

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440094

研究課題名(和文)極性上皮細胞における微小管の編成機構とその役割

研究課題名(英文)Organization and function of non-centrosomal microtubules array in polarized epithelial cells

研究代表者

戸谷 美夏 (Toya, Mika)

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・研究員

研究者番号：80455360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞は、多くの臓器の主成分で、上(頂端面)、下(基底面)という極性をもつ。微小管細胞骨格が、頂端-基底軸に沿って配向する特徴的な編成を示すことが知られていたが、その仕組みは不明であった。微小管は、それ自身がプラス端・マイナス端という極性をもつ。本研究では、微小管マイナス端結合タンパク質CAMSAP3に着目し、マウス小腸と、培養上皮細胞を用いた解析を行った。その結果、CAMSAP3が頂端面に局在してマイナス端を繋ぎとめることで、上皮細胞に特徴的な微小管編成を可能にしていること、そのような微小管編成は、核やゴルジ体などの細胞内小器官が正しく配置されるために必須の働きを示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Polarized epithelial cells organize characteristic array of non-centrosomal microtubules that align along apical to basal axis of the cells. The minus-ends of these microtubules face apically, and the plus-ends face towards the basal side. However, how this orientation is established remains elusive. CAMSAP3 is a member of CAMSAP (Calmodulin-regulated-spectrin-associated protein) family proteins that are known as microtubule minus-end binding proteins at non-centrosomal site. In this study, using CAMSAP3 mutant mice and 3D-cultured Caco-2 cells, we showed that CAMSAP3 localizes to the sub-apical region and tethers the minus-ends of microtubules to this site. In the absence of CAMSAP3 function, the orientation of cytoplasmic microtubules or positioning of cell organelle is perturbed. Obtained results demonstrate that apically localized CAMSAP3 determines the proper orientation of microtubules, and in turn that of cell organelles, in mammalian intestinal epithelial cells.

研究分野：細胞生物学

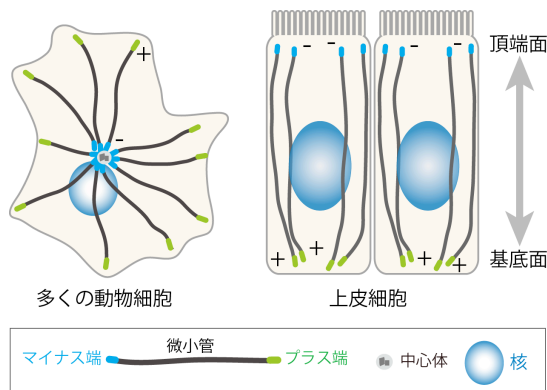
キーワード：極性上皮細胞 微小管編成 微小管マイナス端 CAMSAP3/Nezha 変異マウス 小腸 Caco-2細胞 立体培養系

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、表皮や多くの臓器を構成する主要な成分で、外界とのバリアとして、また、細胞内物質の分泌や細胞外からの物質の吸収など、さまざまな重要な働きを担っている。その構造的特徴の1つは細胞の上(頂端面)、下(基底面)という極性をもつことであり、この極性は上皮の機能を発揮するために必須であるが、その形成機構はよく分かっていない。上皮細胞では、細胞骨格の1つである微小管が、上皮細胞の頂端-基底軸に添った特徴的な編成を示すことが知られていたが、その仕組みもよく分かっていなかった。

微小管は、細胞内でその役割にしたがって整然と再編成され、細胞の極性や運動、染色体分配到に重要な役割を果たしている。微小管の編成には、微小管自身をもつ極性から生じるプラス端(動的な伸長端)とマイナス端(より静的な微小管形成起点)の制御が深く関与する。プラス端の制御に関わる因子は、これまでに、多く同定され広く解析が進められている。しかしながら、マイナス端の制御については、未だ多くのことが明らかにされていない。

多くの動物細胞では、微小管マイナス端は、中心体と呼ばれる微小管形成中心に束ねられている。いっぽう、上皮細胞では、マイナス端は中心体に束ねられることなく、非中心体微小管として細胞質に存在する。所属研究室では、2008年に、培養上皮細胞株において、非中心体微小管のマイナス端に結合するタンパク質 CAMSAP3 (当時は *Nezha* と呼んだ) を発見した (Meng, W. et al., 2008, *Cell* 135, 948-959)。培養細胞内で CAMSAP3 は、細胞質と細胞接着部位に点状に観察されるが、局在の機構は明らかになっていない。RNAi を用いて CAMSAP3 の機能を破壊すると、細胞質微小管の編成形態が乱される。CAMSAP3 が微小管マイナス端で微小管編成の制御に関わると考えられたが、CAMSAP3 の役割の詳細やその機構は不明であった。



