

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650071

研究課題名(和文) 微小管プラス端集積因子(+TIPs)依存的な新規物質輸送機構の探索

研究課題名(英文) Search for novel trafficking pathway dependent on microtubule plus-end-tracking proteins (+TIPs)

研究代表者

清末 優子(KIYOSUE, Yuko)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：90568403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、微小管の先端と細胞内構造をつなぐ分子群“微小管プラス端集積因子(+TIPs)”が、モータータンパク質によって運ばれた貨物の積み下ろしや選別のためのプラットフォームとしての役割を果たしていると仮定し、+TIPs依存的な被輸送物質と輸送経路の探索を行った。LL5とAPC癌抑制因子に着目した解析は、新たな輸送制御機構とマウスの表現型の発見につながった。APC癌抑制因子については、細胞分裂において染色体運搬に関わる重要なキナーゼとのクロストークも見出した。さらに、細胞を丸ごとくまなく高時間分解能でスキャンできる格子光シート顕微鏡を利用して、微小管ダイナミクスの3D追跡に成功した。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed at search for novel trafficking pathway dependent on microtubule plus-end-tracking proteins (+TIPs), which connect microtubule ends with subcellular structures, on the supposition that these molecules serve as platforms for loading/unloading or sorting of cargos transported by motor proteins. Our analyses focused on LL5 protein and APC tumor suppressor protein led to the discovery of novel regulatory mechanisms for trafficking and mouse phenotypes. We also found a crosstalk between APC tumor suppressor and an important mitotic kinase involved in the transport of chromosomes. In addition, we succeeded in the 3D tracking of microtubule growth throughout the cell cytoplasm using the recently developed lattice light-sheet microscope, which enables 3D scanning at subsecond intervals with high spatial resolution.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞骨格 微小管 細胞極性 物質輸送 細胞分裂 高解像イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

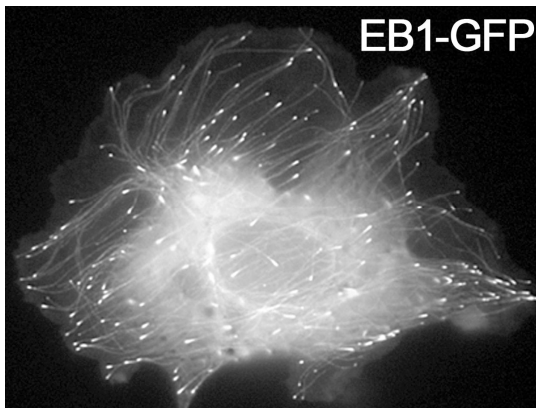
生物の発生や生命の維持は、全身を駆け巡る物質や情報の流れを感知し統合することで成り立つ。その第一次的な制御は、生命活動をつかさどる基本単位である細胞のレベルで行われる。細胞が周囲の環境を感知し、その情報を核に伝え、その応答として新たな分子を合成し細胞外に放出する、そのたゆまぬ双方向の流れを実現するために重要な細胞内インフラが“微小管”細胞骨格である。

微小管の“向き”を読むことでモータータンパク質が正しい場所に物質を輸送する。微小管を正しく配置することは、細胞の、ひいては個体の活動を統合するために非常に重要であるはずであるが、その分子機構を解明するための研究はなされてこなかった。本研究者はこの着眼点から微小管配向をつかさどる分子機構の探索を開始し、微小管先端に結合してその動態を制御する分子群“微小管プラス端集積因子(+TIPs)”を見出している(Mimori-Kiyosue et al., J Cell Biol. 2000; Curr Biol. 2000; J Biochem. 2003 (review); J Cell Biol. 2005; Cytoskeleton 2011 (review) など)。これに続き、本研究課題では、+TIPs 依存的に制御される新たな輸送経路を探索することで、生命活動を統合する新規な機構の発見につなげる。

なお、細胞内部でくり広げられる分子活動を、分子機能解析のために十分な高い時空間分解能でとらえるためには従来のイメージング技術では不十分であったことから、顕微鏡技術の開発も必要である。

