

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22247030

研究課題名（和文） 細胞極性のシグナリングの分子・細胞機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of the polarity-regulating signaling.

研究代表者

大野 茂男 (OHNO SHIGEO)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：10142027

研究成果の概要（和文）：

上皮細胞を初めとする様々な細胞の極性制御の要として働いている普遍的な細胞極性シグナル経路、PAR-aPKC 系の新規構成員として ASPP2 を発見し、細胞極性の制御と細胞死の制御の関係を示唆した。PAR-aPKC 系の新たな制御機構として、aPKC 結合タンパク質 KIBRA が aPKC のキナーゼ活性を基質と競合的に抑制し Lgl とは異なる機構で aPKC を通じたアピカル膜ドメイン形成のプロセスを特異的に抑制することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

To understand the molecular mechanism of the PAR-aPKC polarity complex to regulate cell polarity, we identified ASPP2 as a novel member of the PAR-aPKC polarity complex. ASPP2 as well as PAR3 localizes to the apical junctional complex of epithelial cells and their localization are mutually-dependent. Another finding involves a novel regulatory system for the exocytosis of apical membrane proteins by the PAR-aPKC polarity complex. We identified KIBRA as a competitive inhibitor of aPKC kinase activity. Further studies revealed that KIBRA suppress apical exocytosis through inhibition of the aPKC kinase activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
2011年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2012年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
年度			
年度			
総計	34,200,000	10,260,000	44,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：癌、再生医学、細胞・組織、シグナル伝達、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

個々の細胞の機能や運命を制御する分子機構の解析が大きく進む一方で、細胞の集団

からなる組織・臓器の形成と維持（細胞の組織化と呼ぶ）の分子・細胞レベルでの理解が遅れている。細胞の組織化の機構の理解は生体の理解の根幹であり、発生学や細胞生物学

などの基礎生物学のみならず、疾患の生理・病態学と将来の細胞医療を含む広い医学の領域の大きな課題でもある。そのような中で、個々の細胞の極性を制御する PAR-aPKC 複合体を中心とした細胞極性因子群機構が、細胞集団の組織化を制御しているとの証拠が集積しつつある。しかし、その実態はほとんど不明である。

PAR-aPKC 複合体は、他の細胞極性因子群と相互に作用しながら、上皮組織の形成の要である上皮細胞の細胞接着装置の形成過程、上皮細胞や組織の極性化の過程、脱極性化の過程を制御している事がわかっている。しかし、その分子機構に関しては不明の点が多く残されている。また、組織の形成や維持と大きく関わることが予想される既知の細胞の増殖や細胞死のシグナル経路との関わりもほとんど不明である。

2. 研究の目的

本研究においては、細胞の極性を制御する PAR-aPKC 系に着目して、上皮細胞のモデルとして研究の集積が行われている MDCK 細胞を用いて、上皮細胞及び細胞シートの極性化、脱極性化、及び細胞極性制御の分子・細胞機構を解析する。また、ここで上皮組織の形成と維持の過程に大きな役割を果たしている細胞の増殖や細胞死などのシグナル経路との関わりを解析する。これらを通じて、細胞極性因子を会した上皮細胞のシグナリングの分子・細胞機構を理解することを大きな目的とする。

3. 研究の方法

上皮細胞としてこれまでに研究の蓄積のある MDCK 細胞（イヌ腎尿細管由来正常上皮細胞）をモデルとして用いる。まず、PAR-aPKC 系の中心分子である aPKC、PAR3、Lg1 などに対する結合タンパク質を探索する。具体的には、内在性のタンパク質の発現を抑制した状態で tag を付けたタンパク質を発現させ、タンパク質複合体を精製してプロテオミクス解析を行う。また、タンパク質をノックダウンした細胞について、RNA 及びタンパク質レベルでのオミクス解析を行う。これらを通じて、PAR-aPKC 系の新規の制御因子、下流因子などの候補を探索する。得られた候補について、MDCK 細胞に様々な遺伝子操作を施し、主に細胞の増殖、細胞密度依存的な増殖抑制、細胞接着装置の熟成、頂底極性化などに与える効果を調べる。免疫沈降法を用いて、PAR-aPKC 複合体を中心とした分子複合体の形成に与える効果を調べる。平行して、aPKC 及び PAR3 の conditional-KO マウスを用いて、細胞レベルの実験で得られた結果の生体レ

ベルでの検証を行う。さらに、必要に応じて、ヒト癌の臨床検体などを用いた、ヒト疾患との関わりを解析する。

4. 研究成果

(1) PAR-aPKC 複合体の新規構成員の発見、細胞死シグナル系と PAR-aPKC 系とを繋ぐ新たな分子機構：ASPP2

PAR3 の新規結合タンパク質として同定した ASPP2 が、PAR3 と同様に MDCK 細胞の極性化と脱極性化の過程に関わっていることを確認した。さらに、ASPP2 と PAR3 とは共に細胞接着装置に局在するが、互いに違いの局在を制御している事を見いだした。これらの結果は、ASPP2 が PAR3-aPKC-PAR6 複合体の新規の構成員であることを意味している。

ASPP2 は、がん抑制遺伝子産物 p53 の細胞死の促進因子として同定され、マウスで癌抑制因子であることが示されている。今回の発見は、細胞極性の制御と細胞死の制御の間の関係を示唆する。そこで、ASPP2 の結合タンパク質の探索を進め複数の新規分子を同定した。これらについて、細胞極性及び細胞の運命決定への影響などを解析の結果、新規タンパク質の一つが、細胞死を誘導する事を見いだしその解析を進めている。また、他の分子については、細胞接着装置と細胞極性因子とを結びつけることを示唆する証拠を得ており、その更なる解析が次の大きな課題となる。

(2) 上皮細胞の極性化と脱極性化における PAR-aPKC 系の新たな分子機構の発見：aPKC-KIBRA 経路

aPKC 結合タンパク質として見いだしたタンパク質 KIBRA の役割を検討した結果、これが aPKC のキナーゼドメインに直接結合し、そのキナーゼ活性を基質と競合的に抑制する事を見いだした。さらに、MDCK 細胞を用いた様々な解析の結果、これが aPKC を通じたアピカル膜ドメイン形成のプロセスを特異的に抑制することを見いだした。

これまで、PAR-aPKC 複合体によるアピカル膜の制御に関しては、これがエキソサイトシスを促進すると同時にエンドサイトーシスを抑制する事により行われていることを示唆する結果が得られている。Lg1 は PAR-aPKC 複合体の形成過程を PAR3 と拮抗的に阻害することにより、この両方の過程を阻害する事もわかっていた。今回の発見は、これとは異なるアピカル膜特異的な制御機構の存在を示したものである。

興味深い事に、ショウジョウバエでの遺伝学的な研究から KIBRA は細胞の増殖制御を通じて臓器の大きさを決めている Hippo 経路の正の制御因子であることがわかってきた。今回の発見を踏まえて、Hippo 系との関連の解析が次の大きな課題である。

(3) 細胞増殖シグナル系と PAR-aPKC 系とを繋ぐ新たなシグナル経路の発見:

Lgl-VprBP/DDB1 経路

これまでの研究で、ショウジョウバエのがん抑制遺伝子 LgP は、AR-aPKC 複合体の形成過程を PAR3 と拮抗的に阻害することにより、その細胞極性形成を負に制御していることを明らかにしてきた。ここで Lgl の増殖制御が、PAR-aPKC 複合体を介した作用のみであるかどうかという点は未だに解明されていない。

そこで、Lgl 結合タンパク質の探索を行い、VprBP-DDB1 複合体を同定した。VprBP-DDB1 は、VprBP-DDB1-Cul4A-Roc1 ユビキチン E3 リガーゼの構成因子であるが、Lgl は、この E3 リガーゼ複合体の形成を拮抗的に阻害する事も見いだした。この E3 リガーゼ複合体の下流で p27 及び Skp2 の発現制御に関わる事を見いだした。一連の結果は、一連の結果は細胞極性因子 Lgl が、細胞極性の抑制能に加えて細胞増殖をの抑制能を併せ持つ事を示唆している。その更なる検証が次の課題となる。

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 25 件)

1. Satake T, Otsuki K, Banba Y, Suenaga J, Hirano H, Yamanaka Y, Ohno S and Hirai S: The interaction of Kinesin-1 with its adaptor protein JIP1 can be regulated via proteins binding to the JIP1-PTB domain. BMC Cell Biol, 14 12, 2013. 査読有、DOI:10.1186/1471-2121-14-12
2. M. Nakayama, A. Nakayama, M. van Lessen, H. Yamamoto, S. Hoffmann, H. C. Drexler, N. Itoh, T. Hirose, G. Breier, D. Vestweber, J. A. Cooper, S. Ohno, K. Kaibuchi and R. H. Adams: Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. Nat Cell Biol, 15(3): 249-60, 2013. 査読有、DOI:10.1038/ncb2679
3. Y. Yoshihama, Y. Izumisawa, K. Akimoto, Y. Satoh, T. Mizushima, K. Satoh, K. Chida, R. Takagawa, H. Akiyama, Y. Ichikawa, C. Kunisaki, Y. Inayama, I. Endo, Y. Nagashima and S. Ohno: High expression of KIBRA in low atypical protein kinase C-expressing gastric cancer correlates with lymphatic invasion and poor prognosis. Cancer Sci, 104(2): 259-65, 2013. 査読有、DOI:10.1111/cas.12066
4. S. Iden, W. E. van Riel, R. Schafer, J. Y. Song, T. Hirose, S. Ohno and J. G. Collard: Tumor type-dependent function of the par3 polarity protein in skin tumorigenesis. Cancer Cell, 22(3): 389-403, 2012. 査読有、DOI:10.1016/j.ccr.2012.08.004
5. Y. Yoshihama, K. Chida and S. Ohno: The KIBRA-aPKC connection: A potential regulator of membrane trafficking and cell polarity. Commun Integr Biol, 5(2): 146-51, 2012. 査読有、DOI:10.4161/cib.18849
6. Hayashi K, Suzuki A and Ohno S: PAR-1/MARK: a kinase essential for maintaining the dynamic state of microtubules. Cell Struct Funct, 37(1): 21-5, 2012. 査読有、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list_uids=22139392
7. N. Izumi, A. Yamashita, H. Hirano and S. Ohno: Heat shock protein 90 regulates phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase family proteins together with the RUVBL1/2 and Tel2-containing co-factor complex. Cancer Sci, 103(1): 50-7, 2012. 査読有、DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02112.x
8. Izumi N, Yamashita A and Ohno S: Integrated regulation of PI3K-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2. Nucleus, 3(1): 29-43, 2012. 査読有、DOI:10.4161/nucl.18926
9. Hayashi K, Suzuki A, Hirai S, Kurihara Y, Hoogenraad CC and Ohno S: Maintenance of dendritic spine morphology by partitioning-defective 1b through regulation of microtubule

- growth. *J Neurosci*, 31(34): 12094-12103, 2011. 査読有、
DOI:10.1523/JNEUROSCI.0751-11.2011
10. Ishiguro H, Akimoto K, Nagashima Y, Kagawa E, Sasaki T, Sano J, Takagawa R, Fujinami K, Sasaki K, Aoki I, Ohno S, Kubota Y and Uemura H: The co-expression of aPKC λ / ϵ and IL-6 in prostate cancer tissue correlates with biochemical recurrence. *Cancer Science*, 102(8): 1576-1581, 2011. 査読有、
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.01972.x
 11. Horikoshi Y, Hamada S, Ohno S and Suetsugu S: Phosphoinositide binding by par-3 involved in par-3 localization. *Cell Structure and Function*, 36(1): 97-102, 2011. 査読有、
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21467691>
 12. Hirai S-I, Banba Y, Satake T and Ohno S: Axon formation in neocortical neurons depends on stage-specific regulation of microtubule stability by the DLK-JNK pathway. *J. Neuroscience*, 31(17): 6468-6480, 2011. 査読有、
DOI:10.1523/JNEUROSCI.5038-10.2011
 13. Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, Suzuki A, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S-I, Ohno S and Chida K: KIBRA Suppresses Apical Exocytosis through Inhibition of aPKC Kinase Activity in Epithelial Cells. *Current Biol.*, 21(8): 705-711, 2011. 査読有、
DOI :10.1016/j.cub.2011.03.029
 14. Izumi N, Yamashita A, Iwamatsu A, Kurata R, Nakamura H, Saari B, Hirano H, Anderson P and Ohno S: AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Sci Signal*, 3(116): ra27, 2010. 査読有、
DOI:10.1126/scisignal.2000468
 15. Cong W, Hirose T, Harita Y, Yamashita A, Mizuno K, Hirano H and Ohno S: ASPP2 regulates epithelial cell polarity through the PAR complex. *Curr Biol*, 20(15): 1408-14, 2010. 査読有、
DOI:S0960-9822(10)00769-4

[学会発表] (計 55件)

1. Ohno S: Epithelial cell polarity and the PAR-aPKC complex. *Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia*, 2012-11-02, Merida, Mexico.
2. Ohno S: Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2. *First International Workshop on Pontin (RUVBL1) and Reptin (RUVBL2)*, 2012-10-18, Bordeaux, France.
3. Ohno S: The regulators and the effectors of the aPKC-PAR. *SFB Symposium 2012 "Molecular Cell Dynamics"*, 2012-06-01, Münster, Germany.
4. 大野茂男: 細胞極性化の原理と生理機能. 第117回解剖学会総会・全国学術集会, 2012-03-28, 山梨大学甲府キャンパス (山梨県).
5. Ohno S: Cell polarity and cancer. *2011 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction, 2011 Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation*, 2011-11-20, Tainan City, Taiwan.
6. Ohno S: Epithelial cell polarity and the Par-aPKC complex. *5th International Epithelial-Mesenchymal Transition Meeting*, 2011-10-13, Biopolis, Singapore.
7. Ohno S: Cell polarity and the maintenance and disruption of epithelial tissues. *US-Japan Summer Conference on Cancer, Diabetes and Inflammation*, 2011-08-05, Duarte, CA, USA.
8. Ohno S: Signaling Crosstalk between Cell Polarity and Cell Growth/Apoptosis. 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, 2010-12-07, 神戸ポートアイランド (兵庫県).
9. Ohno S: Inside-out signalling effects on extracellular membrane and polarity. *The 8th International Podocyte Conference*, 2010-06-08, Bristol, UK.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 茂男 (OHNO SHIGEO)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：10142027

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

平井 秀一 (HIRAI SYU-ICHI)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：80228759

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

秋本 和憲 (AKIMOTO KAZUNORI)
東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・准教授
研究者番号：70285104

山下 暁朗 (YAMASHITA AKIO)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号：20405020

廣瀬 智威 (HIROSE TOMONORI)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：20381668

中谷 雅明 (NAKAYA MASA-AKI)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：70422095

佐々木 和教 (SASAKI KAZUNORI)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：50438131