2. 研究の目的

所属研究室で作成を完了した CAMSAP3 変異マウスと、培養上皮細胞株 (ヒト大腸癌

由来 Caco-2 細胞) の立体培養系を併用し、頂端面-基底面という極性をもつ上皮細胞での CAMSAP3 の役割とその機構を明らかにする。このことから、極性をもつ上皮細胞における微小管マイナス端の制御機構と微小管編成のしくみ、非中心体微小管のもつ生物学的役割についての理解を深めることを目的とした。具体的には、以下の項目を明らかにすることを旨とした。

- (1) マウス腸上皮細胞における微小管の編成形態
- (2) 上皮細胞に特徴的な、頂端-基底軸に沿った非中心体微小管編成が形成されるしくみ
- (3) 上皮細胞における微小管編成が果たす生物学的役割

3. 研究の方法

- (1) CAMSAP3 変異マウス腸上皮細胞における表現型の解析

極性をもつ上皮細胞として、小腸の上皮細胞に着目した。CAMSAP3 変異マウスを用いて、凍結組織切片を作製し、蛍光抗体染色をおこなった。小腸上皮細胞における微小管の編成形態、および、細胞極性・細胞接着に関わる因子の局在、核・ゴルジ体など細胞内小器官の配置について、解析をおこなった。試料作製法を微小管観察に最適化し、微小管編成形態と CAMSAP3 の局在についてのより詳細な観察を行うためには、超解像顕微鏡を使用した。細胞内微細構造の観察には電子顕微鏡を用いた。

- (2) 立体細胞培養系を用いた微小管編成機構の解析

(1)で観察された個体内での表現型の機構を明らかにする実験系として、Caco-2 細胞の立体培養系を用いた。Caco-2 細胞を、細胞外基質の成分を含むマトリゲルに埋め込んで、あるいは、多孔質膜を用いて、3次元的に培養した。立体培養系の実験では、マトリゲルで5~7日程度、多孔質膜を用いた場合は10~20日程度の長期培養が必要となる。このため、RNAi や蛍光融合マーカー遺伝子の発現は、一過的ではなく染色体に組み込んで行う必要がある。Caco-2 細胞は、遺伝子の染色体への組み込みが困難であることから、トランスポゾンシステム (*piggyBac*) を導入し、CAMSAP3 機能破壊株 (shRNAi CAMSAP3) を単離して、解析に使用した。*piggyBac* によって、微小管動態観察用にプラス端マーカー遺伝子 (*EB3-GFP*) を安定に発現する Caco-2 細胞株も作製し、分子遺伝学的手法を組み合わせた実験を行った。

4. 研究成果

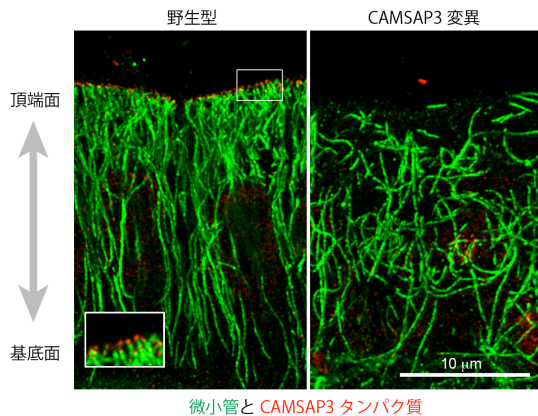
本研究から以下のことが明らかになった。

(1) CAMSAP3 変異マウス小腸上皮細胞における表現型

(1)-① CAMSAP3 は、小腸上皮細胞の頂端部に点状に局在し、微小管端に結合している小腸上皮細胞の微小管は、他の上皮細胞において観られていたように、非中心体微小管が頂端-基底軸に沿って配置していた。CAMSAP3 タンパク質は、頂端部に局在し、頂端面を覆うように点状に散在した。アクチンとの共染色の結果、CAMSAP3 は、頂端面細胞膜直下に存在するアクチンネットワークの下部に重なるように局在することがわかった。超解像顕微鏡を用いた観察により、CAMSAP3 タンパク質が、頂端面に向かう微小管端に結合していることが明らかになった。

(1)-② 頂端部に局在する CAMSAP3 は、微小管のマイナス端を頂端面につなぎとめている

CAMSAP3 変異マウスの小腸上皮細胞では、野生型で観察された頂端部の CAMSAP3 局在が消失し、微小管の編成が乱されていた。CAMSAP3 変異細胞の微小管は、頂端-基底軸に沿うことなく様々な方向に向かって存在した。頂端面から観察すると、野生型では頂端面に向かう微小管端が点状に観察されるのに対して、CAMSAP3 変異細胞では、微小管の側面が観察され、頂端部に局在する CAMSAP3 によって、微小管端が頂端部につなぎとめられていることがわかった。



(1)-③ CAMSAP3 変異細胞は、細胞の高さが低くなる傾向があり、細胞内小器官の配置が乱される

細胞極性、細胞内小器官のマーカーとなるタンパク質の局在を調べた結果、CAMSAP3 変異細胞では、細胞膜の極性に乱れは観察されなかったが、細胞の高さが低い傾向があり、核やゴルジ体の細胞内での配置が乱された。電子顕微鏡による観察により、ミトコンドリアの細胞内配置、形態が乱されることも示唆された。アクチンが関与する構造である微絨毛の形態には異常は認められなかったが、微絨毛を有する頂端面の細胞膜が細胞質内に落ち込む様子が、低頻度ではあるが変異細胞でのみ、観察された。

(2) ヒト大腸癌由来培養細胞株 Caco-2 の立体培養系を用いた解析からわかったこと

(2)-① CAMSAP3 機能破壊 Caco-2 細胞では、微小管の方向性が乱される

立体培養をおこなった Caco-2 細胞では、小腸上皮細胞における場合と同様の表現型が観察された。野生型 Caco-2 細胞において、微小管は頂端-基底軸に沿って配列し、CAMSAP3 が頂端部に局在する様子が観察された。CAMSAP3 の機能を RNAi で破壊した Caco-2 細胞 (CAMSAP3 shRNAi 細胞) では、微小管の編成が乱され、核とゴルジ体の細胞内配置も乱された。CAMSAP3 shRNAi 細胞に、微小管プラス端マーカーである EB-GFP を発現させ、プラス端の動きをライブで観察した。その結果、野生型細胞では、EB1 は、頂端部から基底部に向かって動く様子が観察されたのに対して、CAMSAP3 shRNAi 細胞では、EB1 が細胞内をランダムに走り、細胞を横断するように動くシグナルや基底部から頂端側に向けて動くシグナルも観察された。この結果から、細胞の頂端部に局在する CAMSAP3 が微小管のマイナス端を頂端部に繋ぎ止めることによって、頂端部から基底部に向かう、マイナス端→プラス端という微小管配向を決定していることが示唆された。

(2)-② CAMSAP3 を異所的に局在させると、微小管マイナス端の局在が変化する

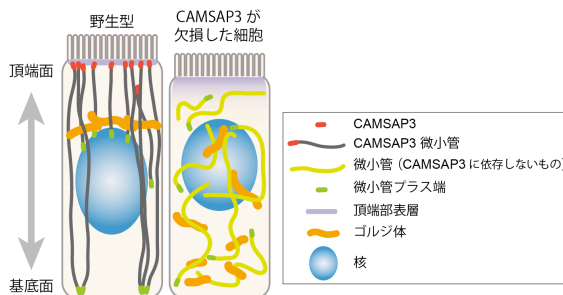
CAMSAP3 の機能領域の N 末端に、細胞膜移行シグナルを付加して Caco-2 細胞に発現させ、CAMSAP3 を頂端面のみならず、側面・基底面を含む細胞膜全体に、強制的に局在させた。この時、細胞の側面や基底面に、CAMSAP3 が結合する微小管端が観察された。このような細胞では、ゴルジ体が断片化し、細胞質全体に散在する様子が観察された。これらの結果から、CAMSAP3 の局在は、微小管マイナス端の局在決定に必要十分であること、CAMSAP3 が規定する微小管配向は、ゴルジ体を細胞内で正しく編成させるために必須であることが示唆された。