## 2. 研究の目的

+TIPs 分子群は微小管先端への局在という特徴から発見されたもので、多様な構造や機能を持つ分子が含まれる。End-binding 1 (EB1)ファミリータンパク質が微小管の伸長端に最初に結合し(下図, Mimori-Kiyosue et al., Curr Biol. 2000)、EB1 の介在により CLIP-170、CLASP、APC 癌抑制因子などの分子も微小管先端に集積する。後者の分子群は、細胞膜などの細胞構造にも結合することにより、微小管と様々な細胞内構造とをつなぎ、このプロセスが微小管の配置を制御する。



微小管プラス端と細胞膜との連結部分は輸送のターミナルであることから、ここに貨

物の積み下ろしを制御する分子機構が存在することが予測される。そこで、CLASP を細胞膜に結合する LL5 $\alpha$ ,  $\beta$  (Dev Cell. 2006; J Cell Biol. 2010) や APC 癌抑制因子 (J Cell Biol. 2000; Genes Cells. 2007) に特に注目して、これらに影響を受ける分子や細胞現象の探索を行う。

また、顕微鏡技術の開発については、細胞内部の全空間にわたって、十分な時空間分解能をもって細胞骨格動態を検出できる手段が必要である。新たな光学技術を利用して、従来の限界を超えるイメージングを実現する。

## 3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた+TIPs 依存的被輸送物質の探索

LL5 $\alpha$ ,  $\beta$  や APC 癌抑制因子(以下、APC)に依存して細胞外に分泌される因子を同定するため、shRNA を導入して LL5 $\alpha$ ,  $\beta$  と APC を恒常的にノックダウンした細胞を樹立し、細胞が分泌する因子を分析する。

(2) 変異マウスを利用した+TIPs 依存的被輸送物質の探索

LL5 $\alpha$  や APC 変異マウスの表現型から、培養系で同定した経路の生物学的重要性を明らかにし、また、in vitro 培養系では特定することができない、組織や発生段階に特異的な+TIPs 依存的な被輸送物質の探索を行う。

(3) マウス表現型から見出した+TIPs の新規役割の分子機構の細胞生物学的解析

変異マウスの表現型から見出した+TIPs の新規役割の詳細な分子機構を解析するために、マウス初代培養細胞や、ゲノム編集技術により内在性遺伝子に変異を導入した細胞株を利用して、細胞生物学的な機能解析を行う。

(4) 格子光シート顕微鏡の開発と利用

従来の限界を超えた高い時空間分解能で細胞内空間全体の正確な 3D 情報を得るため、米国ハーワード・ヒューズ医学研究所の Eric Betzig 博士の研究室での格子光シート顕微鏡の開発に参画する。微小管伸長を検出するための標準マーカーとして広く利用されるようになった EB1-GFP の 3D 追跡が出来ることを基準として新技術の性能評価を行い、蛍光 3D ライブイメージングを行う。

## 4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた+TIPs 依存的被輸送物質の探索

+TIPs に依存的に分泌される因子を探索するため、レンチウイルスを用いて shRNA を導入することで LL5 $\alpha$  と  $\beta$  または APC を恒常的にノックダウンした細胞を樹立した。培養上清を濃縮し成分を質量分析で同定、コントロール細胞との比較を行うと、LL5s ノックダウン細胞ではアポリポタンパク質のひとつが特異的に減少しており、一方、APC ノックダウン細胞では多数の分子の増減がみられた。同定されたアポリポタンパク質の輸送と

分泌の過程を全反射顕微鏡でイメージングすると、アポリポタンパク質を内包する小胞が微小管にそって輸送され、LL5の集積部位に到達するとそこにとどまった後、アポリポタンパク質の開口放出が起こることが観察された。この結果から、異なる+TIP分子に特異的に依存する輸送/分泌経路や積み荷の選別プロセスが存在することが明らかになった。この経路の生物学的な重要性は、変異マウスの表現型解析とあわせて解析を進めた。

(2) 変異マウスを利用した+TIPs 依存的被輸送物質の探索

#### a. LL5 $\alpha$ 変異マウスの解析

LL5 $\alpha$  遺伝子 3'近傍への 1ヌクレオチド挿入によってタンパク質 C 末端の PH ドメインが破壊された自然発症マウスは、水晶体脱臼・白内障を引き起こす(学会発表2)。本研究室において、この変異がタンパク質機能に及ぼす影響を調べた。培養細胞に変異型 LL5 $\alpha$  を発現させると、細胞膜への局在能力が低下しており、細胞質に遊離するプールが増加していた。LL5 はその PH ドメインで細胞膜に結合するため、変異により PH ドメインの機能が喪失したと考えられる。遊離した分子は不安定で早く分解されるため、同じプラスミドを用いて外来的に発現させると、野生型に比べて変異体は存在量が低下した。これに一致して、LL5 $\alpha$  変異マウスの組織や初代培養細胞では、変異型 LL5 $\alpha$  タンパク質はほとんど検出されなかった。従ってこのマウスは LL5 $\alpha$  の機能低下モデルとして利用することができる。

LL5 ファミリータンパク質には LL5 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  が存在する。 $\alpha$ ,  $\beta$  は相同性が高く、微小管捕捉能に関して同様の機能を持つことをこれまでに報告しているが(Hotta et al., J Cell Biol. 189, 901-917, 2010)、 $\gamma$  は PH ドメインを含まず  $\alpha$ ,  $\beta$  の N 末端部分のみを有する短い分子で、機能は異なると考えられる。マウス組織での LL5 $\alpha$ ,  $\beta$  タンパク質発現をウェスタンブロットティングで調べると、LL5 $\alpha$  の発現は広範囲に認められ、特に脳組織で強く検出されたが、LL5 $\beta$  の発現はほとんど検出できなかった。LL5 $\beta$  は筋肉の神経筋接合部位に発現しているとの報告があるが、発現場所がかなり限られているようである。

次に、LL5 $\alpha$  マウスにおける(1)の in vitro 培養系で特定されたアポリポタンパク質の状態をウェスタンブロットティングで調べたところ、脳組織において、野生型では検出されない、予想外のサイズのバンドが検出された。翻訳後のプロセッシングや修飾に変化が生じた結果であると考えられる。また、LL5 $\alpha$  変異マウスが高脂肪食への耐性が低い可能性を調べたところ、LL5 $\alpha$  変異マウスでは体重増加が大きい傾向がみられた。

以上の結果により、LL5 $\alpha$  がマウス体内においても物質輸送に関与していることが確認できた。水晶体脱臼・白内障の原因がこの輸

送経路の障害であるかどうかは現時点では不確定であるが、今後引き続き検証を行う。また、白内障の原因が他にあるならば、その調査が、新たな生体機能制御機構の発見と、病気の治療のための標的の特定につながるから、さらなる検証が必要である。

#### b. APC 変異マウスの解析

APC 遺伝子の変異がヒトの大腸がんにつながることは明らかにされているが、正常発生における APC の役割を調べるため、非発癌性の APC 変異マウス (APC1638T, Smits et al., Genes Dev. 13(10):1309-21, 1999) を入手し、表現型の解析を行った。本研究において、これまでに報告されている当該マウスの表現型の他に、分泌因子の作用やトランスポーターの局在の変動に加え、発生への目立った影響として、散発的な発生障害や臓器の形態異常(目の形成障害や一部臓器の肥大化など)を見出した。障害の頻度やパターンから、その原因は確率的に生じるエラーであり、細胞分裂におけるエラーに起因する遺伝的不安定性の可能性が想定された。発癌性の APC 変異によって遺伝的不安定性が生じるとの観察は多数報告されているが、非発癌性の APC1638T マウスにおいても発生過程において継続的で確立的な細胞分裂エラーが存在する可能性があり、その機構は発癌性変異のそれとは何らかの違いがあると考えられる。その詳細な分子機構を明らかにするため、マウスから初代培養細胞を調製し、細胞生物学的手法による解析を進めた。

(3) マウス表現型から見出した +TIPs の新規役割の分子機構の細胞生物学的解析

細胞分裂における微小管の主要な被輸送物質は染色体である。APC1638T マウス細胞の細胞分裂の精度を調べるため、胎仔繊維芽細胞や肺繊維芽細胞の初代培養細胞を観察すると、APC1638T マウス細胞では、染色体分配を含め、細胞分裂の複数の過程においてエラー頻度が上昇していた。影響の範囲が広範であったことから、細胞分裂全体にわたって影響を及ぼす細胞分裂キナーゼの関与を仮定し、各種キナーゼの活性化状態を調べたところ、重要なマスターキナーゼの活性が低下していることを見出した。さらに APC は、APC1638T 変異体では喪失している C 末端側でキナーゼと直接結合することを見出した。

次に、発癌につながる APC 変異の細胞分裂への影響を調べるために、ゲノム編集技術により MCF10A 乳腺上皮細胞株の内在性 APC 遺伝子に発癌につながる変異を導入した細胞株 (MCF10A (APC $^{-/-}$ )) を利用した。MCF10A (APC $^{-/-}$ ) 細胞における細胞分裂エラーの頻度は APC1638T マウス細胞よりも著しく高く、異なるメカニズムの存在が明らかであった。詳細な解析の結果、APC は Axin,  $\beta$ -catenin を含む Wnt シグナル制御複合体として細胞分裂キナーゼと相互作用しており、発癌性 APC 変異によって  $\beta$ -catenin のターンオーバーが阻害されると、過剰な  $\beta$ -catenin がキナーゼ活

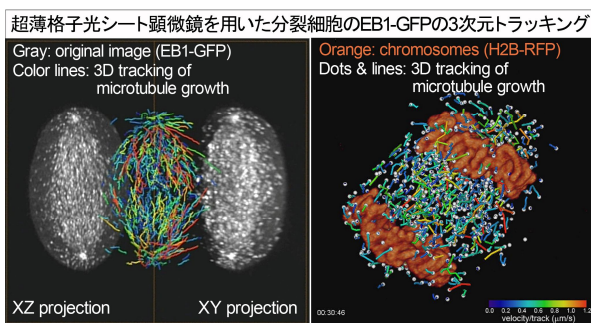
性を抑制することが分かった。外来の活性型キナーゼの恒常的発現により細胞分裂エラーをレスキューすることができたことから、このキナーゼの重要な関与が裏付けられた。

以上の結果から、発癌性 APC 変異と非発癌性の APC1638T 変異では同じキナーゼの制御異常があるものの、阻害機構と程度が異なっており、それが個体の表現型の違いに関連している可能性が見出された。この発見は、いまだ確立されていない、発癌に関わる遺伝的不安定性の最も上流のプロセスを標的とする治療戦略の構築に貢献することが期待できる。

### (3) 格子光シート顕微鏡の開発と利用

染色体分配をつかさどるのは微小管から構成される分裂装置である。細胞分裂制御機構の詳細な解析のためには、微小管動態の詳細な解析が重要であるが、数百もの微小管が密集する分裂装置内部での個々の微小管の動態観察は、従来技術では実現していない。

従来の限界を超えるイメージングの可能性を求めて、米国ハワード・ヒューズ医学研究所の Eric Betzig 博士の研究室での格子光シート顕微鏡の開発に参画し、微小管伸長マーカー EB1-GFP を用いた分裂装置微小管動態の検出を試みた。格子光シート顕微鏡は、xyz 全方位に等方的な高分解能を達成し、さらに高速性を兼ね備えて、1 秒以内に細胞内空間全域を超解像レベルでスキャンすることができる。この新手法は高精度 3D ライブイメージングに絶大な威力を発揮し、分裂装置内部の微小管伸長の 3D トラッキングを初めて実現した(下図, 雑誌論文 1, 3)。



この顕微鏡を利用して APC や細胞分裂キナーゼを阻害した細胞の微小管伸長と染色体動態のデータを取得したので、今後、これらのデータ解析を進める。それにより、APC の分裂装置への作用点を明確に特定し、異なる APC 変異が細胞分裂に及ぼすメカニズムと、発生障害や発癌にいたるプロセスの起源を解明する。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

下澤東吾, 清末優子. “3D革命 — 生命活動の真の姿を照らし出す次世代蛍光顕微鏡技術” **実験医学** vol.33 No.3 (2月号), 458-461, 2015. 査読無

URL: <https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/current.html>

藤田克昌, 岡田康志, 清末優子. “2014年ノーベル化学賞: 超解像顕微鏡の開発”

**実験医学** vol.32 No. 19 (12月号), 3071-3076, 2014. 査読無

URL: <https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/nhpd/9784758101349/c2.html>

Chen B, Legant WR, Wang K, Shao L, Milkie DE, Davidson MW, Janetopoulos C, Wu XS, Hammer III JA, Liu Z, English BP, Mimori-Kiyosue Y, Romero DP, Ritter A, Lippincott-Schwartz J, Fritz-Laylin L, Mullins RD, Mitchell D, Bembenek JM, Reymann AC, Böhme R, Grill SW, Wang J, Seydoux G, Tulu US, Kiehart DP, Betzig E. “Lattice Light-Sheet Microscopy: Imaging Molecules, Cells, and Embryos at High Spatiotemporal Resolution” **Science** Oct 24;346(6208):1257998, 2014. 査読有  
DOI: 10.1126/science.1257998.

下澤東吾, 清末優子. “生体試料深部の高速・高精細な蛍光イメージング装置の開発と応用” **バイオインダストリー** 7月号, 43-50, 2014. 査読無

URL: [http://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product\\_id=4705](http://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=4705)

van der Vaart B, van Riel WE, Doodhi H, Kevenaar JT, Katrukha EA, Gumy L, Bouchet BP, Grigoriev I, Spangler SA, Yu KL, Wulf PS, Wu J, Lansbergen G, van Battum EY, Pasterkamp RJ, Mimori-Kiyosue Y, Demmers J, Olieric N, Maly IV, Hoogenraad CC, Akhmanova A.

“CFEOM1-Associated Kinesin KIF21A Is a Cortical Microtubule Growth Inhibitor” **Dev Cell**. 2013 Oct 28;27(2):145-60. 査読有  
DOI: 10.1016/j.devcel.2013.09.010.

下澤東吾, 清末優子. “スピニングディスク共焦点顕微鏡の改良と組織・個体内部の観察への応用” **生体の科学**, 64, 564-570, 2013. 査読無

URL: <http://www.igaku-shoin.co.jp/journal/Detail.do?journal=35201>

### 〔学会発表〕(計 4 件)

清末優子, 下澤東吾. “Toward high-speed high-resolution 3D imaging” 第120回日本解剖学会 / 第92回日本生理学会 合同大会, 2015年3月23日, 神戸国際会議場・展示場(神戸).

渡部桂, 和田健太, 松島芳文, 設楽浩志,

清末優子, 吉川 欣亮 “PHLDB1/LL5 の PHドメインの部分欠損はマウスの水晶体脱臼内障を引き起こす” 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月27日, パシフィコ横浜 (横浜).

下澤東吾, 清末優子. “高速高精細3Dイメージングへのチャレンジ” 第66回日本細胞生物学会大会, 2014年6月13日, 奈良県新公会堂 (奈良).

下澤東吾, 清末優子. “Challenges toward High-Speed, High-Resolution 3D Imaging” 日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会, 2014年5月13日, 幕張メッセ国際会議場 (千葉).

〔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〕

ホームページ等

<http://www.clst.riken.jp/ja/science/labs/bdi/biosys/cda/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

清末 優子 (KIYOSUE, Yuko)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号 : 90568403