

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19570175
研究課題名（和文） 細胞膜損傷を契機とした微小管配向再構築における 微小管プラス端集積因子の役割の解析
研究課題名（英文） Research on the role of microtubule plus-end tracking proteins in the reorganization of microtubule array upon cell membrane disruption
研究代表者 東郷 建（TOGO TATSURU） 聖マリアンナ医科大学・医学部・講師 研究者番号：40334247

研究成果の概要（和文）：細胞膜損傷による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、微小管配向の再構築を誘起する。このことは微小管のダイナミクスを調節するタンパク質・微小管プラス端集積因子（+TIPs）が Ca^{2+} により制御されていることを示唆している。今回既知の+TIPs のうち、 Ca^{2+} 濃度上昇によって adenomatous polyposis coli と EB1 が細胞内局在を変化させることを明らかにし、更に Ca^{2+} がどのようなシグナル伝達系を経てこれら+TIPs を制御しているのかを検討した。

研究成果の概要（英文）：Microtubule (MT) plus end tracking proteins (+TIPs) are involved in the regulation of MT dynamics. It was reported previously that an increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) induced by cell membrane disruption stimulates rearrangement of MTs, suggesting that some +TIPs are regulated by Ca^{2+} . In the present study, the behaviors of +TIPs following an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed. Disruption of plasma membrane and increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimulates redistribution of adenomatous polyposis coli (APC) and EB1. Present study also indicated that Ca^{2+} stimulates redistribution of APC through a tyrosine kinase- and GSK-3 β -dependent pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：膜修復、微小管、プラス端集積因子、adenomatous polyposis coli, EB1、カルシウム、GSK-3 β 、チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

細胞膜損傷とその修復は、筋肉、消化器、角膜、皮膚など物理的負荷がかかる器官・組織で広く観察されるが、多くの場合は修復される。膜損傷は脂質二重層の物理化学的性質によって受動的に修復されると考えられてきたが、近年になって細胞自身の積極的な関与が必要なことが明らかになった。即ち、膜損傷の修復には損傷箇所から流入する Ca^{2+} が誘起するエキソサイトーシスが必須である(1)。このエキソサイトーシスには、細胞膜が自発的に修復できるように、本来高い状態にある細胞膜の張力を下げる働きのあることを見出した(2)。

細胞膜に5分間隔で繰り返し損傷を与えると、2回目の修復は1回目より早い(3, 4)。これは2回目の損傷時のエキソサイトーシス量が1回目に比べて多いことによる。

この修復促進反応には、プロテインキナーゼA (PKA) 依存性の反応と、プロテインキナーゼC (PKC) 依存性-ブレフェルディンA (BFA) 感受性の反応の2つがあった(3, 4)。興味深いことに、PKCの阻害やBFA処理の影響が観察されるのが、2回の損傷を細胞の同じ場所に与えた場合のみであることから(3)、ゴルジ体/トランスゴルジネットワークからの小胞輸送が、損傷箇所に向いていることが示唆された。

細胞の中に張り巡らされた微小管は、細胞内における小胞輸送のいわばレールとして必須の構造体である。これまでの研究において、細胞膜損傷を契機として大規模な微小管

配向の再構築が起こることを明らかにしてきた(5)。即ち、細胞膜損傷は損傷箇所近傍でまず微小管の脱重合を引き起こし、その後、微小管プラス端が細胞膜の損傷箇所に向かって伸長し、微小管配向の再構成が起こることを見出した。

近年、微小管プラス端に特異的に結合してそのダイナミクスを調節し、かつプラス端と様々な細胞構造との結合を仲介するタンパク質・微小管プラス端集積因子(+TIPs)が発見され、注目されている。

細胞膜損傷が微小管配向を変動させることから、+TIPsが Ca^{2+} によって制御されていることが示唆されるが、これまで詳細な検討はなされていない。

引用文献

- (1) McNeil, PL, Steinhardt, RA: *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 697-731 (2003)
- (2) Togo, T, Krasieva, TB, Steinhardt, RA: *Mol Biol Cell* 11, 4339-4346 (2000)
- (3) Togo, T, Alderton, JM, Bi, GQ, Steinhardt, RA: *J Cell Sci* 112, 719-731 (1999)
- (4) Togo, T, Alderton, JM, Steinhardt, RA: *Mol Biol Cell* 14, 93-106 (2003)
- (5) Togo, T: *J Cell Sci* 119, 2780-2786 (2006)

2. 研究の目的

本研究は、細胞膜損傷後に時空間的にダイナミックに変化する微小管配向を制御する分子機構を解明することを目的とし、既知の+TIPsのうち、どの+TIPsが細胞膜損傷という刺激に反応しているかを解析し、更に細胞

膜損傷による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がどのようなシグナル伝達系を経てこれら +TIPs を制御しているのかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜損傷後の +TIPs 分子の挙動の解析

まず、どの +TIPs 分子が細胞膜損傷や細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によって影響を受けるかを検討した。具体的には、様々な +TIPs の GFP 融合タンパク質を強制発現させた細胞を用いて、マイクロインジェクションと同じ要領で細胞膜に損傷を与え、タイムラプス観察を行った。

(2) 細胞膜損傷から +TIPs 分子の細胞内局在変動に至る情報伝達系の解析

これまでの研究から、細胞膜損傷は Ca^{2+} の流入を伴うこと、更に Ca^{2+} の流入が細胞膜損傷後の微小管配向の再構築に必要であることを見出している。しかし、 Ca^{2+} と +TIPs との分子連鎖は全く不明である。そこで、 Ca^{2+} 濃度上昇から +TIPs に至るシグナル伝達因子について、とくに APC を直接リン酸化し微小管との親和性を制御している GSK-3 β が Ca^{2+} によって活性化されているかを中心に検討を行った。

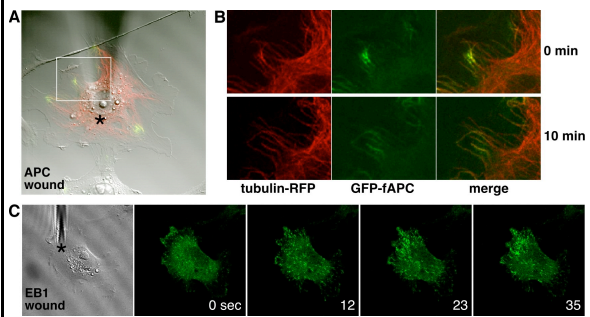
4. 研究成果

(1) 細胞膜損傷後の +TIPs 分子の挙動

様々な +TIPs の GFP 融合タンパク質を強制発現させた細胞に膜損傷を与え、タイムラプス観察を行った。その結果既知の +TIPs のうち、EB1 および APC (adenomatous polyposis coli) が細胞膜損傷後に細胞内での局在を変動させていることを見出した。

APC は細胞辺縁部で微小管と共局在しているが (図 1 A)、細胞膜損傷後 78.6 ± 34.8 秒 ($n = 8$) から局在の変動を開始し、10 分後に

は大部分の APC は微小管との共局在を解消した (図 1 B)。

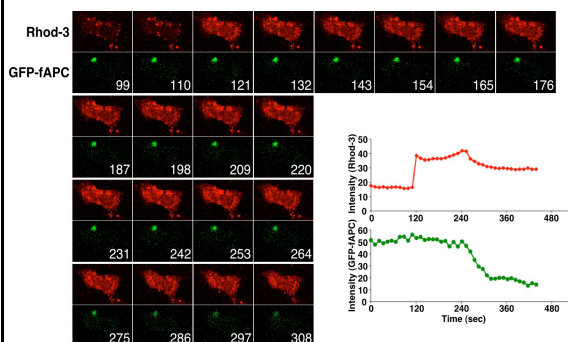


[図 1]

このとき微小管は、細胞膜損傷箇所近傍では Ca^{2+} の影響を受けて局所的に脱重合していたが、APC が局在変動を示した細胞辺縁部では微小管の脱重合は認められなかった。以上のことから、細胞膜損傷は APC を微小管から解離させていることが明らかとなった。

一方、EB1 は APC とは異なる挙動を示した (図 1 C)。即ち細胞膜損傷後 30 秒以内に損傷を与えた場所の近傍でとくに集積が認められた。

次に、この APC の局在変動が細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によるのかを確認するために、APC-GFP を強制発現させた細胞に Ca^{2+} 蛍光指示薬 Rhod-3 を導入し、カルシウムイオノフォアであるイオノマイシンで処理した (図 2)。



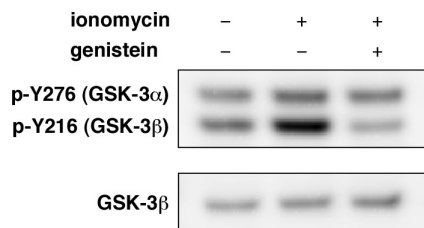
[図 2]

その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇開始後 66.7 ± 11.8 秒 ($n = 18$) に APC の解離が始まり、

その局在を変動させていることが明らかとなった。このことから、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が APC の局在変動の直接の引き金となっていることが明らかとなった。

(2) 細胞膜損傷から APC の細胞内局在変動に至る情報伝達系

APC は GSK-3 β によってリン酸化を受けると微小管から解離することが知られている。更に、GSK-3 β の活性化は Tyr216 のリン酸化によって起こることが明らかにされている。そこで、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が GSK-3 β の活性化、すなわち GSK-3 β の Tyr216 のリン酸化を引き起こしているかを検討した。細胞をチロシンキナーゼ阻害剤 genistein 存在下、非存在下でイオノマイシン処理し、タンパク質を抽出後、ウエスタンブロット解析を行った (図 3)。

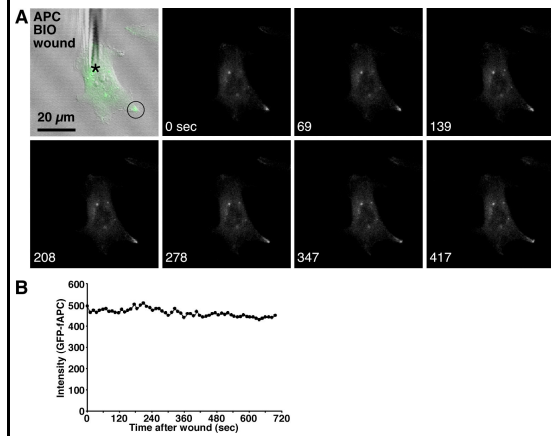


[図 3]

その結果、イオノマイシン処理による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は GSK-3 β の Tyr216 をリン酸化することで GSK-3 β を活性化していることが明らかとなった。

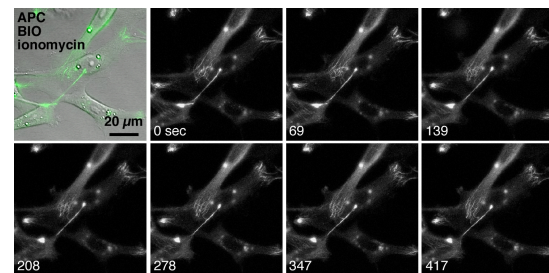
次に GSK-3 β 活性を阻害した条件で細胞膜損傷を与えるか、またはイオノマイシン処理を行って、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させたときの APC の局在変動を観察した (図 4, 5)。

図 4 に示したように、GSK-3 β 活性を 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) で阻害し、細胞膜損傷を与えたが、APC の局在は全く変動しなかった。



[図 4]

また図 5 に示すように、BIO 処理した細胞にイオノマイシンを与えたが、これも同様に APC の局在変動を誘起できなかった。



[図 5]

以上の結果から、細胞膜損傷が引き起こす細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はチロシンキナーゼを活性化し、それによって GSK-3 β が活性化されること、更に活性化した GSK-3 β が APC を微小管から解離させることが明らかとなった。

APC は微小管を安定化させることが知られているので、今回の研究から明らかとなったシグナル伝達系は微小管配向を一時的に不安定化させると考えられる。細胞モノレイヤーをスクラッチすると、スクラッチに面した細胞は細胞膜損傷を受けるので、このシグナル伝達系はモノレイヤーのスクラッチに沿った細胞において微小管配向を一時的に不安定化し、極性を持った上皮細胞が細胞シート修復のために微小管配向を変動させて、

細胞移動を開始させるきっかけになると考えられる。実際、APC の微小管からの解離をチロシンキナーゼ阻害剤や GSK-3 β 阻害剤を用いて抑制したところ、スクラッチ後の細胞形態の変化と細胞の移動開始が大幅に遅れることが分かった。今後さらに、細胞シートの修復時の微小管配向の変動における APC の役割について、詳細な検討を行う必要がある。

本研究において、EB1 が膜損傷後 30 秒以内に膜損傷箇所近傍に集積することも明らかにできた。EB1 は伸長する微小管全てにおいてプラス端に集積すること、また EB1 は他の +TIPs と複合体を形成することが知られているので、細胞膜損傷によって EB1 に加えて別の +TIPs も膜損傷箇所近傍に集積していると考えられるが、今回の研究においては見出すことができなかった。今後さらに、膜損傷箇所近傍に集積する +TIPs の探索を続け、細胞膜損傷を契機とした微小管配向の再構築の分子機構を明らかにしていきたい。

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)

Togo, T. (2009). Ca²⁺ regulates the subcellular localization of adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 12-16. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 東郷 建. 細胞膜損傷は adenomatous polyposis coli を微小管から解離させる. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 6/4/2009, 名古屋.
- ② Togo, T. Ca²⁺ signaling regulates the

subcellular localization of adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting, 12/15/2008, San Francisco, USA.

[その他]

東郷 建. 日々傷つく細胞たち-細胞の損傷と修復. 第 4 回ライフサイエンス T カフェ, 12/4/2009, 東洋大学板倉キャンパス.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東郷 建 (TOGO TATSURU)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40334247

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし