

- 33, 840–847.
- 7) Iwasaki, T., Murata-Hori, M., Ishitobi, S., & Hosoya, H. (2001) *Cell Struct. Funct.*, **26**, 677–683.
  - 8) Fumoto, K., Uchimura, T., Iwasaki, T., Ueda, K., & Hosoya, H. (2003) *Biochem. J.*, **370**, 551–556.
  - 9) Matsumura, F., Ono, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G., & Yamashiro, S. (1998) *J. Cell Biol.*, **140**, 119–129.
  - 10) Miyauchi, K., Yamamoto, Y., Kosaka, T., & Hosoya, H. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 543–548.
  - 11) Kondo, T., Itakura, S., Hamao, K., & Hosoya, H. (2012) *Exp. Cell Res.*, **318**, 915–924.
  - 12) Asano, S., Hamao, K., & Hosoya, H. (2009) *Genes Cells*, **14**, 555–568.
  - 13) Kondo, T., Hamao, K., Kamijo, K., Kimura, H., Morita, M., Takahashi, M., & Hosoya, H. (2011) *Biochem. J.*, **435**, 569–576.
  - 14) Ma, X., Kovács, M., Conti, M.A., Wang, A., Zhang, Y., Sellers, J.R., & Adelstein, R.S. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4509–4514.
  - 15) Kondo, T., Isoda, R., Uchimura, T., Sugiyama, M., Hamao, K., & Hosoya, H. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 686–691.

近藤 興, 濱生 こずえ, 細谷 浩史  
 (広島大学大学院理学研究科  
 生物科学専攻細胞生物学研究室)

Roles of myosin II regulatory light chain at the constricting area of dividing cells  
 Tomo Kondo, Kozue Hamao and Hiroshi Hosoya (Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739–8526, Japan)

## Slp2-a によるシグナル伝達分子 podocalyxin の apical 輸送と細胞間相互作用への影響

### はじめに

腎臓尿細管や消化管(胃・腸)の管腔面に見られる上皮細胞は、その細胞の形態から単層上皮と呼ばれ、基底膜上に細胞が互いに接着しながら一層に並んだ構造を持つ。このような上皮細胞は、基底膜や隣接する細胞と接する basolateral 膜、いずれとも接しない apical 膜を有し、頂端部-基底部軸に沿った極性(apicobasal polarity)を持つ<sup>1)</sup>。apical 膜と basolateral 膜の境界部には密着結合(tight junction)および接着結合(adherens junction)と呼ばれる細胞間接着構造が存在し、それらを境に特異的な脂質やタンパク質

分子が方向性を持ってそれぞれの膜に輸送されることで細胞極性を維持している<sup>2)</sup>。極性輸送に関わる分子として、近年低分子量 G タンパク質 Rab とそのエフェクター分子(Rab 結合分子)が注目を集めているが、その詳細な役割はいまだ十分に解明されていない<sup>2-4)</sup>。最近筆者らは、Rab27 の特異的なエフェクター分子として同定された Slp (スリッ: synaptotagmin-like protein)<sup>5)</sup>が、上皮細胞の極性輸送に関与することを見いだした<sup>6,7)</sup>。本稿では、Slp ファミリーの基本的な構造と性質について概説すると共に、Rab27 と Slp による細胞極性形成と細胞間相互作用への関与について最近の知見を紹介する。

