

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700980

研究課題名(和文)細胞周期と協調した上皮極性の形成維持機構とその破綻に伴う発がん

研究課題名(英文) Tumorigenesis triggered by the misregulation of cell polarity associated with cell cycle

研究代表者

菊池 浩二 (Kikuchi, Koji)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：70457290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細胞極性の形成・維持機構は、動物発生における組織や器官形成に必須であり、また、細胞極性の破綻は発がん及びがんの悪性化における重要な要因となりうる。細胞極性の形成・維持には、細胞骨格による細胞の形態維持、及び、細胞骨格を介した細胞内での物質輸送等の関与が知られている。本研究では、「細胞極性の形成・維持機構における微小管動態の役割」について、その詳細な分子機構の解明を目的とし、その結果、機能未知の微小管結合蛋白質群より細胞極性の制御に関与する因子を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：The establishment and maintenance of cell polarity has a crucial role in multiple biological processes from chemotaxis to embryogenesis, and the abnormality of cell polarity promotes tumorigenesis. It is believed that cytoskeletal network between microtubule (MT) and filamentous actin plays an important role for the establishment and maintenance of cell polarity. However, molecular mechanisms of the cytoskeletal network still remain unclear. Here, we found that MT co-sedimented proteins, which we have previously identified, are involved in the establishment of cell polarity by regulating the cytoskeletal network.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：細胞運動 前後極性 上皮極性 微小管動態 MAP7ファミリー Wnt5aシグナル Dvl2

1. 研究開始当初の背景

「細胞極性の形成・維持機構」は、動物発生における組織や器官形成に必須であり、また、細胞極性の破綻は発がん及びがんの悪性化における重要な要因となりうることから、重要な研究テーマのひとつである。細胞極性の形成・維持には、細胞骨格(アクチンフィラメント・中間径フィラメント・微小管)による細胞の形態維持や細胞骨格を介した細胞内での物質輸送等の関与が知られている。私共の研究室(以降、本研究室とする)では細胞骨格でも特に、微小管に着目し、微小管に結合する分子を新たに単離し、その機能解析から細胞極性における微小管の機能を解明すべく、研究を進めている(Makino et al., 2008, BBRC; Sakamoto et al., 2008, Genes Cells)。

微小管はプラス端及びマイナス端といった方向性を持ち、重合・脱重合によりダイナミックな伸長と短縮を繰り返す性質を持つ(動的不安定性)。微小管は主にプラス端側で伸長と短縮を繰り返し、そのダイナミクスは細胞内の場所や細胞周期に応じて制御される。例えば、創傷治癒過程では、創傷面において細胞の極性化を伴う細胞運動が誘導されるが、遊走する細胞の先端端では、進展する細胞膜先端に向かって微小管が放射状に配向する。また、有糸分裂期においては、2つの紡錘体極から伸びる微小管が、染色体上の動原体と結合して紡錘体を形成し、更に細胞表面と星状系の相互作用によって紡錘体の方向性を決定し正しい紡錘体軸を維持する。こうした微小管の配向は、微小管プラス端に集積する蛋白質(+TIPs)が、細胞表面のアクチン骨格と相互作用することにより決定されると考えられているが、その詳細は明らかではない。また、細胞運動時及び有糸分裂期に観察される細胞極性には細胞が基質と結合することが必須である。これまで細胞-基質間接着には接着斑を構成する蛋白質とアクチン骨格の連結の重要性が指摘されてきたが、微小管がどのように細胞-基質間接着に関与するかは明らかでない。さらに、上皮極性の形成と維持においても同様に、周辺環境に応じた微小管-アクチン骨格の相互作用や紡錘体軸の制御機構が重要な役割を果たすと考えられているが、依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究室は以前に、ラット脳抽出液を用いたプロテオミクス解析により、網羅的に新規微小管結合蛋白質を同定した(Sakamoto et al., 2008, Genes Cells)。本研究の目的は、本研究室の成果を活用し、申請者が得意とする微小管動態の解析手法を用いて、以下の3点を明らかにし、「細胞極性の形成・維持機構における微小管動態の役割」を理解することである。

細胞運動時における新規微小管結合蛋白質

質による微小管動態制御機構の解明

紡錘体軸決定における新規微小管結合蛋白質による微小管動態制御機構の解明

微小管動態を基盤とした上皮極性の形成機構の解明

本研究では、第一段階として、平面培養系において観察される、細胞周期で異なる細胞極性(「細胞運動時の前後極性:間期における細胞極性」、「紡錘体軸の決定機構:有糸分裂期における細胞極性」)に着目し、それぞれの細胞極性に関する因子を同定し、さらに、第二段階として、平面培養系の解析結果を3次元培養系による解析に活用し、上皮極性の形成・維持機構を明らかにすることにした。

3. 研究の方法

細胞運動時における新規微小管結合蛋白質による微小管動態制御機構の解明

本研究の開始までに、本研究室はラット脳抽出液を用いたプロテオミクス解析により、網羅的に微小管結合蛋白質を同定した。その中から、機能未知の新規微小管結合蛋白質、及び、そのパラログに着目し、候補蛋白質を選定した。表現型スクリーニングで用いるHeLa細胞において、候補蛋白質をコードする遺伝子(以降、候補遺伝子とする)の発現レベルをリアルタイムPCRにより確認し、発現が確認された候補遺伝子を対象に、siRNAライブラリーを作製した。本項では、「細胞接着と創傷治癒過程における細胞運動」を指標とした表現型スクリーニングを実施し、細胞運動時の前後極性に関する因子の同定を試みた。さらに、詳細な分子機構を解明すべく、免疫染色法や生細胞タイムラプス撮影による分子レベルでの表現型解析、及び、生化学的解析を実施した。

紡錘体軸決定における新規微小管結合蛋白質による微小管動態制御機構の解明

前項で作製したsiRNAライブラリーを用いて、本項では「紡錘体軸(有糸分裂期)」を指標とした表現型スクリーニングを実施し、紡錘体軸の制御機構に関する因子の同定を試みた。さらに、詳細な分子機構を解明すべく、免疫染色法による分子レベルでの表現型解析等を実施した。

微小管動態を基盤とした上皮極性の形成機構の解明

細胞運動時の前後極性の形成に関する因子が、上皮極性の形成においても機能する可能性がある。例えば、Par3-Par6-aPKC複合体といった分子群は、前後極性と上皮極性の両者において重要な役割を果たすことが知られている。そこで、で同定した因子の上皮極性における役割を解明すべく、本項では、細胞外基質ゲル(マトリゲル)を用いた3次元培養により上皮極性を伴った嚢胞を形成するイヌ腎臓尿管上皮細胞 MDCKII を用い

て、細胞内局在や表現型を解析した。

4. 研究成果

細胞運動時における新規微小管結合蛋白質による微小管動態制御機構の解明

siRNA ライブラリーを用いた表現型スクリーニングにより、「細胞運動時の前後極性(間期)」に關与しうる因子として、Map7 とそのパラログ Map7D1 を同定した。Map7 と Map7D1 は、MAP7 ファミリーに属し、他に2つのパラログ、Map7D2 と Map7D3 が存在する。リアルタイム PCR の結果から、HeLa 細胞では Map7、Map7D1、Map7D3 の発現は認められたものの、Map7D2 の発現は認められなかった。表現型スクリーニングの結果を確認すべく、バリデーションを行った siRNA を用いて、再度、Map7、Map7D1、及び、Map7D3 ノックダウン細胞における細胞運動を確認したところ、表現型スクリーニングの結果の通り、Map7、及び、Map7D1 ノックダウン細胞では細胞運動能の低下が認められ、Map7D3 ノックダウン細胞では異常が認められなかった。また、細胞運動と同様に、微小管-アクチン骨格の相互作用が必要である細胞接着を観察した。Map7、及び、Map7D1 ノックダウン細胞では細胞接着時のラメリポディア形成に異常が認められ、Map7D3 ノックダウン細胞では異常が認められなかった。Map7 と Map7D1 は、MAP7 ファミリーの中で最も相同性が高く、それぞれのシングルノックダウン細胞において類似した表現型を呈することから、Map7 と Map7D1 の機能相補性を考慮し、Map7/Map7D1 ダブルノックダウン細胞(以降、Map7/7D1 ノックダウン細胞とする)における細胞運動能と細胞接着能を確認した。Map7/7D1 ノックダウン細胞では、それぞれのシングルノックダウン細胞と比較し、細胞運動能と細胞接着能の著しい低下が認められた。従って、細胞運動と細胞接着における Map7 と Map7D1 の機能相補性が示唆された。以上の結果を踏まえ、Map7/7D1 ノックダウン細胞を用いて、以降の解析を行うことにした。

