

# 月田細胞軸プロジェクトの研究成果

## 目次

1. Centriolar Satellites は微小管依存性に輸送される 新規非膜系オルガネラである . . . . .	2
2. APC (adenomatous polyposis coli) タンパク質の動態解析 . . . . .	4
3. EB1 タンパク質の動態解析 . . . . .	6
4. 蛋白質高次構造を破壊する因子アンフォルジン . . . . .	8
5. アドヘレンスジャンクションが蛍光を発するショウジョウバエ株の樹立	10
6. 多細胞動物におけるカドヘリンの分子構造の多様性の解明 . . . . .	11

# 1. Centriolar Satellites は微小管依存性に輸送される新規非膜系オルガネラである

## 研究成果の概要

Centriolar satellite は中心体近辺に存在する直径 70~100nm の球状の electron dense material として形態学的に記述されてきたが、その構成蛋白・機能とも全く不明であった。我々は免疫電顕により、従来 pericentriolar material (PCM) の構成蛋白と考えられていた PCM-1 蛋白が、centriolar satellite の構成蛋白である事を示した(図 1-1)。Centriolar satellite の中心体近辺への局在は微小管依存性であった。GFP (green fluorescent protein) と PCM-1 の融合蛋白を発現する細胞から GFP でラベルされた centriolar satellite を粗精製し、Xenopus 卵再構成系を用いて微小管に対する動きを観察したところ、centriolar satellite は微小管に沿って ATP 依存性に微小管マイナス端方向に動き、中心体近辺に集積した(図 1-2)。また、繊毛形成中の細胞を免疫電顕により観察した処、従来形態学的に繊毛形成中に特異的に出現するとされ、centriole 複製への関与が示唆されていた”fibrous granules”に PCM-1 蛋白が特異的に局在する事が示された(図 1-3)。この事より、fibrous granules と centriolar satellite が同一のオルガネラであり、共に centriole 複製に関与している可能性が示唆された。

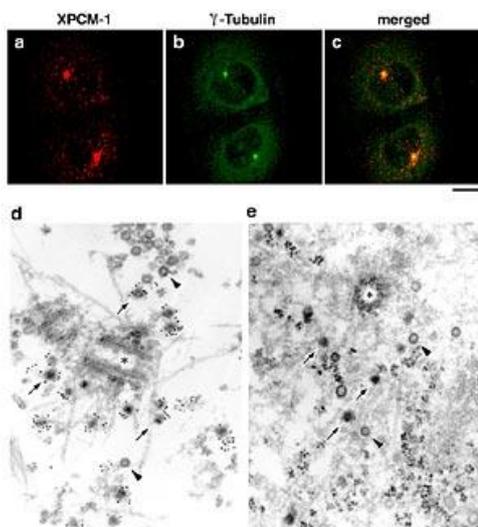
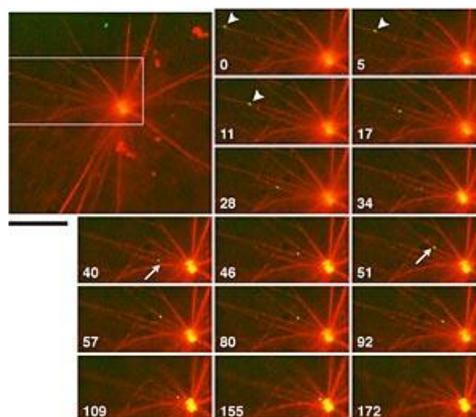


図 1-1 A6 細胞における XPCM-1 の細胞内局在

(a-c) A6 細胞の、抗 XPCM-1 ポリクローナル抗体 (a) と抗  $\gamma$  チューブリン抗体 (b) による免疫二重染色、およびその合成 (c)。XPCM-1 を含む顆粒は  $\gamma$  チューブリンによって示される中心体近辺に集積している。一部の XPCM-1 顆粒は細胞質に散らばっている。Bar, 10  $\mu$  m. (d) XPCM-1 は centriolar satellites に局在する。A6 細胞を Triton X-100 処理し、抗 XPCM-1 抗体でラベルすると、中心体 (\*) 周辺に存在する電子密度高な顆粒 (矢印) が特異的にラベルされる。一部の顆粒は微小管と接しているのがわかる。直径が同じ中空の顆粒 (矢頭) も存在するが、それは XPCM-1 を含まない。(e) A6 細胞の通常の電子顕微鏡写真。Triton X-100 処理せずに、A6 細胞を電子顕微鏡で観察した。中心体 (\*) 周辺に、いわゆる centriolar satellites (矢印) と中空の顆粒 (矢頭) が見られる。Bar, 200 nm.

図 1-2 GFP ラベルされた centriolar satellites の、in vitro で再構成された微小管上での動き

In vitro で再構成された星状微小管 (赤) 上を動く GFP ラベルされた centriolar satellites (緑) の動きを示した。左上の図で枠で囲まれた部分を連続写真で示した。左下の数字は経過時間 (秒) を示す。GFP ラベルされた centriolar satellite (矢頭) は微小管に沿って、すでに多くの centriolar satellites が集積した中心体に向かって運動した。中心体に向かう途中で、centriolar satellites は矢印で示した地点で微小管を乗り換えているのがわかる。



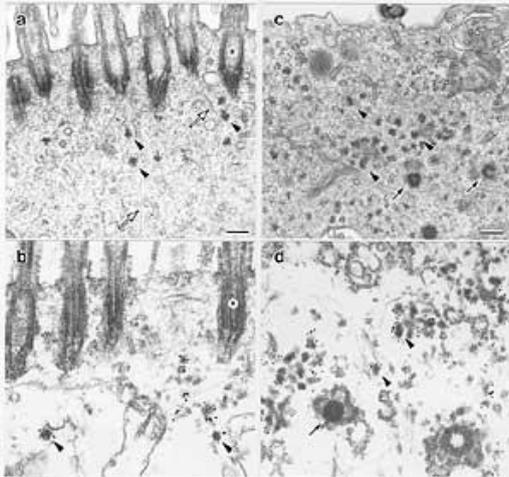


図 1-3 マウス鼻気管上皮細胞における mPCM-1 の局在

蒸留水刺激後 (a, b) または 1% ZnSO<sub>4</sub> 水溶液刺激後 (c, d) 4 日目のマウス鼻気管上皮における PCM-1 の局在。(a) 超薄切片電顕像。基底小体 (\*) 付近に centriolar satellites と形態学的に区別できない直径 70~100nm の球状電子密な顆粒 (黒矢印) が観察された。白矢印は微小管を示す。(b) Pre-embedding 免疫電顕では centriolar satellites 様の顆粒に特異的に PCM-1 が局在していた。(c) 超薄切片電顕像。繊毛及び基底小体は完全に消失し、アピカル細胞質には多数の fibrous granules (矢頭) および deuterosome (矢印) が出現している。(d) Pre-embedding 免疫電顕では、fibrous granules に PCM-1 が局在しており、deuterosome には PCM-1 は存在しなかった。Bar, 200 nm.

### 将来への展望・応用の可能性

Centriole の複製は細胞分裂に必須であり、その異常は細胞の癌化に繋がると考えられる。故に Centriole 複製機構を解明することにより、癌の治療に新たな道が切り開かれる事が期待される。Centriolar satellites の機能を解明することは、未だ謎に包まれている centriole の複製機構を解明する手がかりになると考えられる。