### 1. Slp ファミリーの構造と Rab27 エフェクターとしての機能

Slp ファミリーはカルボキシル末端側に Ca<sup>2+</sup> 結合モチーフとして知られる C2 ドメインをタンデム(それぞれ C2A ドメイン, C2B ドメインと呼ばれる)に持つシナプトタグミン類似分子として、筆者らの研究室で同定・命名されたタンパク質群である<sup>8)</sup>。哺乳動物では 5 種類(Slp1~5)、ショウジョウバエでは 1 種類(dm-Slp/Bitesize)のアイソフォームが報告されているが、線虫ではホモログは見つかっていない<sup>8-11)</sup>。Slp ファミリーの最大の特徴は、アミノ末端側に SHD (Slp homology domain) という保存領域を持つ点である(図 1A)。ショウジョウバエの Bitesize もゲノム上には SHD 類似配列を有しているが、mRNA/タンパク質レベルでの発現はこれまで確認されていない。筆者らは、Slp と同様に C2 ドメインを有するタンパク質 rabphilin の Rab3A 結合ドメインと SHD が類似することに着目し、ヒトおよびマウスに存在する全ての Rab との結合を試すことにより、Rab27A/B が SHD の特異的なリガンドであることをこれまでに明らかにしている<sup>5,12)</sup>。なお、Slp4-a のみが例外的に Rab3/8/27 と結合する<sup>5,11)</sup>、Rab27 に対する親和性が最も高く、生体内では主に Rab27A/B と結合して機能するものと考えられている。Slp ファミリーの最も良く知られた機能は、Rab27 が局在する分泌顆粒などを細胞膜につなぎ止める役割である<sup>12)</sup>。例えば、Slp2-a は C2A ドメインが細胞膜のリン脂質と直接結合することで、分泌顆粒やメラノソームを細胞膜につなぎ止める。一方、Slp4-a はリンカードメイン(SHD と C2A ドメインの間の領域)を介して、Munc18・syntaxin と結合することで分泌顆粒の細胞膜へのつなぎ止めを行う(図 1B)<sup>3,11-13)</sup>。

これまでの Slp の研究は、主に内分泌細胞(クロマフィン細胞由来の PC12 細胞、膵臓 α 細胞、β 細胞など)、細

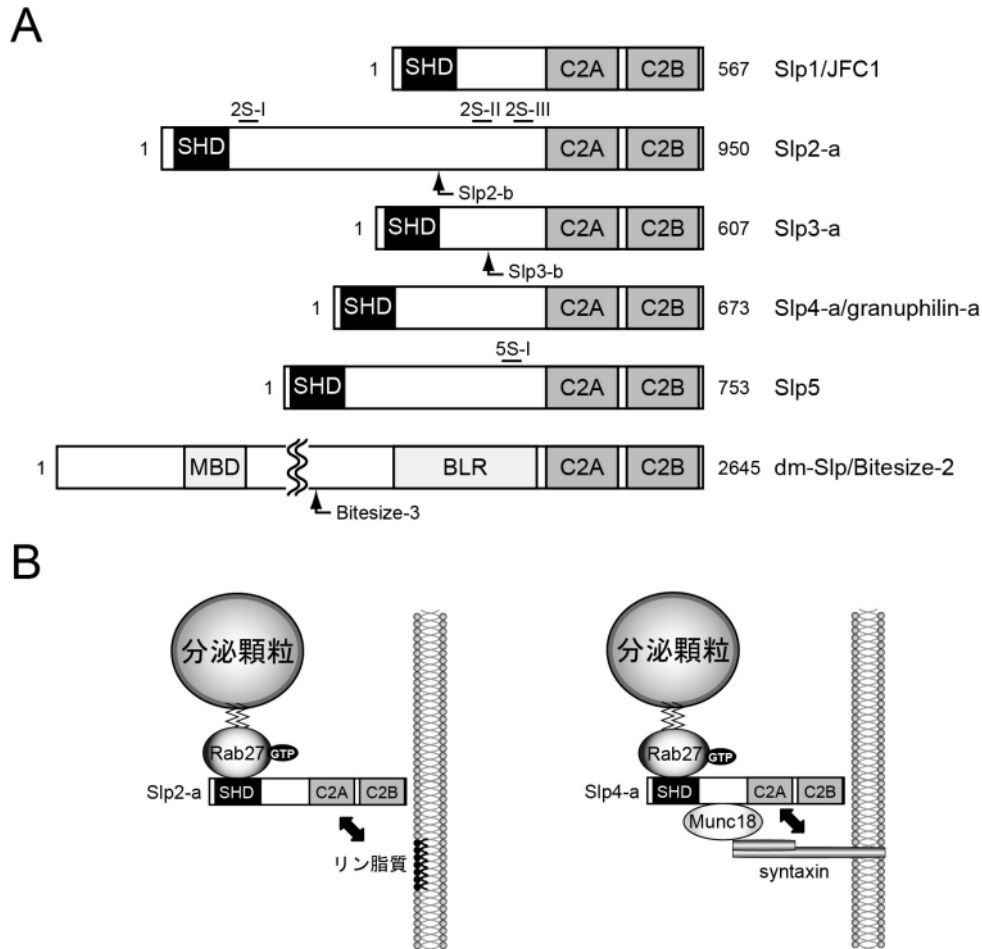


図1 Slpファミリーの構造と機能

(A) SlpファミリーはタンデムC2ドメインに加え、アミノ末端側にSHD (Slp homology domain) と呼ばれるRab27結合ドメインを持つ。ただし、ショウジョウバエのBitesizeは例外的にSHDを持たない。ほぼすべてのSlpファミリーで、mRNAの選択的スプライシングにより多様な分子種が産生される<sup>8)</sup>。ここでは、主なスプライシング部位を矢印および実線で示した。BitesizeのMBDおよびBLRはそれぞれmoesin-binding domainとBitesize localization regionを示す。

