

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221104

研究課題名(和文) 中心体に依存しない微小管による細胞構築の研究

研究課題名(英文) Noncentrosomal microtubule-dependent organization of the cells

研究代表者

竹市 雅俊 (Takeichi, Masatoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00025454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 166,000,000円

研究成果の概要(和文)：微小管マイナス端に結合するCAMASP3の細胞構築における役割を研究し、1) CAMASP3は小腸上皮細胞の頂端側皮質に微小管マイナス端を固定し、生じた簾状の微小管が核やゴルジ体などの細胞内小器官の分布を規定すること、2) CAMASP3連結微小管はKIFC3を介してユビキチン特異的キナーゼUSP47を細胞境界膜に輸送してカドヘリン分解を抑制し、細胞結合の安定性を保つこと、3) CAMASP3は神経軸索に集まり、微小管の安定性を制御することにより軸索の数を限定すること、さらに、4) CAMASP3による微小管動態制御は、肺がん細胞のEMTを抑制するために働くこと、などを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物細胞の微小管はマイナス端が中心体に結合して放射状に伸長することが知られているが、分化した上皮、神経細胞などでは中心体と結合していない。この「非中心体」微小管の動態制御機構、さらには、生物学的役割については謎が多い。本研究では、マイナス端結合分子CAMASP3の発現や活性を人為的に操作し、その結果として起きる細胞の応答を解析することにより、非中心体微小管の動態、役割について多くの新知見を得た。本研究の成果は大きな波及効果があり、非中心体微小管に関連する国際的研究の進展に著しく貢献した。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the roles of CAMASP3, a microtubule minus-end binding protein, in cell structure and functions, and found: 1) CAMASP3 anchors microtubules to the apical cortex in intestinal epithelial cells and the microtubule arrays thus organized play a pivotal role for proper assembly of organelles including the nucleus and Golgi complex; 2) CAMASP3-anchored microtubules transport the ubiquitin-specific kinase USP47 to cell junctions via KIFC3, and stabilize them by suppressing cadherin degradation; 3) CAMASP3 accumulates in the axon of a neuron, and determines axon number through regulation of microtubule dynamics; and 4) the CAMASP3-dependent regulation of microtubule dynamics functions to suppress EMT in lung carcinoma cells. We have also uncovered other important functions of CAMASP3 in epithelial and neuroepithelial morphogenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 細胞構築 細胞構造・機能 細胞骨格・運動 細胞極性

1. 研究開始当初の背景

微小管は、その輸送機能等を介して細胞の構造と機能を制御する重要な細胞骨格である。微小管にはプラス端とマイナス端があり、プラス端が重合-脱重合を繰り返しながら全体として伸長し、マイナス端は特定の構造体に付着し安定化している。その主要な構造体が中心体である。中心体に含まれる γ -チューブリン複合体から微小管が放射状に伸長し、これが動物細胞における微小管配列パターンの典型とされている。しかし、上皮細胞、神経細胞など特定の細胞群では、微小管は中心体以外の部位から伸長する。たとえば、上皮細胞では、微小管のマイナス端は、細胞の頂端部に分布している。このマイナス端を繋ぎ止める機構は明らかでなく、さらに、このような配向パターンの生理的意義も不明であった。

私達は、2008年、微小管のマイナス端に結合する新しい分子 Nezhha を発見した（文献1）。それ以降、類似分子が Nezhha を含め3つ同定され（文献2）、CAMSAP (calmodulin regulated spectrin-associated protein) CAMSAP1、2、3と命名された（Nezhha は CAMSAP3 と再命名）。また、ショウジョウバエでも類似分子が見つかり Patronin と名付けられた（文献3）。その後の研究により、少なくとも CAMSAP2、3 については、共に、微小管のマイナス端に結合して安定させ、プラス端の成長を支える機能があることが明らかとなった。これにより、 γ -チューブリン以外の主要なマイナス端安定化因子が初めて同定され、本分野に大きなブレークスルーがもたらされた。本研究計画は、このような背景の下、CAMSAP が細胞の構築と機能に果たす役割を明らかにするために立案された。

2. 研究の目的

本研究課題の申請時における当初の研究目的：

(1) 極性上皮構築における役割：上皮細胞における微小管の配向機構は明らかでなく、CAMSAP の関与を検討する。同時に CAMSAP を起点とする微小管が、上皮細胞全体の構築のために果たす役割を研究する。

(2) 上皮細胞接着維持における役割：CAMSAP3 は細胞間接着装置' adherens junction (AJ)' にも局在することから、AJ の構築・維持における役割を明らかにする。

(3) 神経軸索の構築における役割：神経細胞の軸索には中心体に依存しない微小管が豊富に存在するが、その生成機構は明らかでない。CAMSAP の役割を探る。

(4) CAMSAP 及び中心体から由来する微小管の機能分担の同定：予備実験により、これらの微小管は配向が異なるだけでなく、安定性等の動態も異なる。この違いが細胞機能にどのような影響をもたらすかを明らかにする。

(5) CAMSAP のタイプ間の機能的違い：CAMSAP サブタイプ間の機能の違いを明らかにする。

(6) CAMSAP による微小管伸長機構：CAMSAP がどのように微小管伸長の起点として働くのか、その分子的仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

理化学研究所で作製した CAMSAP2、及び、CAMSAP3 の変異マウスを用い、研究対象とする組織・器官を取り出して組織学的観察を行う。また、当該器官の細胞を培養して、種々の細胞生物学的観察を行う。必要に応じ、細胞株を用いて同様な解析を行う。

4. 研究成果

(1) 極性上皮構築における役割：分化した単層上皮細胞では、微小管は中心体からは伸びず、マイナス端が細胞頂端部に向かって配向していることが教科書にも記載されている。しかし、その分子的背景は解明されていなかった。今回、マウス小腸上皮細胞を用い、CAMSAP3 が頂端部の細胞膜直下に点刻状に分布しており、個々の微小管がその点刻に結びついて、そのプラス端を簾のように細胞基底側に伸ばしていることをまず明らかにした。そして、CAMSAP3 を不活性化すると、微小管が頂端部から解離して不規則に湾曲し、整然としていた微小管配列が崩壊した(図1)。同時に、正常ではステレオタイプ状に配置される細胞核やゴルジ体の空間分布が著しく攪乱された。以上、分化した上皮細胞における微小管の配列機構が解明されると同時に、細胞内小器官配置の微小管依存性が明らかになった(研究協力者：戸谷美夏)。

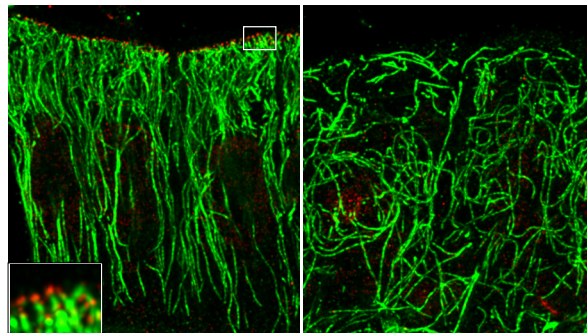


図1. 小腸上皮における CAMSAP3 (赤)、微小管 (緑) の分布。左、野生型；右、CAMSAP3 変異マウス由来。白枠の部分を左下に拡大。画面上部が細胞頂端部に対応。

この課題に関連して、他の上皮細胞における CAMSAP3-微小管系の役割についても成果が得られている。CAMSAP3 欠失マウスの腎臓では、近位尿細管が膨れて、いわゆる「嚢胞腎」が観察され、さらに、血液及び尿の検査を通じて腎障害が起きていることが確認された(戸谷美夏：未発表)。また、同マウスは喘息様の咳をすることから、気管を調べたところ、繊毛の運動に大きな異常があること、そして、繊毛の構造的基盤となる基底小体の極性にも異常があるという所見を得た(斉藤弘子：今年度内に発表予定)。CAMSAP3-微小管系は、多様な上皮細胞において、様々な重要機能を果たしていることが明白となった。

