

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08574

研究課題名(和文)細胞極性制御複合体Exocyst-Par3の機能解析と乳がん治療への応用

研究課題名(英文)Functional analysis of the cell polarity regulatory complex Exocyst-Par3 in mammary epithelial cells

研究代表者

福田 尚代(西田尚代)(NISHIDA-FUKUDA, Hisayo)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：00802703

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、細胞極性因子Partitioning defective 3 (Par3)との結合を介して細胞生存を制御するexocyst複合体の細胞内動態解析を行い、さらにexocystサブユニットと結合する因子の役割について検討した。マウス乳腺上皮細胞NMuMGを用いて、exocyst複合体のサブユニットのC末端にGFP, mScarlet1, Haloタグを付加したノックイン細胞を樹立し、ライブセルイメージング解析により各サブユニットの細胞内動態の詳細を明らかにした。本成果は、exocystによる細胞生存制御機構を理解する上で重要な分子基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞極性の消失は多くのがん組織で認められており、がんの悪性度を見極める上で1つの指標となっている。exocyst複合体は、細胞極性因子Partitioning defective 3 (Par3)との結合を介して細胞極性形成や細胞生存を制御するが、その分子機構は不明な点が多い。本研究は、ゲノム編集とライブセルイメージングを組み合わせる事でexocyst複合体の細胞内動態を明らかにした。本研究成果は、exocystによる細胞極性制御、細胞生存制御のメカニズムを理解するための分子基盤となる。

研究成果の概要(英文): In this study, we analyzed the intracellular dynamics of the exocyst complex, which regulates cell survival through binding to the cell polarity factor partitioning defective 3 (Par3). we also examined the role of factors that bind to the exocyst subunit. Using mouse mammary epithelial cells NMuMG, we established knock-in cells with GFP, mScarlet1 or Halo tag attached to the C-terminus of the exocyst complex subunits, and clarified the details of the intracellular dynamics of each subunit by live cell imaging analysis. These results provide insights for understanding the mechanism of cell survival regulation by exocyst.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：exocyst 細胞極性 細胞生存 乳腺上皮細胞 乳がん

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞における細胞極性とは、密着接合・接着接合を境に管腔側と基底膜側に分離され、細胞の形や機能が細胞内で偏りを持つことを指す。この不均一性は、分泌や吸収などの上皮細胞特有の機能を維持する上で非常に重要である。細胞極性因子 Partitioning defective 3 (Par3)は、細胞内の非対称に局在化したタンパク質ネットワークを生成する主な駆動力の1つであり、Par3 の機能不全は、発達異常やがんなどの疾患を引き起こす。乳がん組織における Par3 の発現低下は予後不良因子として知られており、担がんマウス実験において Par3 の欠損は、乳がん細胞の増殖能および転移能の上昇を引き起こすことが示された(McCaffrey LM, Cancer Cell, 2012)。一方で、正常乳腺細胞で Par3 を欠失させると、exocyst の機能低下を原因とした AKT リン酸化の減少が起こり、細胞死が誘導される(Ahmed SM, Nat Commun, 2017)。これらの報告は、Par3 の機能破綻によるアウトプットが、がん細胞と正常細胞では異なることを意味しており、Par3-exocyst を標的とした新たな乳がん治療開発の創出が期待できる。しかし、Par3-exocyst がどのように AKT シグナル経路を制御するのかが不明な点が多く、より詳細な解析が求められている。

exocyst は、Exoc1 から Exoc8 までの8つのサブユニットからなる複合体であり、エキソサイトーシスの際に分泌小胞と細胞膜を繋ぎ止めることで、SNARE 複合体による膜融合を促す役割を持つ。酵母では、8つのサブユニットはそれぞれ4つのサブユニットから成るサブ複合体を2つ形成し、それらが結合することで8量体複合体を形成する。酵母では、exocyst は常に8量体複合体として存在し、膜融合を制御している (Mei K, Nat Struct Mol Biol, 2018)。一方で、哺乳類細胞における exocyst の細胞内動態モデルは複数存在しており、いまだ議論の中にある。本研究では、Par3-exocyst による細胞生存シグナルを理解する上で重要な exocyst の細胞内動態をゲノム編集とライブセルイメージングを組み合わせることでより詳細に解析した。

2. 研究の目的

本研究ではゲノム編集により exocyst サブユニットを可視化したノックイン細胞を樹立し、それらをライブセルイメージングにより解析することで exocyst サブユニットの細胞内動態を詳細に解析することを計画した。さらに GFPtrap を利用した質量分析により exocyst サブユニット結合因子の同定を行い、それらの機能解析をすることで Par3-exocyst による細胞生存制御の分子機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) CRISPR-Cas9 技術による exocyst サブユニットの可視化

哺乳類細胞で exocyst サブユニットを過剰発現すると、タンパク質分解が誘導され、また異所的な細胞局在(mislocalization)を呈するといった問題があった。また、免疫組織学的解析に適した exocyst サブユニット特異的抗体は市販されておらず、exocyst サブユニットの細胞内局在の解析は不十分なままであった。本研究ではこれらの問題を解決するために、CRISPR-Cas9 技術を利用し exocyst サブユニットの C 末端に GFP, mScarlet1, or Halo を挿入したノックイン細胞を樹立することで、この問題を解決しようと試みた。

(2) ライブセルイメージングによる exocyst サブユニットの細胞内動態解析

樹立した exocyst ノックイン細胞を用いて、ライブセルイメージング解析することで、exocyst サブユニットの膜融合時における細胞内動態を明らかにする。膜融合を観察するために、全反射照明顕微鏡(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF-M)を利用する。

(3) GFPtrap を利用した質量分析

樹立した exocyst ノックイン細胞を用いて GFPtrap を使った質量分析を行うことで、GFP, mScarlet1, Halo タグがついた exocyst サブユニットの機能を評価する。さらに、exocyst サブユニットと結合する因子群を網羅的に同定する。

4. 研究成果

(1) CRISPR-Cas9 技術による exocyst サブユニットの可視化

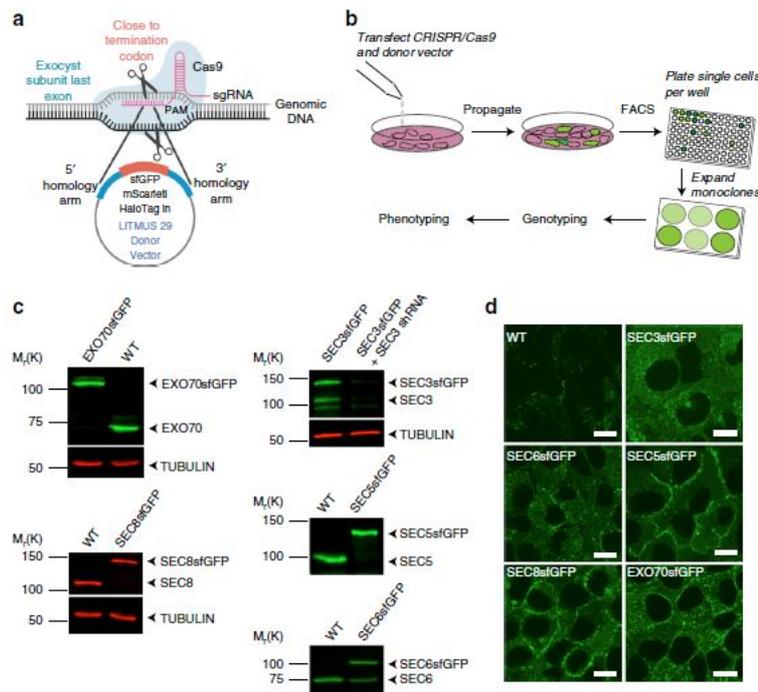


図 1. exocyst-GFP ノックイン細胞の樹立

分裂酵母を使った先行研究では、全ての exocyst サブユニットの N 末端および C 末端に GFP を挿入した変異体が作製されており、GFP 融合後も機能を維持していることが報告されている(Picco A, Cell, 2017)。そこで、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集によりマウス乳腺細胞株 NMuMG の全ての exocyst サブユニット遺伝子に superfolder GFP (sfGFP), mScarlet1, Halo-tag を C 末端にインフレームで

挿入することを試みた。FACS ソーティングにより蛍光標識された細胞を単離し、クローン化した後に genotyping PCR により遺伝子型を検出した。その結果、8 種類のターゲティングベクターのうち、5 種のベクターでノックイン細胞株の樹立に成功した。Exoc5/Sec10 および Exoc6/Sec15 では GFP 陽性細胞を検出したが、細胞分裂異常が起こったため株化までに至らなかった。N 末端領域へのタグの挿入も試みたが、同様の結果となった。また、Exoc8/Exo84 では GFP 陽性細胞を検出できなかった。これらのサブユニットでは、GFP 挿入により立体障害が生じ、exocyst が機能不全になる可能性が示唆される。樹立できた Exoc1-Exoc4 および Exoc7 ノックイン細胞ではいずれも GFP が細胞膜に局在があり、かつ細胞質で広範囲で発現が認められ、核領域では GFP 発現はなかった。これらの結果は、免疫染色による報告と一部で一致していた。

(2) ライブセルイメージングによる exocyst サブユニットの細胞内動態の解析

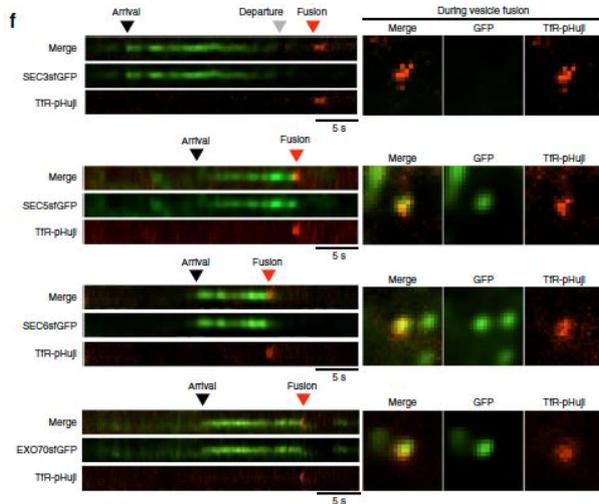


図 2. exocyst サブユニットの細胞内動態解析

分泌小胞内部の pH の変化(pH 4.5 から pH 7 への上昇)に伴って pHuji の蛍光輝度が上昇するため、膜融合の時期と場所を特定することができる。それぞれのノックイン細胞に TfR-pHuji を発現させ、TIRF-M により膜融合前後における exocyst サブユニットの細胞膜上での発現様式を解析した。その結果、exocyst サブユニットは膜融合が起きる約 10 から 14 秒前に細胞膜へ到達することが明らかとなった。この時間は、別のエンドソームマーカである Rab11 の到着時間とほぼ一致していたことから、exocyst サブユニットは分泌小胞と共に細胞膜まで移動していることが示唆された。興味深いことに、Exoc1/Sec3 は膜融合直前に細胞膜から遊離することが分かった。一方で、他のサブユニットは膜融合後、1.4 秒間ほど留まった後に細胞膜から遊離することが示された。この遊離の違いに関してはさらなる解析が必要である。

膜融合時における各 exocyst サブユニットの細胞内動態を調べるために、細胞膜から細胞膜直下までを観察できる全反射照明顕微鏡(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF-M)を用いたライブセルイメージング解析を行った。膜融合のマーカとして、Transferrin receptor-pHuji (TfR-pHuji)を使用した。TfR は膜タンパク質であり、エンドソームに局在する。pHuji は pH 感受性の赤色蛍光タンパク質である。膜融合後、

(3) GFPtrap を利用した質量分析

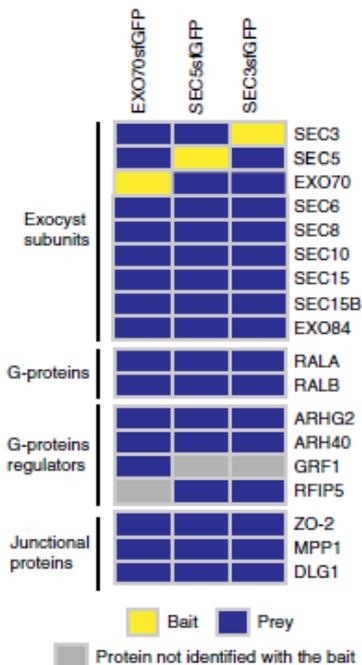


図 3. GFP-trap を用いた質量分析

樹立したノックイン細胞は GFP 融合タンパク質であるため、GFP-trap による質量分析を行うことで、各 exocyst サブユニットに結合するタンパク質を網羅的に解析することができる。Exoc1/Sec3, Exoc2/Sec5, Exoc7/Exo70 のノックアウト細胞を使って質量分析を行ったところ、他の全てのサブユニットとの結合および既知のタンパク質相互作用が確認できた。この結果は、酵母での報告と一致して、C 末端への GFP 融合は各 exocyst サブユニットの機能を阻害しないことを示している。さらに本解析では、これまで報告されていなかったタンパク質との結合を同定した。これら新規の相互作用に関して、さらなる解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishida-Fukuda Hisayo, Tokuhiko Keizo, Ando Yukio, Matsushita Hiroaki, Wada Morimasa, Tanaka Hiromitsu	4. 巻 16
2. 論文標題 Evaluation of the antiproliferative effects of the HASPIN inhibitor CHR-6494 in breast cancer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0249912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamanaka Satoshi, Shoya Yuki, Matsuoka Saya, Nishida-Fukuda Hisayo, Shibata Norio, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 3
2. 論文標題 An IMiD-induced SALL4 degron system for selective degradation of target proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishida Fukuda Hisayo	4. 巻 41
2. 論文標題 The Exocyst: Dynamic Machine or Static Tethering Complex?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 1900056 ~ 1900056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.201900056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Syed Mukhtar Ahmed, Hisayo Nishida-Fukuda, Yuchong Li, W. Hayes McDonald, Claudiu C. Gradinaru, Ian G. Macara	4. 巻 9
2. 論文標題 Exocyst dynamics during vesicle tethering and fusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07467-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakayama Hironao, Ohnuki Hidetaka, Nakahara Masako, Nishida-Fukuda Hisayo, Sakaue Tomohisa, Fukuda Shinji, Higashiyama Shigeki, Doi Yuki, Mitsuyoshi Masahiro, Okimoto Takashi, Tosato Giovanna, Kusumoto Chiaki	4. 巻 611
2. 論文標題 Inactivation of axon guidance molecule netrin-1 in human colorectal cancer by an epigenetic mechanism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 146 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.201900056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Syed Mukhtar Ahmed, Hisayo Nishida-Fukuda, Yuchong Li, W. Hayes McDonald, Claudiu C. Gradinaru, Ian G. Macara	4. 巻 9
2. 論文標題 Exocyst dynamics during vesicle tethering and fusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07467-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 福田尚代、徳弘圭造、松下博昭、安東由喜雄、和田守正、田中宏光
2. 発表標題 HASPIN阻害剤CHR-6494の乳がん細胞増殖抑制効果の検証
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 庄屋祐希、山中聡士、澤崎達也、福田尚代
2. 発表標題 サリトマイド依存的タンパク質分解タグの開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田信治、福田尚代、Debrah Lannigan、東山繁樹
2. 発表標題 Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2)の細胞内局在制御と細胞間接着の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisayo Nishida-Fukuda, Syed Mukhtar Ahmed and Ian G. Macara
2. 発表標題 Dynamics of the Exocyst Complex During Vesicle Tethering and Fusion
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田尚代, Syed Mukhtar Ahmed, Ian G. Macara
2. 発表標題 TIRF顕微鏡による内在性exocystのリアルタイムイメージング
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福田 信治 (FUKUDA Shinji) (70398238)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Vanderbilt University			