

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07756

研究課題名(和文) 進化上保存された細胞極性形成ネットワークによる新規の微小管制御機構の解明

研究課題名(英文) Roles of a conserved cell polarity signaling network in cell cycle-dependent microtubule organization

研究代表者

久米 一規 (Kume, Kazunori)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授

研究者番号：80452613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞極性は、生体の諸組織・各器官形成の基盤であり、その破綻は細胞の癌化や老化を引き起こす要因となる。細胞極性の形成には、アクチンと微小管の構築が重要であり、細胞増殖と運動した細胞骨格形成の制御機構の存在が示唆されている。しかしその制御機構については不明な点が多い。本研究では、研究代表者がこれまでに明らかにした、当該制御機構に重要な分子経路(MOR経路)について、MOR経路の新規機能として示唆された、微小管制御機構の解析を行った。その結果、MOR経路が細胞周期に依存した微小管の形成制御に重要であることを明らかにした。さらにその分子機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で注目しているMOR経路は酵母からヒトまで高度に保存された分子経路であり、高等生物では神経細胞や腸上皮細胞などの多様な細胞の極性制御と細胞増殖制御に重要である。本研究成果は、高等生物におけるMOR経路が関わる新規生命現象の理解に貢献することが期待される。またヒトにおいて、MOR経路は腫瘍形成や遺伝性癌症候群の原因分子の制御に関わることが報告されている。それゆえ本研究により得られた知見は、MOR経路の破綻が原因となり引き起こされる細胞癌化や遺伝疾患の分子機構の理解、生理活性物質探索系の開発に資する研究につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell polarity control is essential for organization of cells and formation of various tissues and organs in eukaryotes. Actin and microtubule play important roles in establish and maintenance of cell polarity during cell growth but coordination mechanisms between organization of cytoskeletons and cell growth remain elusive. Here we focused on a conserved signaling network, the MOR, which is essential for the establishment of cell polarity and the control of actin-based polarized growth during interphase and analysed the roles of the MOR in microtubule organization during the cell cycle. We found that the MOR is crucial for cytoplasmic microtubule organization, and contributes to reorganization of the microtubule cytoskeletons during the cell cycle.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 アクチン 細胞極性 シグナル伝達 細胞増殖 細胞周期 分裂酵母

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞極性は、生体の諸組織・各器官形成の基盤であり、その破綻は細胞の癌化や老化を引き起こす要因となる。細胞極性の形成には、アクチンと微小管が適切に構築され、機能することが重要であり、細胞増殖と連動した細胞極性制御機構の存在が示唆されている。しかし当該制御機構の実体については不明な点が多い。

研究代表者は、当該制御機構の全容解明を目指し、これまでに酵母を真核生物のモデル系として用いて研究を行ってきた。そして細胞増殖と連動する分子経路の一つとして、進化上高度に保存された細胞極性形成ネットワーク(以下、MOR 経路)を発見した。MOR 経路は、細胞の極性成長時のアクチンの局在制御に重要である。さらに MOR 経路は、高等生物において、細胞極性や細胞増殖(癌化)に関わることが報告されており、MOR 経路が関わる生命現象の全容解明は、細胞癌化の理解に貢献しうる重要な研究課題である。研究代表者は、MOR 経路の新規機能として、MOR 経路が微小管制御に関わることを見出した。つまり、MOR 経路はアクチンに加え、微小管の制御にも関わる重要な分子経路であることが示唆された。これまでに MOR 経路の構成因子の機能や MOR 経路とクロストークするその他の分子経路について明らかにされてきたが、MOR 経路による細胞骨格制御機構について、その全体像や MOR 経路のターゲット分子については未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、進化上高度に保存された分子経路である MOR 経路について、これまでの研究代表者の解析から見出した、MOR 経路の新規機能(MOR 経路による微小管制御)の分子メカニズムの解明および当該制御の細胞極性および細胞増殖における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

MOR 経路による新規微小管制御の分子メカニズムの解明および当該制御の細胞極性及び細胞増殖の役割を理解するために、以下の具体的な研究計画を実施した。

(1) MOR 経路変異体の微小管構造の定量的解析と MOR 経路による微小管制御機構の細胞極性及び細胞増殖における役割の検証

MOR 経路変異体を示す微小管構造の異常の特徴を特定するために、ライブセルイメージングを用いて定量的に解析を行った。また MOR 経路変異体を示す微小管構造の異常が細胞増殖の悪化をもたらす原因究明のための解析を行った。さらに細胞極性制御との関連性についての解析も行った。

(2) MOR 経路と微小管制御とをつなぐ因子の同定と機能解析

MOR 経路と微小管制御とをつなぐ因子を同定するために、研究代表者はこれまでに、MOR 経路変異体を用い、MOR 経路変異体が微小管重合阻害剤存在下で示す増殖悪化を抑圧する変異体(以下、*sup* 変異体とよぶ)の取得に成功した。取得した *sup* 変異体の原因遺伝子を同定し、機能解析を行った。

(3) MOR 経路による微小管制御の分子メカニズムの解析

上記(2)の解析に加え、既知の微小管関連因子の中から、MOR 経路による微小管制御における MOR 経路のターゲット分子を探索し、MOR 経路による制御の分子メカニズムについての解析を行った。

4. 研究成果

(1) MOR 経路変異体の微小管構造の定量的解析と MOR 経路による微小管制御機構の細胞極性及び細胞増殖における役割の検証

MOR 経路変異体の微小管の異常について詳細を明らかにするために、チューブリンに GFP を連結した株を用いて、MOR 経路変異体の微小管構造をライブセルイメージングにより観察した。その結果、細胞周期間期に形成される細胞質微小管の本数が、野生株と比較して顕著に増加していた。次に、微小管のマイナス端にドット状で局在し微小管形成に関わる因子の細胞内局在を観察したところ、MOR 経路変異体では、微小管の本数と同様、野生株よりもドットの数が増加していた。つまり、MOR 経路変異体では、細胞質微小管の形成が促進され、本数が増加していることがわかった。

一方、分裂期の細胞では、野生株と同様、ほとんどの細胞において、細胞質微小管が消失し核内で染色体分配に重要な核内スピンドルの形成が観察された。しかし、MOR 経路変異体では 10-15%の細胞において、核内スピンドル形成時に、細胞質微小管が 1-2 本程度残存した異常な微小管構造が観察された。この異常な微小管構造をもつ分裂期細胞の核内スピンドルの蛍光強度について調べたところ、正常な分裂期の細胞よりも蛍光強度が有意に低下していることがわかった。したがって、MOR 経路変異体では、間期において細胞質微小管の形成が促進されるため、間期から分裂期の移行時における微小管の再構成に異常を示すことが示唆された。その結果、染色体分配に重要な核内スピンドルの十分な強度を確保することができず、染色体分配異常の頻度が上がることが予想された。実際、MOR 経路変異体を示す細胞質微小管の増加を抑圧する二重変異体では、染色体分配異常の増加が抑圧された。さらに二重変異体では、微小管重合阻害剤存在下でも染色体分配異常が野生株程度に

まで抑えられ、MOR 経路単独変異体が示す増殖悪化を顕著に抑圧した。以上のことから、MOR 経路は細胞周期に依存した微小管の構成・再構成に重要であることが示唆された。そして MOR 経路の破綻は、細胞周期と連動した微小管形成に異常をもたらす、染色体分配異常を引き起こすリスクを上昇させると考えられる。

なお、MOR 経路による微小管制御と細胞極性の関係についても検証を行ったところ、細胞質微小管の増加と MOR 経路変異体が示す細胞極性異常との相関はみられなかった。

(2) MOR 経路と微小管制御とをつなぐ因子の同定と機能解析

MOR 経路変異体が示す微小管重合阻害剤存在下での増殖悪化を抑圧する *sup* 変異体の原因遺伝子の同定を行った。*sup* 変異体 (*sup1*~*sup6* 変異体) は、相補性試験の結果、微小管構成因子である チュープリンと チュープリンを含む 6 つの遺伝子座に分類された。未同定の 4 つの *sup* 変異体について、原因遺伝子のクローニングを行ったところ、*sup5* 変異体の原因遺伝子の同定に成功した。*sup5* 変異は、核外輸送に重要な Exportin をコードする *crm1*⁺ であった。*sup5/crm1* 変異体は核外輸送に異常を示し、微小管重合阻害剤存在下で MOR 経路変異体が示す増殖悪化を顕著に抑圧した。さらに *sup5* 変異と MOR 経路変異の二重変異体の微小管構造を観察したところ、MOR 経路単独変異体が示す細胞質微小管の増加を抑圧し、野生株と同程度まで本数を減少させた。以上より、MOR 経路変異による細胞質微小管の本数の増加および微小管重合阻害剤存在下での増殖悪化は、核-細胞質間の輸送と関連することが示唆された。

核-細胞質間の輸送と微小管制御との関係にせまるため、*sup5* 単独変異体の解析を進めた。*sup5* 変異体の微小管構造を観察したところ、細胞周期間期の細胞質微小管の本数が野生株よりも顕著に減少し、核内で微小管が形成された細胞がみられた。通常、間期の野生株の細胞では、細胞質でのみ細胞質微小管が形成され、核内では微小管は形成されない。つまり *sup5* 変異による核外輸送の破綻が、細胞周期と連動した微小管形成能に異常をもたらす、核内での微小管形成を促進したと考えられた。次に *sup5* 変異による間期での核内微小管の形成に関わる因子を探索したところ、核内輸送に関わる Importin をコードする Imp1 と微小管形成に重要な微小管ポリメラーゼの Alp14 (TOG/XMAP215) と微小管の安定化に重要な Mal3 (EB1 ホモログ) を同定した。これまでに、Alp14 は細胞周期に依存した微小管形成に関わることが報告されており、間期では細胞質に局在して細胞質微小管の形成に、分裂期では核内に集積して核内スピンドルの形成を促進する。*sup5* 変異体では、間期の細胞において Alp14 の核内蓄積が観察されたことから、*sup5* 変異体での核内微小管の形成は Alp14 の核内蓄積が原因であることが示唆された。そこで野生株において、Alp14 に核移行シグナルを連結し、強制的に核内に局在させると、間期にも関わらず、核内微小管を形成することがわかった。したがって、細胞周期に依存した微小管形成には、微小管形成に関わる因子が、核-細胞質間の輸送によりその局在を時空間的に適切に制御される必要があることがわかった。

(3) MOR 経路による微小管制御の分子メカニズムの解析

MOR 経路による微小管制御の分子メカニズムを解明するために、MOR 経路の下流で微小管制御に関わる MOR 経路のターゲット分子を探索し、MOR 経路との機能的関係を調べた。既知の微小管関連因子の中から、MOR 経路変異体が示す細胞質微小管の本数の顕著な増加に関わるものをスクリーニングしたところ、Alp14 を含む微小管形成に関わる因子を複数同定した。選抜した遺伝子に GFP を連結した株を構築し、野生株と MOR 経路変異体での細胞内局在を調べたところ、MOR 経路変異により、局在量が増加する因子が複数存在することがわかった。次に選抜した微小管関連因子が、MOR 経路の最下流で機能するタンパク質リン酸化酵素・Orb6 によりリン酸化される可能性を検証した。その結果、微小管のマイナス端に局在し、微小管形成に重要な 2 つ微小管関連因子が Orb6 によってリン酸化される可能性が示唆された。これらの因子が Orb6 により直接リン酸化されることを確認するために、大腸菌を用いて精製できた 1 つの微小管関連因子について、*in vitro* でキナーゼアッセイを行った。その結果、Orb6 が直接リン酸化することを確認した。さらにリン酸化プロテミクスにより Orb6 がリン酸化するサイトを探索したところ、5 箇所のサイトを同定した。当該サイトの非リン酸化型変異体構築し、微小管構造を観察した結果、MOR 経路変異体と同様、細胞質微小管が増加した。このことから Orb6 が選抜した微小管関連因子をリン酸化することにより細胞質微小管の本数を適切に制御するというモデルが示唆された (論文投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kume Kazunori	4. 巻 84
2. 論文標題 Control of cellular organization and its coordination with the cell cycle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 869 ~ 875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1080/09168451.2020.1717926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kume Kazunori, Kaneko Sayuri, Nishikawa Kenji, Mizunuma Masaki, Hirata Dai	4. 巻 503
2. 論文標題 Role of nucleocytoplasmic transport in interphase microtubule organization in fission yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1160 ~ 1167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.06.135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kume Kazunori, Hashimoto Tomoyo, Suzuki Masashi, Mizunuma Masaki, Toda Takashi, Hirata Dai	4. 巻 491
2. 論文標題 Identification of three signaling molecules required for calcineurin-dependent monopolar growth induced by the DNA replication checkpoint in fission yeast	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 883 ~ 889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻拓也、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母のアクチンと微小管の制御に関わる分子経路の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久米一規
2. 発表標題 正常な細胞機能を保証する細胞構造の制御機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第54回講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田早紀、水沼正樹、平田大、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の細胞形態形成ネットワークによる微小管制御機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻拓也、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母のMOR経路による微小管制御に関わる因子の探索
3. 学会等名 第37回Yeast Workshop
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久米一規、水沼正樹、平田大
2. 発表標題 分裂酵母の細胞周期に依存した微小管制御機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植田早紀、水沼正樹、平田大、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の細胞形態形成ネットワークによる微小管制御に関わる因子の探索
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植田早紀、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の細胞形態形成ネットワークによる微小管制御機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植田早紀、西川健二、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の細胞形態形成ネットワークによる微小管制御機構の解析
3. 学会等名 第35回Yeast Workshop
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西川健二、水沼正樹、平田大、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の細胞形態形成ネットワークによる微小管制御機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第50回研究報告会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ
<https://www.hiroshima-u.ac.jp/adsm/graduateschool/bio/cellbio>

広島大学健康長寿研究拠点
<http://hiha.hiroshima-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----