(2) 上皮細胞接着維持における役割：以前の研究から、培養上皮細胞において CAMSAP3 を除去すると、上皮細胞間の接着が異常になることを観察していた。また、微小管マイナス端方向性キネシンの一つ KIFC3 が CAMSAP3-微小管系を介して細胞間接着部位に移動することを明らかにしていた。KIFC3 が細胞間接着の安定に寄与する

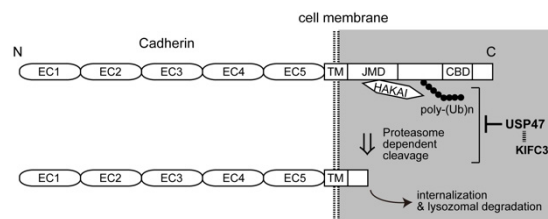


図2. KIFC3によって運ばれた USP47 がカドヘリンを分解から保護するモデル。

する何らかの因子を運んでいるのではないかと仮定し候補を探ったところ、ユビキチン特異的キナーゼ USP47 が同定された。E-カドヘリンは E3 ユビキチンリガーゼ Hakai によって分解されることが知られているが、この分解が USP47 によって抑制され、細胞間結合が安定に保たれるという筋書きが明らかとなった(図2)(研究協力者：窪田杏子、田中慶利)。

(3) 神経軸索の構築における役割：分化した神経細胞の微小管は、基本的に中心体とは独立している。CAMSAP3 が何らかの役割を演じていると想定し、培養海馬神経細胞を用いて、CAMSAP2 と CAMSAP3 の分布を調べたところ、CAMSAP2 は全ての神経突起に、CAMSAP3 は主として軸索に分布することが明らかになった。それぞれの変異マウス由来の海馬神経細胞を培養したところ、CAMSAP2 欠失細胞は、神経突起の分岐異常を示す程度だったが、CAMSAP3 欠失細胞では、一つの神経細胞から複数の軸索が形成されるという予想外な異常が観察された(図3)。また、神経芽腫細胞を用いて、CAMSAP ノックダウンの効果を調べたところ、CAMSAP2 の欠失には特別の効果

はなかったが、CAMSAP3 の欠失は神経突起の伸長を誘導した。CAMSAP3 の作用機序を明らかにする研究を進めたところ、CAMSAP3 は、微小管のプラス端の安定性を低下させ、これが、神経突起形成の伸長を抑えることによって軸索の本数を制限している可能性が示唆された。一方、

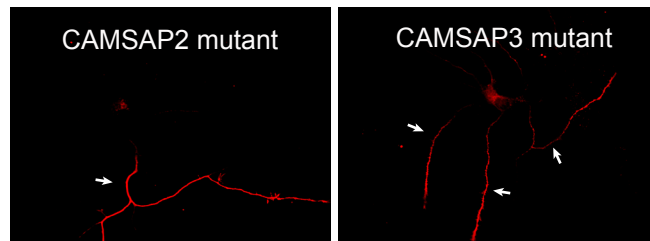


図3. CAMSAP2 及び CAMSAP3 変異マウスから取り出し培養した海馬神経細胞。矢印は軸索を指す。

CAMSAP2 にはそのような作用は認められず、CAMSAP のタイプ間による機能的違いの一端が明らかになった（研究協力者：Varisa Pongrakhananon, 斉藤 弘子, Sylvain Hiver）。

(4) CAMSAP 及び中心体から由来する微小管の機能分担の同定：分化した上皮細胞では、中心体からの微小管伸長が抑えている。その機構解明を試みる中、CAMSAP3 が中心体に集まり、自身に結合している微小管切断因子カタニンを使って、微小管を中心体から切り離していることが明らかになった。このように、CAMSAP3 が中心体微小管を積極的に除去することから、当初予定した「機能分担」の問題については迫ることはできず、むしろ、互いの排他性が示唆された。本研究は、中国科学院遺伝・発生生物学研究所 Wenxiang Meng 博士との共同研究の成果である。