細胞運動時の前後極性では、運動方向の先端端に向かって微小管が配向する。Map7 と Map7D1 は微小管に結合し、微小管動態を制御する可能性が考えられたことから、Map7/7D1 ノックダウンによる微小管配向への影響を確認した。コントロール細胞では運動方向の先端端に向かって微小管が配向する一方、Map7/7D1 ノックダウン細胞では配向の異常が認められた。次に、Map7/7D1 ノックダウン細胞において、細胞運動に必須である接着斑のターンオーバーとアクチン動態を評価した。接着斑の構成因子のひとつである FAK の免疫染色により先端端における接着斑の面積を測定し、接着斑のサイズによりターンオーバーを比較したところ、Map7/7D1 ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較して接着斑が肥大していたことから、接着斑のターンオーバーの遅延が認められた。また、ア

クチン動態を介して形成される先端端のフィロポディア形成を確認したところ、Map7/7D1 ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較し、フィロポディアの数が減少していた。以上の結果から、Map7 と Map7D1 は、細胞運動時における先端端での微小管動態の制御を介して、接着斑のターンオーバーやアクチン動態の制御に關与することが示唆された。

Map7/7D1 ノックダウン細胞で観察される表現型が、Wnt シグナル経路のひとつである Wnt5a シグナル経路(微小管動態の制御を介して接着斑のターンオーバーやアクチン動態を制御することが知られている)の異常によって観察される表現型と類似していることに着目し、Map7、Map7D1 と Wnt5a シグナル経路との関連性を解析することにした。Wnt5a シグナル経路の構成因子のひとつである Dvl2 との複合体形成を anti-Dvl2 抗体を用いて確認したところ、Map7 と Map7D1 は Dvl2 と免疫沈降することがわかった。次に、Map7 と Dvl2 の結合様式を明らかにすべく、それぞれの欠損変異体、もしくは、点変異体を作成し、解析を行った。Map7 の欠損変異体を用いた解析から、Map7 のアミノ末端側に存在するコイルドコイル1領域を含む 89-246 アミノ酸領域が Dvl2 との結合に必要なことがわかった。また、Dvl2 の欠損変異体、及び、点変異体を用いた解析から、平面内細胞極性の形成に必須である Dvl2 の DEP 領域に存在するループ構造が Map7 との結合に必要なこと、及び、Dvl2 のリン酸化が Map7 との結合に必要なことが示唆された。さらに、Wnt5a シグナル経路において、Map7 と Map7D1 が Dvl2 の上流もしくは下流で機能するか否かを、Wnt5a シグナルに依存した Dvl2 のリン酸化により検討したところ、Wnt5a 添加後の Dvl2 のリン酸化は Map7/7D1 ノックダウン細胞においてもコントロール細胞と同様に確認できたことから、Map7 と Map7D1 は Dvl2 の下流で機能する可能性が示唆された。従って、Wnt5a シグナル経路において、Map7 と Map7D1 が Dvl2 のエフェクターとして、微小管動態と接着斑、アクチン動態の相互作用に關与することが示唆された。

紡錘体軸決定における新規微小管結合蛋白質による微小管動態制御機構の解明

「紡錘体軸(有糸分裂期)」を指標とした siRNA ライブラリーを用いた表現型スクリーニング、及び、スクリーニングのバリデーションを実施し、新規の紡錘体軸制御因子(未発表のため、蛋白質 X とする)を同定した。紡錘体軸の制御に重要な役割を果たす星状系の安定性を α -Tubulin の免疫染色で確認したところ、蛋白質 X ノックダウン細胞ではコントロール細胞と比較し、安定性が低下していた。また、GFP を付加した蛋白質 X により細胞内局在を確認したところ、間期においては細胞辺縁部の微小管末端部分に局在し、

有糸分裂期においては細胞膜に局在することを見出した。今後、より詳細な解析を行うことにより、紡錘体軸の制御機構における蛋白質 X の分子機能を明らかにする予定である。

微小管動態を基盤とした上皮極性の形成機構の解明

Map7 と Map7D1 は、3次元培養下で嚢胞形成により極性化した MDCKII 細胞において、頂端部側に局在し、Map7、Map7D1、Map7/7D1 ノックダウン細胞では、嚢胞形成過程において上皮極性の異常が認められた。従って、Map7 と Map7D1 は嚢胞形成時における上皮極性の形成に関与することが示唆された。今後、より詳細な解析を行うことにより、上皮極性の形成における Map7 と Map7D1 の分子機能を明らかにする予定である。また、紡錘体軸の方向性は嚢胞形成において重要な役割を果たすことから、 で同定した新規の紡錘体軸制御因子・蛋白質 X についても、今後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)

Kikuchi, K., Narita, T., Van, P.T., Iijima, J., Hirota, K., Keka, I.S., Mohiuddin, M., Okawa, K., Hori, T., Fukagawa, T., Essers, J., Kanaar, R., Whitby, M.C., Sugawara, K., Taniguchi, Y., Kitagawa, K., and Takeda, S. Structure-specific endonucleases Xpf and Mus81 play overlapping but essential roles in DNA repair by homologous recombination. **Cancer Res.** 73: 4362-4371, 2013. (*: 同等貢献) 査読有

Fumoto, K., Kikuchi, K., Gon, H., and Kikuchi, A. Wnt5a signaling controls cytokinesis by correctly positioning ESCRT-III at the midbody. **J. Cell Sci.** 125: 4822-4832, 2012. (*: 同等貢献) 査読有

[学会発表](計8件)

菊池 浩二、中西 宏之 MAP7 family proteins organize the cytoskeletal network by regulating microtubule dynamics in cell polarity. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日 - 6日

菊池 浩二、麓 勝己、菊池 章 Novel functions of Wnt signaling pathways in mitotic progression. 3rd GDR1 French Japanese Cancer Meeting、2013年11月20日 - 23日、Hotel Mercure Toulouse Compans Caffarelli (フランス・トゥールーズ)

菊池 浩二、中西 宏之 siRNA Screening Reveals the Involvement of MAP7 Family in Cell Polarity. 平成24年度文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム、2013年1月29日 - 30日、学術総合センター橋講堂(東京都千代田区)

菊池 浩二、中西 宏之 siRNA Screening Reveals the Involvement of MAP7 Family in Cell Polarity. The 23rd CDB Meeting "Building multicellular systems from Cellular Cross-Talk"、2013年1月22日 - 23日、理化学研究所再生・発生科学総合研究センター(神戸市)

菊池 浩二、中西 宏之 MAP7 ファミリーによる細胞極性の制御機構 第85会日本生化学会大会、2012年12月14日 - 16日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡市)

菊池 浩二、中西 宏之 MAP7 ファミリーによる細胞極性の制御機構 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日 - 14日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡市)

菊池 浩二、中西 宏之 MAP7 family proteins are involved in cell polarization by regulating the cytoskeletal network. 第65回日本薬理学会西南部会、2012年11月23日、熊本大学薬学部(熊本市)

菊池 浩二、中西 宏之 siRNA screening reveals the involvement of MAP7 family in cell polarity. 新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」平成24年度がん若手研究者ワークショップ、2012年9月5日 - 8日、蓼科グランドホテル滝の湯(長野県茅野市)

[その他]

ホームページ等

・本研究室のホームページ

<http://www.medphas.kumamoto-u.ac.jp/research/bunya/8.html>

・Researchmap の個人ページ

<http://researchmap.jp/read0147459/>

・Researchgate の個人ページ

https://www.researchgate.net/profile/Koji_Kikuchi/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 浩二 (KIKUCHI KOJI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：70457290