(2)-③ CAMSAP3 の頂端部への局在は、微小管とアクチンに依存している

CAMSAP3 の頂端部への局在は、微小管重合阻害剤であるノコダゾールを処理することによって消失した。小腸上皮細胞において、CAMSAP3 は、頂端面細胞膜直下に存在するアクチンネットワークの下部に重なるように局在したことから、アクチンが局在に関わる可能性も調べた。アクチン重合阻害剤であるラトランキュリン A を処理すると、頂端部の CAMSAP3 シグナルは消失し、細胞質中にいくつかのクラスターをつくったシグナルが検出された。これらの結果から、CAMSAP3 の局在は、微小管とアクチン双方に依存することがわかった。

(2)-④ CAMSAP3 の頂端部への局在には、CAM SAP3 の CC1 領域内にある5つのアミノ酸が重要である

CAMSAP3タンパク質は、N末端にCH領域、中央部に3つのCoiled-coil領域(CC1~CC3)、CC2とCC3の間にプロリンリッチな領域、C末端にCAM SAPタンパク質で保存されたCKK領域をもつ。CAM SAP3の頂端部への局在に必要な領域をドメイン解析によって調べた。その結果、微小管との結合に必須であることがわかっていたCKK領域に加えて、プロリンリッチな領域も微小管との結合に必要なことが明らかになり、CAM SAP3は、双方の領域を介してと微小管と結合し、頂端部に局在することがわかった。どちらかの領域を欠くとCAM SAP3は細胞質中に散在した。脳で発現しているCAM SAPファミリータンパク質であるCAM SAP1について、CC1領域が、アクチン結合タンパク質であるβII-スペクトリンのアイソフォームに結合することが示され、CC1領域内の結合に必須なアミノ酸が同定されている(King MD et al., 2014, *J. Neurochem.*)。CAM SAP3の頂端部への局在がアクチンに依存すること、CAM SAP3のCC1領域内に、CAM SAP1とβII-スペクトリンアイソフォームとの結合を担うアミノ酸が保存されていることから、これらのアミノ酸に変異を導入し(CAM SAP3-5A)、Caco-2細胞内で発現させた。その結果、CAM SAP3-5Aは、頂端部に局在せず、微小管端への結合を保ったまま細胞質中に散在した。CKK領域、および、プロリンリッチ領域を介して微小管マイナス端に結合したCAM SAP3が、CC1領域内の5つのアミノ酸領域を介して、頂端部に局在する機構が示唆された。



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 1 件)

- 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), 査読有

DOI: 10.1073/pnas.1520638113.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Mika Toya, Wenxiang Meng and Masatoshi Takeichi. CAMSAP3 determines the apical-to-basal orientation of microtubules in polarized epithelial cells. 第38回日本分子生物学会年会 2015/12/3 神戸ポートピアホテル・神戸市・兵庫県
- ② 戸谷美夏、孟文翔、竹市雅俊 Nezha/CAMSAP3は極性上皮細胞における微小管の頂底軸配向に必須の役割を果たす 第67回日本細胞生物学会大会 2015/6/30 タワーホール船堀・江戸川区・東京都
- ③ 戸谷美夏、孟文翔、竹市雅俊 Nezha/CAMSAP3は極性上皮細胞における微小管の頂底軸配向に必須の役割を果たす 第37回日本分子生物学会年会 2014/11/27 パシフィコ横浜・横浜市・神奈川県

[その他]

- ① 理研 NEWS 2016年5月号 SCIENCE VIEW 上皮細胞の機能と形をつくる微小管の謎を解明 (印刷中)
- ② ASCB (The American Society for Cell Biology) Cell News –Microtubules organize top to bottom in epithelial cells due to CAMSAP3– 2016/2/22 <http://www.ascb.org/cell-news-microtubules-organize-top-to-bottom-in-epithelial-cells-due-to-camsap3/>
- ③ 理化学研究所多細胞システム形成研究センター ホームページ(研究成果記事) 上皮細胞の微小管を正しく配向させるメカニズム http://www.cdb.riken.jp/news/2016/researches/0119_9499.html
- ④ プレスリリース 2016/1/19 上皮細胞の微小管配向の謎を解明 –微小管結合タンパク質 CAMSAP3 が重要な働き– http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160119_1/

6. 研究組織

(1)研究代表者

戸谷 美夏 (TOYA MIKA)

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 研究員

研究者番号: 80455360