特許出願 なし

### 報告書他

口頭

- 1) *Xenopus* における中心体周辺物質構成蛋白 PCM-1 のクローニングと機能解析. 久保亮治、松本裕、西田栄介、月田承一郎、椎名伸之. 第 20 回日本分子生物学会年会、1997 年 12 月 16-19 日、京都。
- 2) Centriolar Satellites は微小管依存性に輸送される新規非膜系オルガネラである. 久保亮治、佐々木博之、久保 (弓場) 亜紀子、月田承一郎、椎名伸之. 第 22 回日本分子生物学会、1999 年 12 月 7-10 日、福岡。
- 3) Centriolar Satellites: Molecular Characterization, ATP-dependent Movement Toward Centrioles and Possible Involvement in Centriolar Replication. Kubo, A., Sasaki, H., Yuba-Kubo, A., Tsukita, Sh., Shiina, N., Keystone Symposium 2000, Keystone, Colorado, U.S.A., 2000/2/4-9.

論文

- 4) Kubo, A.; Sasaki, H.; Yuba-Kubo, A.; Tsukita, Sh.; Shiina, N. Centriolar satellites: Molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis. *J. Cell Biol.*, 147, 1999, 969-979

〔研究者名〕 久保 亮治

## 2. APC (adenomatous polyposis coli) タンパク質の動態解析

### 研究成果の概要

APC タンパク質は APC 癌抑制遺伝子の産物であり、遺伝子の欠失による切断型タンパク質の発現が大腸癌の原因となる。これまで、Wnt シグナル伝達系における APC の機能異常が癌化の原因であるとされてきたが、APC には微小管を安定化する能力も持つ。細胞における APC の役割を調べるために、GFP 融合 APC をアフリカツメガエル A6 上皮細胞に発現させ、様々な条件下でその挙動を調べた。細胞内で APC-GFP は、細胞周辺領域において、微小管先端に顆粒状に濃縮して局在した (図 2-1)。APC-GFP のタイムラプス観察により、APC は微小管上を ATP 依存的に輸送されることにより微小管先端に集積することが明らかになった (図 2-2)。APC の集積は、活発に伸展する細胞先端領域にダイナミックに再配置される (図 2-3) ことから、APC による細胞局所における微小管の安定化が、細胞の移動方向の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

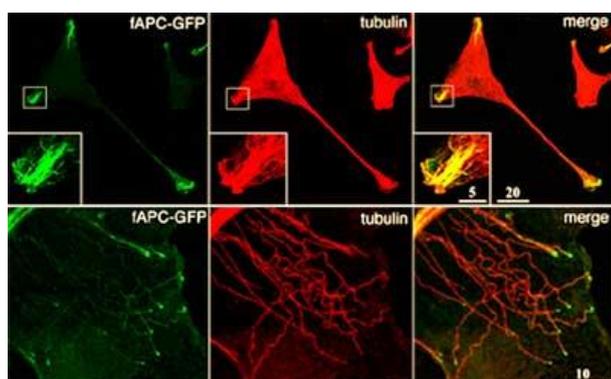


図 2-1 アフリカツメガエル A6 上皮細胞における APC-GFP の局在

APC-GFP は細胞突起先端に濃縮し (上)、広がった葉状仮足においては各微小管の先端に顆粒状の集積が観察された (下)

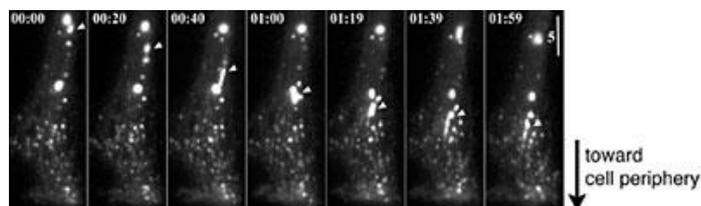


図 2-2 C 末端 1/3 を欠失した APC-GFP の挙動

このコンストラクトは微小管結合領域を欠いているが、微小管上に分布し、細胞周辺方向への直線的な移動が観察された。

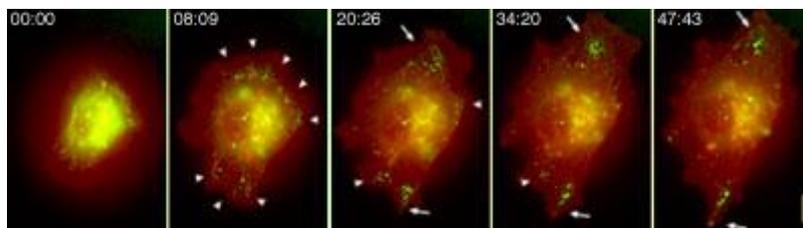


図 2-3 細胞が基質に伸展する過程での APC-GFP の挙動

細胞膜を赤で染色し、APC-GFP を緑で表示。細胞が広がるにつれて APC-GFP は細胞先端端に移動し (矢頭)、細胞突起の伸長とともにその先端により強く集積した (矢印)。

### 将来への展望・応用の可能性

この研究により APC が細胞骨格の制御に深く関わっていることが分かってきた。その結果、これまで Wnt シグナル伝達系の中でのみ考えられてきた APC の機能が、異なる視点から研究されるようになりつつあり、今後、APC 遺伝子の変異による癌化のメカニズムの解明が進むことが期待される。

### 特許出願

なし

### 報告書他

- 1) Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita. (2000) Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 148:505-518.
- 2) Eccleston, A. 2001. GFP in Motion 2. *Trends in Cell Biology* 11:311.
- 3) 清末優子、月田承一郎 (2000) 微小管伸長端局在タンパク質と細胞極性. *細胞工学* 19 :1774-1780.
- 4) Mimori-Kiyosue Y, Tsukita S. (2001) Where is APC going? *J Cell Biol.* 154 :1105-1110.

〔研究者名〕 清末 優子

### 3. EB1 タンパク質の動態解析

#### 研究成果の概要

EB1 は APC 結合タンパク質として two-hybrid スクリーニングにより同定されたタンパク質で、EB1 それ自身が微小管結合タンパク質である。EB1 の機能や APC との相互作用の意義を調べるため、GFP 融合 EB1 を作成し、その細胞内における挙動を調べた。その結果、EB1 は、新たなチューブリン分子の付加により微小管が伸長するときその伸長端に濃縮し、数秒間留まった後に微小管から解離することが分かった。このような挙動により、細胞内全体に渡って伸長している微小管の先端がマークされる (図 3-1)。APC は細胞先端端にのみ集積するため、APC と EB1 は細胞先端端の微小管上でのみ共局在した。微小管を脱重合させると APC は凝集体を形成したまま細胞膜 basal 側全体に分散するが、その APC 凝集体には EB1 は共局在しないことから、APC と EB1 は微小管上でのみ相互作用することが明らかになった (図 3-2)。この細胞の局所における相互作用により、微小管先端と細胞膜を結合させ、微小管の配向を制御していると考えられる。

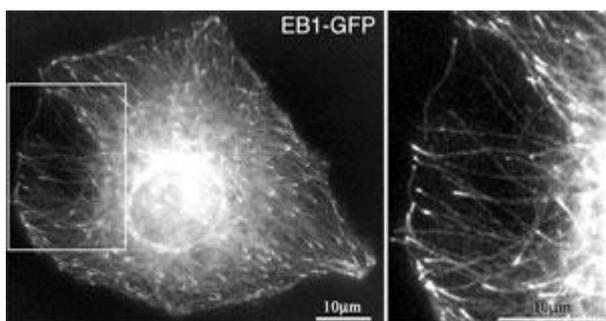


図 3-1 アフリカツメガエル A6 上皮細胞における EB1-GFP の局在  
一部の微小管先端にコメット状の EB1-GFP の濃縮が観察される。

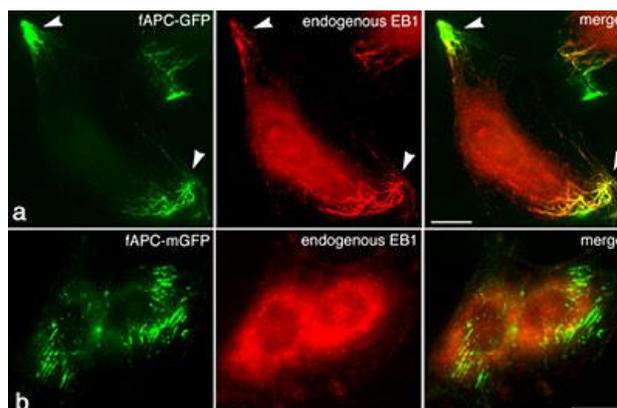


図 3-2 APC-GFP を発現する A6 細胞の内在性 EB1 の抗体染色像  
a) EB1 は、細胞突起先端の微小管に沿った APC-GFP の集積に強くリクルートされる。b) 微小管を脱重合させると、APC は細胞膜 basal 面にそって散在するが、もはや EB1 は共局在しない。

#### 将来への展望・応用の可能性

このプロジェクトの進行中に、いくつかのタンパク質が EB1 のように微小管伸長端に特異的に結合することが明らかにされ、そのようなタンパク質群が、細胞膜裏打ちなどを探って特異的な領域に微小管をターゲットさせる役割を担っていると考えられるようになった。これらの発見は、今後、微小管骨格の制御と細胞極性形成の機構を探る上で重要な手がかりとなるだろう。

## 特許出願

なし

## 報告書他

- 1) Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita. (2000) The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol.* 10:865-868.
- 2) Eccleston, A. 2001. GFP in Motion 2. *Trends in Cell Biology* 11:311.
- 3) 清末優子、月田承一郎 (2000) 微小管伸長端局在タンパク質と細胞極性. *細胞工学* 19 :1774-1780.
- 4) Mimori-Kiyosue Y, Tsukita S. (2001) Where is APC going? *J Cell Biol.* 154 :1105-1110.

〔研究者名〕 清末 優子

#### 4. 蛋白質高次構造を破壊する因子アンフォルジン

##### 研究成果の概要

蛋白質は正しい高次構造をとることができてはじめて正しく機能する分子となる。そのためにすみやかな高次構造形成を手助けする分子を細胞はもっており分子シャペロンと呼ばれている。いっぽうで、蛋白質の立体構造は細胞分裂時などのダイナミックな細胞の動きに際して立体障害となりうる。このようなとき細胞はいったんといった蛋白質の高次構造を緩めることができるだろうか？

この疑問に答えるため我々は出芽酵母を材料として用い試験管内のアッセイ系を作成、新しい蛋白質高次構造破壊因子を見だしアンフォルジンと名付けた。電子顕微鏡で観察するとアンフォルジンは10から12個のモノマー分子が集合した多量体で中央には直径2ナノメートルのホールがあいていた(図4-1)。

細胞内の局在を調べると細胞分裂時には出芽neckに濃縮しており分裂を行わない定常期には細胞の周囲に分散していた。

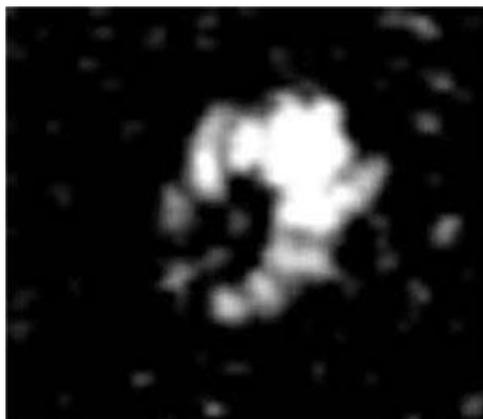


図 4-1 回転シャドウ法で見たアンフォルジン分子

##### 将来への展望・応用の可能性

アンフォルジンは出芽酵母から我々が発見した基質特異性なしに蛋白質の高次構造を破壊する分子シャペロンである。この性質を利用してパーキンソン原因因子アルファシヌクレインの溶解やアミロイド蓄積病、ポリグルタミン病への応用が見込まれている。

##### 特許出願

1) アンフォルジン

特 許 願 : NPO1179-YS

出 願 人 : 科学技術振興事業団・逆瀬川(八谷) 如美、佐々木 博之、月田 承一郎

請求の概要 : 蛋白質高次構造に対してアンフォールド活性を有する蛋白質多量体

##### 報告書他

- 1) 蛋白質高次構造破壊因子アンフォルジンの機能解析. 逆瀬川(八谷) 如美、逆瀬川 裕二、月田 承一郎. 第72回日本生化学会大会、1999年10月6-9日、横浜
- 2) 蛋白質高次構造破壊因子アンフォルジンの局在解析. 逆瀬川(八谷) 如美; 月田 承一郎. 第73回日本生化学会、横浜、Oct. 11-14, 2000
- 3) A novel protein unfolding factor from *S.cerevisiae*. Hachiya, N., Tsukita, Sh. 40th Annual

Meeting, American Society for Cell Biology, 12/9-13/2000, San Francisco, CA.

- 4) 蛋白質高次構造を unfold する因子アンフォルジンの解析. 八谷 (逆瀬川) 如美、佐々木博之、逆瀬川裕二、月田承一郎. 日本細胞生物学会、2001年5月29日-6月1日、岐阜
- 5) A novel protein unfolding factor unfoldin from *S.cerevisiae*. Hachiya, N.S., Sasaki, H., Sakasegawa, Y., Tsukita, Sh. 20 th Yeast2001 meeting, 8/26-31, 2001, Praque, Check
- 6) Unfoldin , which unfolds folded proteins. Hachiya N.S. CGGH シンポジウム、平成13年8月6-9日、札幌
- 7) 蛋白質高次構造を unfold する因子アンフォルジンと基質の結合. 八谷如美、逆瀬川裕二、佐々木博之、月田承一郎. 第74回日本生化学会大会、2001年10月25-28日、京都

〔研究者名〕 逆瀬川 (八谷) 如美、逆瀬川 裕二

## 5. アドヘレンスジャンクションが蛍光を発するショウジョウバエ株の樹立

### 研究成果の概要

アドヘレンスジャンクションは動物の形態形成に極めて重要な働きをしており、その動態を制御するメカニズムを理解することは大きな研究課題である。しかし、これまではその動態を検出することすら十分にできなかった。

本研究では、生きたままでアドヘレンスジャンクションが蛍光で可視化されているショウジョウバエ株を樹立した（図5-1）。これにより、アドヘレンスジャンクションの動態を観察することが可能になっただけでなく、実際にショウジョウバエの胚発生におけるアドヘレンスジャンクションの変化を高時間解像度で検出し、記述することに成功した。

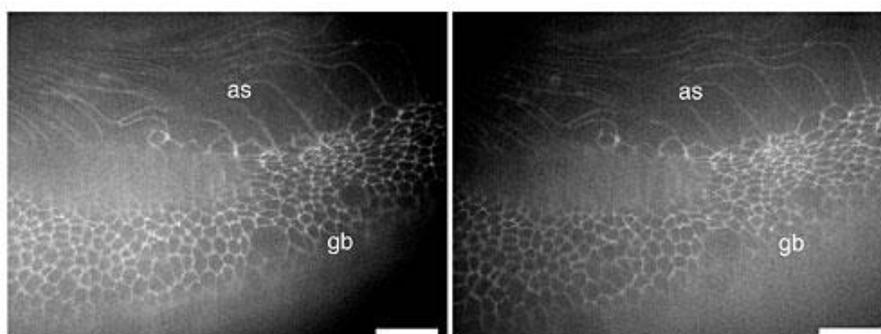


図 5-1 アドヘレンスジャンクションが光って見える生きたショウジョウバエの胚  
(ステレオ写真)

