

機関番号：22701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570186

研究課題名 (和文) 普遍的な極性制御タンパク質キナーゼ、PAR-1 の上皮細胞極性制御機構の研究

研究課題名 (英文) Study on the molecular mechanisms by which general cell polarity-regulating kinase, PAR-1, regulates epithelial polarity

研究代表者

鈴木 厚 (SUZUKI ATSUSHI)

横浜市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00264606

研究成果の概要 (和文)：上皮細胞は、私たちの身体が外界と接する部分を覆う細胞（たとえば皮膚）であり、外界に接する細胞膜領域と体内に接する細胞膜領域の間に機能の非対称性（極性）が存在するという特徴を持つ。そしてこの極性の発達異常は生理機能の異常等につながるということが明らかとなっている。本研究においては、上皮極性制御因子であることがわかっている PAR-1 というリン酸化酵素がいかにしてその作用を発揮しているのかという点を明らかにすることを目的とし、特にその結合タンパク質の解析を進めた。

研究成果の概要 (英文)：Epithelial cells cover the boundary between our body and external environment, and thus develop functional asymmetry (polarity) between the cell membranes facing internal and external environment. It has been demonstrated that abnormal epithelial polarity leads to physiological deficiency. In this study, we have analyzed how the general cell polarity-regulating protein, PAR-1, plays important roles for epithelial polarity, especially by analyzing its binding proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：細胞極性、PAR、上皮細胞、微小管

1. 研究開始当初の背景

個々の細胞の示す極性（細胞内成分の非対称な分配とそれに基づく細胞機能や形態の非対称化）は、多細胞生物が生命を維持する上で根源的に重要であり、発生分化の過程（運命決定因子の非対称分配やダイナミックな上皮-間葉変換制御など）、成体機能の維持（上皮細胞や神経細胞の機能など）、さらには種々の疾患の発生（発癌における上皮極性

の喪失、細胞運動の亢進）など様々な局面の生命現象に深く関わっている。研究開始時点までの間に、すでに私は、この細胞極性を普遍的に制御する細胞内シグナル伝達制御システム、「PAR-aPKC システム」の研究を精力的に展開し、主として哺乳動物上皮細胞の極性制御の上でこのシステムに属する因子群が非常に重要な役割を果たしていることを明らかとしてきた。

2. 研究の目的

本研究においては、これまでの成果を系統的に発展させ、特に、PAR-aPKC システムの出力を担う二種のセリン・スレオニンキナーゼのうちの一つ、PAR-1b の上皮細胞極性制御の分子メカニズムをさらに解明することを目的とした。具体的には、PAR-1b の新規標的分子、および PAR-1b の非対称局在を担う因子の同定と解析を試みた。

3. 研究の方法

培養上皮細胞、MDCK 細胞に tag 付き PAR-1 (PAR-1b isoform) を高発現して、tag による免疫沈降物の中に検出される PAR-1b 特異的な結合タンパク質を質量分析によって同定した。この際、MDCK 細胞内在性の PAR-1b をあらかじめノックダウンしておいた細胞を用いることで、PAR-1b 結合タンパク質の検出を高めるといった工夫をこらした。

本研究においては、いくつか同定した PAR-1b 結合タンパク質の中の 250 kDa の分子 (p250 と命名) の PAR-1b との関係、および上皮極性制御への関与の可能性について検討を進めた。この解析は、基本的に MDCK 細胞における

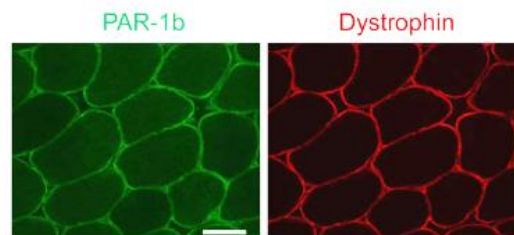
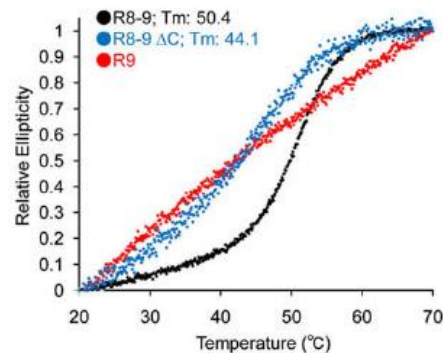
4. 研究成果

1) PAR-1 によるジストログリカン複合体の機能制御機構の解明

先の研究期間に得ていた結果、「PAR-1 が、細胞基質 (ラミニン) 受容体であるジストログリカン複合体に結合し、上皮細胞における膜局在、およびラミニン結合に必須な糖鎖修飾を正に制御する」という結果を論文として公表するとともに、その分子メカニズムの一端にさらに踏み込み、その点についても論文を公表した。その中では、PAR-1 が直接結合するのは膜タンパク質であるジストログリカンに結合する膜裏打ちタンパク質、ユートロフィンのスペクトリン・リピートの 8 番と 9 番にわたる領域であることを明らかとした。そして、CD スペクトルの解析から、この二つのリピート構造は高い構造的協調性を有しており (下図)、PAR-1 はこれらリピートのリンカー部分をリン酸化し、その結果、C 末端におけるジストログリカンとの結合に影響を与える効果を発揮していることを報告した。

また、PAR-1 がユートロフィンの相同分子であり、デジャンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィンにも同様に

結合し、リン酸化活性を示すこと、そして、ヒト骨格筋細胞膜で両者が共局在を示すことも明らかとした (下図)。

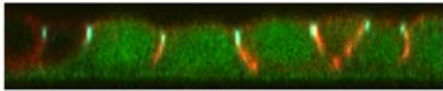


2) 新規 PAR-1b 結合タンパク質の同定と解析

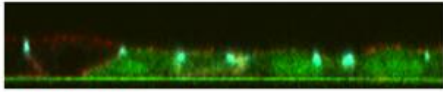
新たに方法を改善 (3. 研究の方法、参照) することによって、本研究において新たな PAR-1 結合タンパク質、p250 (仮称) を同定した。この p250 は N 末端にコイルド・コイル領域を有する以外は既知のタンパク質と明確な相同性を示さない機能未知のタンパク質であったが、本研究によって、このタンパク質が、N 末端を介して会合する活性を示すとともに、その C 末端の特徴的な塩基性領域を介して微小管に結合するタンパク質であり、細胞内で微小管を束化・安定化する活性を有することを明らかとした。そして、RNA 干渉法 (RNAi) による p250 の培養上皮細胞における発現抑制によって、PAR-1 発現抑制の場合と同様なラテラル膜の伸長抑制が観察されることが判明した (次ページ参照: NC: コントロール)。したがって、p250 が PAR-1 とともにこの上皮極性化後期のこの過程に関与している可能性が示された。その後の研究により、p250 は上皮細胞のサブ・ラテラル膜の微小管に局在し、その領域への PAR-1 のリクルートに働いている可能性も示唆された。また、PAR-1 はキナーゼ領域を介して、p250 の分子中央の領域に結合し、その近傍の特定のセリン残基をリン酸化することも判明した。この研究は現在、投稿準備中である。

3) PAR-1 の上流因子、aPKC に関する研究

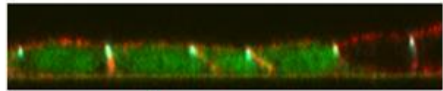
NC RNAi



PAR-1b RNAi



p250 RNAi #1



PAR-1の上流因子であるaPKCの上皮アピカル膜形成促進活性に関する研究も進め、PAR-3とaPKCの間の結合がアピカル膜タンパク質を含む細胞内小胞の細胞膜への標的化に必須であることを明らかとして論文として発表した。

一方、東京大学農学部の千田教授との共同研究によって、KIBRAがaPKCの内在的な阻害タンパク質として働き、そのことを介してaPKCのアピカル膜形成促進能を調節していることを明らかとし、論文として報告した。

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9件)

- ① 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. *Curr Biol.* 21:705-11, 2011. 査読有
- ② Kan Y, Ohmura M, Suzuki A, Theeraladanon C, Oka T, Nakagami Y, Suzuki A, Nagashima Y, Inoue T. Proliferation of human lung cancer in an orthotopic transplantation mouse model. *Exp. Therapeut. Med.* 1:471-475, 2010. 査読有
- ③ 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. *BBRC* 391: 812-817, 2010. 査読有

- ④ Mori D, Yamada M, Mimori-Kiyosue Y, Shirai Y, Suzuki A, Ohno S, Saya H, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. An essential role of the aPKC-Aurora A-NDEL1 pathway on neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nat. Cell Biol.* 11(9): 1057-68, 2009. 査読有
- ⑤ Masuda-Hirata M, Suzuki A, Amano Y, Yamashita K, Ide M, Yamanaka T, Sakai M, Imamura M, Ohno S. Intracellular polarity protein PAR-1 regulates extracellular laminin assembly by regulating the dystroglycan complex. *Genes to Cells* 14:835-50, 2009. 査読有
- ⑥ Horikoshi Y, Suzuki A, Yamanaka T, Sasaki K, Mizuno K, Sawada H, Yonemura S, Ohno S. Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 122:1595-1606, 2009. 査読有
- ⑦ Matsuda C, Kameyama K, Suzuki A, Mishima W, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi Y. Affixin activates Rac1 via bPix in C2C12 myoblast. *FEBS Lett.* 582: 1189-1196, 2008. 査読有
- ⑧ Ebnet K, Iden S, Gerke V, Suzuki A. Regulation of epithelial and endothelial junctions by PAR proteins. *Front Biosci*, 13: 6520-36, 2008. 査読有
- ⑨ Kishikawa M, Suzuki A, Ohno S. aPKC enables development of zonula adherens by antagonizing centripetal contraction of the circumferential actomyosin cables. *J Cell Sci.* 121: 2481-92, 2008. 査読有

[学会発表] (計13件)

- ① Yoshihama Y, Sasaki K, Horokoshi Y, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S-I, Suzuki A, Ohno S, Chida K: KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells. The 50th American Society for Cell Biology Annual Meeting, Philadelphia, 2010 12.
- ② 林 健二, 鈴木 厚, 大野茂男: Maintenance of dendritic spine morphology by PAR1b through regulation

- of microtubule dynamics. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010 12.
- ③ Yoshihama Y, Sasaki K, Horokoshi Y, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S-I, Suzuki A, Ohno S, Chida K: KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010 12.
- ④ 平手良和, 平原志乃, 井上健一, 中尾和貴, 鈴木 厚, 秋本和憲, 大野茂男, 平井孝明, 千田和広, Marikawa Y, Vernadeth A, 佐々木 洋: 細胞極性による Hippo 経路の抑制がマウス着床前胚における位置依存的な細胞分化をつかさどる. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会(口頭発表), 神戸, 2010 12.
- ⑤ 鈴木 厚, 佐藤由典, 秋津真志, 天野芳子, 大野茂男: 新規 PAR1 結合タンパク質 p250 は, 微小管安定化タンパク質である. 第62回日本細胞生物学会大会, 大阪市, 2010, 5.
- ⑥ A. Suzuki, K. Yamashita, Y. Amano, M. Masuda-Hirata, S. Ohno. Intracellular polarity protein PAR-1 regulates extracellular laminin assembly by regulating the dystroglycan complex. American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, San Diego, CA, 2009, 12.
- ⑦ Y. Horikoshi, A. Suzuki, T. Yamanaka, K. Sasaki, K. Mizuno, S. Yonemura, S. Ohno. Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 Complex Is Indispensable for Apical Domain Development of Epithelial Cells. The American Society for Cell Biology /Japan Society for Cell Biology /RIKEN Center for Developmental Biology Meeting, Kyoto, 2009, 9.
- ⑧ A. Suzuki, K. Yamashita, Y. Amano, M. Hirata, S. Ohno. PAR-1/MARK Regulates Extracellular Laminin Assembly by Controlling the Dystroglycan Complex. The American Society for Cell Biology /Japan Society for Cell Biology /RIKEN Center for Developmental Biology Meeting, Kyoto, 2009, 9.
- ⑨ 鈴木 厚, 平田真樹, 天野芳子, 山下和成, 大野茂男: 細胞内極性タンパク質, PAR-1 はジストログリカン複合体を制御することによって, 細胞外のラミニンの集積を制御している. 第61回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 2009, 6.
- ⑩ 堀越洋輔, 鈴木 厚, 山中智行, 佐々木和教, 水野恵子, 米村重信, 大野茂男: PAR-3 と aPKC-PAR-6 との相互作用は, 上皮細胞のアピカルドメインの形成に必要である. 第61回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 2009, 6.
- ⑪ 秋津真志, 鈴木 厚, 山下和成, 天野芳子, 井出真理子, 大野茂男: 円柱様上皮細胞の形態に必須な新規 PAR-1b 結合タンパク質. 第61回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 2009, 6.
- ⑫ 山下和成, 鈴木 厚, 井出真理子, 天野芳子, 林 由起子, 平田真樹, 嶋田香子, 大野茂男: 細胞極性制御キナーゼ PAR-1b は, utrophin の spectrin repeat ドメインと相互作用することで, utrophin-dystroglycan 複合体を安定化する. 第61回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 2009, 6.
- ⑬ 岸川優, 鈴木厚, 大野茂男: aPKC は, 円周性アクトミオシンバンドルの収縮をアンタゴナイズすることによって上皮細胞の接着結合の発達に必須な役割を果たしている. 第60回日本細胞生物学会大会, 横浜, 日本, 2008, 2008年6月29日(日)~7月1日(火).

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~ohnos/Japanease/indexJ.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 厚 (SUZUKI ATSUSHI)

横浜市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 00264606

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし