

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 31日現在

機関番号：12102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22770184
 研究課題名（和文）細胞運動やエンドサイトーシスに伴うアクチンメッシュワークの GMF による制御
 研究課題名（英文）Study of GMF-based control of actin-meshwork organization during cell migration and endocytosis
 研究代表者 中野 賢太郎（NAKANO KENTARO）
 筑波大学・生命環境系・講師
 研究者番号：50302815

研究成果の概要（和文）：アクチン重合促進因子 Arp2/3 は、様々な細胞運動において、細胞膜の変形を促すメッシュ状のアクチン構造体を形成する。細胞内の Arp2/3 の活性化機構はよく調べられているが、アクチン細胞骨格のリサイクリング過程での Arp2/3 の活性抑制化は不明である。本研究では、グリア成熟転換因子 GMF の酵母ホモログの機能解析に端を発し、活発に細胞運動する細胞性粘菌について、その GmfA の機能を調べた。

研究成果の概要（英文）：Arp2/3 induces formation of actin meshwork which is required for membrane deformation in various type of cell movements. It has well been studied the molecular machinery activating Arp2/3 function. However, there is almost no study how Arp2/3-activity is down regulated during recycling of the actin cytoskeleton. Therefore, I decided to study the molecular function of a yeast homologue of the glia maturation factor GMF. Moreover, I tried to investigate cellular function of GmfA by using cellular mold which shows dynamic cell behavior.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・細胞生物

キーワード：細胞骨格、アクチン、エンドサイトーシス、分裂酵母、メンブレントラフィック、Rho、Rab、細胞性粘菌

1. 研究開始当初の背景

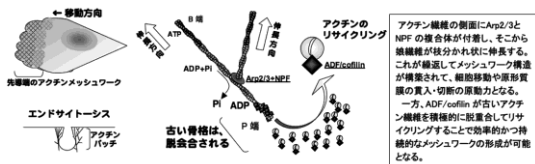
太古の地球上で、原始的な生命体が徘徊し、エネルギー代謝に必要な物質を外環境から細胞内部へと取り入れる様子を想像していただきたい。いかにして、現在の細胞の祖先であるこの生命体は、運動能力を獲得したのだろうか？これを理解するには、本研究が対

象とするアクチンメッシュワークの構築と、その動的機構の制御に関わる分子群の解明が大切である。

これまでの研究から、動物細胞が移動し、外環境から物質を細胞内に取込む（エンドサイトーシス）際には、移動細胞の先端端やエンドサイトーシス部位において、多数の枝分

かれしたアクチン細胞骨格が構築され、それが原形質膜を押すことで、膜の形状変化が促されることが分かってきた。この過程に働く分子として、アクチン重合促進因子である Arp2/3 が同定され、その働きにより多数のアクチン繊維が枝分かれしたメッシュワーク構造が構築される。この構造が膜を押しやるためには、常に原形質膜直下で新生し続けることが不可欠である。それに伴い、古いアクチンメッシュワーク構造は、速やかに脱重合され、アクチンに付着していた Arp2/3 などの蛋白質は外され、リサイクルし、新しい構造をつくる。この一連の反応が調和することで、効率的かつ連続的な細胞移動やエンドサイトーシスが可能となる。

近年、メッシュワーク構造の構築過程は、Arp2/3 とその活性化因子 NPF が同定され、解析が進んでいる。ところが、解体過程については不明な点が多い。例えば、移動細胞の先端部の Arp2/3 は、アクチンと同程度に速くリサイクリングする ($t_{1/2} = 10$ s 以下)。しかし、精製蛋白質を用いた試験管内の反応では、アクチン重合の誘導後に、アクチン繊維から Arp2/3 が解離する速度は、細胞内の Arp2/3 のリサイクリング速度と較べて数百倍以上も遅い。そのため、細胞内には、アクチン繊維から Arp2/3 を積極的に解離するしくみがあるはずである。



2. 研究の目的

運動中の細胞膜の内側では、古いアクチンメッシュワークは、ADF/cofilin (以下、AC) により切断・脱重合されて、リサイクリングされる。AC は、アクチン繊維内のサブユニットからリン酸の放出を促し、ATP 型よりも ADP 型の繊維に強く作用する。重合したばかりのアクチンサブユニットは ATP 型で、次第に ADP 型に移行するため、選択的に古い繊維を解体することができる。最近、私が中心となって、分裂酵母から同定した新奇の AC ファミリーであるグリア細胞形質転換因子 (GMF) 様蛋白質は、生化学的に Arp2/3 に結合し、そのアクチン重合誘導活性を抑制することが判明した。しかし、その分子レベルの詳細な反応プロセスは不明であり、また分裂酵母のエンドサイトーシスや細胞性粘菌などの移動細胞における GMF の役割につい

ては未解明である。そこで本研究では、これらの問題の解明を目指した。

3. 研究の方法

おもに次の3点について研究を進める。

(1) GMF による Arp2/3 の活性制御作用についての分子構造学的な解析

- ① 大腸菌に発現させた組換え GMF と Arp2/3 複合体の電子顕微鏡ネガティブ染色像の単粒子画像解析を行い、GMF 結合による Arp2/3 複合体の構造変化を解析する。
- ② 分裂酵母 Gmf1 について、アラニンスキャニング解析により、Arp2/3 との結合に必要な残基を同定する。アラニンスキャニング解析とは、目的の遺伝子がコードする蛋白質について、電荷をもつアミノ酸残基が連続して配置している部分を、電荷をもたないアラニン残基と置換する点突然変異の導入を基盤とした方法である。電荷をもつ残基は蛋白質の分子表面に露出し、他の蛋白質との相互作用に寄与する可能性が高いため、それらの相互作用部位を同定することが可能である。

(2) エンドサイトーシスにおける Gmf1 の役割とその動態についての解析

- ① 分裂酵母の Gmf1 は細胞内のアクチンパッチに局在する。アクチンパッチとは、細胞表面においてエンドサイトーシス小胞の形成と原形質膜からの離脱に働くアクチンの構造体である。細胞内の Gmf1 の機能について理解するために、野生株と *gmf1* 遺伝子破壊株について、エンドサイトーシス、アクチンパッチの挙動、Arp2/3 複合体の細胞内動態計測を行う。
- ② アクチンパッチと他の細胞内アクチン細胞骨格 (アクチンケーブルやアクチンリングなど) は、相互に構造の動的均衡を保ちつつ、それぞれの機能を発揮する。例えば、間期の細胞成長時には、アクチンケーブルがエキソサイトーシス小胞を細胞の伸長領域へと輸送し、それに関与した分子群はアクチンパッチがエンドサイトーシスすることでリサイクリングされると推定されている。Gmf1 を細胞に過剰発現すると、アクチンパッチの形成は抑制され、細胞内のアクチンケーブルの本数は増加する。細胞の成長方向の切り替えやストレス応答時などに Gmf1 の機能が、どのように関係しているか、その他の機能関連因子の働きと共に調べる。

(3) 運動細胞における GMF の機能解析

細胞運動における GMF の機能を明らかにする目的で、細胞移動の研究に実績のある細胞性粘菌を用いた解析を行う。具体的には、GMF 様遺伝子破壊細胞、および GMF 様遺伝子過剰発現株の運動様式を野生株と比較する。異なる生物の GMF の機能を調べることで、その進化的な普遍性を知ることができるかもしれない。

4. 研究成果

(1) GMF による Arp2/3 の活性制御作用についての分子構造学的な解析

- ① 大腸菌に発現させた組換え GMF と Arp2/3 複合体の電子顕微鏡ネガティブ染色像の単粒子画像解析については、現在も解析中である。その理由として、東日本大震災に伴い、数ヶ月間、電子顕微鏡が使用不能であったこと、そして震災直後から数日間の停電により精製した蛋白質試料が壊滅的な打撃を被ったことによる。
- ② 分裂酵母 Gmf1 のアラニンスキャニング解析については、合計 15 種類の変異遺伝子を作成し、それぞれを分裂酵母に過剰発現させた際に Arp2/3 の機能が抑制されるか調べた。その結果、AC とのアミノ酸配列の類似性から分子表面にあるであろう 2 本の α ヘリックスに挟まれたループの電荷が、Arp2/3 との結合に必要なことを同定した。このループ構造は、異なる分子活性をもつ AC ファミリーの蛋白質分子の間で多様性が認められる部分である。そのため、本実験により同定した分子の箇所は、その機能の決定に重要な役割を担うことが期待された。また、この結果は、上記①の構造解析に反映させることで、GMF と Arp2/3 の分子の認識機構の理解が期待できる。

(2) エンドサイトーシスにおける Gmf1 の役割とその動態についての解析

- ① 分裂酵母の野生株と *gmf1* 遺伝子破壊株について、エンドサイトーシス、アクチンパッチの挙動、Arp2/3 複合体の細胞内動態計測 (FRAP 解析) を行った。その結果、いずれにおいても野生株と *gmf1* 遺伝子破壊株で優位な差は認められなかった。分裂酵母のエンドサイトーシスにおいては、Gmf1 の機能を代替する分子が存在する可能性が考えられた。
- ② アクチンパッチとアクチンケーブルの形成のバランスについて検討した。アクチンケーブルの形成およびエキソサイトーシ

ス小胞の細胞伸長領域への繫留に必要な因子として Pob1 を同定し、この温度感受性変異株について、エキソサイトーシス量の変化、および細胞内の Gmf1 活性の変化があるかを調べた。その結果、アクチンケーブルが消失し、エキソサイトーシスが抑制された条件下では、細胞表層全体にアクチンパッチが形成される異常が認められたものの、エンドサイトーシス量の増加はみられなかった。これより、アクチンケーブルが形成されない場合は、細胞内のアクチンがアクチンパッチの形成に回されることが考えられたが、細胞内と細胞表層の膜の出し入れについては適切な平衡が設けられることが示唆された。この結果から、アクチンパッチによるエンドサイトーシスの効率が下がる (アクチンパッチが増えてもエンドサイトーシス量は変化しないため) と推定した。この制御に Gmf1 が関与しているか検討するため、*pob1* 温度感受性変異株と *gmf1* 遺伝子破壊株の二重変異株を作成した。ところが、単独変異株と 2 重変異株の間に顕著な差異はみつからなかった。これより、Gmf1 以外のアクチンパッチの機能を負に制御する因子が Pob1 の機能が低下した状態で働いているものと考えた。

(3) 運動細胞における GMF の機能解析

上述したように、分裂酵母の細胞内における Gmf1 の機能は、顕著に示すことができなかった。そこで、細胞体が活発に運動する細胞性粘菌の GMF 様遺伝子である *gmfA* の産物の細胞内機能を調べることにした。細胞性粘菌は、基質上をアメーバ運動し、活発に外環境物質を細胞内に取込む (マクロピノサイトーシス)。これらの細胞運動にもメッシュ状のアクチン繊維の構造が働くことが知られている。*gmfA* 遺伝子破壊細胞は、野生型細胞と比較して、基質に対して細胞がより平らに張り付く様子が認められた。その細胞運動を計測すると、野生型細胞の 4 倍の速度で基質上を移動した。さらに、その運動方向が直線的であることが分かった。そのため、*gmfA* 遺伝子破壊細胞では、細胞の運動方向の切り替えが起こりにくくなっていると考えられた。これらの細胞について、アクチン細胞骨格の分布を観察したところ興味深いことが判明した。*gmfA* 遺伝子破壊細胞では、細胞の移動方向側の細胞端に数多くの糸状仮足の形成が認められた。細胞の形状が平らにみえること、そして運動方向の切り替えが減少していることと深い関係があるように思われた。さらに

野生株では細胞の背側に形成されるマクノピノサイトーシスを誘導するアクチンのリング状構造が、*gmfA* 遺伝子破壊細胞ではあまり認められないことも分かった。これらの観察結果から、GmfA の機能が欠損したことで、Arp2/3 のリサイクリングがおかしくなり、その正常な働きに支障を生じた可能性が考えられた。震災による停電で、細胞株が壊滅したことで、再び細胞株を作製し直すなど、実験は停滞してしまっただが、以上の研究成果については論文投稿の準備を進めている。

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 3 件)

以下の論文は全て査読あり

- (1) Kentaro Nakano, Mika Toya, Aki Yoneda, Yukiko Asami, Akira Yamashita, Naomi Kamasaki, Masako Osumi and Masayuki Yamamoto (2011) Pobl ensures cylindrical cell shape by coupling two distinct Rho signaling events during secretory vesicle targeting. *Traffic*, vol. 12, 726-739.
- (2) Anupama Goyal, Masak Takaine, Viesturs Simanis and Kentaro Nakano (2011) Dividing the spoils of growth and the cell cycle: The fission yeast as a model for the study of cytokinesis. *Cytoskeleton*, vol. 68, 69-88.
- (3) Kentaro Nakano, Hidekazu Kuwayama, Masato Kawasaki, Osamu Numata and Masak Takaine (2010) GMF is an evolutionarily developed ADF/cofilin-super family protein involved in the Arp2/3 complex-mediated organization of the actin cytoskeleton. *Cytoskeleton*, vol. 67, 373-382.

[学会発表] (計 1 件)

Kentaro Nakano, Hidekazu Kuwayama, Masato Kawasaki, Osamu Numata and Masak Takaine. GMF is an evolutionarily developed ADF/cofilin-super family protein involved in the Arp2/3 complex-mediated organization of the actin cytoskeleton. *Actin, Cytoskeleton, and Nucleus*. 2010 年 11 月 11 日 シンガポール国立大学、シンガポール

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/organelle/nakano.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 賢太郎 (NAKANO KENTARO)

筑波大・生命環境系・講師

研究者番号：50302815