### 将来への展望・応用の可能性

ショウジョウバエの遺伝学に基づいた実験系は、個体発生における細胞の運動やふるまいを制御する分子メカニズムを知るために大きな可能性を持っている。本研究で樹立したショウジョウバエ株は突然変異解析と組み合わせて使うことによって、アドヘレンスジャンクションの制御に関わる分子や遺伝子の解析を容易に行うことができる。ショウジョウバエを用いた細胞生物学的な研究を大きく前進させることが期待される。

特許出願 なし

### 報告書他

- 1) Oda, H., and Tsukita, S (1999) Dynamic features of adherens junctions during *Drosophila* embryonic epithelial morphogenesis revealed by a D $\alpha$ -catenin-GFP fusion protein. *Dev. Genes Evol.* 209, 218-225.
- 2) Oda, H. and Tsukita, S. (2001). Real-time imaging of cell-cell adherens junctions reveals that *Drosophila* mesoderm invagination begins with two phases of apical constriction of cells. *J. Cell Sci.* 114, 493-501.

〔研究者名〕 小田 広樹

## 6. 多細胞動物におけるカドヘリンの分子構造の多様性の解明

### 研究成果の概要

脊椎動物のカドヘリン（細胞間接着分子）は、5回の繰り返し構造からなる細胞外領域と膜貫通領域、進化的に比較的よく保存された細胞内領域からなる。このような分子構造を持つカドヘリンは脊椎動物と同じ脊索動物の、尾索類でも見つかっている。しかし、ショウジョウバエやウニ、線虫でわかっている無脊索動物のカドヘリンの分子構造は脊椎動物のカドヘリンと細胞外領域が大きく異なっている。本研究は、コオロギやエビ、ヒトデなどをはじめ様々な左右相称動物からカドヘリン遺伝子をクローニングし、その分子構造を比較検討することによって、動物間による構造的な共通点と相違点を明らかにした。その結果、カドヘリン分子の構造的変化が大進化の重要な時点で起こっていることが示唆された。このことは、動物の系統進化と細胞間接着の進化との間に密接な関係があることを意味しているのかもしれない。

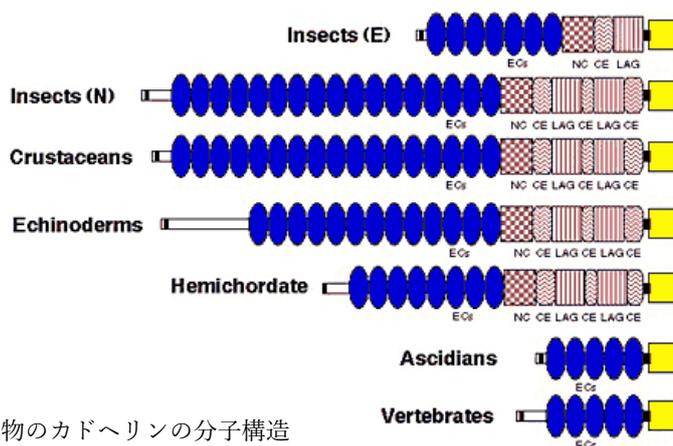


図 6-1 いろいろな動物のカドヘリンの分子構造

### 将来への展望・応用の可能性

本研究は動物の多様性や進化の歴史を知るためのひとつの手がかりを提供している。特に、脊索動物と昆虫の起源や初期の進化の研究に大きく貢献する可能性がある。

特許出願 なし

### 報告書他

- 1) Oda, H. and Tsukita, S. (1999) Nonchordate classic cadherins have a structurally and functionally unique domain that is absent from chordate classic cadherins. *Dev. Biol.* 216, 406-422.

〔研究者名〕 小田 広樹、秋山-小田 康子