

令和元年6月7日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17991

研究課題名(和文)細胞極性を制御する新規リン酸化シグナル伝達系の同定

研究課題名(英文)Identification of the novel cell polarity-regulating signal cascade

研究代表者

山下 和成 (Yamashita, Kazunari)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70589481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PAR3は細胞極性を制御するPAR-aPKC因子群の因子一つで、上皮細胞では細胞間接着部位に局在して機能する。本研究では、新規に同定したPAR3のリン酸化による局在制御機構を明らかにした。まず、このリン酸化部位はPAR3の結合タンパクであるASPP2がリクルートするPP1によって脱リン酸化されることを明らかにした。さらに、脱リン酸化によってPAR3分子自身が集積(クラスタリング)しやすくなることがわかった。PAR3が細胞間接着部位に濃縮する機構として、脱リン酸化によって起こる局所的な集積があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAR-aPKC細胞極性制御因子群は、非対称な形態を形成する細胞(上皮細胞、神経細胞、非対称分裂を行う幹細胞など)において、非対称な細胞膜ドメインを形成するために必要な因子であり、動物種間や組織種間にわたって普遍的に保存された因子群である。PAR3はその因子一つで、上皮細胞では細胞間接着部位に局在して機能する。本研究では、新規に同定したPAR3のリン酸化修飾に着目し、PAR3の局在制御機構を明らかにした。細胞極性は生体恒常性の維持・幹細胞の維持・がん化の抑制に働いているため、本研究はこれら生理・病理現象の解明にも寄与する。

研究成果の概要(英文)：PAR3 is a constituent of PAR-aPKC system, the evolutionally-conserved polarity-regulating signal network. This factor localizes and functions at the apical cell-cell junction. In this study, significance of the novel phosphorylation on PAR3 localization was clarified. I revealed that ASPP2, a PAR3-binding protein, recruits PP1 to PAR3 to dephosphorylate this site. Dephosphorylated form of PAR3 strongly accumulated to the cell-cell junction suggesting this phosphorylation regulates PAR3 localization.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞極性 上皮細胞 PAR-3 ASPP2 クラスタリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞のアピカル細胞膜(管腔側)とバソラテラル細胞膜(基底膜側)はそれぞれを構成する脂質や蛋白質が異なっており、この境界にタイトジャンクションが形成される。このような細胞の非対称な性質を細胞極性といい、上皮組織の構築や恒常性維持に必須な性質である。PAR-aPKCシグナルタンパク群は、細胞内で非対称に局在する極性制御因子として同定された。PAR3-aPKC-PAR6-Cdc42複合体はアピカル膜形成を促進する。その中でも、PAR3は先がけて細胞間接着部位に局在化し、他の複合体因子をタイトジャンクション領域とアピカル膜にリクルートすると考えられているので、PAR3の局在制御機構は細胞極性形成を理解する上で重要である。我々は以前、ASPP2がPAR3の局在に必要な因子であることを明らかにしたが、その機構は不明であった。

2. 研究の目的

PAR3の局在制御に必須な役割を果たしているASPP2は、脱リン酸化酵素であるPP1と相互作用することが知られていた。そのため、PAR3の局在制御にはこの相互作用とリン酸化制御が重要であると考え、局在制御におけるリン酸化の意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) PAR3の免疫沈降によってPP1が共沈降する。細胞中のASPP2をあらかじめKnockdownすることでPAR3とPP1間の結合に影響が出るかどうか調べた。
- 2) 14-3-3をプローブにしたFar-western blottingによってPAR3のリン酸化領域を絞り込み、点変異によって新規リン酸化部位を同定した。
- 3) PAR3のリン酸化部位点変異体タンパクを細胞に発現させ、野生型PAR3との性質的な違いを探索した。

4. 研究成果

- 1) ASPP2のKnockdownによって、PAR3と共免疫沈降するPP1の量が減少した。また、PP1と結合しないASPP2 RVKF変異体は、PAR3を細胞間接着に局在させる活性が低かった。これらの結果は、ASPP2がPAR3とPP1間の結合を媒介しており、この結合がPAR3の局在に必要なことを示唆している。
- 2) 上述の方法で、PAR3のリン酸化部位を絞り込み、この領域にあるセリン・スレオニンを全て置換することで、新規リン酸化部位を同定した。新規リン酸化部位のリン酸化レベルは、ASPP2のknockdownにより上昇した。また、PP1阻害剤を作用させると上昇した。これら結果は、ASPP2はPAR3とPP1の両者に結合することで、PAR3の脱リン酸化を行っていることを支持する。このPAR3のリン酸化部位変異体を上皮細胞に発現させ、カルシウム除去により細胞間接着を破壊すると、野生型PAR3は細胞質に一樣に分布したのに対し、変異体PAR3は塊状の構造を作って細胞質に分布した。この結果から、脱リン酸化によってPAR3分子自身が集積(クラスタリング)しやすい性質になることが示唆された。野生型PAR3-GFPとPAR3_SA-GFPのターンオーバー(分子の交換)をFRAP法で比較したところ、SA変異体の方が入れ替わりが遅かったことから、非リン酸化型PAR3は細胞間接着に安定局在していることが示唆された。また、SA変異体PAR3はタイトジャンクション領域よりもベーサル側であるラテラル膜にも異所的に局在し、タイトジャンクション形成領域をよりベーサル側であるラテラル膜へと伸長させた。これら結果から、PAR3が細胞間接着部位に濃縮する機構として、脱リン酸化によって起こる局所的な集積があることが示唆された。線虫やショウジョウバエにおいてもPAR3のクラスターが観察されており、今回のリン酸化制御が普遍的に働いている可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Furukawa T K, Yamashita K, Sakurai N, Ohno S. The epithelial circumferential actin belt regulates YAP/TAZ through nucleocytoplasmic shuttling of Merlin. Cell Reports, 8;20(6):1435-1447. 2017. 査読有り

〔学会発表〕(計 4件)

1. Tamura-Furukawa K, Yamashita K, Ohno S. FETAL AND MATERNAL ASYMMETRY IN PLASMA MEMBRANE DOMAINS OF SYNCYTIOTROPHOBLAST LAYER-I CELLS ARE MAINTAINED BY A POLARITYREGULATING FACTOR, KIBRA-LIKE/WWC2. International Federation of Placenta Associations. 2018

2. 山下 和成, 水野 恵子, 大野 茂男. 上皮細胞の空間パターンを作る細胞極性制御因子 PAR3 のクラスタリング制御機構. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018

3. 田村 可奈, 山下 和成, 大野 茂男. Circumferential actin belt の張力は、Merlin の核細胞質シャトリングを介して YAP/TAZ の核局在を抑制する. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018

4. Yamashita K, Furukawa K T, Sakurai N, Ohno S. The epithelial circumferential actin belt regulates YAP/TAZ through nucleocytoplasmic shuttling of Merlin. ASCB (American Society for Cell Biology)/EMBO 2017 Meeting. 2017

〔図書〕(計 1 件)

1. 山下 和成, 田村-古川 可奈, 大野 茂男. 上皮細胞の増殖抑制機構 環状アクチンベルトの収縮は YAP の核外排出を促進する. 実験医学. 羊土社. 36(1):79-82. 2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

1. 横浜市立大学医学部分子細胞生物学教室 (大野研)
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~ohnos/Japanese/indexJ.html>

2. 東北大学生命科学研究科分子細胞生物分野 (大橋研)
http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/ohashi_lab/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。