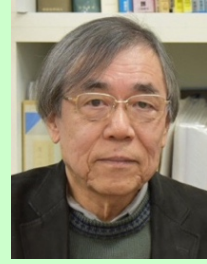


科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分  
平成28年3月15日現在

中心体に依存しない微小管による細胞構築の研究

Noncentrosomal microtubule-dependent organization of the cells



課題番号：25221104

竹市 雅俊 (Takeichi, Masatoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー

研究の概要 微小管は、細胞の構造と生理機能のために重要な役割を果たす構造体である。中心体から伸長するものと、それ以外の場所から伸長するものがあり、成熟した上皮細胞や神経細胞では、後者が主要な微小管である。非中心体微小管の安定化機構はほとんど知られていなかったが、我々は近年、微小管のマイナス端に結合する新しいタンパク質 Nezha/CAMSAP を同定した。この分子の機能解析を通じて、非中心体微小管の細胞構築における役割を探る。

研究分野：細胞生物学・発生生物学

キーワード：微小管、CAMSAP、上皮細胞、神経軸索、細胞極性

1. 研究開始当初の背景

微小管にはプラス端とマイナス端があり、多くの細胞ではマイナス端は中心体に結合し、プラス端が放射状に伸長する。しかし、上皮細胞、神経細胞などでは、微小管は中心体以外の部位から伸長する。たとえば、上皮細胞では、微小管のマイナス端は細胞の頂端部に分布することが知られている。このマイナス端を繋ぎ止める機構は明らかでなく、さらに、このような微小管配向パターンの生理的意義も不明であった。

2. 研究の目的

私達は、微小管のマイナス端に結合して安定化させる新しい分子 Nezha を近年発見した。それ以降、類似分子が2つ同定され、CAMSAP1、2と命名された (Nezha は CAMSAP3 と再命名)。本研究の目的は、CAMSAP タンパク質が、上皮細胞の構築・接着維持、神経軸索の伸長、脳組織の構築等において果たす役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

研究は、CAMSAP2 と CAMSAP3 に焦点を当てる。それぞれの分子について遺伝子変異マウスを作製し、免疫組織学的手法等により組織学的異常を解析する。並行して、組織細胞の初代培養や細胞株を用い、RNAi 法、外来遺伝子発現系、ライブイメージングなどを駆使してマウス個体では困難な解析を補完する。

4. これまでの成果

上皮細胞構築における CAMSAP3 の役割

上皮細胞のモデルとして、構造が単純なマウス小腸の「吸収上皮細胞」を選んだ。まず、CAMSAP3 の分布を調べたところ、細胞頂端部の膜直下、アクチン terminal web が分布する皮質層に斑点状に分布することが分かった。微小管は、他の上皮細胞で報告されているように、細胞の頂端-底部軸に添って簾状に配向していたが、重要なことは、それぞれの微小管が CAMSAP3 斑と 1 : 1 で結合していた。

並行して、CAMSAP3 変異マウスを作製し解析した。本変異マウスは、当初、CAMSAP3 遺伝子を完全に欠失させるようデザインされたが、実際には、CAMSAP3 の C 末端にある微小管結合部位を欠く変異分子が発現していた。しかし、変異分子がドミナントネガティブ効果等の副次的作用を示す様子はないことが確認され、CAMSAP3 の機能不全個体として表現型を解析した。その結果、このマウスでは、細胞頂端部に濃縮していた CAMSAP3 が完全に消失し、そして、微小管の配向が完全にランダム化していることが分かった。すなわち、小腸上皮細胞では、頂端部に局在する CAMSAP3 が微小管のマイナス端を捉えプラス端を下方に伸長させ、微小管の配向パターンを決めていることが初めて明らかになった。

次に、細胞構築に及ぼす CAMSAP3 機能喪失の影響を調べた。正常小腸上皮細胞では核が細胞内の定位置を占め、その上部にゴルジ体が分布する。CAMSAP3 変異細胞では、核とゴルジ体がそれぞれ定位置から外れ、細胞の高さも短縮する傾向にあった。ミトコンドリア

の形態異常も観察された。これらの結果から、上皮細胞における頂端-底部軸に添った微小管配向は、オルガネラの分布にとって重要であることが確認された。しかし、意外なことに、細胞膜の構造や極性はほとんど影響を受けなかった。微小管の配向は細胞膜構造の形成とは無関係であることを示唆している。

さらに研究を進め、CAMSAP3 分子内の頂端部局在に関与する部位を特定し、次いで、CAMSAP3 が頂端部に局在することが、微小管配向とオルガネラの正常分布に必須であることを確認した。こうして、長年の謎であった、上皮細胞における微小管配向の機構と、その細胞構築における役割を初めて明らかにすることができた。

#### 上皮細胞接着維持における CAMSAP3 の役割

CAMSAP3 は、上皮細胞の皮質層だけでなく細胞間結合にも分布する（細胞タイプ、生理的状況によって分布は変化する）。この CAMSAP3 から微小管が伸長するが、そのマイナス端に向かって、モータータンパク質 KIFC3 が移動することが以前の研究から分かっていた。KIFC3 が何を運んでいるか、質量分析により解析したところ、ユビキチン分解酵素の一種 USP47 が同定された。細胞間結合で働く E-カドヘリンは、E3 ユビキチンリガーゼのひとつ Hakai によりユビキチン化され、その結果エンドサイトーシスされることが知られているが、KIFC3 によって運ばれる USP47 はこの過程を抑制し、細胞間接着を安定にしていることが分かった。この研究から、CAMSAP3 由来微小管の生理機能の一端を明らかにすることができた。

#### 神経系構築における CAMSAP の役割

典型的な神経細胞は、二種類の神経突起（樹状突起と軸索）を伸ばす。マウスの海馬神経細胞を培養して CAMSAP の分布を調べると、CAMSAP2 と CAMSAP3 がそれぞれの突起において差次的に分布していることが分かった。変異マウスから海馬神経細胞を分離、培養して神経突起のパターンを解析すると、それぞれの分子の分布と相関する異常が観察された（未発表）。

また、CAMSAP2、3 の単独ノックアウトマウスは生存するが、二重変異は誕生前に死亡する。胎児期の脳を調べると、種々の解剖学的異常が観察され、細胞レベルで異常が顕著だったのは放射状グリアの形態であった（未発表）。これらの異常を詳細に解析し、神経系細胞の構築における CAMSAP-微小管系の関与を明らかにしていく。

#### 5. 今後の計画

CAMSAP タンパク質は、種々の上皮器官で発現する。今後は、小腸以外の他の器官における分布、変異マウスにおける異常を探る。予

備的な観察によれば、一部の器官においては、組織構築異常だけでなく、顕著な機能異常が示唆された。異常を詳しく解析することにより、個々の細胞の構築異常と器官全体の生理機能異常の関係を明らかにし、その延長として、CAMSAP-微小管系と病気との関わりを明らかにしたい。

神経組織に関しては、進行中の研究を継続する。神経突起の主要な微小管は基本的に中心体に依存しない微小管であることから、これまで謎とされている種々の微小管関連の問題に答えが出せると期待している。

#### 6. これまでの発表論文等

1. Toya, M., Kobayashi, S., Kawasaki, M., Shioi, G., Kaneko, M., Ishiuchi, T., Masaki, K., Meng, W., and Takeichi, M. CAMSAP3 orients the apical-to-basal polarity of microtubule arrays in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113:332-337, 2016
2. Hayashi, S., and Takeichi, M. Emerging roles of protocadherins: from self-avoidance to enhancement of motility. *J. Cell Sci.* 128, 1-10, 2015.
3. Sako-Kubota, K., Tanaka, N., Nagae, S., Meng, W., and Takeichi, M. Minus end-directed motor KIFC3 suppresses E-cadherin degradation by recruiting USP47 to adherens junctions. *Mol. Biol. Cell* 25, 3851-3860, 2014
4. Tsukasaki, Y., Miyazaki, N., Matsumoto, A., Nagae, S., Yonemura, S., Tanoue, T., Iwasaki, K., and Takeichi, M. Giant cadherins Fat and Dachsous self-bend to organize properly spaced intercellular junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 16011-16016, 2014.
5. Hayashi, S., Inoue, Y., Kiyonari, H., Abe, T., Masaki, K., Moriguchi, H., Tanaka, Y., and Takeichi, M. Protocadherin-17 mediates collective axon extension by recruiting actin regulator complexes to interaxonal contacts. *Dev Cell* 30, 673-687, 2014.
6. Takeichi M. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15, 397-410, 2014.

#### 受賞等

1. 日本内分泌学会マイスター賞(2014年)
2. アメリカ科学振興協会 (AAAS) フェロー(2014年)