

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 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390013

研究課題名（和文） 細胞運動の調節における小胞輸送と細胞骨格リモデリングの共役

研究課題名（英文） Coupling of membrane traffic and cytoskeleton remodeling in the regulation of cell motility

研究代表者

中山 和久（NAKAYAMA KAZUHISA）

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：40192679

研究成果の概要（和文）：

本研究では、Arl1 と Rac1 の共通のエフェクターである Arfaptin が、Arl1 によってゴルジ体トランス領域の膜上にリクルートされ、Arl1 依存的に膜の変形を引き起こし、最終的に管状構造の輸送中間体の形成に関与することを明らかにした。一方、このような Arfaptin の機能には Rac1 は関与しなかった。また、本研究では Arfaptin と Arl1 の複合体の X 線結晶構造を解明し、Arl1 による Arfaptin の膜へのリクルートの分子基盤を明らかにした。一方、Arf6 が MKLP1（MgcRacGAP と複合体を形成する）と相互作用することによってフレミングボディーにリクルートされ、細胞質分裂を調節することを示した。さらに、Arf6-MKLP1 の X 線結晶構造を解明し、MKLP1 による Arf6 のリクルートの分子基盤を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Cell motility and cell division are under coordinated regulation of membrane traffic and actin cytoskeleton remodeling. The Arf and Rab families of small GTPases regulate membrane traffic, and the Rho family small GTPases regulate cytoskeleton remodeling. In this study, we showed that Arfaptins, which are dual effectors of Arl1 and Rac1, are recruited onto *trans*-Golgi membranes through interacting with Arl1, and induce membrane tubulation in an Arl1-dependent manner. X-ray crystal structure of the Arl1-Arfaptin-2 complex revealed the molecular basis for the membrane recruitment of Arfaptin-2 and indicated a possibility that Arl1 and Rac1 compete with each other for binding to Arfaptin-2.

On the other hand, we showed that Arf6 is recruited to the Flemming body during cytokinesis through interacting with MLKP1, which forms a complex with MgcRacGAP, and is involved in regulation of cytokinesis. Furthermore, We revealed the structure of the Arf6-MKLP1 complex by X-ray crystallography and suggested the molecular basis for recruitment of Arf6 onto the Flemming body. We further showed that EFA6, an Arf-GEF, is involved in local activation of Arf6 during cytokinesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：メンブレントラフィック、小胞輸送、細胞骨格、細胞運動、細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

細胞運動は、我々のからだを構成する細胞の基本機能の一つであり、アクチン細胞骨格のリモデリングによって駆動されるとともに、細胞の形状の劇的な変化を伴う。一方、細胞分裂の際にも、劇的なアクチン細胞骨格のリモデリングとともに細胞の形状やサイズが劇的に変化し、一つの細胞から二つの娘細胞が形成される。

細胞の形状やサイズの変化に必要な細胞膜の変形が起こるためには、メンブレントラフィック（主として小胞輸送）による膜の供給と除去（エキソサイトーシスとエンドサイトーシス）が適切な細胞部位で適切な時期に行われなければならない。したがって、アクチン細胞骨格のリモデリングと小胞輸送による膜の供給や除去は厳密に協調して起こる必要がある。

アクチン細胞骨格のリモデリングの調節には Rho ファミリー (Rho, Rac, Cdc42 など) の低分子量 GTPase が、小胞輸送の調節には Arf ファミリー (Arf6, Arl1 など) や Rab ファミリーの低分子量 GTPase が主として関与する。しかし近年、Rho ファミリーと Arf/Rab ファミリーの低分子量 GTPase の機能が、共通の調節タンパク質やエフェクタータンパク質を介して密接に共役する可能性が示唆されている。

本研究では、Arf ファミリーと Rho ファミ

リーの低分子量 GTPase による細胞骨格リモデリングと小胞輸送の協調的調節機構について探る。

2. 研究の目的

細胞が運動する際や分裂する際には、運動部位や分裂部位で細胞膜が変形したり、特定のタンパク質や脂質が供給されたりしなければならない。そのために、局所的なアクチン細胞骨格のリモデリングと小胞輸送による特定のタンパク質や脂質の供給が協調して起こる必要がある。これら二つの機能の協調は、小胞輸送の調節を担う Arf ファミリーと細胞骨格の調節を担う Rho ファミリー (Rho, Rac, Cdc42 など) の低分子量 GTPase の共役によって達成される。

本課題では、細胞の運動部位や分裂部位での局所的な Arf ファミリーと Rho ファミリーの活性の調節、およびこれらの低分子量 GTPase のエフェクターの機能や構造の解析、および細胞内局在の時間的・空間的変化の解析を通じて、細胞の運動や分裂の基礎をなすアクチン細胞骨格のリモデリングと小胞輸送の協調的調節の分子基盤の解明を目指す。このような解析によって、炎症やがんなどを対象とする新たな創薬標的を開拓できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) Arf ファミリーと Rho ファミリーに

共通するエフェクタータンパク質の機能

Arfaptin (Arfaptin-1 と Arfaptin-2) は Arl1 と Rac1 の共通のエフェクタータンパク質である。この Arfaptin について以下のような研究を行なう。

- ① Arfaptin の EGFP あるいは mCherry との融合タンパク質を培養細胞に発現させ、細胞運動時の葉状仮足への局在、および細胞分裂時のミッドボディー近傍への局在の変化等をタイムラプスイメージングによって観察する。さらに、Arl1 の EGFP あるいは mCherry の融合タンパク質と組み合わせ二色のタイムラプスイメージング解析を行ない、これらの低分子量 GTPase による Arfaptin の機能の時間的かつ空間的な調節を確認する。
- ② これまでに Rac1 と Arfaptin の複合体の X 線結晶構造は報告されているが、Arl1 と Arfaptin の複合体の構造に関する情報はない。この Arl1-Arfaptin の複合体の構造を解明して、Rac1-Arfaptin 複合体の構造と比較することによって、Arf ファミリーと Rho ファミリーによる協調的調節機構の分子基盤を探る。

(2) 細胞運動や細胞分裂に関与する Arf の GEF と GAP の同定と機能解析

低分子量 GTPase が時間的・空間的に正しく機能するためには、GEF による活性化と GAP による不活性化が厳密に調節されなければならない。Rho の GEF である Ect2 や GAP である MgcRacGAP は収縮管近傍やフレミングボディーで機能して、細胞質分裂を調節することが知られている。一方、Arf が細胞運動や細胞分裂を調節するためには、細胞運動時の仮足や細胞質分裂時の収縮環やフレミングボディーの近傍で Arf が局所的に活性化されたり不活性化されたりしなければならない。ヒトのデータベースには、Arf の GEF

は 15 種類、GAP は 19 種類存在する。これらの GEF や GAP の半分以上は、葉状仮足や収縮環の近傍に蓄積するホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PI(4,5)P₂) や PI(3,4,5)P₃ に結合する PH ドメインをその一次配列内に含む。

- ① MgcRacGAP は、フレミングボディーにおいて、Arf のエフェクターの一つであるキネシン様タンパク質 MKLP1 と複合体(セントラルスピンドリン複合体)を形成することが知られている。そこで、Arf と MKLP1 の相互作用に関して、X 線結晶構造解析を行うとともに、時間的・空間的な解析を行うことによって、細胞質分裂時の Rho と Arf の機能の共役について検討する。
- ② Arf に対する GEF や GAP について網羅的に解析し、細胞運動や細胞分裂で機能する GEF や GAP を特定するとともに、EGFP あるいは mCherry との融合タンパク質を発現させてタイムラプス解析を行い、Arf 活性化の時間的・空間的な変化を追う。