(5) CAMSAP のタイプ間の機能的違い：神経軸索を用いた研究から、CAMSAP3 は連結している微小管を不安定にしており、一方、CAMSAP2 にはそのような活性がないことが示唆されたが、このような違いを分子レベルで解明するには至らなかった。この問題に迫るため、神戸大学大学院医学研究科研究科生理学・細胞生物学講座仁田亮教授と共同研究を開始し、現在までに、精製 CAMSAP と微小管を用いた試験管内再構築系の開発に成功している。今後、この系を用いて、本課題の達成を目指す。

(6) CAMSAP による微小管伸長機構：本課題は、#5 の課題と密接に関係しており、今後、試験管内再構築系を使った共同研究を継続する。

(7) 当初の研究計画には記載しなかったが重要と考え追加した課題：

①上皮細胞における CAMSAP3 の役割研究の発展として、肺がん細胞株を用いて CAMSAP3 除去の効果を調べたところ、意外なことに、上皮-間充織転換 (EMT) が促進され、しかも、EMT に関する種々の遺伝子について転写レベルで変化が起きていた。その分子的背景を解析したところ、神経細胞の研究から分かったように CAMSAP3 除去によって微小管が安定化し、微小管のアセチル化が促進され、その結果、Akt (protein kinase B) の活性が増強され、これが EMT を誘発することが明らかになった。本研究は、チュラロンコン大学薬学部 Varisa Pongrakhananon 博士（理化学研究所客員研究員）との共同研究の成果である。

②脳組織の構築に CAMSAP3 が関与する可能性を検討するため、CAMSAP3 変異マウスの脳の解剖学的解析を進め、基底核原基における放射状グリア細胞の動態が、CAMSAP3 の欠失によって異常となることが分かった。すなわち、基底核の放射状グリア細胞の頂端部細胞間の接着に異常が生じ、また、側脳室が縮小して脳室下帯における神経幹細胞が減少した。これに関連して嗅球が縮小することも分かった。以上の結果から、CAMSAP3 が放射状グリア細胞間の構築と接着に関与しており、その異常が神経幹細胞の産生に影響することが示唆された（木村 俊哉, 川崎美和：論文準備中）。

<引用文献>

1. Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T. & Takeichi, M. *Cell* 135, 948–959 (2008).
2. Baines, A.J. *et al.* *Mol Biol Evol* 26, 2005–2014 (2009).
3. Goodwin, S.S. & Vale, R.D. *Cell* 143, 263–274 (2010).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Pongrakhananon, V., Saito, H., Hiver, S., Abe, T., Shioi, G., Meng, W., and Takeichi, M. (2018) CAMSAP3 maintains neuronal polarity through regulation of microtubule stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 9750–9755. doi:10.1073/pnas.1803875115. (査読有)
2. Pongrakhananon, V., Wattanathamsan, O., Takeichi, M., Chetprayoon, P., and Chanvorachote, P. (2018) Loss of CAMSAP3 promotes EMT via the modification of microtubule–Akt machinery. *J. Cell Science* 131, doi: 10.1242/jcs.216168. (査読有)
3. Wang, J., Xu, H., Jiang, Y., Takahashi, M., Takeichi, M., and Meng, W. (2017) CAMSAP3–dependent microtubule dynamics regulates Golgi assembly in epithelial cells. *Journal of Genetics and Genomics* 44, 39–49. doi: 10.1016/j.jgg.2016.11.005. (査読有)
4. Dong, C., Xu, H., Zhang, R., Tanaka, N., Takeichi, M., and Meng, M. (2017) CAMSAP3 accumulates in the pericentrosomal area and accompanies microtubule release from the centrosome via katanin. *J. Cell Science* 130, 1709–1715. doi: 10.1242/jcs.198010. (査読有)
5. Toya, M., Kobayashi, S., Kawasaki, M., Shioi, G., Kaneko, M., Ishiuchi, T., Misaki, K., Meng, W., and Takeichi, M. (2016) CAMSAP3 orients the apical-to-basal polarity of microtubule arrays in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113:332–337. doi: 10.1073/pnas.1520638113. (査読有)
6. Toya, M., and Takeichi, M. (2016) Organization of non-centrosomal microtubules in epithelial cells. *Cell Structure and Function* 41, 127–135. doi.org/10.1247/csf.16015. (査読有)
7. Sako-Kubota, K., Tanaka, N., Nagae, S., Meng, W., and Takeichi, M. (2014) Minus end-directed motor KIFC3 suppresses E-cadherin degradation by recruiting USP47 to adherens junctions. *Mol. Biol. Cell* 25, 3851–3860. doi: 10.1091/mbc.E14-07-1245. (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

1. Takeichi, M. Adherens junction remodeling for epithelial migration and closure. 3rd International Symposium on Mechanobiology (Singapore), December 11–14, 2017.
2. Takeichi, M. Cortical contractility: a critical regulator of polarized epithelial architecture. Mechanobiology: from molecules to tissues – theory and applications (Quy Nhon, Vietnam), June 26–July 2, 2016.
3. Toya., and Takeichi, M. CAMSAP3 orients the apical-basal polarity of microtubule arrays epithelial cells. EMBO/EMBL Symposium “Microtubules from Atoms to Complex Systems” (Heidelberg), May 29–June 1, 2016.
4. Takeichi, M. Dynamic aspects of epithelial polarity: microtubule-dependent processes. Commemorative Symposium for the 31st International Prize for Biology “New horizons in life science through advances in cell biology” (Kyoto), December 5 and 6, 2015.
5. 戸谷美夏, Wenxiang Meng, 竹市雅俊. CAMSAP3 determines the apical-to-basal orientation of microtubules in polarized epithelial cells. 第38回日本分子生物学会年会(神戸)2015年12月1日–4日
6. Takeichi, M. Factors that disrupt epithelial junction integrity. TEMTIA–VII (Melbourne), October 11–14, 2015.
7. 戸谷美夏, Wenxiang Meng, 竹市雅俊. CAMSAP3 orients the apical-to-basal microtubule arrays in polarized intestinal epithelial cells. 第67回日本細胞生物学会大会(船堀)2015年6月30日–7月

2日

8. Takeichi, M. Rho-dependent regulation of epithelial junction formation, SFB 629 Symposium (Muenster), May 28-30, 2015.
9. 戸谷美夏, Wenxiang Meng, 竹市雅俊. Nezha/CAMSAP3 is essential for the apicobasal orientation of microtubules in polarized intestinal epithelial cell. 第37回日本分子生物学会年会(横浜)2014年11月25-27日
10. Takeichi, M. Morphogenetic roles of non-centrosomal microtubules. C. elegans development, cell biology and gene expression meeting/the 6th Asia-Pacific C. elegans Meeting (Nara), July 15-19, 2014.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

本研究課題に関連して発表された新論文について以下のコメントを出版している。

Takeichi, M., and Toya, M. (2016) Patronin takes a shot at polarity. *Develop. Cell* 38, 12-13.

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：戸谷 美夏

ローマ字氏名：Toya, Mika

研究協力者氏名：窪田 杏子

ローマ字氏名：Kubota, Kyoko

研究協力者氏名：田中 慶利

ローマ字氏名：Tanaka, Nobutoshi

研究協力者氏名：木村 俊哉

ローマ字氏名：Kimura, Toshiya

研究協力者氏名：ポングラカナノン, バリサ

ローマ字氏名：Pongrakhananon, Varisa

研究協力者氏名：齊藤 弘子

ローマ字氏名：Saito, Hiroko

研究協力者氏名：イベル, シルバン

ローマ字氏名：Hiver, Sylvain

研究協力者氏名：川崎 美和

ローマ字氏名：Kawasaki, Miwa

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。