

主論文の要旨

**PAR3 and aPKC regulate Golgi organization through  
CLASP2 phosphorylation to generate cell polarity**

〔 PAR3 と aPKC は CLASP2 のリン酸化を介して Golgi 形態を制御し  
細胞極性を形成する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
神経科学講座 神経情報薬理学分野

(指導：貝淵 弘三 教授)

松井 利憲

## 【背景と目的】

生体内で多くの細胞は、細胞内の構成要素を非対称に分布させる細胞極性を獲得し、各々の細胞に特徴的な構成要素の非対称性を介してその細胞特有の機能を発現している。細胞が極性を獲得、維持する際、Golgi 装置は新規に合成された蛋白質や脂質を機能的に特化した細胞領域に選択的に輸送する機構の中心的な役割を担っている。間期の哺乳類細胞において Golgi 装置は、Golgi stack という *cis-trans* 極性をもつ機能単位を高度に整列し組織化することでリボン様構造を呈し、Golgi 装置全体でも *cis-trans* 極性を保持することによって方向性を有した機能を発揮すると考えられている。細胞極性形成時には、Golgi 装置は遊走細胞における先導端のような特定の機能領域に *trans* 面を向けて再配置されることで、細胞内の非対称な蛋白質・脂質輸送に寄与する。すなわち、Golgi 装置の配置やその形態を制御する分子機構は、細胞極性形成において重要な役割を果たしている。

PAR3、aPKC、PAR6 で構成される PAR 複合体は、上皮細胞における頂端基部極性形成、神経細胞における軸索形成、遊走細胞における前後軸極性形成を含む様々な極性を制御する司令塔的役割を果たす。これまでの研究により、PAR 複合体が遊走細胞の先導端において微小管を安定化し非対称の微小管 network を形成すること、Golgi 装置を遊走方向へ再配向させることが明らかにされてきた。しかしながら、PAR 複合体が Golgi 形態にどのように関与するのかは不明であった。一方、微小管結合蛋白質 CLASPs は、遊走細胞において微小管先端と *trans*-Golgi network (TGN) に局在し、Golgi 装置の形態や蛋白質・小胞輸送の足場となる微小管を制御することで、極性形成に関与する。本研究において、我々は PAR3 の新規結合蛋白質 CLASP2 に着目し、PAR 複合体の Golgi 装置への制御機構を明らかにすることで、細胞極性を制御する分子機構の一端を解明することを目的とした。

## 【方法と結果】

我々は、以前に生化学的手法と質量分析を用いて PAR3 の結合分子の網羅的探索を行い、CLASP2 を同定した (伊藤ら、2010 年、Cytoskeleton)。今回、我々は PAR3 と CLASP2 の精製蛋白質を用いた結合実験により、PAR3 の PDZ ドメインが CLASP2 と直接結合することを見出した。さらに、免疫沈降実験により PAR3 と CLASP2 が生体内で複合体を形成することを明らかにした。aPKC が基質をリン酸化する際、PAR3 はその基質と結合することで足場蛋白質として働くことが知られている。そこで、CLASP2 が aPKC によってリン酸化されるかを検討した。*In vitro* リン酸化実験において aPKC は CLASP2 をリン酸化した。さらに、aPKC による CLASP2 のリン酸化サイトを複数同定した後、そのサイトの一つのリン酸化を特異的に認識する抗体を作成して aPKC が CLASP2 を *in vivo* においてもリン酸化することを示した。次に、極性を形成して遊走する上皮細胞株 RPE-1 細胞で RNA 干渉を用いて PAR3、aPKC、CLASPs の発現を抑制し、免疫染色において CLASP2 の局在並びに Golgi 形態がどのような影響を受けるかを検討した。既に報告にある通り、CLASPs の発現抑制は Golgi

形態の異常を引き起こした。同様の条件下で、PAR3 と aPKC の発現を抑制すると CLASP2 は Golgi 装置に異常集積し、それに伴って Golgi 装置の形態異常が誘導されることが明らかになった(Figure 1)。我々は、PAR3 と aPKC が CLASP2 の Golgi 装置への集積を調節することで Golgi 形態を制御していると仮定した。CLASP2 は、TGN 蛋白質 GCC185 と結合することで Golgi 装置へ集積することが報告されている。そこで、生化学的手法を用い、PAR3/aPKC が CLASP2 と GCC185 との結合に与える影響を検討した。その結果、PAR3 と aPKC は CLASP2 と GCC185 の結合を CLASP2 のリン酸化を介して負に制御することが明らかになった(Figure 2)。さらに、CLASP2 の GCC185 との結合を制御するリン酸化サイトを同定し、CLASP2 非リン酸化型変異体を作製した。CLASPs の発現を抑制した細胞を用いた救援実験において、CLASP2 野生型の発現は Golgi 形態の異常を救援したのに対し、非リン酸化型変異体の発現は救援しなかった。さらに、非リン酸化型 CLASP2 変異体の局在は PAR3、aPKC の発現を抑制した細胞における内在性の CLASP2 を模倣した(Figure 3)。これらの結果から、PAR3 と aPKC は極性化した遊走細胞で CLASP2 のリン酸化を介して CLASP2 と GCC185 の結合を制御し、Golgi 形態を制御していることが示唆された。

#### 【結語】

上記のとおり、Golgi 装置は細胞極性形成における方向性を持った蛋白質・脂質輸送に重要な役割を果たす。本研究において、我々は PAR 複合体が Golgi 装置の配向に加え、その形態を制御していることを明らかにした。このことは、PAR 複合体が Golgi 装置の細胞内局在と形態を協調的に制御することで、効率的に細胞の極性形成・維持に関与していることを示唆している。しかし、PAR 複合体の活性が Golgi 装置でどのように調節されているのかは不明であり、この点に関しては今後の解析が必要である。本研究は、細胞極性形成を制御する重要な分子機構を明らかにした。この研究成果が腫瘍および神経・精神疾患における機能分子の側面からの原因解明や治療法確立の礎となることを期待する。