4. 研究成果

(1) ① Arfaptin-1 と Arfaptin-2 はその BAR ドメインを介して Arl1 に結合し、それによってゴルジ体トランス領域の膜上にリクルートされ、膜の変形を引き起こすことを明らかにした。また、この膜の変形には Rac1 は関与しないことも明らかにした。EGFP 標識 Arl1 と mCherry 標識 Arfaptin-2 を細胞に発現させてタイムラプス解析を行い、Arfaptin-2 は Arl1 によってトランスゴルジ膜上にリクルートされたのちに、そこからの管状構造の輸送中間体の形成に関与することを明らかにした。

(1) ② Arl1 と Arfaptin-2 の複合体の X 結晶

構造を解明し、相互作用の分子基盤を明らかにした。さらに、構造から予想される相互作用にとって重要なアミノ酸に変異を導入して、相互作用に関する構造データを裏づけるとともに、この相互作用が膜の管状構造の形成にとって重要であることを明らかにした。さらには、この構造から、Arf1 と Rac1 は Arfaptin-2 との結合に関して競合する可能性を示した。

(2) ①Arf6がMKLP1と相互作用することによってフレミングボディーにリクルートされることを見いだした。Arf6あるいはMKLP1をsiRNAでノックダウンすると多核の細胞の割合が増えることから、この相互作用は細胞質分裂の進行にとって重要であることが明らかになった。さらに、Arf6-MKLP1複合体のX線結晶構造を解明し、MKLP1によるArf6のリクルートの分子基盤を明らかにした。

(2) ②15種類存在するArf-GEFのうちで、EFA6ファミリー (EFA6A-EFA6D) が、細胞質分裂時にPHドメイン依存的に収縮環 (アクチン細胞骨格の束からなる) の近傍に集積することを見いだした。さらには、タイムラプス解析によって、EFA6 は収縮環近傍でArf6を活性化して、Arf6のみがMKLP1と相互作用することによってフレミングボディーにリクルートされ、細胞質分裂の調節に関与することを示した。

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 12 件)

1. Ueda, T., Hanai, A., Takei, T., Kubo, K., Ohgi, M., Sakagami, H., Takahashi, S., Shin, H.-W. & Nakayama, K. (2013) EFA6 activates Arf6 and participates in its targeting to the Flemming body during cytokinesis. *FEBS Lett.*, **587**, 1617-1623.

doi: 10.1016/j.febslet.2013.03.042. (査読あり)

2. Takatsu, H., Katoh, Y., Ueda, T., Waguri, S., Murayama, T., Takahashi, S., Shin, H.-W. & Nakayama, K. (2013) Mitosis-coupled, microtubule-dependent clustering of endosomal vesicles around centrosomes. *Cell Struct. Funct.*, **38**, 31-41. doi: 10.1247/csf.12028. (査読あり)
3. Kondo, Y., Hanai, A., Nakai, W., Katoh, Y., Nakayama, K. & Shin, H.-W. (2012) ARF1 and ARF3 are required for the integrity of recycling endosomes and the recycling pathway. *Cell Struct. Funct.*, **37**, 141-154. doi: 10.1247/csf.12015. (査読あり)
4. Nakamura, K., Man, Z., Xie, Y., Hanai, A., Makyio, H., Kawasaki, M., Kato, R., Shin, H.-W., Nakayama, K. & Wakatsuki, S. (2012) Structural basis for membrane binding specificity of the Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) domain of Arfaptin-2 determined by Arl1 GTPase. *J. Biol. Chem.*, **287**, 25478-25489. doi: 10.1074/jbc.M112.365783. (査読あり)
5. Takahashi, S., Kubo, K., Waguri, S., Yabashi, A., Shin, H.-W., Katoh, Y. & Nakayama, K. (2012) Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J. Cell Sci.*, **125**, 4049-4057. doi: 10.1242/jcs.102913. (査読あり)
6. Makyio, H., Ohgi, M., Takei, T., Takahashi, S., Takatsu, H., Katoh, Y., Hanai, A., Ueda, T., Kanaho, Y., Xie, Y., Shin, H.-W., Kamikubo, H., Kataoka, M., Kawasaki, M., Kato, R., Wakatsuki, S. & Nakayama, K. (2012) Structural basis for Arf6-MKLP1 complex formation on the Flemming body

- responsible for cytokinesis. *EMBO J.*, **31**, 2590-2603. doi: 10.1038/emboj.2012.89. (査読あり)
7. Fukumatsu, M., Ogawa, M., Arakawa, S., Suzuki, M., Furuse, M., Nakayama, K., Shimizu, S., Kim, M., Mimuro, H. & Sasakawa, C. (2012) *Shigella* targets epithelial tricellular junctions and uses a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway to spread between cells. *Cell Host Microbe*, **11**, 325-336. doi: 10.1016/j.chom.2012.03.001. (査読あり)
 8. Takano, H., Furuta, K., Yamashita, K., Sakanaka, M., Itano, N., Gohda, E., Nakayama, K., Kimata, K., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. & Tanaka, S. (2012) Restriction of mast cell proliferation through hyaluronan synthesis by co-cultured fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 408-412. doi: 10.1248/bpb.35.408. (査読あり)
 9. Takashima, K., Saitoh, A., Hirose, S., Nakai, W., Kondo, Y., Takasu, Y., Kakeya, H., Shin, H.-W. & Nakayama, K. (2011) GBF1-Arf-COPI-ArfGAP-mediated Golgi-to-ER transport involved in regulation of lipid homeostasis. *Cell Struct. Funct.*, **36**, 223-235. doi: 10.1247/csf.11035. (査読あり)
 10. Takatsu, H., Baba, K., Shima, T., Umino, H., Kato, U., Umeda, M., Nakayama, K. & Shin, H.-W. (2011) ATP9B, a P4-ATPase (a putative aminophospholipid translocase), localizes to the *trans*-Golgi network in a CDC50-independent manner. *J. Biol. Chem.*, **286**, 38159-38167. doi: 10.1074/jbc.M111.281006. (査読あり)
 11. Takahashi, S., Takei, T., Koga, H., Takatsu, H., Shin, H.-W. & Nakayama, K. (2011) Distinct roles of Rab11 and Arf6 in the regulation of Rab11-FIP3/Arfophilin-1 localization in mitotic cells. *Genes Cells*, **16**, 938-950. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01538.x. (査読あり)
 12. Man, Z., Kondo, Y., Koga, H., Umino, H., Nakayama, K. & Shin, H.-W. (2011) Arfaptins are localized to the *trans*-Golgi by interaction with Arl1, but not Arfs. *J. Biol. Chem.*, **286**, 11569-11578. doi: 10.1074/jbc.M110.201442. (査読あり)
- [学会発表] (計 29 件)
1. 中山和久 (2013) 細胞分裂におけるメンブレントラフィックの役割: 細胞生物学と構造生物学の融合研究. 第1回物構研サイエンスフェスタ. つくば, 3月15日
 2. 中山和久 (2011) 細胞分裂時のオルガネラの分配の調節. 千里ライフサイエンスセミナー「生命科学を支えるオルガネラ研究の新展開」. 豊中, 9月30日
 3. 申 惠媛、中井和香、近藤由美香、花井綾子、中山和久 (2011) ゴルジ体に局在する低分子量 GTPase ARF の機能の再考. 第84回日本生化学会大会シンポジウム. 京都, 9月23日
 4. Nakayama, K., Takatsu, H., Ueda, T., Waguri, S., Takahashi, S., Kondo, Y. & Shin, H.-W. (2010) Mitosis-Coupled Sequestration of Recycling Endosomes around Spindle Pole Centrosomes. 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シンポジウム. 神戸. 12月9日

5. Nakayama, K. (2010) Regulation of Arf6 and Rab11 during cell division. FASEB Summer Research Conference, “Arf Family G Proteins”. Carefree, Arizona, USA. 8月18日

[その他]
ホームページ等
<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/physchem/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 和久 (NAKAYAMA KAZUHISA)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：40192679

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし