

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20790233

研究課題名（和文） 細胞極性を制御する新規 Par3 結合蛋白質の作用機構

研究課題名（英文） Regulation of cell polarity by a novel Par3-binding protein

研究代表者

鎌倉 幸子 (KAMAKURA SACHIKO)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80398081

研究成果の概要（和文）：細胞が正常に機能し調節されるためには、細胞の極性 (cell polarity) が適切に形成されることが必要である。細胞極性の決定時には、細胞膜の特定の領域に、極性決定のための蛋白質複合体「Par-aPKC 複合体」が、形成される。本研究では、私たちが見出した新規 Par3 結合蛋白質の極性形成における役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cell polarization is crucial for a variety of processes in development. The Par3/Par6/aPKC (Par-aPKC) complex is required for polarity establishment in several types of cell. During the process, the Par-aPKC complex is targeted to the plasma membrane, which plays an important role in cell polarization. However, little is known about the mechanisms underlying proper subcellular localization of the complex. In the present study, we identify a novel Par3-binding protein, which recruits the Par-aPKC complex to the plasma membrane for regulating mammalian epithelial cell polarity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

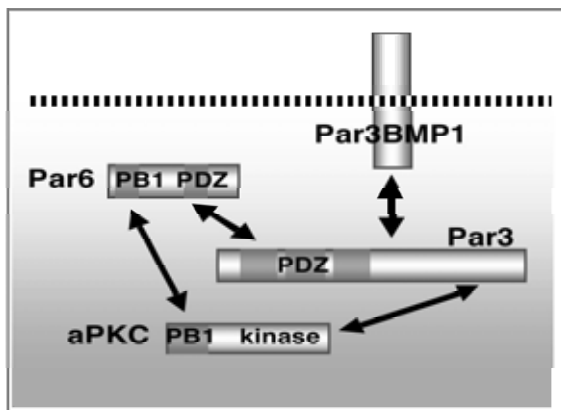
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞が正常に機能し調節されるためには、細胞の極性 (cell polarity) が適切に形成されることが必要である。細胞極性のもつ意義は、細胞の種類や分化段階によって異なり、また、空間配置やその分子組成も細胞の種類によって大きく異なるが、『細胞極性の決定』には、いくつかの共通の分子機構が存在することが明らかになりつつある。その1つとして、細胞極性が決定される時には、細胞膜の特定の領域領域に、極性決定のための蛋白質複合体が形成されることが必要である。そのような蛋白質複合体のひとつが「Par-aPKC 複合体」であり、上皮細胞のタイトジャンクション (TJ) が形成される部位や、海馬ニューロンの軸索先端などの細胞膜直下に局在することが必要になってきた。しかし「Par-aPKC 複合体」がどのようにして細胞膜の特異的な領域に局在化するのか、その分子機構はよく解っていない。



2. 研究の目的

申請者らはこれまでに、哺乳類の「Par-aPKC 複合体」についての生化学的、構造生物学的、あるいは細胞生物学的解析を行ってきたが、最近、新規な Par3 結合蛋白質として、I 型の膜蛋白質 Par3BMP1 を単離した。Par3BMP1 は Par3 との結合依存的に細胞極性を制御することを見出している。本研究では、私達が単離した Par3BMP1 に焦点を当て、哺乳類の極性決定に必要な「Par-aPKC 複合体」が、極性形成時の細胞膜直下に事前に形成されるための分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、私達が単離した Par3BMP1 に焦点を当て、哺乳類の極性決定に必要な「Par-aPKC 複合体」が、極性形成時の細胞膜直下に事前に形成されるための分子機構を明らかにする。

(1) TJ 形成時における Par-aPKC 複合体の局在制御; Par3BMP1 は Par3 との結合を介して極性形成に関与することを見出していることから、膜蛋白質である Par3BMP1 が Par3 を直接的に膜へとリクルートする可能性を考え、次のような実験を行う。

① Par3BMP1 による Par-aPKC 複合体の局在制御; 上皮細胞の極性形成を観察する系として、Par3BMP1 が高発現しているイヌ腎上皮

由来培養細胞 MDCK を使用する。Par3BMP1 の RNAi を行い、Par3、Par6、aPKC の TJ 形成部位の膜への局在を細胞染色により観察する。

②Par3BMP1 の極性形成過程の細胞内局在；上皮細胞 MDCK では Par3BMP1 は TJ に局在することを見出している。Par3BMP1 抗体を用いて、極性形成過程での局在を観察する。

③細胞外領域の機能； in vitro の結合実験から、Par3BMP1 の細胞外領域がホモフィリックに結合することを見出している。そこで、Par3BMP1 の細胞外領域の機能を調べるために、細胞外領域を欠失した変異体を発現させて Ca²⁺スイッチを行い、極性形成への影響を観察する。解析には、TER 法（transepithelial resistance 法；上皮細胞シートの上下の電気抵抗の上昇を測定することで、機能的な TJ 形成を測定する方法）や、TJ マーカーである ZO-1 に対する抗体で細胞染色する方法（TJ 形成を形態学的に測定する方法）を用いる。

（2）海馬ニューロンの軸索形成における Par-aPKC 複合体の局在制御；海馬ニューロンの極性形成（軸索形成）の過程では「Par-aPKC 複合体」が、軸索先端の細胞膜直下に局在することが必要である。Par3BMP1 は脳、特に海馬での発現が高いことを見出しており、膜蛋白質 Par3BMP1 が Par3 を膜へとリクルートする可能性を考え以下のような実験を行う。

①軸索形成過程の Par3BMP1 の細胞内局在；前述の 2 種類の Par3BMP1 抗体を用いて、海

馬ニューロンの軸索形成過程の Par3BMP1 の局在の変化を観察する。

②Par3BMP1 による Par-aPKC 複合体の局在制御；私たちは、これまでの解析により Par3BMP1 の Par3 結合領域を決定しており、Par3 結合能を持たない Par3BMP1 変異体も作製している。そこで、Par3BMP1 の野生型及び変異体を海馬ニューロンに導入し、Par-aPKC 複合体の局在に与える影響を観察する。また同時に軸索形成への影響も観察する。

4. 研究成果

Par3BMP1 は糖鎖を持つ type I 膜貫通蛋白質であり、C 末端の PDZ 結合モチーフを用いて Par3 と結合した。さらに Par3BMP1 は Par3 との結合を介して Par6 や aPKC とも複合体を形成した。内在性 Par3BMP1 は上皮細胞の細胞間接着部位に集積して局在すること、細胞外領域がホモフィリックに結合することから Par3BMP1 が細胞間接着を介して機能することが予想された。Par3BMP1 の過剰発現は、TJ 形成（極性形成）を著しく阻害したが、Par3BMP1 の C 末端（Par3 結合領域）を欠失した変異体ではこの阻害効果は全く見られなかった。以上の結果から、Par3BMP1 は Par3 との結合を介して、「Par-aPKC 複合体」の局在を制御し、上皮細胞の細胞極性形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

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 2 件)

①Minakami, R., Maehara, Y., Kamakura, S., Kumano, O., Miyano, K., Sumimoto, H.,
Membrane phospholipid metabolism during
phagocytosis in human neutrophils.,
Genes Cells 15, 409-423 (2010) 査読あり

② Taura, M., Miyano, K., Minakami, R.,
Kamakura, S., Takeya, R., Sumimoto, H.,
A region N-terminal to the tandem SH3 domain
of p47^{phox} plays a crucial role in activation of the
phagocyte NADPH oxidase
Biochem. J. 419, 329-338 (2009) 査読あり

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鎌倉 幸子 (KAMAKURA SACHIKO)

研究者番号 : 80398081

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :