

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	田中 慶利
論文題目	CAMSAPsによる上皮細胞特有の微小管配向制御に関する研究		
（論文内容の要旨） 微小管は、細胞骨格系の主要因子の一つで、細胞分裂、細胞内輸送、細胞運動など多岐にわたる生命現象に重要な役割を果たしている。機能が特化された分化細胞では、細胞タイプによって微小管の配列パターンが異なり、たとえば、多くの細胞では微小管は中心体から重合するが、上皮細胞では中心体以外の場所から重合する。よって、細胞タイプ特異的な微小管重合の制御機構が存在すると推測できるが、その本態は明らかではない。本研究では、微小管結合タンパク質CAMSAP2とCAMSAP3/Nezhaに注目し、ヒト上皮細胞株Caco-2細胞を用いて、上皮細胞における非中心体由来微小管の重合制御機構を研究した。 まず、各分子に対する抗体を作製した後、細胞における局在を観察した結果、CAMSAP2とCAMSAP3が重なって小顆粒を形成し、これが細胞質に広く分散していた。更に、この小顆粒は微小管の末端に局在し、微小管プラス端に結合するEB1と反対の末端に局在したことから、両分子が複合体を形成しながら、非中心体由来微小管のマイナス端に結合していることが示唆された。複合体形成は、免疫沈降実験によって確認された。 次に、これらの分子が微小管の重合にどのように関与するか検討した。はじめに、これらのタンパク質とEB1の細胞内での挙動を蛍光タイムラプス観察した結果、EB1のクラスターがCAMSAP複合体から放出される様子が観察された。更に、RNAiにより1つのCAMSAPの発現を抑制した状態でも、EB1の放出が認められたことから、これらの分子は独立して微小管の伸長に関与することが示唆された。 次に、固定化標本を用いてEB1の数を定量した結果、両CAMSAPを除去した細胞では、EB1クラスターの数が顕著に減少していたことから、2つのCAMSAPは協調して微小管伸長の維持に関与することが示唆された。更に、微小管量を測定した結果、CAMSAPsを除去した細胞では、重合微小管の量が減少していることが明らかとなった。 次いで、CAMSAPにより微小管の配向がどのように制御されているのかを検討した。低密度培養下でのCaco-2細胞では、微小管は核を取り巻くように分布し、中心体から放射される微小管はほとんど観察されなかった。一方、CAMSAP2と3を同時に除去した細胞では、中心体から放射される微小管が観察できるようになった。この結果は、CAMSAPsが中心体の微小管重合活性を阻害することを示唆する。 最後に、CAMSAP由来微小管の機能を検討するため、オルガネラの分布を観察した。正常なCaco-2細胞では、ゴルジ体は核の周辺で連続したクラスターを形成しているが、CAMSAP2と3を除去した細胞ではクラスターが断片化し、一部の断片化したゴルジ小胞が、中心体付近に集積する様子が観察された。この結果は、CAMSAPs由来の微小管が、ゴルジ体の集合と局在に重要であることを示唆する。 以上の結果から、CAMSAP2とCAMSAP3は非中心体微小管のマイナス端に結合して、そのプラス端の伸長に寄与すること、そしてCAMSAPsあるいはCAMSAPs由来の微小管が中心体の微小管重合活性を制御することで、上皮細胞特有の微小管配向を決定していることが明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、微小管結合タンパク質CAMSAP2とCAMSAP3/Nezhaに注目し、ヒト上皮細胞株Caco-2細胞を用いて、上皮細胞における非中心体由来微小管の重合制御機構を研究した。研究成果は以下の4点にまとめられる。

1) CAMSAP2とCAMSAP3は非中心体由来微小管のマイナス端に結合する。各分子に対して抗体を作成し、細胞内局在を観察することにより、CAMSAP2とCAMSAP3は細胞内に分散した小顆粒に共局在し、非中心体由来微小管のマイナス端に結合していること示された。両タンパク質の複合体形成は免疫沈降実験によっても確認された。

2) 微小管の重合における役割。これらのタンパク質と微小管プラス端結合因子EB1の細胞内での挙動を蛍光タイムラプス観察した結果、これらの分子は独立して微小管の伸長を促進することが示唆された。次に、固定化標本を用いてEB1の数を定量した結果、両CAMSAPを除去した細胞では、EB1クラスターの数が顕著に減少していたことから、2つのCAMSAPは協調して微小管伸長の維持に関与することが示唆された。更に、微小管量を測定した結果、CAMSAPsを除去した細胞では、重合微小管の量が減少していることが明らかとなった。

3) CAMSAPによる微小管の配向の制御。低密度培養下でのCaco-2細胞では、微小管は核を取り巻くように分布し、中心体から放射される微小管はほとんど観察されなかった。一方、CAMSAP2と3を同時に除去した細胞では、中心体から放射される微小管が観察できるようになった。この結果は、CAMSAPsが中心体の微小管重合活性を阻害することを示唆する。

4) オルガネラの分布に関するCAMSAP由来微小管の機能。正常なCaco-2細胞では、ゴルジ体は核の周辺で連続したクラスターを形成しているが、CAMSAP2と3を除去した細胞ではクラスターが断片化し、一部の断片化したゴルジ小胞が、中心体付近に集積する様子が観察された。この結果は、CAMSAPs由来の微小管が、ゴルジ体の集合と局在に重要であることを示唆する。

以上の結果から、CAMSAP2とCAMSAP3は非中心体微小管のマイナス端に結合して、そのプラス端の伸長に寄与すること、そしてCAMSAPsあるいはCAMSAPs由来の微小管が中心体の微小管重合活性を抑制することで、上皮細胞特有の分散型微小管配向を決定していることが明らかになった。平成25年2月8日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、本研究は微小管細胞内配向の制御に関して、重要な発見をもたらしたことから、学位論文を価値あるものと認め、口頭試問の結果、申請者を合格とした。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：学位授与後即日公表可