(B) Rab27-Slp2-a-リン脂質複合体およびRab27-Slp4-a-Munc18-syntaxin複合体による分泌顆粒の細胞膜へのつなぎ留めの分子機構を示す。

胞傷害性T細胞、メラノサイトなどを用いて行われていたが、興味深いことに、Slpの発現は極性を持つ上皮細胞にも報告されている。例えば、胃の表層粘膜細胞においてSlp2-aはapical面にのみ局在しており、粘液分泌への関与が明らかになっている<sup>14)</sup>。また、ショウジョウバエの上皮細胞においてBitesizeはapical面に局在し、細胞骨格関連タンパク質と相互作用することで細胞間接着分子であるE-cadherinの安定性に関与し、細胞の形態形成に影響を及ぼすことが報告されている<sup>9,10)</sup>。これらの知見から、筆者らは哺乳動物のSlpファミリーも上皮細胞において、方向

性を持った極性輸送に関与しているのではないかと考えた。

## 2. 腎臓尿細管上皮細胞 apical 面における Slp2-a の役割

筆者らはまず、極性輸送のモデル細胞として知られるイヌ腎臓尿細管上皮細胞株 (Madin-Darby canine kidney II ; MDCKII 細胞) におけるSlpファミリーの発現を検討したところ、Slp1~4までの発現が認められた。面白いことに、MDCKII細胞がコンフルエントになり極性を形成すると、Slp2-aの発現のみが上昇し、apical面に局在すること

が明らかとなった<sup>6)</sup>。

次に, apical 面における Slp2-a の役割を調べるため, RNA 干渉法により内在性の Slp2-a 分子の発現を低下させたところ, 細胞の極性形成に異常は認められなかった。しかし, 予想外なことに, 細胞間のバリア機能と密接な関わりのある経上皮電気抵抗値 (TER) が Slp2-a 欠損株で顕著に増加していた。この原因を調べた結果, 密着結合の構成因子である claudin-2 の発現量 (mRNA 量) が, Slp2-a 欠損株で顕著に低下していることが明らかとなった。また, Slp2-a は直接 claudin-2 の輸送を行うのではなく, apical 面に何らかのシグナル分子を輸送することで, 間接的に claudin-2 の発現調節に関与することが示唆された。そこで, MDCKII 細胞の apical 面に局在するシグナル分子を探索した結果, 図 2 に示すような claudin-2 の発現調節機構を初めて明らかにすることに成功した<sup>6)</sup>。Slp2-a は Rab27 によって運ばれてきたシグナル分子 podocalyxin を含む小胞を apical 面に集積させ, podocalyxin の apical 面への輸送を促進する。apical 面に輸送された podocalyxin はその下流分子である細胞骨格関連タンパク質 ezrin の活性調節および MAP キナーゼカスケード (ERK1/2) の活性調節を行うことで, claudin-2 の発現調節に関与する (図 2)。これらの結果から, Slp2-a を介した「apical 面への極性輸送」と「細胞間相互作用」との間に新たな機能的関係が存在す

ることが明らかとなった。

### 3. 腎臓尿管上皮細胞管腔形成における Slp の役割

上皮細胞の極性形成は, 上皮細胞の基底面がラミニンやコラーゲンなどを含む細胞外基質との接着刺激を受けることから始まり, 細胞の増殖や遊走が促進されて個々の細胞が互いに接着する。次に, その細胞接着を起点として細胞内シグナル伝達が起こり, 特異的な脂質やタンパク質分子がそれぞれ方向性を持って目的地へと運ばれることで極性が形成される<sup>1)</sup>。二次元培養系では基底面が与えられているため, そこからの強い刺激によって極性がかなりの程度規定されてしまう。一方, コラーゲンなどの細胞外基質中で上皮細胞を三次元培養すると, 内腔を有する cyst と呼ばれる特徴的な構造を形成することが知られている。この cyst という構造は生体内における上皮細胞管腔形成のモデルと考えられており, 近年, この cyst 形成の仕組みがある程度わかってきた<sup>15)</sup>。MDCKII 細胞を用いた cyst 形成においては, まず, 細胞外基質に取り囲まれた細胞が分裂・増殖して集合体を形成する。この時, 上述の apical マーカーである podocalyxin 分子は細胞周辺 (細胞外基質側) に局在しているが, Cdc42 や Par 複合体, Rab8/11 などによってトランスサイトーシス (異なる膜からエンドサイトーシスされ, エンドソームを介して別の膜へと輸送され

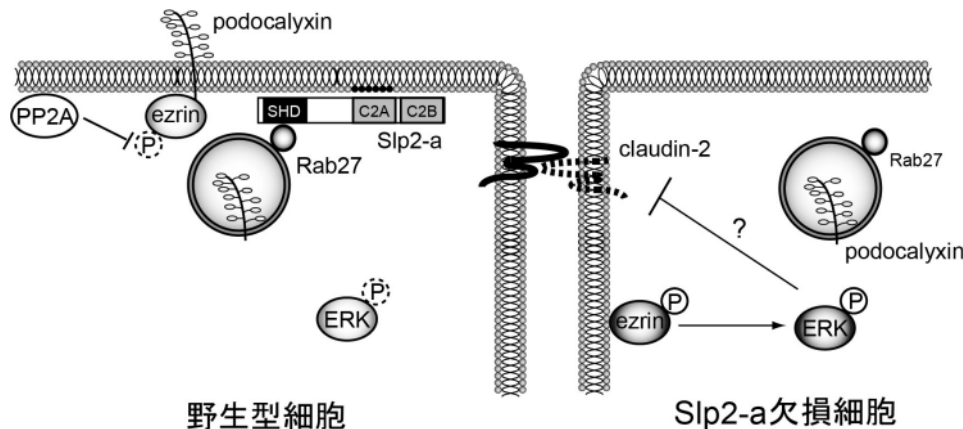


図 2 Slp2-a による podocalyxin 小胞の apical 輸送と claudin-2 の発現調節機構

(左図) 野生型細胞において, Slp2-a は Rab27 によって運ばれてきた podocalyxin 小胞を apical 面に集積させる。apical 面に輸送された podocalyxin は, 細胞質ドメインを介して ezrin と結合する。ezrin は apical 面でプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) による脱リン酸化を受けると考えられている。

(右図) Slp2-a 欠損細胞において, podocalyxin 小胞は apical 面に輸送されない。このため ezrin が不活性化されず, ERK (extracellular signal-regulated kinase) のリン酸化が亢進することで claudin-2 の発現が低下する (文献 6 より許可を得て, 改変・転載)。なお, ERK1/2 のリン酸化に伴う claudin-2 の発現低下は既に報告されているが, 詳しい機構ははまだ明らかではない。

る過程)され、将来 apical 面となる pre-apical patch (PAP) に集積する。podocalyxin は細胞外ドメインが負電荷を有するシアル酸を多く含むため、互いの電氣的反発によって細胞の隙間を形成する。PAP 領域には水分子やイオンを通す膜タンパク質 (claudin やイオンチャンネル) が集積しており、細胞の隙間に水分子やイオンが流れ込むことで細胞塊中央に一つの管腔形成が進行すると考えられている (図 3 上段)<sup>15)</sup>。最近、単層状態 (二次元培養) と cyst 形成した状態 (三次元培養) の MDCKII 細胞の mRNA 発現量を DNA マイクロアレイ法により網羅的に比較すること、および RNA 干渉法を用いたノックダウン実験を組み合わせることにより、管腔形成に関わる新規遺伝子の探索が行われた。興味深いことに、これらの候補分子の中には上述した podocalyxin の輸送に関わる Slp2-a が含まれており、

腎がんや乳がん患者組織において Slp2-a の発現が顕著に低下していることも明らかとなった<sup>7)</sup>。Slp2-a を欠損する MDCKII 細胞では、cyst 形成がうまく行われず、細胞塊内部に二つ以上の管腔が形成された。さらに、MDCKII 細胞においては Slp4-a という別の Slp ファミリーが発現しており、やはり管腔形成に関与することが明らかとなった<sup>7)</sup>。Slp4-a は cyst 形成後に発現が上昇し、podocalyxin を含む Rab27 小胞と共に、apical 面へトランスサイトーシスされる。しかし、Slp2-a を欠損する MDCKII 細胞では、Slp2-a 欠損細胞とは異なり、管腔そのものが形成されないことから、Slp2-a と Slp4-a は管腔形成の異なるステップに関与するものと考えられ、現在以下のようなモデルが提唱されている。管腔形成の初期段階においては、PAP 領域に Slp2-a が局在しており、Rab27 によってトランスサイトーシスさ

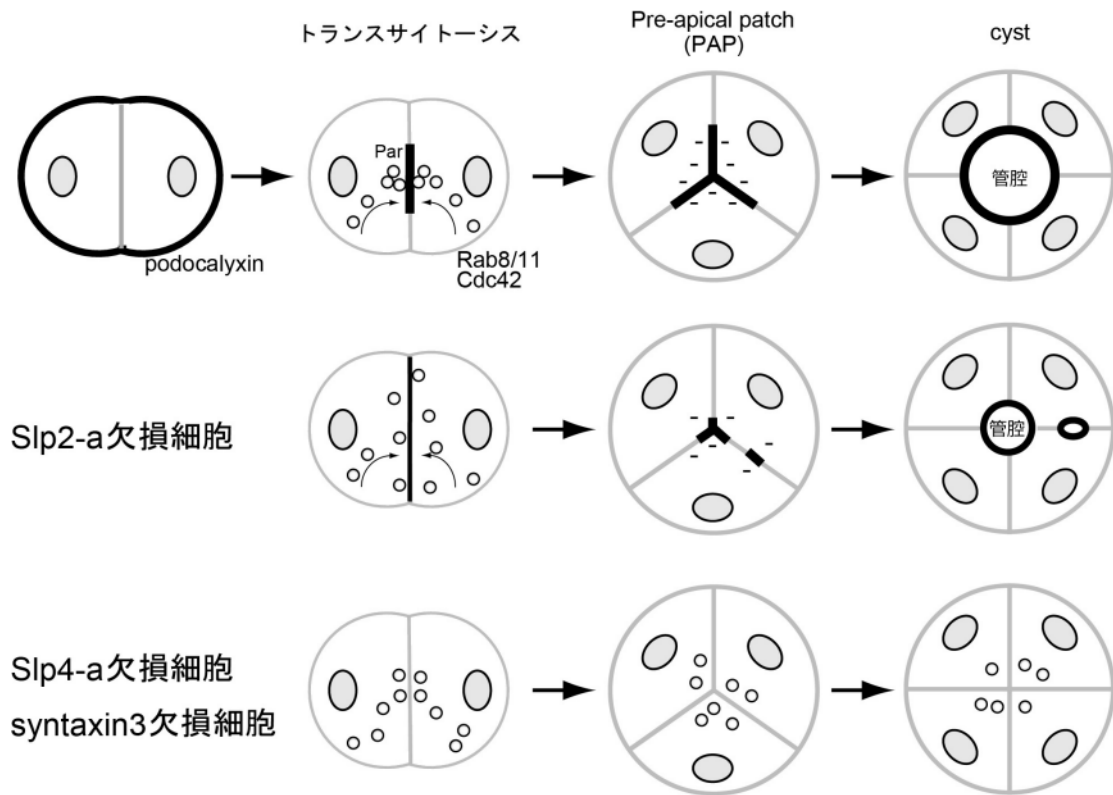


図 3 MDCKII 細胞の管腔形成モデル

細胞周辺に局在していた podocalyxin (黒の実線部分) が Par 複合体/Cdc42/Rab8/Rab11 などによりトランスサイトーシスされて PAP 領域にまず集積する<sup>15)</sup>。podocalyxin の細胞外ドメインの負電荷により生じた電氣的反発に加え、PAP 領域に集積した claudin やイオンチャンネルによって水やイオン分子が細胞塊中心に流れ込むことにより管腔が形成される (上段)。Slp2-a は PAP 領域に局在しており、トランスサイトーシスされてきた podocalyxin 小胞を apical 面に集積させる役割を担う。podocalyxin 小胞上の Slp4-a は PAP 領域に局在する syntaxin3 と結合し、逐次 podocalyxin 小胞のトランスサイトーシスを促進することにより、一つの管腔形成を行う<sup>7)</sup>。Slp2-a を欠損すると podocalyxin 小胞の PAP 領域への誘導がうまくできず、複数個の管腔が形成される (中段)。一方、Slp4-a または syntaxin3 を欠損すると、管腔そのものが形成されない (下段)。

れてきた podocalyxin を含む小胞を PAP 領域に集積させる。podocalyxin を含む小胞上には Rab27 に加え Rab3 や Rab8 が局在しており、それらと結合する Slp4-a が同時にトランスサイトosisされる。Slp4-a は PAP 領域に局在する syntaxin3 と結合することで、podocalyxin を含む小胞を逐次つなぎ止めていき PAP 領域に podocalyxin を集積させることにより、一つの管腔が形成される<sup>7)</sup>。このため、Slp2-a を欠損すると podocalyxin 小胞を PAP 領域に正しく集めることができず、複数の管腔が形成される (図3中段)。一方、Slp4-a や syntaxin3 を欠損すると podocalyxin 小胞を apical 面につなぎ止めることができず、管腔そのものが形成されないと考えられる (図3下段)。

### おわりに

本稿では、Slp ファミリーの上皮細胞の極性輸送における最新の知見を中心にまとめてみた。Rab27 のエフェクターとして同定された Slp ファミリーは、分泌小胞の輸送など classical な細胞内輸送だけでなく、上皮細胞の管腔形成にも関与しており、極性形成の破綻による細胞のがん化とも密接な関連があることが明らかとなった。今後、Slp ファミリーとがんの病態との関連性についてさらに検討していく必要がある。また、Slp ファミリーは Slp1~5 まで存在しており様々な組織・細胞で異なる発現パターンを示すことから、それらの時間的・空間的な制御による細胞内輸送や極性形成獲得の仕組みの解明も今後の課題である。

### 謝辞

本稿で紹介した研究は、九州大学大学院医学研究院・鎌倉幸子博士、住本英樹博士、産業技術総合研究所・三枝智香博士、及びマドリード自治大学・Fernando Martín-Belmonte 博士らとの共同研究により行われたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。

- 1) Mostov, K., Su, T., & ter Beest, M. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 287–293.
- 2) Rodriguez-Boulán, E., Kreitzer, G., & Müsch, A. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 233–247.
- 3) Fukuda, M. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2801–2813.
- 4) Stenmark, H. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 513–525.
- 5) Kuroda, T.S., Fukuda, M., Ariga, H., & Mikoshiba, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 9212–9218.
- 6) Yasuda, T., Saegusa, C., Kamakura, S., Sumimoto, H., & Fukuda, M. (2012) *Mol. Biol. Cell*, **23**, 3229–3239.
- 7) Gálvez-Santisteban, M., Rodríguez-Fraticelli, A.E., Bryant, D. M., Vargarajauregui, S., Yasuda, T., Bañón-Rodríguez, I., Bernascone, I., Datta, A., Spivak, N., Young, K., Slim, C.L., Brakeman, P.R., Fukuda, M., Mostov, K.E., & Martín-Belmonte, F. (2012) *Nat. Cell Biol.*, **14**, 838–849.
- 8) Fukuda, M., Saegusa, C., & Mikoshiba, K. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 513–519.
- 9) Serano, J. & Rubin, G.M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13368–13373.
- 10) Pilot, F., Philippe, J.M., Lemmers, C., & Lecuit, T. (2006) *Nature*, **442**, 580–584.
- 11) Fukuda, M. (2005) *J. Biochem.*, **137**, 9–16.
- 12) Fukuda, M. (2006) *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 691–695.
- 13) Kuroda, T.S. & Fukuda, M. (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 1195–1203.
- 14) Saegusa, C., Tanaka, T., Tani, S., Itohara, S., Mikoshiba, K., & Fukuda, M. (2006) *Genes Cells*, **11**, 623–631.
- 15) Rodríguez-Fraticelli, A.E., Gálvez-Santisteban, M., & Martín-Belmonte, F. (2011) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23**, 638–646.

安田 貴雄, 福田 光則

(東北大学大学院生命科学研究所膜輸送機構解析分野)

Slp2-a transports the apical signaling molecule podocalyxin to the apical surface and affects cell-cell interactions  
Takao Yasuda and Mitsunori Fukuda (Laboratory of Membrane Trafficking Mechanisms, Department of Developmental Biology and Neurosciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Aobayama, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan)