

## 線虫における細胞移動・浸潤の制御機構

伊原伸治

発生過程において細胞は生まれた場所から移動を行い、組織構築や器官形成に関与している。生体内で細胞はランダムに移動するのではなく、様々なガイダンス分子に応答して、誘導あるいは反発性の移動を行う。近年、モデル生物を用いた可視化技術と分子遺伝学的手法を組み合わせることにより、細胞移動、浸潤を制御する様々な分子が同定された。なかでも線虫 *Caenorhabditis elegans* では、胚発生期と幼虫期に観察される細胞系譜と細胞の移動経路が全て明らかにされており、細胞移動に異常を示す様々な変異体が分離されてきた。本稿では、線虫を用いて明らかにされた細胞移動の制御に関与する分子機構について最近の知見を紹介する。また筆者らが報告した細胞移動・浸潤を制御する分子機構及び基底膜の構造変化に関する最近の知見を紹介したい。

### 1. はじめに

細胞の移動・浸潤は、発生過程において様々な細胞で観察することができ<sup>1-3)</sup>、またリンパ球の血管外への遊走など恒常性の維持機構にも重要な役割を果たしている<sup>4,5)</sup>。細胞移動・浸潤は、細胞自身が持つ機能のみならず、細胞を取り囲む環境、すなわち細胞外マトリックスによっても制御を受けている<sup>6)</sup>。多細胞体の組織は細胞と細胞外マトリックスによって構成されており、細胞外マトリックスの構成タンパク質は、コラーゲンやエラスチン等の線維状の高分子タンパク質、フィブロネクチン、ラミニン等の各種糖タンパク質、プロテオグリカンなど多様な高分子成分からなることが知られている<sup>7,8)</sup>。細胞外マトリックスは、結合組織の主体である間質と上皮細胞や内皮細胞の裏打ち構造として存在する基底膜に大別できる。基底膜は多細胞生物の共通構造であり、進化的にほぼ完全に保存された数種類のタンパク質からなるシート状の構成物である<sup>9)</sup>。基底膜は生体内の至るところに存在しており、結合組織に比べ

て強固な構造で生体内を区別する超高分子構造体である<sup>10)</sup>。細胞移動は間質内や基底膜上で起こり、適切な移動距離や移動方向の制御を行うために、細胞は細胞外マトリックスを適切な形に分解、再編しているものと考えられている<sup>6,11,12)</sup>。細胞浸潤は基底膜を越えた移動のことであるが、浸潤するために上皮細胞は基底膜を壊す必要がある<sup>11,12)</sup>。またがん細胞が基底膜を通過して間質組織などに浸潤したものを微小浸潤がんと呼ぶが、これは生命予後と強い相関がある。したがって、細胞浸潤は医学や生物学における主要な研究テーマの一つである<sup>13,14)</sup>。しかしながら、*in vivo*における細胞移動・浸潤の実験モデルの確立は非常に困難である。その主たる理由は、生体内で細胞は周囲を取り囲まれており、三次元方向に指向性をもって移動するが、その移動様式を *in vitro* で再現するのが困難なこと、そして基底膜を人工的に作れないことにある。このため、細胞移動・浸潤を統一的に取り扱うことのできる実験系の確立が必要と考えられてきた。本稿では、線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた研究で明らかになった近年の関連分野の成果とあわせて、線虫を用いて確立された細胞移動・浸潤の実験モデル<sup>15)</sup>、そして筆者らの最近の研究成果について概説する。

### 2. 前後軸、背腹軸に沿った細胞移動のメカニズム

細胞移動は器官形成の基礎をなす過程である。例えば、ショウジョウバエやマウスの気管形成では、その伸長は新

国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター多細胞構築研究室 (〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111)

Molecular mechanisms of cell migration and invasion in *Caenorhabditis elegans*

Shinji Ihara (Multicellular Organization Laboratory, National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima 411-8540, Japan)

本総説は 2013 年度奨励賞を受賞した。

たに形成された気管支先端の細胞群の移動により成し遂げられる<sup>16)</sup>。また神経前駆細胞から分化した神経細胞の移動は中枢神経系の構築に必須であり、その破綻はてんかんや精神遅滞などを引き起こす<sup>17)</sup>。細胞の移動は、細胞自身の機能のみならず細胞を取り囲む微小環境にも強く依存しており、移動細胞の特性及び微小環境を理解するには、モデル生物による解析が有用な手法の一つである。

線虫 *C. elegans* は細胞系譜が全てわかっており、さらに幼虫期（線虫はL1~L4までの4段階の幼虫期を経て成虫になる）に観察される細胞の移動経路も全て明らかになっている<sup>18~20)</sup>。体が半透明である特性を生かして、これまでに細胞移動に変異をきたす様々な変異体が確立され、その機能解析が行われてきた。現在までに明らかになっている

前後軸そして背腹軸に沿った細胞移動の制御機構を概説する。

1) FGF シグナルによる前後軸に沿った細胞移動

線維芽細胞増殖因子 (FGF) 受容体チロシンキナーゼ経路は、脊椎動物では様々な器官のパターン形成に関与することが知られており、とくに有名なのは肺の枝分かれのパターン制御である<sup>16)</sup>。線虫では FGF シグナリングは性筋芽細胞である SM 細胞の移動を調節している。SM 細胞は L2 幼虫期に、体の後方から体の中心部にある腹側体壁筋上に移動する (図 1A)。SM 細胞は陰門筋と子宮筋の前駆細胞であり、SM 細胞が正確な位置に移動するためには、生殖巣に依存した誘引機構が必要である。面白いことに前

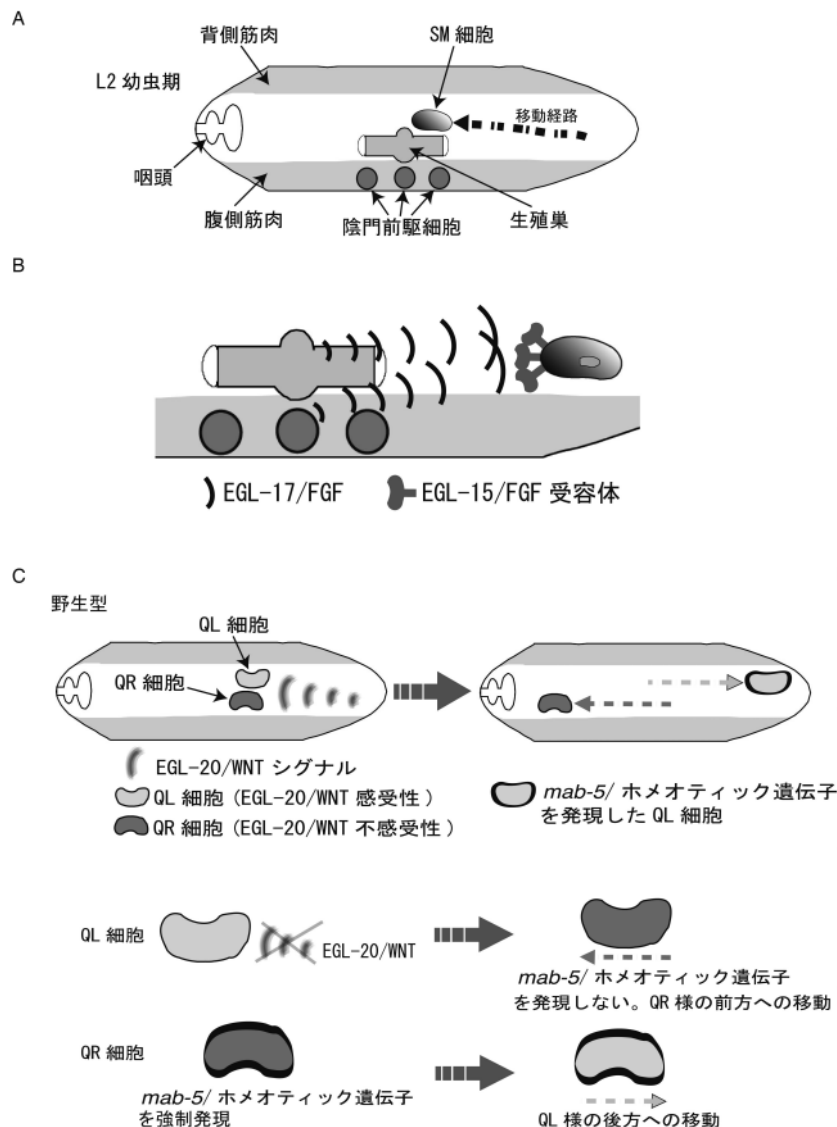


図 1 線虫の発生期で見られる SM 細胞と Q 細胞の移動  
 (A) SM 細胞の移動の模式図。(B) SM 細胞は EGL-17/FGF に引き寄せられる。  
 (C) Q 細胞の移動。前後方向に対称的な移動を行う。EGL-20/WNT は QL 細胞の運命を決定して、移動方向を制御する。

方方向への大まかな移動は、生殖巣に依存しない誘引機構を用いている<sup>21,22)</sup>。ここでは正確な位置に移動するための機構、すなわち生殖巣依存誘引機構を説明する。生殖巣依存誘引機構はEGL-17/FGFとEGL-15/FGF受容体によるシグナルのやり取りによって成し遂げられる。*egl-15*はFGF受容体ファミリーに属する受容体の遺伝子であり、移動するSM細胞自身が発現している<sup>23)</sup>。*egl-17/FGF*遺伝子によりコードされるFGF様リガンドは、移動先の生殖巣と陰門前駆細胞で発現しており、SM細胞はFGFシグナルを感知することによって正確に生殖巣中央に位置することができる(図1B)<sup>24,25)</sup>。EGL-17/FGFあるいはEGL-15/FGF受容体どちらかのシグナルが阻害されると、SM細胞は目的の場所まで到達することができず途中で停止する<sup>26)</sup>。そのために陰門筋が正常な位置で分化できず*egl*(EGG Laying defect)表現型が観察される。興味深いことにEGL-15/FGF受容体の抑圧変異体の解析によって、CLR-1と呼ばれる受容体チロシンホスファターゼをコードする遺伝子がクローニングされた<sup>27)</sup>。CLR-1はFGF受容体に対して負の調節因子として作用すると考えられている。ここでは紹介しないが生殖巣に依存したSM細胞の反発機構も存在している<sup>26)</sup>。

## 2) WNTシグナルによる前後軸に沿ったQ細胞の移動制御

Q細胞と呼ばれる細胞も前後軸に沿った移動を行うことが知られている。Q細胞は孵化直前(大体1時間前)に作られ、体のやや後方部のほぼ同じ位置に左右一対で存在している(QLとQR)。QLとQRは、細胞系譜、そしてその後により出す細胞の種類がほぼ同じであるにもかかわらず、面白いことに、QL(後方へ移動)とQR(前方へ移動)で全く逆の方向に移動することが知られている(図1C上段)。この移動方向の違いは、EGL-20/WNT分子による応答性によって制御されている。EGL-20/WNTは体の後方部分で発現しており、QL細胞ではEGL-20/WNTに反応して、*mab-5*/ホメオティック遺伝子の発現が誘導される。*mab-5*/ホメオティック遺伝子の発現が誘導されたQL細胞は、体の後方へと移動をする<sup>28,29)</sup>。*egl-20*変異体では、QL細胞で*mab-5*遺伝子は発現しておらず、前方へ移動する(図1C中段)。またQL細胞で*mab-5*遺伝子を抑制しても、QL細胞は前方へ移動する。一方、QR細胞では、*mab-5*/ホメオティック遺伝子は発現しておらず、前方に移動する。QR細胞で*mab-5*/ホメオティック遺伝子を異所的に発現させた場合、あるいはWNTシグナルを抑制する*pry*/Axin遺伝子の変異体では、*mab-5*/ホメオティック遺伝子はQR細胞でも発現し、QR細胞は後方へと移動するようになる(図1C下段)。QLとQR細胞で移動方向が違うのは、体の後方で発現しているEGL-20/WNTが移動の向きを制御しているのではなく、EGL-20/

WNTに対するQL細胞とQR細胞の感受性が違うために、逆方向の移動を行うと考えられている<sup>30)</sup>。その後の解析により、Q細胞の移動距離の決定は複数のWNT分子によって制御されていることが報告されており、複数のWNT分子を用いることによって、精巧に神経細胞の位置決めを行っていると考えられている<sup>31)</sup>。更に近年、Q細胞における移動距離の位置決定に、トロンボスポンジンモチーフをもつ*mig-21*遺伝子やwnt分子のアンタゴニストとして作用する分泌タンパク質のsecreted Frizzled-related proteinなどの関与が報告されている<sup>32,33)</sup>。

## 3) 背腹方向における細胞移動の制御機構

線虫の幼虫期に観察される背腹軸に沿った細胞移動や神経軸索の移動は、*unc-5*、*unc-6*、*unc-40*と呼ばれる遺伝子群による制御機構がよく知られている。*unc-6*遺伝子は、体の動きに異常を示す*unc*(UNCoordinated)変異体として分離され、順遺伝学的解析により1992年にクローニングされている<sup>34)</sup>。UNC-6は基底膜タンパク質ラミニンの $\gamma$ 鎖に相同性が高く、線虫から哺乳類まで進化的に保存されている。ネトリンは約100年前にスペインの解剖学者カハールによって提唱された化学向性説(chemotropic theory)を証明する分子であり、1994年にニワトリ胚の脳から精製された分泌タンパク質であるが、ネトリンが*unc-6*の相同遺伝子であることは驚きであった<sup>35)</sup>。さらに線虫を用いた優れた遺伝学的解析により、UNC-5とUNC-40がUNC-6による背腹方向の移動制御に関与することが予測されていた<sup>36)</sup>。その後の解析によりUNC-5とUNC-40は共にネトリン受容体であることがわかり、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞表面に局在する膜タンパク質であることが報告された。*unc-40*遺伝子は大腸がんの抑制因子であるDeleted in Colorectal Cancer(DCC)の相同遺伝子であり、四つの免疫グロブリン様領域と六つのファイブネクチン様リピートを持っており<sup>37,38)</sup>、UNC-5は二つの免疫グロブリン様領域と二つのトロンボスポンジン・タイプI領域をもっている<sup>39)</sup>。

ネトリンシグナルによる背腹方向の細胞移動の制御は、生殖巣先端にあるDistal Tip Cell(DTC)細胞や神経軸索などで知られている。DTCは幼虫期に二回のターンを行うことでU字型の移動を行い、生殖巣を形成する(図2A)。*unc-5*、*unc-6*、*unc-40*変異体では、背側方向への移動ができないため、二回目のターンの後も腹側に沿って移動する(図2B)。UNC-6/ネトリンは、幼虫期には腹側運動ニューロンで発現しており、背側に向かって濃度勾配を形成していると考えられている(図2C)<sup>40)</sup>。DTC細胞ではUNC-5/ネトリン受容体がUNC-40/ネトリン受容体とヘテロ二量体を形成して、腹側で発現しているUNC-6/ネトリンに反発することでDTC細胞は背側方向へ移動する。一

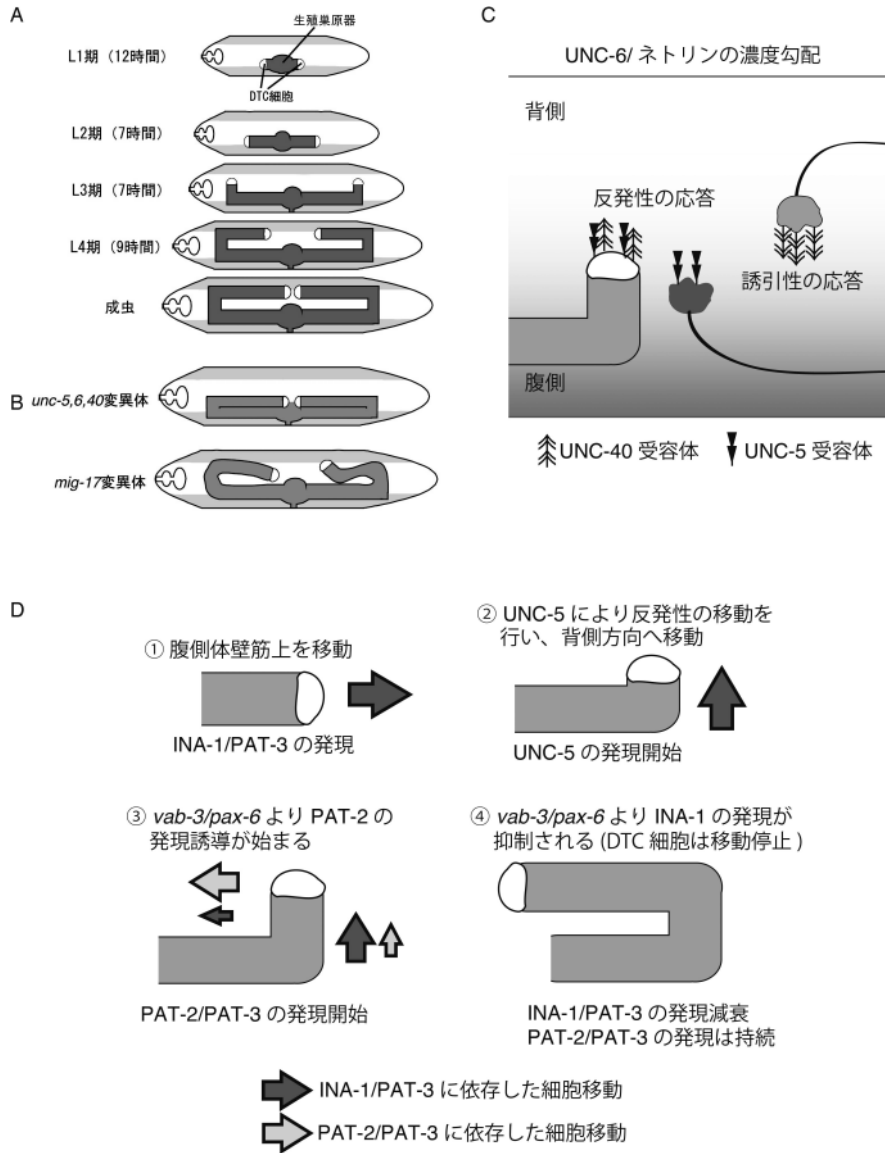


図2 線虫の発生 (L2~L4期) で見られるDTC細胞の移動 (A) 線虫 *C. elegans* の生殖巣形成. 幼虫期にDTC細胞がU字型に動くことにより形成される. 上が背側で下が腹側を示す. (B) DTC細胞の移動に異常を示す変異体. (C) 背腹軸への移動方向を決める分子機構. 左がDTC細胞で右の二つが神経軸索でのガイド機構. (D) *VAB-3/PAX-6* 転写因子によるDTCの移動と停止を制御する分子機構. 上が背側で下が腹側を示す. 後方側のDTC細胞のみを示しているが, 前方側も同様に制御されている.

方, 神経軸索ではUNC-40/ネトリン受容体あるいはUNC-5/ネトリン受容体が単独で発現しており, UNC-6/ネトリンに誘引または反発して腹側もしくは背側への移動を行う<sup>41,42</sup>. このようにUNC-6/ネトリンのみで生殖巣や軸索の移動方向が決定するわけではなく, 細胞が発現しているUNC-5とUNC-40の種類によって制御されているのである (図2C). DTC細胞の場合, UNC-40/ネトリン受容体は常に発現しているが, 反発性を引き出すUNC-5/ネトリン受容体は, 通常その発現が低く, 背側への移動が始まる時期になると, 特異的に発現が誘導される. 面白いことに

*unc-5* 遺伝子をDTC細胞で通常よりも早く発現させると, 早い時期に背側への移動が開始される<sup>43</sup>. UNC-5とUNC-40は共にネトリン受容体であるが, 二つの受容体の細胞内領域の違いにより反発性 (UNC-5) と誘引性 (UNC-40) の応答が引き起こされる<sup>42</sup>. さらにUNC-5受容体によって引き起こされる背側方向への移動にはSRC-1が関与することが報告されている<sup>44,45</sup>.

ここでは詳細は省略するが, 背側筋肉細胞ではUNC-129/TGFβが発現し, UNC-40とUNC-5のバランスを制御することにより, 背側方向の移動を調節している<sup>46,47</sup>. ま

た *slt-1*/SLIT 遺伝子も同様に背側の筋肉細胞で発現しており、その受容体である SAX-3/ROBO 受容体を介して神経軸索が反発して腹側へと移動する<sup>48)</sup>。

近年、DTC 細胞が適切に背側方向に移動するには、ガイド分子による誘導だけでは不十分で、移動している細胞の方向変換に付随した核の移動が必要であることが明らかにされた<sup>49)</sup>。DTC の核は移動の間、常に細胞の移動方向の先端部に位置しているが、線虫のスペクトラプラキンの相同遺伝子である *VAB-10B* (Variable ABnormal morphology) 変異体では、移動方向に伴う核の移行が抑制され、結果として背側方向への移動を適切に行うことができない。スペクトラプラキンは細胞骨格を制御する巨大タンパク質であり、アクチンと微小管をつなぐリンカータンパク質として機能することが知られている<sup>50)</sup>。*VAB-10B*/スペクトラプラキンは、微小管の伸長を制御することにより、移動細胞内で核の移行を制御しており、このスムーズな核移行が DTC 細胞の方向転換には必要である。

### 3. 基底膜タンパク質による細胞移動制御

基底膜タンパク質は、IV 型コラーゲン、ラミニン、パールカン、ナイドジェン (エンタクチン) によって作られるメッシュ構造を有するシート状の超巨大タンパク質複合体である<sup>6)</sup>。線虫の基底膜については、すでに優れた総説があるので<sup>51)</sup>、ここでは生殖巣先端の DTC 細胞の移動に関与する基底膜タンパク質や基底膜受容体であるインテグリンの役割について紹介する。

#### 1) ヘパラン硫酸プロテオグリカン、UNC-52/パールカンとシンデカンによる制御機構

パールカンは、基底膜の主要構成成分として同定されたヘパラン硫酸プロテオグリカンである。硫酸基を多数持つ構造的な特性から、様々な成長因子と結合してその機能を制御する機能分子である。ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、コアタンパク質とヘパラン硫酸鎖から構成され、さらに *N* 結合型及び *O* 結合型の糖鎖が付加されている。線虫では、パールカンは行動異常を示す *unc-52* 変異体から発見 (同定) された。強い表現型を示す *unc-52* 変異体では筋肉細胞で発現するインテグリンと基底膜との結合に破綻が生じており、結果として筋肉構造が適切に維持できず、行動異常が観察される<sup>52,53)</sup>。面白いことに *unc-5* 変異体 (ネトリン受容体) のエンハンサースクリーニングによって、弱い表現型を示す *unc-52* 変異体がクローニングされ、パールカンの機能低下がネトリンシグナルの異常を増幅することが明らかになっている<sup>54)</sup>。弱い表現型を示す *unc-52* 単独の変異体では DTC 細胞の移動は正常であるが、それぞれ *UNC-6*/ネトリン、*UNC-5*/ネトリン受容体、*UNC-40*/ネトリン受容体との二重変異体を作製すると、ネ

トリン経路の単独変異体で観察される背側方向への細胞移動の異常を強く増幅する。興味深いことに、*unc-52* 遺伝子と *unc-5*/ネトリン受容体の二重変異体に、さらに *egl-17*/FGF、*egl-20*/WNT、*unc-129*/TGF $\beta$  などの遺伝子と三重変異体を作製すると、*unc-52* の変異によって増幅された背側方向への移動異常が抑制される。これらの結果は、弱い表現型を示す *unc-52* 変異体では、成長因子などの分泌タンパク質が適切に保持されず、結果的にそのシグナル強度が増強されることを示唆している。

シンデカンは、膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、パールカンと同様に様々な細胞外の成長因子と結合する。線虫におけるシンデカンの相同遺伝子は *sdn-1* であり、神経環や陰門で発現している。また最初に樹立された *sdn-1* 欠損変異体では産卵障害 (EGG Laying : Egl) が観察される<sup>55)</sup>。この欠損変異体はシンデカンの大部分のエキソンを失っているが in-frame で残ったエキソン領域が発現しており、完全な機能喪失ではないことが後に示された。完全な機能喪失変異体を用いた解析により、シンデカンは SLT-1/Slit、SAX-3/ROBO システムを介して、細胞自律的に運動ニューロン的一种である HSN ニューロンや感覚ニューロンである ALM ニューロンの移動を制御していることが明らかにされた<sup>56)</sup>。面白いことにパールカンと同様に、シンデカンも背側方向への DTC 細胞の移動を指標にした *unc-5* 変異体のエンハンサースクリーニングによってクローニングされている<sup>57)</sup>。*unc-5*/ネトリン受容体の変異体で観察される DTC 細胞の移動異常は、パールカンと同様にシンデカンの変異によって増幅され、その異常の増幅は *egl-17*/FGF、*egl-20*/WNT の変異によって抑制される。シンデカンの欠損は、EGL-20/WNT の細胞外局在に影響を与えることが明らかになっている。この観察結果は、EGL-17/FGF、EGL-20/WNT などの成長因子が、シンデカンによって細胞外で保持されることを示唆している。興味深いことに、DTC 細胞の移動を制御しているシンデカンは細胞非自律的に作用し、ニューロンでは細胞自律的に作用していることがわかっており、DTC 細胞とニューロンでは異なる分子機構が存在しているようである。

#### 2) インテグリンによる細胞移動制御

インテグリンは細胞外マトリックス分子の受容体として知られ、 $\alpha/\beta$  サブユニットからなるヘテロ二量体を形成する。インテグリンが細胞接着と移動に重要であることは、よく知られている。脊椎動物では 18 種類の  $\alpha$  サブユニットと 8 種類の  $\beta$  サブユニットの存在が知られており、少なくとも 24 種類のヘテロ二量体の組み合わせが報告されている。線虫のゲノムには、二つの  $\alpha$  サブユニット、一つの  $\beta$  サブユニットが存在し、それぞれ *ina-1*/ $\alpha$  サブユ

ニット, *pat-2*/α サブユニット, *pat-3*/β サブユニットと呼ばれている。したがって線虫の生体内には, INA-1/PAT-3 と PAT-2/PAT-3 の2種類の組み合わせが存在する<sup>51</sup>。

*ina-1* 遺伝子はラミニン結合型の α サブユニットと最も相同性が高く, 神経細胞の移動に異常を示す変異体の原因遺伝子としてクローニングされた<sup>58</sup>。神経が移動するためにインテグリンを必要とすることは古くから想定されていたが, *ina-1* 遺伝子のクローニングは, インテグリンが神経細胞の移動に関与することを最初に証明した遺伝学的証拠である。一方, *pat-2*/α サブユニットは RGD 結合性インテグリンと相同性が高く, *pat-2*/α サブユニットと *pat-3*/β サブユニットの変異は, どちらも *pat* 表現型 (PARalyzed at Two-fold) を示す<sup>59</sup>。 *pat* 表現型とは, 受精後に観察される最初の卵割から 450 分ほどたった二つ折れ期 (two-fold) と呼ばれる時期になるが, この時期に発生が停止する表現型のことである。 *unc-52*/パールカンの欠損変異体 (強い表現型を示す) も *pat* 表現型を示すことが知られており, おそらくこの時期に形成される筋肉細胞と基底膜の結合に PAT-2/PAT-3 を組み合わせたインテグリンと UNC-52/パールカンが関わっていると考えられる。

インテグリンは神経細胞の移動のみならず, 生殖巣の DTC 細胞の U 字型の移動にも関わっている。 PAT-3/β サブユニットのドミナントネガティブ型を筋肉細胞に発現させると, *pat-3* 変異体と同様に *pat* 表現型を示すが, DTC 細胞に発現させると移動の方向性に異常を示す<sup>60</sup>。 また *ina-1* 変異体でも同様の移動異常が観察される。これらの観察は, インテグリンが移動方向の決定に関与していることを示唆している。前述したように線虫のゲノムには二つの α サブユニット *ina-1* と *pat-2* があるが, DTC 細胞は移動と停止の時期に合わせて, 二つの α サブユニットを使い分けていることが報告された<sup>61</sup>。 L2 幼虫期には, 腹側の筋肉細胞上を二つの DTC 細胞がそれぞれ前後方向に移動しており, L3 幼虫期になると 90 度方向転換して背側へと移動を開始する。 L4 幼虫期直前に背側まで到達した後, 再び 90 度の方向転換により腹側を移動していた時とは逆向きの方向に移動し, 体の中央部まできたところで停止する (図 2A)。 *vab-3* 遺伝子は, 哺乳類の転写因子として知られている *pax-6* 遺伝子の相同遺伝子である。 *vab-3* 変異体では, DTC 細胞は蛇行, 迷走の表現型が観察されるが, 最も興味深いことは L4 幼虫期の DTC 細胞が止まる時期になっても, 更に DTC が移動を続けることである。

詳細な観察から, 腹側を移動しているときは, DTC 細胞では *ina-1* 遺伝子が強く発現しているが (図 2D 上段), 背側に方向転換する時期になると, *vab-3* の発現が始まり, もう一つの α サブユニットである *pat-2* 遺伝子の発現が誘導される (図 2D 下段)。背側に移動してから誘導さ

れる PAT-2 の発現は, その後の細胞移動の経路を維持するために必要であり, DTC 細胞が停止する時期になると, *ina-1* 遺伝子の発現は減衰するが, *pat-2* 遺伝子はその発現が持続したままである。 *ina-1* 遺伝子の発現の減衰は *vab-3* 遺伝子に依存しており (図 2D 下段), さらに *ina-1* 遺伝子を RNA 干渉法 (RNAi) でノックダウンすると移動が途中で止まることから, 細胞表面の INA-1 タンパク質が細胞の移動に必要であり, その下流にそれぞれ RAC のホモログである *ced-10* と *mig-2* 遺伝子が関与していることがわかる。このように DTC 細胞は, 転写因子 VAB-3 を介して, 移動するためのインテグリン (INA-1) と, 経路を維持するためのインテグリン (PAT-2) を使い分け, 適切な移動開始と移動経路, さらにその停止までを制御している。

#### 4. ADAMTS ファミリーによる細胞移動の方向制御

DTC 細胞の移動は, ガイダンス分子や基底膜タンパク質のみならず, 分泌型のメタロプロテアーゼファミリーに属する ADAMTS (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motifs) によっても制御されている。 ADAMTS ファミリーは遺伝性の結合組織の変性 (Ehlers-Danlos 症候群や Weill-Marchesani 症候群) や血栓性血小板減少性紫斑病の原因遺伝子として同定され, またリウマチ患者で観察される細胞外マトリックス, アグリカンの過剰な分解を行うことも知られている<sup>62</sup>。 *gon-1* 変異体と *mig-17* 変異体は, DTC 細胞の移動に異常を示す変異体として分離されたが, その原因遺伝子は共に ADAMTS ファミリーに属する分泌型のメタロプロテアーゼである<sup>63,64</sup>。

##### 1) 細胞の移動と方向を制御する *gon-1* と *mig-17* 遺伝子

*gon-1* 遺伝子は DTC 細胞が移動するために必要であり, *gon-1* 変異体では DTC の移動は全く起こらずに, 生殖巣は小さな塊のままである。面白いことに *gon-1* 遺伝子を移動細胞である DTC 細胞に発現させると, DTC 細胞は正常に U 字型の経路を移動するが, 生殖巣腕が細く, また子宮の構造に異常が見られる。一方, 周りの筋肉細胞に特異的に発現させると, DTC 細胞は移動しないが, 生殖巣全体が風船のように膨らむ表現型が観察される。実際に *gon-1* 遺伝子は筋肉細胞と DTC 細胞の両方で発現している<sup>64</sup>。おそらく筋肉細胞で発現した GON-1 は生殖巣腕の形成を制御しており, また DTC 細胞での発現は, 細胞が動くために必要なであろう。

もう一つの ADAMTS ファミリーの遺伝子である *mig-17* は DTC の移動自体には必要ではないが, 移動の方向性制御に必要である。 *mig-17* 変異体では DTC が蛇行・迷走するために生殖巣の形態が異常となるが (図 2B), *gon-1* 変異体と異なり *mig-17* 変異体は稔性である<sup>63</sup>。

GON-1, MIG-17 共に ADAMTS ファミリーに共通のドメイン構造を持っているが, MIG-17 は ADAMTS ファミリーに特徴的なトロンボスポンジンのドメインを欠いている。MIG-17 はその構造的特徴として, N 型糖鎖の付加部位を 9 箇所持っている<sup>65)</sup>。MIG-17 の各ドメインと N 型糖鎖は, それぞれ局在決定や活性化などの役割を担っているが, その役割についてすでに解説した総説があるので<sup>66)</sup>, ここでは簡単に紹介する。

MIG-17 は筋肉細胞から分泌され, 生殖巣上の基底膜に局在するが, その局在決定に最も重要なのは, 正常な糖鎖構造をもつプロドメインである。たとえば, *mig-23* 遺伝子はゴルジ体の *NDPase* 遺伝子をコードしているが, *mig-23* 変異体では, MIG-17 の糖鎖修飾が不完全であり, 正確に生殖巣基底膜上に局在することができない<sup>67)</sup>。通常 ADAMTS ファミリーはゴルジ体に存在するフェーリンによって, プロドメインが切断された後に分泌されるが, MIG-17 はプロドメインを持った形で分泌され, プロドメインに依存して基底膜上に局在する。次に自己触媒機構によって活性化して, DTC 細胞の移動方向を決定している。現在までに MIG-17 の直接の基質はわかっていないが, *mig-17* 変異体を用いた抑圧変異体の解析により, その下流に基底膜タンパク質が関与していることがわかっている。少なくともこれまでに 6 種類の抑圧変異体 (すべて優性変異) が得られており, クローニングされた 2 種類の遺伝子 *fb1-1* (フィビュリン) と *let-2* (IV 型コラーゲンの  $\alpha 2$  サブユニット) は, 共に基底膜の構成タンパク質である<sup>68, 69)</sup>。

## 2) MIG-17 の活性化機構

MIG-17 は, プロドメインを持った不活性化型で基底膜上に局在することからも, 基底膜上で活性化されることが想定された。 *in vitro* 実験系により MIG-17 のプロテアーゼ活性に依存して自己活性化することが明らかになっている。次に活性化に従って, 切断される部位を同定するために, MIG-17 をバキュロウイルスで発現させ, 活性化型のみを精製して, エドマン分解法により N 末端のアミノ酸を決定した。その結果, リシン 206 番目とフェニルアラニン 207 番目の間で切断されることが明らかになった (図 3 A)。次に我々は, 活性化型 MIG-17 のみを特異的に認識する抗体の作製を行った (図 3B)。プロドメインの切断後に

生じる FVDITLEE 配列 (neo-epitope) を抗原として作製したモノクローナル抗体のなかで, 切断されていないペプチド配列 (TDALISSDMPKLRKFVDITLEEMQ, 下線は neo-epitope 配列) を認識しない抗体を選択した。具体的には, 脾臓融合法とリンパ節融合法を用いて樹立した 1439 のハイブリドーマから, neo-epitope への反応性を指標にして 4 ハイブリドーマを選び出した (図 3B, C)。そのうちの一つは活性化型 MIG-17 のみを特異的に認識することが確認できた (図 3D)。樹立したモノクローナル抗体 (No. 6) を用いて免疫染色を行ったところ, プロフォームを認識するポリクローナル抗体 (抗原 1 を使用して作製) では, 生殖巣, 体壁筋, 下皮, 腸などの表面にある全ての基底膜上に局在が観察されるが, 活性化型 MIG-17 を認識するモノクローナル抗体を用いた免疫染色では, 生殖巣の基底膜上のみシグナルが検出された (図 3E)<sup>70)</sup>。興味深いことに, 活性化型 MIG-17 は L3 幼虫期に最も多く観察され, これは MIG-17 が DTC 細胞の移動方向を制御する時期と一致している。どのようなシグナルを引き金として自己触媒化により活性化するのは明らかではないが, L3 幼虫期には, MIG-17 を効率よく活性化させるシグナルが存在するようである。

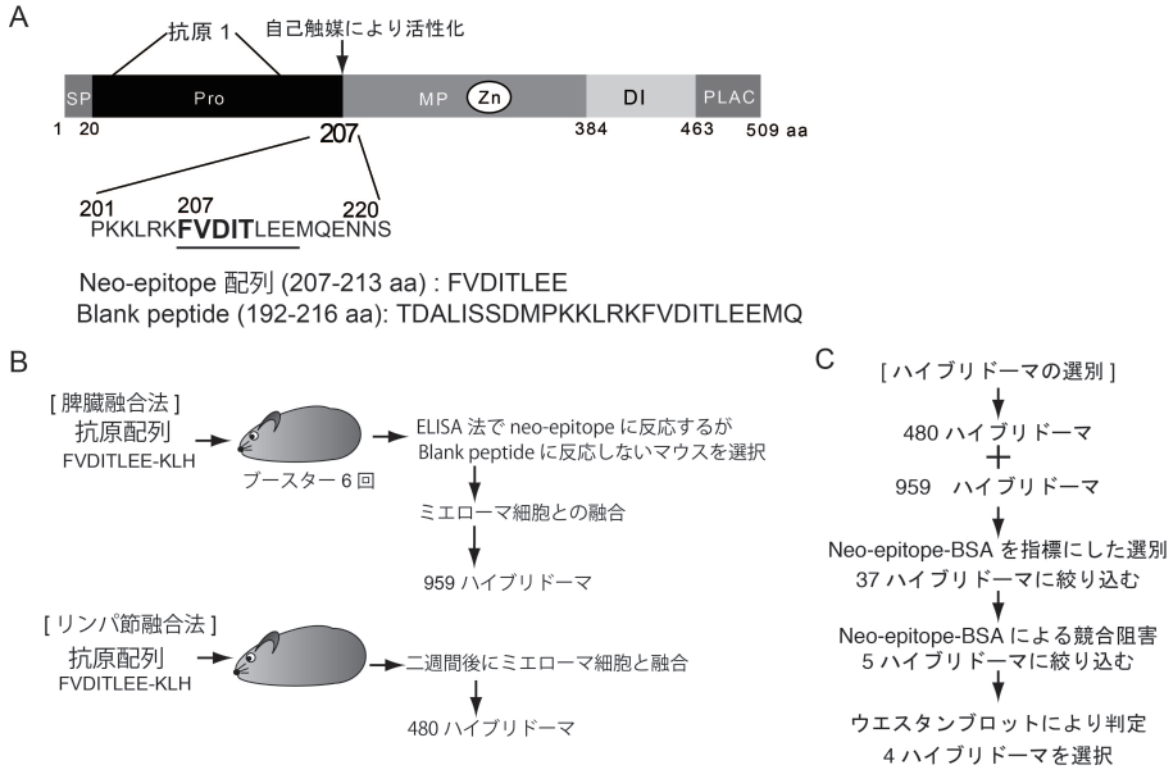
## 5. 線虫を用いた細胞浸潤の *in vivo* 実験モデル

基底膜を介した細胞移動は細胞浸潤と呼ばれ, 多細胞体を構築するために必須な現象である。また種々の疾患でも細胞浸潤が決定的な要因になっている。例えば喘息では好酸球の浸潤, 関節リウマチにおいては白血球の浸潤などが観察され<sup>71)</sup>, とくにがんの転移では浸潤は致命的な要因を引き起こす。近年, 分子イメージング技術や分子生物学の発展により, 細胞浸潤を取り扱うことができる実験モデルが報告されている。ラットやニワトリから取り出した基底膜と浸潤がん細胞を用いた実験モデルでは, 浸潤細胞は三段階のステップを経て浸潤突起を形成すること, さらにアクチン, 微小管, 中間系フィラメントが浸潤突起を形成するために必要であることが報告されている<sup>72, 73)</sup>。

線虫幼虫期の最終段階で観察されるアンカー細胞の浸潤は, 基底膜と浸潤細胞を取り扱うことのできる *in vivo* 実験モデルであり, 遺伝学や細胞生物学を組み合わせ解析できる有用なモデルである<sup>15, 74)</sup>。浸潤時に上皮間葉転換が生じることはよく知られており, 極性の崩壊や細胞間接着

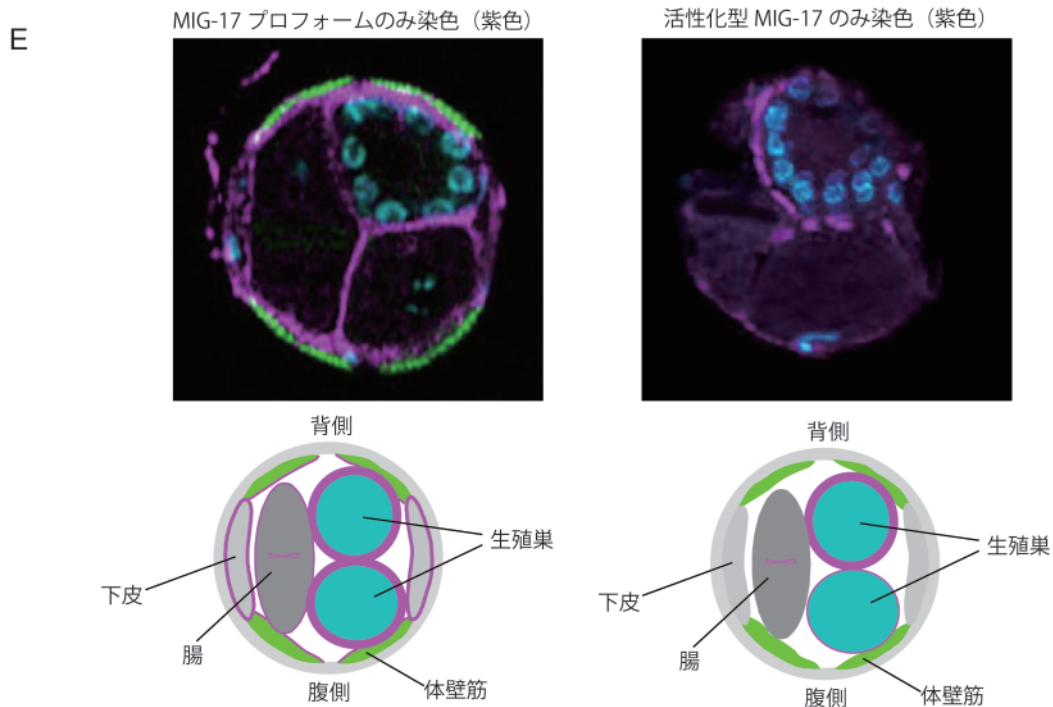
## 図 3 MIG-17 の活性化

(A) MIG-17/ADAMTS の模式図。各ドメイン構造とプロドメインの切断位置を示している。抗原 1 はポリクローナル抗体を作るために使用した領域。(B) モノクローナル抗体作製の模式図。脾臓融合法とリンパ節融合法の 2 種類を用いた。(C) 目的の抗体を産生するハイブリドーマの選別方法。(D) 選別したハイブリドーマ。ウエスタンブロットにより測定した MIG-17-GFP と MIG-17-His に対する交差性を示す。(E) 上段, 線虫を輪切りにした免疫染色像。緑は体壁筋, 青は DAPI 染色, 紫は MIG-17 に対する免疫染色を示す。左はプロフォームを認識するポリクローナル抗体での染色。右は活性化型のみを認識するモノクローナル抗体での染色。右の図ではモノクローナル抗体による染色を見やすくするために, 体壁筋の染色は行っていない。下図は線虫を輪切りにした時の模式図。紫色は, それぞれの抗体で局在が観察された領域を示している。



**D**

ハイブリドーマ No.	方法	IgG サブクラス	MIG-17-His に対する反応	MIG-17-GFP に対する反応
5	リンパ節融合	IgG2b	プロ型と活性化型	活性化型のみ
6	リンパ節融合	IgG2b	活性化型のみ	活性化型のみ
17	脾臓融合	IgG2b	プロ型のみ	認識しない
26	脾臓融合	IgG2a	活性化型のみ	認識しない





の低下が見られ、間葉系細胞同様の移動能や浸潤能を獲得する。しかしながら、完全な上皮間葉転換を経ない様式も報告されている。たとえば発生期やある種のがん細胞で観察される集団的浸潤では、浸潤の先端では間葉系の性質を示しているが、細胞後方のアピカル面では細胞間接着が保持されることが知られている。線虫アンカー細胞の浸潤様式は、おそらく後者のようであり、アンカー細胞の浸潤先端では間葉系細胞のような浸潤突起を形成するが、アピカル側では強固な細胞間結合の保持が観察される<sup>15)</sup>。

我々はこれまでに、この実験モデルを用いて、アンカー細胞が極性を確立するためにネトリンを要求すること<sup>75)</sup>、さらに細胞浸潤を実行するためには、転写因子 *fos-1* 遺伝子や接着分子であるインテグリンが必須であることを明らか

にしてきた<sup>76,77)</sup>。

1) アンカー細胞の浸潤モデル

線虫の外部生殖器官である産卵口（かつては“陰門”と呼ばれたが、昨年翻訳された『ウォルパート発生生物学』では“産卵口”と翻訳）は、腹部中央に存在する厳密に細胞運命が制御された3個の細胞（陰門前駆細胞）が三度の分裂を経て作りだされる合計22個の細胞から構成される器官である<sup>78)</sup>。産卵口の形成誘導はアンカー細胞がEGF経路を用いて行っている（図4A）。さらにアンカー細胞は基底膜を介して細胞移動（浸潤）するが、この浸潤は、子宮と産卵口の適切な結合に必須である。アンカー細胞の浸潤開始時期は厳密に決まっており、1°の運命をもつ陰門

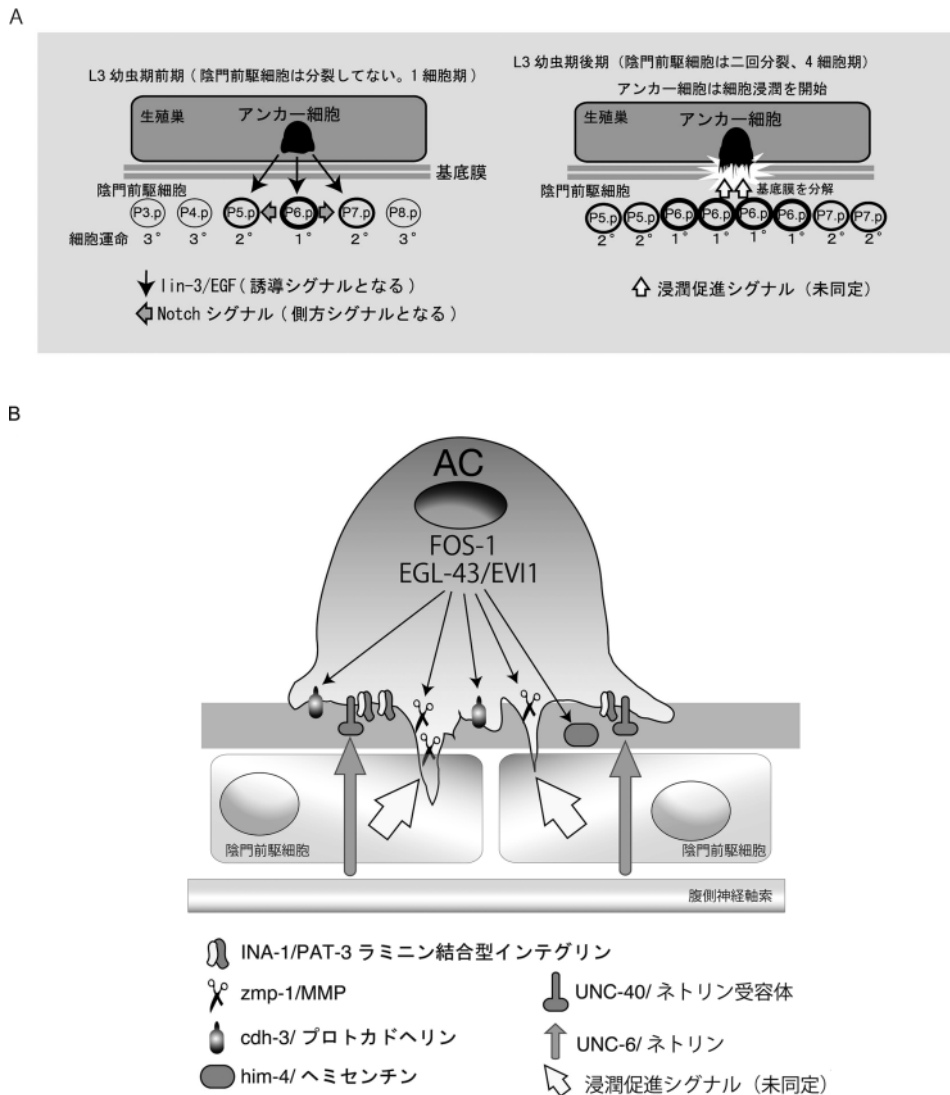


図4 アンカー細胞浸潤の模式図

(A) L3 幼虫期にアンカー細胞 (AC) は陰門前駆細胞の分裂パターンと同調して浸潤を開始する。(B) 現在までに報告されているアンカー細胞 (AC) の浸潤を制御する細胞外因子と細胞自律的な分子機構。

前駆細胞が、二回の分裂を経て4細胞になる時期に、浸潤方向に浸潤突起を形成して浸潤を開始する(図4A)。この1°の運命をもつ陰門前駆細胞は、細胞浸潤を引き寄せる何らかのシグナルを送っていることが明らかになっている。浸潤はほぼ90分で終了するが、細胞自律的な機構と細胞外因子による制御機構が知られている。

## 2) 転写因子による制御

アンカー細胞の浸潤を制御する転写因子の最初の報告は、ロイシンジッパー型転写因子であるFOSの線虫ホモログである*fos-1* 遺伝子である<sup>77)</sup>。FOSタンパク質は様々ながんが高発現していることが知られている。*fos-1* 変異体では、アンカー細胞が浸潤突起を形成するために必要な極性化プロセスは正常であるが、形成された浸潤突起には、基底膜を分解、除去する能力が欠けており、ほぼ全ての個体で浸潤は起こらない。*fos-1* の下流因子として*egl-43/Evi-1*、*cdh-3*/プロトカドヘリン、*him-4*/ヘミセンチン、*zmp-1*/MMPが明らかになっている(図4B)。

## 3) ネットリンとインテグリンの役割

浸潤は細胞自律的なプログラム以外に、細胞外からの因子によっても制御されていることが知られている。アンカー細胞の浸潤を制御する細胞外因子として*unc-6*/ネトリンが同定されている<sup>75)</sup>。UNC-6/ネトリンは、浸潤開始の数時間前に腹側にある神経軸索で発現し始め、分泌されたUNC-6/ネトリンは基底膜を越えて、アンカー細胞に作用してUNC-40/ネトリン受容体を浸潤方向に(基底膜側)局在化させる(図4B)。この局在化にはラミニン結合型のインテグリンである*ina-1*/αサブユニットと*pat-3*/βサブユニットが必要である。インテグリンINA-1/PAT-3のヘテロ二量体は、ネトリン受容体以外にもF-アクチン、リン脂質であるPIP<sub>2</sub>、RACタンパク質であるMIG-2とCED-10、Ena/VASPのホモログであるUNC-34を浸潤方向の細胞膜に局在化させる働きを持つ<sup>76)</sup>。浸潤方向に上記のタンパク質群が局在化したアンカー細胞は、陰門前駆細胞から分泌されるもう一つの細胞外シグナル(未同定)に応答して、浸潤突起を形成する(図4B)。この浸潤突起に浸潤能(基底膜分解能)をもたらすのは、FOS-1転写因子によって制御されている細胞自律的なプログラムである。その一つがZMP-1/MMPであるが、変異体の解析により、他の分子(未同定)も基底膜の分解に関与していることがわかっている。

## 6. 基底膜上の穴の大きさを制御する分子機構

細胞浸潤に特徴的な現象は、基底膜に穴を開けることである。浸潤細胞が穴を開ける際には、前述した浸潤突起の形成や基底膜の分解などを行うが、開けられた穴のサイズ

がどのように制御されているのか、全く解析されていなかった。我々は浸潤時に観察される基底膜の穴のサイズが、複数のメカニズムによって制御されていることを明らかにした<sup>79)</sup>。

### 1) 細胞は協調性をもって穴の大きさを管理する

陰門前駆細胞が4細胞期になると、アンカー細胞は浸潤を開始する。この時期に観察される基底膜上の穴は浸潤細胞の直径よりも小さいが、8細胞期には、アンカー細胞の直径よりも大きくなる(図5A)。穴の拡大はすべての個体で同じように観察される。我々はレーザーによる細胞破壊実験と変異体を用いた解析により、穴の大きさの制御に関わる個々の細胞の働きを同定した。浸潤が開始されるおよそ2時間前程度にレーザー照射によりアンカー細胞を取り除くと(この時期にはアンカー細胞による陰門前駆細胞の運命決定は終了している)、穴は全く観察されない。しかし、一度基底膜上に穴ができるとアンカー細胞を除去しても、観察される穴の大きさは、野生型と殆ど同じサイズである。この観察結果は、アンカー細胞のみが穴を開けることができるが、穴の拡大には、アンカー細胞は必要ではなく、他の細胞が担っていることを示唆している。さらに陰門前駆細胞が分裂しない変異体を用いた解析により、これらの細胞の分裂及び背側方向への移動が穴の拡大に重要なこと、そして将来子宮になる細胞は穴のサイズを一定の大きさに保つ役割を持っていることが明らかになった(図5B, C)。

### 2) 基底膜の移動が穴の拡大に必要である

基底膜上に観察される穴は、4細胞期から8細胞期にかけて約3倍程度大きくなる。基底膜が種々のタンパク質分解酵素によって分解されることから、穴の拡大の際には基底膜分解が起こることが予想された。基底膜分解を測定するために光転換型蛍光タンパク質Dendraを用いた解析を行った。Dendraは405 nmの波長によって、緑色から赤色へと蛍光特性が変化する<sup>80)</sup>。基底膜の主要構成成分のラミニンとIV型コラーゲンをDendraで可視化後、赤色変換を行い、赤色蛍光の減衰量を測定して基底膜の分解及び移動方向を測定した。解析の結果、最初に想定した予想とは異なり、基底膜の分解は殆ど観察されず、基底膜が移動することにより穴が拡大することが明らかになった。さらにラミニンを緑色蛍光タンパク質(GFP)で可視化後、FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching)実験を行い、穴の境界付近の基底膜代謝を測定した。その結果、顕著な基底膜合成の低下は観察されなかった。DendraとFRAPによる解析結果より、穴の拡大時には基底膜の分解も合成の低下も起こっておらず、基底膜が移動することによって、拡大していることが明らかになった(図5A, B)。

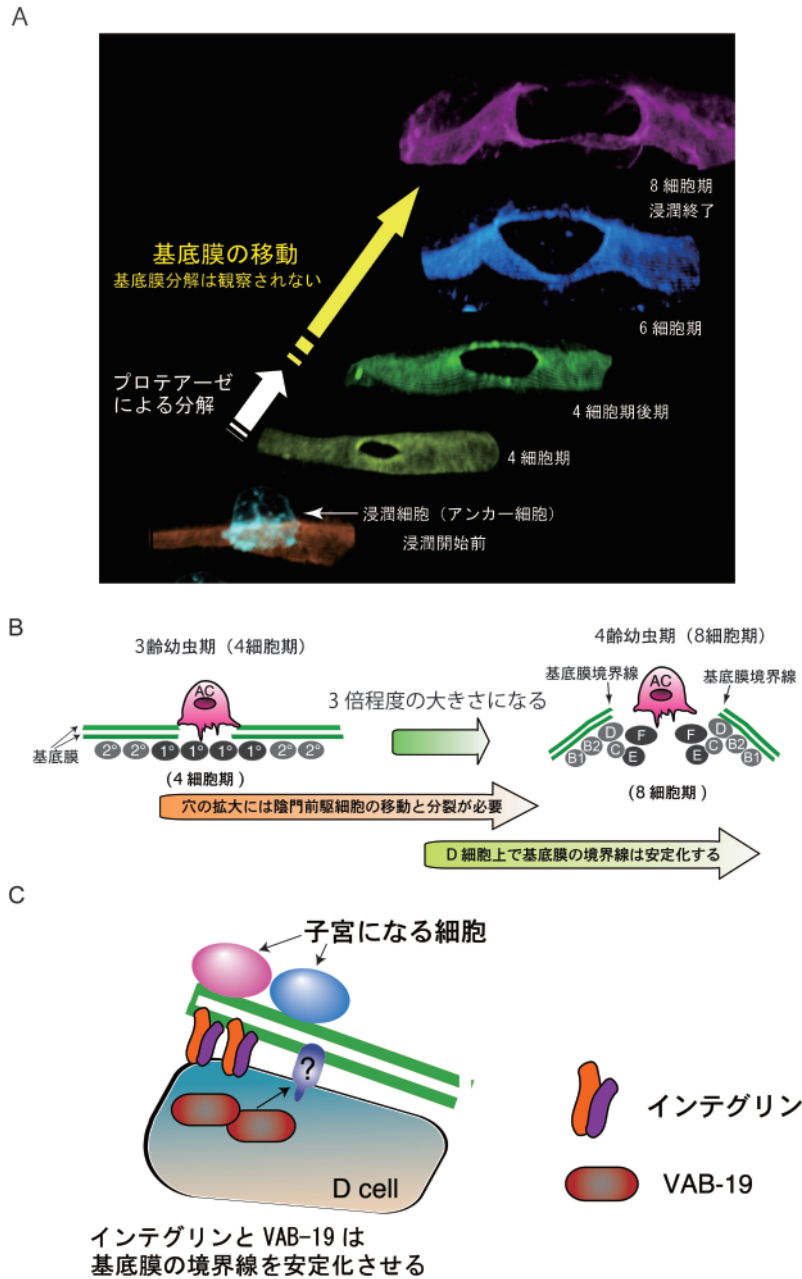


図5 穴のサイズを制御する分子機構

(A) 基底膜の三次元構築像. 4細胞期から8細胞期にかけて穴は拡大する.  
 (B) 基底膜に観察される穴のサイズの調節機構. 基底膜の境界線はD細胞に結合する.  
 (C) D細胞の拡大図. D細胞で発現するインテグリンとVAB-19は、穴のサイズが安定化する時期になると、基底膜直下に強く局在化する.

### 3) 複数の分子による穴のサイズの制御機構

基底膜の境界線は、8細胞期には2°の運命を持つ陰門前駆細胞の子孫であるD細胞と呼ばれる細胞上に移動する(図5B). それを指標にしてスクリーニングを行った. その結果、インテグリンのαサブユニットをコードしている *ina-1* 変異体で、低頻度ではあるものの穴のサイズが異常に拡大することを見いだした(13%程度). 次に生体内でのインテグリンの局在を観察したところ、インテグリン

が穴の境界線付近の細胞(D細胞)に強く局在化することが明らかになった. またD細胞のインテグリンの機能を阻害すると、穴のサイズの異常が観察されることから、インテグリンがD細胞において穴のサイズを制御していることが明らかになった(図5C).

次に上皮や産卵口での発現が報告されている遺伝子群に注目した. その一つ、*vab-19*<sup>(81)</sup>と呼ばれる遺伝子(哺乳類のがん抑制遺伝子として知られる *kank*<sup>(82)</sup>の相同遺伝子)が、

陰門前駆細胞でインテグリンと同様に基底膜との境界線付近に強く局在化すること、そしてその変異体でも *ina-1* 変異体と同様に、低頻度 (8% 程度) の穴のサイズの異常が観察された。さらにこれらの変異体を用いて、陰門前駆細胞とは基底膜を挟んで反対側にある将来子宮を作り出す細胞の破壊実験を行うと、穴のサイズに高頻度 (60~80% 程度) の異常が見られた。これらの結果より、少なくとも三つの独立した経路、すなわち陰門前駆細胞に存在するインテグリン経路、VAB-19 経路、そして将来子宮になる細胞からの制御 (分子機構は不明) が存在することが示され、この3経路によって穴のサイズが制御されていることが明らかになった (図 5C)<sup>79)</sup>。

## 7. おわりに

本総説では、モデル生物である線虫 *C. elegans* を用いた研究によって明らかになった細胞移動、浸潤の分子機構を取り上げた。細胞は種々の細胞外シグナルと細胞自律的な分子機構を統合して、移動・浸潤を実行している。多段階のステップを経る細胞移動・浸潤過程の理解のためには、モデル生物を用いた方法はメリットがあるといえるだろう。反面、モデル生物特有の現象に陥ってしまう危険性もあり、他のモデル生物による比較やヒト培養細胞を用いた解析等を行うなどして、実験事実を慎重に解釈する必要がある。そのような先駆的研究も行われており、線虫で同定された細胞浸潤に関わる種々の遺伝子が、脊椎動物でも保存され、機能していることが明らかになっている<sup>83)</sup>。最近我々は、基底膜制御に関わる新規遺伝子を同定したが、その遺伝子変異がてんかんや精神遅延、顔貌などに異常を示すある種の遺伝病を引き起こす遺伝子と同一であることが明らかになった (未発表)。1ミリ程度の小さな線虫であるが、細胞移動・浸潤のみならず、基底膜制御に関しても多細胞生物で普遍的な分子機構を有しているのかもしれない。今後は、ヒト培養細胞とモデル生物を用いた解析を組み合わせ、それらの分子機構を解明していきたいと考えている。

## 謝辞

本稿で紹介した筆者の研究は、理化学研究所発生・再生科学総合研究センター、細胞移動研究チーム (西脇清二チームリーダー、現在は関西学院大学教授) の研究室で開始したものです。また細胞浸潤の解析は米国 Duke 大学生物学科の Dr. David R. Sherwood と一緒に行ったものです。

学生の頃より様々な局面で、ご指導とご助言をいただきました大阪大学大学院医学系研究科生化学教室、谷口直之教授 (現在は理化学研究所グループディレクター) に心より感謝申し上げます。また同教室の三善英知先生 (現在は大阪大学大学院医学系研究科教授) には、根気よく大学院

生時代の不器用な私に実験を教えて頂きました。現在所属している国立遺伝学研究所多細胞構築研究室、澤斉教授には、研究テーマについて常に encourage して頂き、そして自由に研究をさせて頂いていることに、深く御礼申し上げます。これまで支えて頂いた多くの共同研究者の方々にこの場をお借りして、深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Hughes, S.M. & Blau, H.M. (1990) *Nature*, **345**, 350-353.
- 2) Sato, Y., Higuchi, T., Yoshioka, S., Tatsumi, K., Fujiwara, H., & Fujii, S. (2003) *Development*, **130**, 5519-5532.
- 3) Nakaya, Y., Sukowati, E.W., Wu, Y., & Sheng, G. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 765-775.
- 4) Madsen, C.D. & Sahai, E. (2010) *Dev. Cell*, **19**, 13-26.
- 5) Nourshargh, S., Hordijk, P.L., & Sixt, M. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 366-378.
- 6) Rowe, R.G. & Weiss, S.J. (2008) *Trends Cell Biol.*, **18**, 560-574.
- 7) Timpl, R. & Brown, J.C. (1996) *Bio Essays*, **18**, 123-132.
- 8) Even-Ram, S. & Yamada, K.M. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 524-532.
- 9) Hutter, H., Vogel, B.E., Plenefisch, J.D., Norris, C.R., Proenca, R.B., Spieth, J., Guo, C., Mastwal, S., Zhu, X., Scheel, J., & Hedgecock, E.M. (2000) *Science*, **287**, 989-994.
- 10) Candiello, J., Balasubramani, M., Schreiber, E.M., Cole, G.J., Mayer, U., Halfter, W., & Lin, H. (2007) *FEBS J.*, **274**, 2897-2908.
- 11) Hotary, K., Li, X.Y., Allen, E., Stevens, S.L., & Weiss, S.J. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 2673-2686.
- 12) Sabeh, F., Ota, I., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Soloway, P., Balbin, M., Lopez-Otin, C., Shapiro, S., Inada, M., Krane, S., Allen, E., Chung, D., & Weiss, S.J. (2004) *J. Cell Biol.*, **167**, 769-781.
- 13) Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) *Cell*, **100**, 57-70.
- 14) Chambers, A.F., Groom, A.C., & MacDonald, I.C. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 563-572.
- 15) Sherwood, D.R. & Sternberg, P.W. (2003) *Dev. Cell*, **5**, 21-31.
- 16) Metzger, R.J. & Krasnow, M.A. (1999) *Science*, **284**, 1635-1639.
- 17) Gleeson, J.G. & Walsh, C.A. (2000) *Trends Neurosci.*, **23**, 352-359.
- 18) Kimble, J. & Hirsh, D. (1979) *Dev. Biol.*, **70**, 396-417.
- 19) Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., & Thomson, J.N. (1983) *Dev. Biol.*, **100**, 64-119.
- 20) Sulston, J.E. & Horvitz, H.R. (1977) *Dev. Biol.*, **56**, 110-156.
- 21) Stern, M.J. & Horvitz, H.R. (1991) *Development*, **113**, 797-803.
- 22) Thomas, J.H., Stern, M.J., & Horvitz, H.R. (1990) *Cell*, **62**, 1041-1052.
- 23) DeVore, D.L., Horvitz, H.R., & Stern, M.J. (1995) *Cell*, **83**, 611-620.
- 24) Burdine, R.D., Chen, E.B., Kwok, S.F., & Stern, M.J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2433-2437.
- 25) Burdine, R.D., Branda, C.S., & Stern, M.J. (1998) *Development*, **125**, 1083-1093.
- 26) Branda, C.S. & Stern, M.J. (2000) *Dev. Biol.*, **226**, 137-151.
- 27) Kokel, M., Borland, C.Z., DeLong, L., Horvitz, H.R., & Stern,

- M.J. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 1425–1437.
- 28) Maloof, J.N., Whangbo, J., Harris, J.M., Jongeward, G.D., & Kenyon, C. (1999) *Development*, **126**, 37–49.
- 29) Salser, S.J. & Kenyon, C. (1992) *Nature*, **355**, 255–258.
- 30) Whangbo, J. & Kenyon, C. (1999) *Mol. Cell*, **4**, 851–858.
- 31) Zinovyeva, A.Y., Yamamoto, Y., Sawa, H., & Forrester, W.C. (2008) *Genetics*, **179**, 1357–1371.
- 32) Middelkoop, T.C., Williams, L., Yang, P.T., Luchtenberg, J., Betist, M.C., Ji, N., van Oudenaarden, A., Kenyon, C., & Korswagen, H.C. (2012) *Dev. Biol.*, **361**, 338–348.
- 33) Harterink, M., Kim, D.H., Middelkoop, T.C., Doan, T.D., van Oudenaarden, A., & Korswagen, H.C. (2011) *Development*, **138**, 2915–2924.
- 34) Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., & Hedgecock, E.M. (1992) *Neuron*, **9**, 873–881.
- 35) Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., & Tessier-Lavigne, M. (1994) *Cell*, **78**, 409–424.
- 36) Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., & Hall, D.H. (1990) *Neuron*, **4**, 61–85.
- 37) Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G., & Tessier-Lavigne, M. (1996) *Cell*, **87**, 175–185.
- 38) Chan, S.S., Zheng, H., Su, M.W., Wilk, R., Killeen, M.T., Hedgecock, E.M., & Culotti, J.G. (1996) *Cell*, **87**, 187–195.
- 39) Leung-Hagesteijn, C., Spence, A.M., Stern, B.D., Zhou, Y., Su, M.W., Hedgecock, E.M., & Culotti, J.G. (1992) *Cell*, **71**, 289–299.
- 40) Wadsworth, W.G., Bhatt, H., & Hedgecock, E.M. (1996) *Neuron*, **16**, 35–46.
- 41) Merz, D.C., Zheng, H., Killeen, M.T., Krizus, A., & Culotti, J.G. (2001) *Genetics*, **158**, 1071–1080.
- 42) Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., & Stein, E. (1999) *Cell*, **97**, 927–941.
- 43) Su, M., Merz, D.C., Killeen, M.T., Zhou, Y., Zheng, H., Kramer, J.M., Hedgecock, E.M., & Culotti, J.G. (2000) *Development*, **127**, 585–594.
- 44) Itoh, B., Hirose, T., Takata, N., Nishiwaki, K., Koga, M., Ohshima, Y., & Okada, M. (2005) *Development*, **132**, 5161–5172.
- 45) Lee, J., Li, W., & Guan, K.L. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 6485–6495.
- 46) MacNeil, L.T., Hardy, W.R., Pawson, T., Wrana, J.L., & Culotti, J.G. (2009) *Nat. Neurosci.*, **12**, 150–155.
- 47) Colavita, A., Krishna, S., Zheng, H., Padgett, R.W., & Culotti, J.G. (1998) *Science*, **281**, 706–709.
- 48) Hao, J.C., Yu, T.W., Fujisawa, K., Culotti, J.G., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Moulder, G., Barstead, R., Tessier-Lavigne, M., & Bargmann, C.I. (2001) *Neuron*, **32**, 25–38.
- 49) Kim, H.S., Murakami, R., Quintin, S., Mori, M., Ohkura, K., Tamai, K.K., Labouesse, M., Sakamoto, H., & Nishiwaki, K. (2011) *Development*, **138**, 4013–4023.
- 50) Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A., & Fuchs, E. (2003) *Cell*, **115**, 343–354.
- 51) Kramer, J.M. (2005) *WormBook*, 1–15.
- 52) Rogalski, T.M., Williams, B.D., Mullen, G.P., & Moerman, D.G. (1993) *Genes Dev.*, **7**, 1471–1484.
- 53) Rogalski, T.M., Gilchrist, E.J., Mullen, G.P., & Moerman, D.G. (1995) *Genetics*, **139**, 159–169.
- 54) Merz, D.C., Alves, G., Kawano, T., Zheng, H., & Culotti, J.G. (2003) *Dev. Biol.*, **256**, 173–186.
- 55) Minniti, A.N., Labarca, M., Hurtado, C., & Brandan, E. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 5179–5190.
- 56) Rhiner, C., Gysi, S., Frohli, E., Hengartner, M.O., & Hajnal, A. (2005) *Development*, **132**, 4621–4633.
- 57) Schwabiuk, M., Coudiere, L., & Merz, D.C. (2009) *Dev. Biol.*, **334**, 235–242.
- 58) Baum, P.D. & Garriga, G. (1997) *Neuron*, **19**, 51–62.
- 59) Williams, B.D. & Waterston, R.H. (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 475–490.
- 60) Lee, M., Cram, E.J., Shen, B., & Schwarzbauer, J.E. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 36404–36410.
- 61) Meighan, C.M. & Schwarzbauer, J.E. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 1615–1620.
- 62) Tortorella, M.D., Burn, T.C., Pratta, M.A., Abbaszade, I., Hollis, J.M., Liu, R., Rosenfeld, S.A., Copeland, R.A., Decicco, C.P., Wynn, R., Rockwell, A., Yang, F., Duke, J.L., Solomon, K., George, H., Bruckner, R., Nagase, H., Itoh, Y., Ellis, D.M., Ross, H., Wiswall, B.H., Murphy, K., Hillman, M.C., Jr., Hollis, G.F., Newton, R.C., Magolda, R.L., Trzaskos, J.M., & Arner, E.C. (1999) *Science*, **284**, 1664–1666.
- 63) Nishiwaki, K., Hisamoto, N., & Matsumoto, K. (2000) *Science*, **288**, 2205–2208.
- 64) Belloch, R. & Kimble, J. (1999) *Nature*, **399**, 586–590.
- 65) Ihara, S. & Nishiwaki, K. (2007) *EMBO J.*, **26**, 2607–2620.
- 66) 菊地哲宏, 久保田幸彦, 伊原伸治, 西脇清二 (2010) 生化学, **82**, 957–962.
- 67) Nishiwaki, K., Kubota, Y., Chigira, Y., Roy, S.K., Suzuki, M., Schvarzstein, M., Jigami, Y., Hisamoto, N., & Matsumoto, K. (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 31–37.
- 68) Kubota, Y., Ohkura, K., Tamai, K.K., Nagata, K., & Nishiwaki, K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20804–20809.
- 69) Kubota, Y., Kuroki, R., & Nishiwaki, K. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 2011–2018.
- 70) Ihara, S. & Nishiwaki, K. (2008) *FEBS J.*, **275**, 4296–4305.
- 71) Ulbrich, H., Eriksson, E.E., & Lindbom, L. (2003) *Trends Pharmacol. Sci.*, **24**, 640–647.
- 72) Schoumacher, M., Goldman, R.D., Louvard, D., & Vignjevic, D.M. (2010) *J. Cell Biol.*, **189**, 541–556.
- 73) Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., & Condeelis, J. (2005) *J. Cell Biol.*, **168**, 441–452.
- 74) Sherwood, D.R. (2006) *Trends Cell Biol.*, **16**, 250–256.
- 75) Ziel, J.W., Hagedorn, E.J., Audhya, A., & Sherwood, D.R. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 183–189.
- 76) Hagedorn, E.J., Yashiro, H., Ziel, J.W., Ihara, S., Wang, Z., & Sherwood, D.R. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 187–198.
- 77) Sherwood, D.R., Butler, J.A., Kramer, J.M., & Sternberg, P.W. (2005) *Cell*, **121**, 951–962.
- 78) Sternberg, P.W. (2005) *WormBook*, 1–28.
- 79) Ihara, S., Hagedorn, E.J., Morrissey, M.A., Chi, Q., Motegi, F., Kramer, J.M., & Sherwood, D.R. (2011) *Nat. Cell Biol.*, **13**, 641–651.
- 80) Gurskaya, N.G., Verkhusha, V.V., Shcheglov, A.S., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Fradkov, A.F., Lukyanov, S., & Lukyanov, K.A. (2006) *Nat. Biotechnol.*, **24**, 461–465.
- 81) Ding, M., Goncharov, A., Jin, Y., & Chisholm, A.D. (2003) *Development*, **130**, 5791–5801.
- 82) Sarkar, S., Roy, B.C., Hatano, N., Aoyagi, T., Gohji, K., & Kiyama, R. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 36585–36591.
- 83) Matus, D.Q., Li, X.Y., Durbin, S., Agarwal, D., Chi, Q., Weiss, S.J., & Sherwood, D.R. (2010) *Sci. Signal.*, **3**, ra35.