

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21116004

研究課題名(和文) 普遍的細胞極性制御装置による哺乳動物初期胚発生制御機構の研究

研究課題名(英文) A study on the regulatory mechanisms of mammalian early embryogenesis through the evolutionarily conserved cell polarity regulating system

研究代表者

鈴木 厚 (SUZUKI, Atsushi)

横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授

研究者番号：00264606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 126,900,000円、(間接経費) 38,070,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物の受精卵が身体作りをする非常に初期の段階(8から32細胞の時期)では、細胞塊の外側の細胞が次第に上皮細胞としての性質を獲得することが、細胞の分化状態がゆっくりと固定化していくために非常に重要である。本研究では、哺乳類初期発生にとって細胞の上皮化、脱上皮化が決定的に重要であることに着目し、近年明らかになってきた普遍的な極性制御因子群(PAR-aPKCタンパク質群)が細胞の上皮化を制御する機構を詳細に分析した。その結果、これまで知られていなかった新しい制御機構を3点にわたって見出すに至り、今後の哺乳類初期発生過程解明の基盤となる重要な知見を生み出した。

研究成果の概要(英文)：In the very early stages of the mammalian embryogenesis (8 to 32 cells), the establishment of epithelial polarity in the outer cells of the cell mass is crucially important to guarantee the gradual fixation of the fates of the individual cells. Based on the fact that dynamic change of the epithelial cell polarity is crucially important for the mammalian embryonic development, in this research project, we have intensively analyzed the mechanisms by which the evolutionarily-conserved cell polarity-regulating proteins, the PAR-aPKC proteins, control the epithelial polarity. As a result, we succeeded to reveal three kinds of the novel molecular mechanisms, and provided the important insights and basis for the future research on the early embryogenesis of mammals.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学；基礎生物学、形態・構造

キーワード：細胞極性 上皮細胞 細胞接着 aPKC PAR-1 微小管 細胞運動

## 1. 研究開始当初の背景

(1) この20年あまりの間に、様々な生命現象において観察される細胞の極性化、非対称化が、「PAR-aPKC システム」と呼ばれる進化的に保存された数種のタンパク質群によって共通に制御されていることが明らかとされてきた。これらのタンパク質は、そもそもは線虫胚発生のごく初期に見られる受精卵の前後軸に沿った極性化、非対称分裂に必要な因子として同定された分子群であるが、研究代表者らは、これらが哺乳動物成体で見られる上皮細胞の頂端-基底軸に沿った細胞極性にも必要な役割を果たしていることを明らかとしてきた。ただ、PAR-aPKC システムがいかなる分子メカニズムによって上皮細胞極性を制御するのかという点、特に、相対する膜ドメインに局在する2つの出力因子(セリン・スレオニンタンパク質リン酸化酵素)、aPKC、および PAR-1 の下流の標的については不明な点が多く残されていた。

(2) 哺乳動物初期発生においては明確な非対称分裂は起こらず、割球は柔軟な可塑性を示しながらゆっくりと分化していくことが知られている。そしてこの過程では、細胞塊の外側の細胞が上皮極性を獲得することが、一番最初に確認される細胞分化(栄養外胚葉と内部細胞塊への分化)のきっかけとなることが示唆されていた。従って、哺乳動物 PAR-aPKC システムは、前後軸に沿った受精卵の非対称化を通じてではなく、外側の細胞の上皮化を制御することを介して、初期発生に決定的な役割を果たしていることが予想された。すでに細胞接着と転写制御を結びつける Hippo 経路がこの過程に必要な役割を果たしていることが計画班員の佐々木らによって明らかとされていた。しかし、PAR-aPKC システムがどのような分子メカニズムでこの過程に関与しているのかについては不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究においては研究代表者らがこれまで解明を進めてきた「PAR-aPKC システムの上皮極性制御の分子機構」が、哺乳動物初期胚発生の可塑性の重要な基盤を与えている可能性に注目し、以下の研究を進めた。(1) 佐々木との共同研究を通じ、いかにして PAR-aPKC システムが Hippo 経路と協調しながら、着床前胚の分化、発生に関わるのか、その分子機構を明らかにする。(2) 他方、引き続き PAR-aPKC システムの上皮極性制御機構の解明を分子レベルで進め、初期胚研究の基盤となる分子細胞生物学的知見を蓄積する。(3) 個々の細胞の極性制御の機構が初期胚のダイナミックな挙動にいかに寄与するのかという点に切り込むために、細胞極性制御が集団的細胞運動にいかなる影響を及ぼすのかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 佐々木氏との共同研究については、作成していた aPKC lambda, zeta のコンディショナルノックアウトマウスを供与するとともに、各種プラスミドベクター等を送付し、分子細胞生物学的な研究について適宜アドバイス、ディスカッションを進めた。

(2) 分子細胞生物学的研究については、培養上皮細胞(特に MDCK 細胞)を使って、aPKC および PAR-1 キナーゼの結合タンパク質を検索し、その相互作用の上皮極性における役割を生化学的な実験(in vitro kinase assay や結合実験)、細胞生物学的な機能解析実験(培養細胞におけるノックダウンや優性抑制変異体の発現、免疫組織学的手法によるその上皮極性に与える影響の検討)によって解析した。また、上皮細胞極性制御における重要性が示唆されたタンパク質については遺伝子改変マウスを作成し、初期胚発生をはじめとした表現系に異常が生じないかどうかを検討し、表現系がみられた場合には、組織学的解析によってその原因を探った。

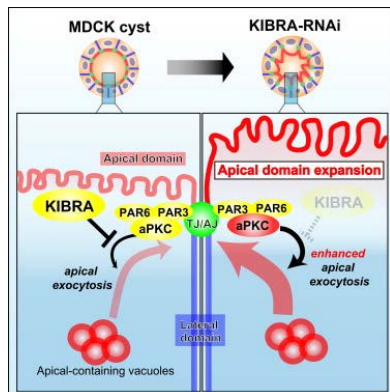
(3) 集団的細胞運動については、標的タンパク質をノックダウンした培養細胞を使った創傷治癒実験(wound healing assay)、あるいは、aPKC コンディショナルノックアウトマウスと tamoxifen-cre 発現マウスを掛け合わせた後に樹立した ES 細胞株を使った細胞播種後の細胞運動の観察をライブ顕微鏡観察によって行い、運動の統計学的解析を進めた。

## 4. 研究成果

(1) PAR-aPKC システムは、着床前胚の外側の細胞において Amot を apical 膜直下に隔離することを介して接着依存的な Hippo 経路の活性化を阻害し、そのことによって外側の細胞の位置依存的な栄養外胚葉への分化を促進する(詳細な研究内容については、佐々木計画班員の報告書に譲る)(Hirate ら、2013)。

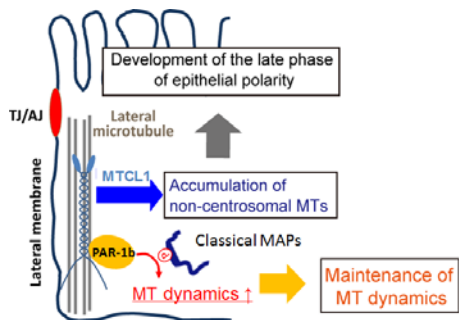
(2) Hippo 経路の上流に位置する KIBRA は aPKC に結合し、そのキナーゼ活性を競合的に阻害することを通じて、aPKC 依存的な上皮細胞頂端膜ドメインの発達を抑制する(Yoshihama et al. 2011)。aPKC 結合タンパク質である KIBRA が Hippo 経路の上流に位置し、その活性化の一翼を担うことがショウジョウバエにおける遺伝学的解析から示されたことを受け、aPKC/KIBRA 相互作用の上皮極性制御における役割を詳細に解析した。まず、aPKC 分子内でキナーゼドメインに結合し活性を抑制している偽基質配列に類似した配列が KIBRA の aPKC 結合領域に存在することを発見した。そして、KIBRA がこの配列を介して aPKC の活性を競合的に阻害することを in vitro のキナーゼ実験、および、この領域を上皮細胞に発現する優性抑制変異体の実験から明らかにした。重要なことには、KIBRA をノックダウンした MDCK 細胞においては、

コラゲンゲル内で形成させた上皮細胞の3次元シストにおいて頂端膜ドメインの異常な発達が誘導された。さらにこうした異常は、KIBRAによる抑制作用が低下したために起こったaPKCの活性の上昇に付随した頂端膜側への小胞輸送の異常な亢進によることが明らかとなった。以上の結果は、哺乳動物胚の発生にも不可欠である正常な上皮化の進行にとってKIBRAによるaPKC活性の適切な制御が必要であることを示唆している。



この知見を受け、その後、KIBRA遺伝子改変マウスの作成を進めたが、単独の変異では初期胚発生に顕著な異常が観察されないことがわかった。KIBRAの哺乳動物ホモログ、WWC1による相補の可能性があるため、引き続き、WWC1, 2の二重変異の影響の検討に進んだ(現在、進行中)。

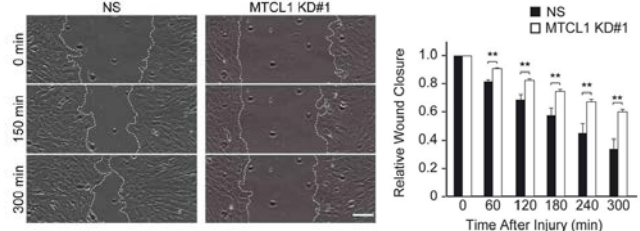
(3) 新規 PAR-1 結合タンパク質、MTCL1 は、新たな微小管架橋タンパク質であり、PAR-1 と協調することにより、上皮細胞特有の非対称な側底膜微小管束の発達に不可欠な役割を果たす(Sato et al. 2013)。PAR-1 は aPKC とは対極の側底膜側に局在しその膜ドメインの発達に関わるが、PAR-1 に知られている動的微小管維持活性(微小管不安定活性)(Hayashi et al. 2011)がいかにこの生理的な活性に関わっているのかは不明であった。今回、独自に発見した PAR-1 の結合タンパク質、MTCL1 が、それまで知られていなかった全く新しい微小管制御タンパク質であり、2量体化した分子の N 末端側の微小管結合部位によって微小管を架橋するとともに、C 末端側にあるもう一つの微小管結合部位を介して微小管の安定化を担うという興味深い性質が明らかとなった。さらに MTCL1 は、上皮細胞特有の側底膜微小管束に結合しその束化を促進することで上皮極性の発達に必須



な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、MTCL1 は、その微小管制御能とは独立に、PAR-1 を側底膜微小管領域にリクルートすることを介して、この微小管束の動的性質を維持する役割も果たしていることも明らかとした。以上の結果は、MTCL1 が微小管の安定化と動的性質の維持の二つの相反する活性を統合することで、上皮細胞特有の微小管構造の発達、上皮極性の制御を担っているという新しい概念を生み出した。

さらに、哺乳動物初期胚との関連では、MTCL1 が着床前胚の後期、すなわち外側の細胞の上皮化が急速に進行する段階でその発現が増大し、エピブラストにおいて、培養上皮細胞におけると同様に側底膜微小管束に共局在することを 8.5 日胚の組織染色によって明らかにした。この結果は、MTCL1 がやはり初期胚細胞の上皮化に重要な役割を果たしている可能性を示唆したので、このタンパク質についても遺伝子改変マウスを作成し、表現系を解析した。おそらくホモログ分子である MTCL2 の存在による相補のために現在のところ初期胚発生に異常は観察するに至っていないが、成長した後に小脳性の運動失調を示すことが明らかとなり、本分子の小脳プルキンエ細胞における役割が示唆された(詳細略)。これは、MTCL1 が生育後に小脳に特に発現が高くなることと合致した結果であった)。初期胚発生異常が生じる可能性については、MTCL1, 2 の二重変異マウスの作成と解析を進めることによってさらに追及した(現在、進行中)。

(4) MTCL1 は極性発達の低い細胞においては、ゴルジ由来の微小管の安定的形成に必須な役割を果たし、そのことを介してゴルジ体の高次構造形成とそれに依存した細胞集団の極性を持った運動に寄与している(Sato et al. submitted)。本研究期間内に論文として発表するには至らなかったが、MTCL1 が脱上皮化した細胞においては、集団的細胞運動に寄与していることを明らかにした。MTCL1 は微小管とは独立に、AKAP450 や CLASP といった分子との結合を介してゴルジ膜に局在し、ゴルジ膜上で重合した微小管の束化、安定化に働くことを発見した。このゴルジ微小管は、ゴルジ層板を横方向に連結し、ゴルジリボンという脊椎動物特有の高次構造形成を促進することで、小胞輸送の極性化、ひいては細胞運動の極性化を誘導する。MTCL1 の欠損は、このゴルジ微小管形成を阻害することを通



じて、運動極性の維持に重大な障害を引き起こすことを発見し、初期胚で見られる脱上皮化細胞のダイナミックな移動等に関与している可能性を確認した。

一方、aPKC ノックアウト ES を作成し、細胞播種後の運動を観察することによって、aPKC が ES 細胞の運動とそれによって起こる細胞同士の均一な混合に不可欠であることが示唆された。現在、その分子メカニズムの解析に入っている（現在、進行中）。

(5) PAR-1 はラミニン受容体複合体 (ジストログリカン複合体) に結合し、その膜局在を制御することを介して inside out に上皮極性を制御している (Yamashita et al. 2010, Masuda-Hirata et al. 2009)。上皮細胞極性の形成には基底面直下に形成されるシート状の細胞外基質構造 (基底膜) からの outside in のシグナルが重要な役割を果たすことが、初期胚発生過程を含めて知られている。今回、PAR-1 がこの基底膜形成に必須なラミニン受容体に結合し、その膜局在を制御することも明らかとした。そしてこの膜局在制御の少なくとも一つの分子機構が、複合体内のスペクトリン様分子、ユートロフィンのコイルドコイル領域のリン酸化を介したものであることを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Sato Y, Akitsu M, Amano Y, Yamashita K, Ide M, Shimada K, Yamashita A, Hirano H, Arakawa N, Maki T, Hayashi I, Ohno S, \*Suzuki A (2013). A novel PAR-1-binding protein, MTCL1, plays critical roles in organizing microtubules in polarizing epithelial cells. *J. Cell Sci.* (査読有) *126*, 4671-4683  
DOI:10.1242/jcs.127845
- ② Hirate Y, Hirahara S, Inoue K, Suzuki A, Alarcon VB, Akimoto K, Hirai T, Hara T, Adachi M, Chida K, Ohno S, Marikawa Y, \*Sasaki H (2013). Polarity-dependent distribution of angiotensin localizes hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol.* (査読有) *23*, 1181-1194  
DOI:10.1016/j.cub.2013.05.014
- ③ Hayashi K, \*Suzuki A, Ohno S. A novel function of the cell polarity-regulating kinase PAR-1/MARK in dendritic spines (2011). (査読有) *BioArchitecture* *1*, 261-266.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22545177>
- ④ Hayashi K, \*Suzuki A, Hirai S, Kurihara Y, Hoogenraad CC, Ohno S. Maintenance

of dendritic spine morphology by partitioning-defective 1b through regulation of microtubule growth (2011). (査読有) *J. Neurosci.* *31*, 12094-12103.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0751-11.2011.

- ⑤ Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, Suzuki A, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S, Ohno S, \*Chida K. KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells (2011). *Curr. Biol.* (査読有) *21*, 705-711  
DOI: 10.1016/j.cub.2011.03.029.
- ⑥ Cong, W., Hirose, T., Harita, Y., Yamashita, A., Mizuno, K., Hirano, H., and \*Ohno, S. († 同等貢献). ASPP2 Regulates Epithelial Cell Polarity through the PAR Complex (2010) (査読有) *Curr. Biol.* *20*, 1408-1414.  
DOI: 10.1016/j.cub.2010.06.024
- ⑦ Yamashita K, \*Suzuki A, Satoh Y, Ide M, Amano Y, Masuda-Hirata M, Hayashi Y, Hamada K, Ogata K, Ohno S. The 8th and 9th tandem spectrin-like repeat of utrophin cooperatively form a functional unit to interact with polarity-regulating kinase Par-1b (2010). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) *391*, 812-817  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.11.144

[学会発表] (計 28 件)

- ① 鈴木 厚、佐藤由典. 中心体非依存的な微小管制御を通じた新しい細胞極性制御機構。日本細胞生物学会、2013年6月19日、愛知県産業労働センター (愛知県)
- ② Akitsu M, Satoh Y, Amano K, ..., Suzuki A (10人中10番目). A novel microtubule binding protein, MARKAP1, cooperates with PAR-1 for the development of the lateral microtubule bundles in epithelial cells. 米国細胞生物学会 2012年12月18日、サンフランシスコ Moscone Center (米国)
- ③ Satake T, Hayashi K, Yamashita K, Sato Y, Ohno S, Suzuki A. Analysis of physiological function of MARKAP1 in the cerebellum. 日本分子生物学会 2012年12月11日、福岡国際会議場 (福岡県)
- ④ 吉濱 陽平、...、鈴木 厚 (9人中5番目) 他. Hippo 経路上流因子 KIBRA は aPKC 活性を抑制し上皮細胞極性を制御する。日本細胞生物学会、2011年6月28日、北海道大学 (北海道)
- ⑤ Hayashi K, Suzuki A, Hoogenraad C.C., Ohno S. Maintenance of dendritic spine morphology by PAR-1b through regulation of microtubule growth. 米

国細胞生物学会 2011 年 12 月 4 日、デンバー国際会議場(米国)

- ⑥ 鈴木 厚ら、新規 PAR-1 結合タンパク質 p250 は、微小管安定化タンパク質である。日本細胞生物学会 2010 年 5 月 20 日、大阪国際会議場 (大阪)
- ⑦ Suzuki A. et al. Intracellular polarity protein PAR-1 regulates extracellular laminin assembly by regulating the dystroglycan complex. 米国細胞生物学会 2009 年 12 月 9 日、サンディエゴ会議センター (米国)

[図書] (計 2 件)

- ① Suzuki A. Springer "Cell Polarity: Biological Role and Basic Mechanisms" 2014 年 in press
- ② 鈴木 厚、医学書院「生体の科学」63 巻 3 号 2012 年 189-195

[その他]

ホームページ等

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/mcbl/suzuki/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 厚 (SUZUKI, Atsushi)  
横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授  
研究者番号：00264606

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

廣瀬智威 (HIROSE, Tomonori)  
横浜市立大学・医学部・講師  
研究者番号：20381668  
(平成 21 年度から 23 年度まで)

中谷 雅明 (NAKAYA, Masaaki)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号：70422095  
(平成 24 年度から 25 年度まで)