

課題番号	LS069
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成25年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	細胞分裂軸の新たな制御機構の解析と皮膚の形成・恒常性維持における役割
研究機関・ 部局・職名	京都大学・ウイルス研究所・教授
氏名	豊島文子

**1. 当該年度の研究目的**

本研究は、申請者が発見した新規の細胞分裂軸制御機構の分子メカニズムと皮膚の組織構築における役割の解明を目指すものである。この分子機構では、細胞外基質から紡錘体へのシグナル伝達が重要な役割を果たす。また、紡錘体の極を形成する中心体の制御機構も分裂軸決定に必須である。そこで本年度では、下記の課題の解明を行うこととした。

- 1) 分裂期におけるインテグリンのダイナミクスの解析と機能制御機構の解明
- 2) 細胞外基質の情報を分裂軸制御因子に伝達する、細胞膜タンパク質の同定と解析
- 3) 新規分裂軸制御因子 PCK1 の機能解析
- 4) 分裂期の中心体制御における脂質代謝産物の機能解析

**2. 研究の実施状況**

1) 分裂期におけるインテグリンのダイナミクスの解析と機能制御機構の解明  
 インテグリンは、細胞分裂期において多くがエンドサイトーシスされる。分裂期には小胞膜融合とエキソサイトーシスが不活性化されているため、インテグリンを含む小胞は細胞質にとどまる。分裂期終了後、速やかに分裂溝へと輸送され、この極性輸送は細胞質分裂に必要であることが報告されている。本年度では、分裂期において、インテグリン小胞の膜融合を阻害するメカニズムの解明を試みた。その結果、Polo-like kinase1 (Plk1) が、分裂期における初期エンドソームの膜融合阻害に必須であることが分かった。初期エンドソーム分画に存在する Plk1 の基質をリン酸化プロテオーム解析により探索をした結果、中間径フィラメントであるビメンチンを同定した。Plk1 は分裂期においてビメンチンの 459 番目のセリン (Ser459) を直接リン酸化し、このリン酸化は膜融合阻害に必要であることを発見した。さらに、この分裂期に起こる膜融合阻害によって、異なる種類の積み荷がエンドゾーム内で混ざること回避しており、分裂期終了後、インテグリン小胞を特異的に分裂溝へと輸送するを保証することを示唆した。分裂期での方向性を持った小胞輸送は、幹細胞の非対称分裂に重要であることが報告されている。本研究で明らかにした機構は、非対称分裂にも貢献している可能性がある。本成果を Cell Cycle に発表した。

2) 細胞外基質の情報を分裂軸制御因子に伝達する、細胞膜タンパク質の同定と解析  
 多くの培養細胞は分裂期において球形化するが、このとき細胞はリトラクションファイバーと呼ばれる長いアクチンファイバーによって細胞外基質に接着している。最近、リトラクションファイバーにかかる張力が X-Y 平面上での分裂軸の平面極性を決めること、この分裂軸の平面極性には LGN/NuMA が必要であることが報告された。しかし、平面極性が決定される時期や、張力を LGN/NuMA に伝えるシグナル伝達は不明であった。我々は、動画から得られる画像情報により、核膜崩壊時に起こる細胞の局所的な変形が分裂軸と高い相関をもつことを見出した。さらに、この膜領域には活性型 Rho が濃縮し、また活性型 Rho に caveolin1 が直接結合することを見出した。さらに、caveolin1 は Gα を介して LGN/NuMA の局在を決定することを突き止めた。本研究は、長年不明であった細胞外基質から紡錘体へのシグナル伝達を、初めて明らかにしたものである。本研究は現在投稿準備中である。

### 3) 新規分裂軸制御因子 PCK1 の機能解析

昨年度までの研究により、PCK1 がそのキナーゼ活性依存的に分裂軸を制御すること、またリン酸化プロテオーム解析と網羅的な siRNA スクリーニングにより、PCK1 は PKA の制御サブユニットである KAP0 の Ser83 をリン酸化すること、このリン酸化は分裂軸に必要であることを見出した。本年度では、このリン酸化依存的に KAP0 に結合する因子の同定を試みた。その結果、我々が以前の研究で細胞分裂軸制御因子として報告したミオシン X が、KAP0 の結合タンパク質であることが分かった。Ser83 のリン酸化は KAP0 とミオシン X の結合を促進した。さらに、ミオシン X はインテグリンと結合することが報告されているが、KAP0 との結合により、インテグリンとの結合も促進されることが分かった。内在性のインテグリンをミオシン X に結合できないインテグリンに置換すると分裂軸が異常となったことから、KAP0 に依存したミオシン X とインテグリンの結合が分裂軸制御に必須であることが示唆された。本研究は現在投稿準備中である。

### 4) 分裂期の中心体制御における脂質代謝産物の機能解析

我々は以前の研究で、リン脂質 PIP3 が分裂軸制御に重要であることを報告した。そこで、分裂期における他の脂質の機能の解析を行ったところ、コレステロール代謝産物であるプレグネノロンが、分裂期の中心体の維持に必要であることを見出した。当初は、分裂軸の異常に着目して解析したが、プレグネノロンを除去すると紡錘体が多極化するという新しい現象が観察されたため、中心体の維持機構に焦点を絞ることとした。プレグネノロンは分裂期に細胞内濃度が上昇し、分裂期終了とともに速やかに減少した。FITC ラベルしたプレグネノロンを細胞に導入したところ、分裂期において紡錘体極に局在した。プレグネノロン産生酵素である Cyp11a を siRNA によりノックダウンすると、分裂期の紡錘体が多極化し、この異常は、プレグネノロンを加えると回復するが、下流の代謝産物では回復しなかった。従って、プレグネノロン自身に紡錘体の多極化を防ぐ働きがあることが分かった。さらに、この紡錘体の多極化は、中心体の複製異常が原因ではなく、本来、分裂期終期におこる中心小体のかい離が、分裂期の初期に早期に起こることが原因であることが分かった。複数の中心体制御因子について解析を行った結

様式19 別紙1

果、プレグネノロンは、中心小体接着維持に必要な sSgo1 を中心体に局在化させることに必要であった。さらに、プレグネノロンは sSgo1 に直接結合し、その二量体化を促進するとの結果が得られた。Sgo1 の二量体化は PP2A との結合に必要なとの報告があることから、プレグネノロンは sSgo1 を二量体化することによって、他の中心体タンパク質との結合を促進し、その結果 sSgo1 の中心体局在を実現させていると考えられる。本研究は現在投稿中である。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計2件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計1件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Ikawa, K., Satou, A., Fukuhara, A., Matsumura, S., Sugiyama, N., Goto, H., Fukuda, M., Inagaki, M., *Ishihama, Y., and *<u>Toyoshima, F.</u> Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. <i>Cell Cycle</i> <b>13</b>, 126-137 (2014).</li> </ol> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計1件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Hamasaki, M., Matsumura, S., and *<u>Toyoshima, F.</u> Pregnenolone associates with mitotic spindles and functions in centriole cohesion.(投稿中)</li> </ol>
<p>会議発表 計 20 件</p>	<p>専門家向け 計 20 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Fumiko Toyoshima: Pregnenolone Associates with Mitotic Spindles and Functions in Centriole Cohesion. The 25<sup>th</sup> CDB Meeting “Cilia and Centrosomes: from Fertilization to Cancer” Kobe, 17-18 June, 2013.</li> <li>Fumiko Toyoshima: A novel role of pregnenolone in centriole cohesion 第 65 回日本細胞生物学会、愛知、2013 年 6 月 19-21 日</li> <li>濱崎眞弓 松村繁 豊島文子: プレグネノロンは中心小体エンゲージメントを制御する 第 65 回日本細胞生物学会、愛知、2013 年 6 月 19-21 日</li> <li>松村繁、豊島文子: 間期細胞形態と細胞分裂軸方向を繋ぐシグナル伝達機構の解析 第 65 回日本細胞生物学会、愛知、2013 年 6 月 19-21 日</li> <li>Sayaka Iwano, Shigeru Matsumura, Ayaka Satou, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama and Fumiko Toyoshima: PCTK1 Regulates Spindle Orientation via PKA Regulatory Subunit, KAPO 第 65 回日本細胞生物学会、愛知、2013 年 6 月 19-21 日</li> <li>一條遼、松村繁、豊島文子: 妊娠期における皮膚基底細胞の増殖制御機構の解析 第 65 回日本細胞生物学会、愛知、2013 年 6 月 19-21 日</li> <li>池田愛、前川桃子、豊島文子: 分化誘導後に ES 細胞が未分化状態を維持する機構の解析 日本細胞生物学会、愛知、2013 年 6 月 19-21 日</li> <li>Sayaka Iwano, Shigeru Matsumura, Ayaka Satou, Masaki Wakabayashi, Yasushi</li> </ol>

様式19 別紙1

	<p>Ishihama and Fumiko Toyoshima. Characterization of PCTK1 as a Novel Regulator for Oriented Cell Division 第8回研究所ネットワーク国際シンポジウム 京都 2013年6月27-28日</p> <p>9. 豊島文子：ステロイドによる細胞分裂制御 第32回分子病理学研究会「吉野シンポジウム」 奈良、2013年7月20-21日</p> <p>10. 豊島文子：細胞分裂の軸回転と生き物の形づくり」IGRE グリーン自然科学レクチャー 名古屋、2013年7月26日</p> <p>11. 豊島文子：細胞分裂期の膜と骨格を制御する新たなリン酸化シグナル伝達 第86回日本生化学会大会シンポジウム 横浜、2013年9月11-13日</p> <p>12. 井川 敬介、佐藤 綾香、松村 繁、杉山 直幸、後藤 英仁、福田 光則、稲垣昌樹、石濱 泰、豊島 文子：Plk1は分裂期における vimentin のリン酸化を介して初期エンドソームの fusion を阻害する 第86回日本生化学会大会 横浜 2013年9月11-13日</p> <p>13. 濱崎真弓 松村繁 豊島文子：Pregnenolone Associates with Mitotic Spindles and Functions in Centriole Cohesion 第86回日本生化学会大会 横浜 2013年9月11-13日</p> <p>14. 豊島文子：細胞分裂軸を決めるシグナル伝達ネットワーク 発生物学会秋季シンポジウム 兵庫 2013年11月18日</p> <p>15. 石橋理基、前川桃子、豊島文子：マウス ES 細胞の中胚葉と内胚葉への分化制御機構の解析 第36回日本分子生物学会 神戸 2013年12月3-6日</p> <p>16. Sayaka Iwano, Shigeru Matsumura, Ayaka Satou, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama and Fumiko Toyoshima : PCTK1 Regulates Spindle Orientation by phosphorylating PKA Regulatory Subunit KAPO 第36回日本分子生物学会 神戸 2013年12月3-6日</p> <p>17. 一條遼、松村繁、豊島文子：妊娠期における皮膚基底細胞の増殖制御機構の解析 第36回日本分子生物学会 神戸 2013年12月3-6日</p> <p>18. 池田愛、前川桃子、豊島文子：分化環境下での多能性維持を促進する転写因子の探索 第36回日本分子生物学会 神戸 2013年12月3-6日</p> <p>19. 豊島文子：細胞分裂の軸を決めるメカニズムと細胞分化・組織構築における意義 再生研学術交流会 京都 2013年12月25日</p> <p>20. 豊島文子：An emerging role of steroids in the control of cell division. 第6回 NAGOYA グローバルリトリート 愛知、2014年2月14-15日</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	

様式19 別紙1

<p>産業財産権 出願・取得状 況  計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>Toyoshima Lab. Lab. of Subcellular Biogenesis Institute for Virus Research, Kyoto University <a href="http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Toyoshima-HP/Home.html">http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Toyoshima-HP/Home.html</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>京都女子中学・高等学校にて、中学生と保護者を対象に講演。(平成25年4月27日) 参加者数約50名、講演演題「細胞分裂から見た生き物の形づくりと疾患」、専門の研究内容とその研究背景について分かりやすく紹介した。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	114,000,000	85,160,000	28,840,000	0	0
間接経費	34,200,000	25,548,000	8,652,000	0	0
合計	148,200,000	110,708,000	37,492,000	0	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	1,133,270	28,840,000	0	29,973,270	29,973,270	0	0
間接経費	21,218,502	8,652,000	0	29,870,502	29,870,502	0	0
合計	22,351,772	37,492,000	0	59,843,772	59,843,772	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	25,300,243	実験機器、実験試薬、実験動物 等
旅費	405,950	研究成果発表、研究情報収集 等
謝金・人件費等	3,372,092	非常勤教職員人件費 等
その他	894,985	学会参加費、シーケンス解析、宅配料 等
直接経費計	29,973,270	
間接経費計	29,870,502	
合計	59,843,772	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
マイクロアレイデータ 解析ソフトウェア	アジレント・テクノロジーズ 社製 GeneSpring GX1 年1ユーザー	1	630,000	630,000	2013/4/1	京都大学
CO2インキュベーター	米国サーモフィッシャーサイエン ティフィック社製 フォーマ ユニ バーサルCO2インキュベーター 3110(架台FX190647 1台 含む)	1	1,187,025	1,187,025	2013/6/4	京都大学