

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06118

研究課題名（和文）Akt-EB2/RP1による微小管動態の新規制御メカニズムと細胞極性制御

研究課題名（英文）Regulation of microtubule dynamics by EB2/RP1 microtubule binding protein

研究代表者

樋口 麻衣子（Higuchi, Maiko）

立教大学・理学部・准教授

研究者番号：30420235

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：細胞が正しい方向に運動するためには、細胞外の走化性因子の濃度勾配に応じた前後の極性形成とそれに引き続く細胞極性の維持が重要であるが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。本研究では、PI3K-Akt経路が微小管結合分子EB2/RP1を介して微小管動態を制御し、細胞の前後の極性維持に貢献する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、細胞外の環境に応じて細胞が前後の極性と形成・維持する、という細胞にとって非常に重要な機構の解明に貢献することが出来た。さらに、古くからの課題である微小管動態の分子的基盤の新しいメカニズムの理解にも貢献することが出来たと考えている。

研究成果の概要（英文）：Cells must establish and maintain a front-to-back polarity to achieve directed migration. However, the underlying mechanisms are still not fully understood. In this study, we examined the roles of the PI3K-Akt pathway in the regulation of a front-to-back polarity and found Akt can regulate microtubule dynamics through phosphorylation EB2/RP1, a member of EB family microtubule associated proteins. This signaling pathway might account for polarized stabilization of microtubules in cell front.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞運動 微小管

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が正しい方向に運動するためには、細胞外の走化性因子の濃度勾配に応じた前後の極性形成とそれに引き続く細胞極性の維持が重要である。この細胞極性の維持には細胞前方における微小管の選択的な安定化が重要な役割を果たすと考えられているが、いかなるメカニズムで前方の微小管が安定化するのかについては未だほとんど明らかになっていなかった。

原癌遺伝子 Akt は様々な癌で異常な活性化が観察されており、その活性化は癌の悪性度と相関が高いことが報告されている。Akt が癌の悪性化を引き起こす原因は長い間不明であったが、癌の浸潤性と関連して申請者らはこれまでに、Akt が、繊維芽細胞の運動に必須の役割を果たしていること、運動方向先端部で活性化した Akt が微小管の安定化に必須であり、繊維芽細胞の極性維持に関与することを報告した。しかし、Akt が微小管を安定化するメカニズムについては明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、Akt による微小管安定化メカニズムの詳細を明らかにすることにより、細胞外の環境に応じて細胞が前後の極性を形成・維持するメカニズムを解明することを目的とした。研究代表者はこれまでに、Akt の結合分子のスクリーニングを行い、Akt が微小管の安定化を制御する際のターゲット分子の候補として微小管結合分子 EB2/RP1 に注目して研究を進めて来た。EB2/RP1 は、微小管プラス端結合因子 (+TIPs: plus-ends-tracking proteins) の中でも中心的な役割を果たすと考えられている EB1 と同じ EB ファミリーに属する微小管結合分子であるが、EB2/RP1 自身の機能解析はこれまであまり行われておらず、その機能はほとんど明らかになっていなかった。そこで本研究では、まず微小管動態制御における EB2/RP1 の機能を明らかにし、さらに Akt と EB2/RP1 の関係について明らかにすることで、繊維芽細胞の運動方向維持(前後の極性維持)における Akt の役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

微小管動態制御における EB2/RP1 の機能を明らかにするため、EB2/RP1 ノックダウン細胞を用いて微小管可視化プローブ EMTB-GFP および tubulin-GFP のライブイメージングを行い、微小管動態の詳細な観察および計測を行った。

また、Akt と EB2/RP1 の関係について明らかにするため、EB2/RP1 が Akt によってリン酸化される可能性について検討を行った。実際に Akt が EB2/RP1 をリン酸化することが明らかとなったため、EB2/RP1 のリン酸化部位の同定を行った。さらに、Akt による EB2/RP1 のリン酸化の生理的意義について検討するため、EB2/RP1 のリン酸化部位変異体を作製し、生化学的・細胞生物学的な実験を行い検討した。

4. 研究成果

まず、微小管動態制御における EB2/RP1 の機能を明らかにするため、EB2/RP1 ノックダウン細胞の微小管の観察を行った。大変に興味深いことに、EB2/RP1 ノックダウン細胞では微小管が著しく安定化し、束化していることが明らかとなった。この結果は、同じ EB ファミリーに属する EB1 が微小管を安定化するのに対し、EB2/RP1 は逆の機能を持つことを示唆している。そこで次に、EB2/RP1 と EB1 の関係について検討を行った。EB1 は通常は伸長している微小管のプラス端に局

在し、その局在はコメット状に見えることが知られている (EB1 コメット)。そこで、EB2/RP1 ノックダウン細胞において EB1 の局在を調べたところ、EB1 コメットの長さがコントロール細胞に比べて有意に長くなっていた。そこで、この EB1 の局在変化が EB2/RP1 ノックダウン細胞における微小管の安定化に關与する可能性について検討を行った。その結果、EB2/RP1 ノックダウン細胞における微小管の安定化および束化は、EB1 をノックダウンすることによりコントロールレベルまでレスキューされることが明らかとなった。したがって、EB2/RP1 ノックダウン細胞においては、EB1 の局在が変化することにより、微小管の異常な安定化、束化が促進されることが示唆された。

そこで次に、Akt と EB2/RP1 の關係について明らかにするため、EB2/RP1 が Akt によってリン酸化される可能性について *in vitro* kinase assay を行い検討した。その結果、EB2/RP1 の 2 カ所のセリン/スレオニン残基が Akt によって効率良くリン酸化されることが分かり、EB2/RP1 が Akt1 の新規基質であることが明らかとなった。さらに、Akt による EB2/RP1 のリン酸化の生理学的意義について明らかにするため、EB2/RP1 のリン酸化部位変異体を作製し検討を行った。その結果、Akt による微小管の安定化が EB2/RP1 のリン酸化部位変異体により抑制されること、さらに繊維芽細胞における走化性因子である PDGF 刺激による細胞運動性の上昇が EB2/RP1 のリン酸化部位変異体により阻害されることが明らかとなった。この結果から、走化性因子の下流で起こる細胞運動性の制御において、Akt-EB2/RP1 経路が重要な役割を果たすことが示唆された。

以上、本研究ではまず EB2/RP1 が微小管を不安定化する分子であること、また EB2/RP1 が EB1 の局在を制御することを見出した。さらに、Akt が EB2/RP1 をリン酸化すること、Akt による EB2/RP1 のリン酸化が微小管の安定性制御、および細胞運動性制御において重要な役割を果たすことを明らかにした。今後は、Akt による EB2/RP1 のリン酸化が細胞内のどこでいつ起きているのかについて検討し、Akt-EB2/RP1 経路による微小管動態制御の詳細について明らかにすることで、細胞外環境に応じて細胞が運動方向を決定するという、細胞にとって非常に重要な機構の解明に貢献出来ると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Higuchi Maiko	4. 巻 25
2. 論文標題 Maternal stress suppresses cell proliferation in the forebrain of zebrafish larvae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 350-357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12761	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 樋口麻衣子、大西啓介、後藤由季子
2. 発表標題 Novel mechanism of regulation of microtubule dynamics by EB2/RP1 microtubule binding protein
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木沢子、大西啓介、後藤由季子、樋口麻衣子
2. 発表標題 細胞周期依存的な微小管動態制御におけるEB2/RP1の役割の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田仁、福島隆士、中野璃奈、後藤聡、岡本仁、樋口麻衣子
2. 発表標題 母親の栄養飢餓ストレスが稚魚の脳発生に与える影響の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------