

## 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 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770126

研究課題名（和文） 細胞分裂時リサイクリングエンドソームのプロテオミクス

研究課題名（英文） Proteomics of isolated recycling endosomes during mitosis

研究代表者

加藤 洋平（KATO YOHEI）

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90568172

研究成果の概要（和文）：細胞周期の間期ではリサイクリングエンドソームは細胞全体に散らばって存在しているが、細胞分裂期になると中心体の周辺にクラスターを形成する。分裂期のリサイクリングエンドソームがなぜこのような動態を示すのかは不明である。そこで本研究では細胞分裂時のリサイクリングエンドソームを単離し、そこに含まれるタンパク質を明らかにすることを目的とした。新規のタンデムアフィニティタグ精製法を開発し、細胞分裂期のリサイクリングエンドソームの精製法を確立した。

研究成果の概要（英文）：Recycling endosomes in interphase are distributed throughout the cell. In contrast, in M phase, they are clustered around the centrosome. However, little is known about the functional behavior of recycling endosomes in M phase. The purpose of this study is to isolate recycling endosomes from mitotic cells and to identify characteristic proteins in isolated recycling endosomes. We have developed a novel tandem affinity tag purification method and purified recycling endosomes from cells synchronized in M phase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：メンブレントラフィック・細胞分裂・細胞周期・プロテオミクス・リサイクリングエンドソーム・タンパク質精製・トランスフェリン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は細胞が増えるという最も重要な生命現象である。分裂期の細胞では染色体が2つの娘細胞に均等に分配されるだけでなく、ゴルジ体などのオルガネラも2つに分配されなくてはならない。分裂間期の細胞では核近傍に一体となって存在するゴルジ体は、有糸分裂前期に一旦は崩壊するが、分裂終期に細胞内の二カ所でクラスターを形成しは

じめ、分裂完了後には再び核近傍の一カ所に集合して分裂間期の形態に戻る。一方、エンドソームなどの他のオルガネラの分配機構は不明であったが、漠然とゴルジ体と同様の挙動を示すのではないかと考えられていた。ところが、リサイクリングエンドソームに局在するトランスフェリン受容体を指標にして、細胞分裂時のライブセル観察を行ったところ、リサイクリングエンドソームがゴルジ

体とはまったく異なる局在変化を経て、2つの娘細胞に分配されることを見いだした。

分裂間期の細胞では、リサイクリングエンドソームは細胞質全体にわたって斑点状に散在するのに対して、ゴルジ体は核の近傍にリボン状で存在する。有糸分裂の前期にはゴルジ体は完全に崩壊するのに対して、リサイクリングエンドソームは中心体のまわりに集まってタイトな構造を形成しはじめる。その後、前中期から中期にかけて、リサイクリングエンドソームは紡錘体極中心体とともに2つに分かれていくが、ゴルジ体は細胞質全体に分散したままである。有糸分裂の後期から終期にかけては、中心体のまわりに形成されていたリサイクリングエンドソームのタイトな構造は徐々に崩れていき、分かれつつある2つの娘細胞の間に形成される細胞間橋の部分にリサイクリングエンドソームが新たに集合しはじめる。この頃には、ゴルジ体も各娘細胞内の二カ所（紡錘体極中心体の近傍、および中央紡錘体の付け根近傍）に集合しはじめる。細胞質分裂の最終段階にいたると、リサイクリングエンドソームは切断が起こる細胞間橋の中央部分（2つの娘細胞に由来する中央紡錘体が交錯するフレミングボディの両側）に集積する。その後、細胞間橋の切断が起こって2つの娘細胞が完成するのにともなって、リサイクリングエンドソームは細胞質全体に分散するのに対して、ゴルジ体は核周辺に一体となって局在するようになる。

今のところ、リサイクリングエンドソームが細胞分裂時にこのような形態変化を起こす理由は不明である。しかし、細胞分裂という細胞にとって最も重要なイベントが進行しているときに、ATPを消費するモータータンパク質を使ってオルガネラを動かしているからには、そこには何らかの必要性（必然性）があると考えられる。分裂期のリサイクリングエンドソームがいったい何を運んでいるのか、動きを制御するモータータンパク質やその調節タンパク質は何か、などを明らかにすることができれば、分裂時のリサイクリングエンドソームの挙動の生理的意義を解明することができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

### (1) 分裂期リサイクリングエンドソームの精製

細胞分裂期のリサイクリングエンドソームの単離・精製法を確立する。

### (2) 分裂期リサイクリングエンドソームに含まれるタンパク質の同定

精製したリサイクリングエンドソームに含まれるタンパク質のプロテオミクス解析

を行う。分裂期のリサイクリングエンドソームの輸送過程に必須のタンパク質を同定する。

### (3) 分裂期リサイクリングエンドソームの生理的意義の解明

(2)で同定したタンパク質について機能解析を行うことで、分裂期リサイクリングエンドソームの動態の生理的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) タンデムアフィニティタグを付加したリサイクリングエンドソーム局在タンパク質の安定発現細胞株の樹立

細胞分裂時のリサイクリングエンドソームを精製するための材料として、リサイクリングエンドソームに局在するタンパク質（トランスフェリン受容体や鉄イオントランスポーターである DMT1-II）に精製のタグを付加したものを安定発現する HeLa 細胞株をレンチウイルスベクターによる遺伝子導入法により樹立した。以後の実験はこれらの細胞株を用いた。

### (2) 細胞同調法

微小管重合阻害剤ノコダゾール処理によって、細胞周期を細胞分裂期に同調させた。同調させた細胞は mitotic shake-off 法により回収した。対照群として、Aphidicolin によって細胞周期を S 期に同調させたものを用意した。

### (3) リサイクリングエンドソームのタンデムアフィニティタグ精製法の改良

タンデムアフィニティタグ精製法によりリサイクリングエンドソームの精製を試みた。始めは Myc タグと FLAG タグを使ってリサイクリングエンドソームの精製を行った。リサイクリングエンドソームの精製はできたものの、収量が少ないという問題があった。そこで、より結合力の高いタグとして FKBP タグを利用し精製方法を改良した。

### (4) 細胞分裂期リサイクリングエンドソームに特異的なタンパク質の同定

M 期と S 期の細胞から精製したリサイクリングエンドソームに含まれるタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞分裂期リサイクリングエンドソームの精製法の開発

細胞内のオルガネラを分離するために遠心分画法がよく使われている。エンドソームを遠心分画法によって分離する方法はこれ

まで報告されていたが、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームという性質のよく似たエンドソームをさらに分離するのは難しかった。そこでタンデムアフィニティタグ精製法によってリサイクリングエンドソームだけを単離する方法を開発した。

## (2) 精製方法の改良

始めは Myc タグと FLAG タグを使ったタンデムアフィニティタグ精製法によりリサイクリングエンドソームの精製を行った。リサイクリングエンドソームを精製できたものの収量が少ないという問題があった。そこで、より結合力の高い FKBP タグを用いた精製法に改良した。抗原と抗体の解離定数は  $1 \times 10^{-10} \text{M}$  程度であるのに対して、FKBP-Rapamycin-FRB の解離定数は  $1 \times 10^{-13} \text{M}$  であり、約 1000 倍のアフィニティがある。また、精製に使う FRB ビーズは大腸菌を使って作製できるため、比較的安価で大量に作る事が可能である。一段階目の精製に FKBP タグを使うことにより、収量の問題を解決することができた。しかし、一段階目の精製では非特異的な結合タンパク質の混入が避けられない。そこで、TEV プロテアーゼによって FKBP タグのリンカー部分を切断することで、リサイクリングエンドソームをビーズから解離させ、2 段階目の精製を行うことで、より純度の高いリサイクリングエンドソームを得ることができた(図 1)。

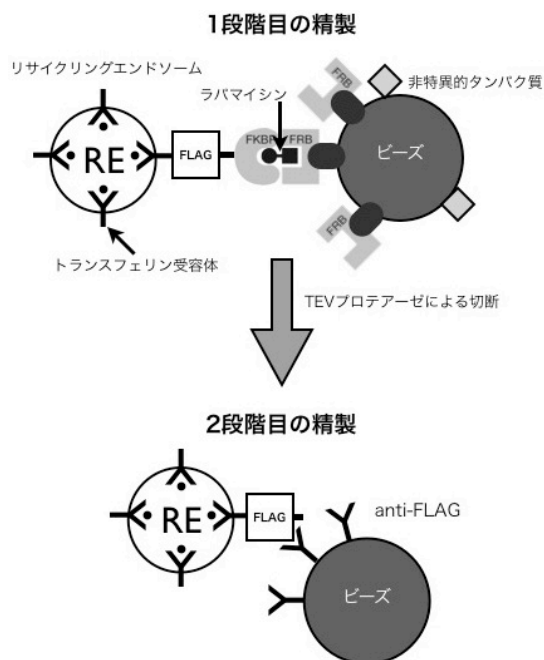


図1 タンデムアフィニティタグ精製法によるリサイクリングエンドソームの単離

## (3) 細胞周期同調法とリサイクリングエンドソームの集積

微小管の重合阻害剤であるノコダゾール処理によって細胞周期を M 期に同調させることができる。高濃度 ( $3 \mu\text{M}$ ) で処理すると、微小管の重合が完全に阻害され細胞分裂が停止する。一方、低濃度 ( $0.1 \mu\text{M}$ ) で処理すると、微小管の重合は完全には阻害されず単極の微小管の束が形成される。ただし、不安定な微小管であるため、正常な紡錘体を形成することはできず細胞分裂は起こらない。この状態の細胞ではリサイクリングエンドソームが微小管の束の根元に集積することを見出した。ノコダゾールを洗い流すと正常な細胞と同じように分裂が起きることから、このときのリサイクリングエンドソームを分裂期リサイクリングエンドソームと同等なものと考え、これを精製することにした。比較対照として、Aphidicolin 処理によって S 期に同調させた細胞からもリサイクリングエンドソームを精製した。

## (4) M 期と S 期のリサイクリングエンドソームの比較

M 期と S 期の細胞から精製したリサイクリングエンドソームに含まれるタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し比較した。現在は両者で差が見られたタンパク質の同定を試みている。今後は分裂期リサイクリングエンドソームに特徴的なタンパク質を同定し、機能解析を行う予定である。

## 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 2 件)

- ①. 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. 査読有 doi: 10.1038/emboj.2012.89.
- ②. Yamamoto, H., Koga, H., Katoh, Y., Takahashi, S., Nakayama, K. & Shin, H.-W. (2010) Functional crosstalk between Rab14 and Rab4 through a dual effector, RUFY1/Rabip4. *Mol. Biol. Cell*, 21, 2746-2755. 査読有 doi: 10.1091/mbc.E10-01-0074

〔学会発表〕(計6件)

- ① 高津宏之、加藤洋平、上田智子、高橋千絵、申惠媛、中山和久 細胞分裂時のトランスフェリン受容体と鉄輸送体 DMT1 の局在変化. フォーラム 2011 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、金沢エクセルホテル東急(石川県)、2011年10月28日
- ② 加藤洋平、高津宏之、中山和久 細胞分裂時におけるリサイクリングエンドソームのライブセルイメージング. 第84回日本生化学会大会. 国立京都国際会館(京都府)、2011年9月22日
- ③ 高橋千絵、久保慶治、加藤洋平、中山和久 Rab11 と Exocyst 複合体による輸送小胞の細胞膜との繫留/融合過程の調節. 第84回日本生化学会大会. 国立京都国際会館(京都府)、2011年9月23日
- ④ 高橋千絵、久保慶治、加藤洋平、和栗 聡、中山和久 メンブレントラフィックにおける Rab11 の細胞内局在と機能. 第63回日本細胞生物学会大会ワークショップ. 北海道大学(北海道)、2011年6月27日
- ⑤ Yamamoto, H., Koga, H., Katoh, Y., Takahashi, S., Nakayama, K. & Shin, H.-W. Functional crosstalk between Rab14 and Rab4 through a dual effector, RUFY1/Rabip4. 50th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Philadelphia(USA). 2010年12月14日
- ⑥ 山本昆明、古賀裕士、加藤洋平、高橋千絵、中山和久、申惠媛 RUFY1/Rabip4 を介する Rab14 と Rab4 のクロストーク. 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. 神戸ポートアイランド(兵庫県)、2010年12月8日

〔図書〕(計1件)

- ① 中山和久、加藤洋平 (2012) メンブレントラフィックによる細胞分裂制御機構の解明. 遺伝子医学 MOOK20 : ナノバイオ技術と最新創薬応用研究. 橋田充・佐治英郎編 メディカルドゥ pp. 109-113.

〔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

加藤 洋平 (KATOH YOHEI)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号 : 90568172

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし