 12 April 2011, Low Wood Hotel U.K.
4. Kazunori Kume, The mitosis to interphase transition is coordinated by crosstalk between the SIN and MOR pathways in *S. pombe*, 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月8日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)
5. Kazunori Kume, Regulation of morphogenesis Orb6 network (MOR) by SIN, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9日, パシフィコ横浜(神奈川県)

6. Kazunori Kume, Regulation of morphogenesis Orb6 network by SIN, The 5th International Fission Yeast Meeting, 27 October 2009, 国立オリンピック記念青少年総合センター(東京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hiroshima-u.ac.jp/adsm/bio/saibou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米 一規 (KUME KAZUNORI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教
研究者番号: 80452613