

哺乳類における細胞分裂軸の制御機構

豊島 文子

哺乳類の様々な組織では、細胞分裂の軸方向を変えることで、細胞分化や組織構築が制御されている。これまで細胞分裂軸制御機構についての研究は、酵母、ハエ、線虫を中心に進められてきた。しかし哺乳類においては解析が困難であるため、その分子機構の解明は立遅れてきた。近年、マウスでの個体レベルの解析に加え、哺乳類培養細胞を用いた細胞分裂軸解析法が確立され、哺乳類での新しいシグナル伝達機構の存在が明らかとなりつつある。本稿では、哺乳類で見られる方向性のある細胞分裂とその生理学的意義を明らかにした最近の研究動向に加え、培養細胞を用いた分裂軸解析法を紹介する。最後に、筆者らが行った分裂軸制御因子のゲノムワイドスクリーニングと新規分裂軸制御因子として同定した ABL1 の機能について論じたい。

1. はじめに

細胞がある決められた軸に沿って分裂する現象は、線虫やハエをはじめとする様々なモデル生物で観察され、非対称分裂や幹細胞の自己複製能の維持、組織形成、個体発生に重要な役割を果たしている。細胞分裂軸すなわち紡錘体軸の方向は、様々な内的・外的要因によって制御される。これまでに報告されている要因としては、「細胞の形」「細胞極性」「細胞-細胞間接着」「細胞-細胞外基質接着」の四つが挙げられる(図1)。細胞は周囲の環境や分化段階に従ってこれらの要因を使い分けることで、その場に適切な分裂軸方向を決めている。線虫受精卵やハエ神経幹細胞などで見られる非対称分裂においては、分裂軸を決めるメカニズムについて多くの研究がなされ、詳細な分子機構が明らかとなりつつある^{1,2)}。特に、三量体Gタンパク質Gα-LGN-NuMAからなるタンパク質複合体は、細胞表層の分裂軸決定要因と紡錘体から伸びる星状体微小管をつなぐ、

進化的に保存された分子機構として確立されている(図2)¹⁻³⁾。最近、哺乳類においても様々な組織で分裂軸に方向性があることが分かってきた。また、分裂軸の異常は多嚢胞腎症や腫瘍形成などの疾患に関与することも報告されている。しかし組織内での解析が技術的に困難であるため、その分子機構には不明な点が多い。このため、培養細胞を用いた分裂軸解析系の確立が必要と考えられてきた。本稿では、哺乳類組織での細胞分裂軸に関する近年の関連分野の進捗と合わせて、現在までに確立されている培養細胞を用いた分裂軸解析方法、ならびに最近筆者らが培養細胞系を用いて行ったゲノムワイドスクリーニングによる新規分裂軸制御因子の同定とその機能解析について概説する。

2. 哺乳類組織で見られる細胞分裂軸の方向性

分裂軸の研究はこれまで出芽酵母、線虫、ハエを中心に進められてきており、哺乳類では神経幹細胞など一部の組織以外では解析が立遅れていた。しかし、2005年頃から様々な組織で方向性のある細胞分裂が相次いで報告され、その生理学的意義の重要性が認識されつつある(表1)。このうち最近飛躍的に研究が発展しつつある、皮膚、腸、腎臓について以下に紹介する。

(1) 皮膚における細胞分裂軸

皮膚は、体液の蒸発を防ぎ紫外線や病原体感染などの

京都大学ウイルス研究所 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53)

Mechanisms for the oriented cell division in mammalian cells

Fumiko Toyoshima (Department of Cell Biology, Laboratory of Subcellular Biogenesis, Institute for Virus Research, Kyoto University, Shogoin-kawaharachou 53, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan)

本総説は2010年度奨励賞を受賞した。

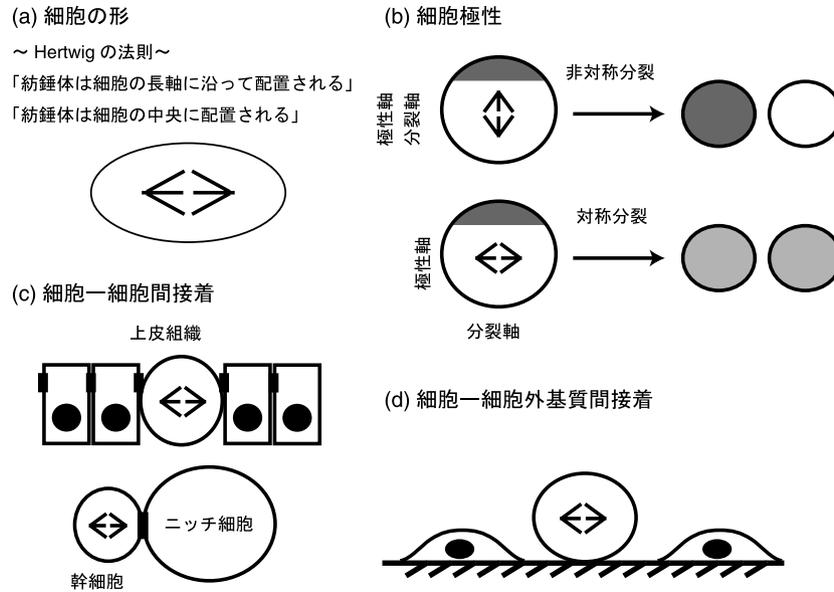


図1 分裂軸を決める四つの要因

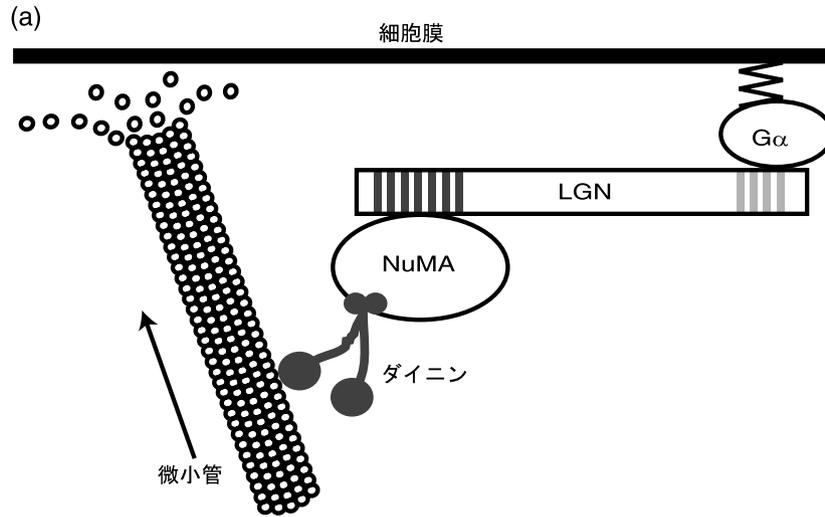
(a) 「細胞の形」による紡錘体軸の制御は Hertwig の法則として知られ、細胞の長軸に沿って細胞の中央に紡錘体を配置する現象である。(b) 「細胞極性」による紡錘体軸の制御は極性を持つ細胞で見られる。極性軸と紡錘体軸が一致する場合は非対称分裂、直交する場合は対称分裂となる。(c) 「細胞-細胞間接着」による紡錘体軸の制御は、上皮細胞（ハエ神経上皮細胞など）やニッチ細胞に接着した幹細胞（ハエ精子幹細胞など）の分裂で見られる。細胞-細胞間接着因子カテニンや APC などが関与する。(d) 「細胞-細胞外基質」による紡錘体軸の制御は、HeLa 細胞などの細胞-細胞間接着の弱い接着細胞でも見られる。

様々な外界刺激から体を保護するバリア機能を果たす。皮膚は外側から表皮、真皮、皮下組織の3層からなり、表皮と真皮の間は基底膜によって仕切られている。表皮の細胞は新陳代謝を繰り返し、古くなった角質がはがれ、内側から新しい細胞が供給されることにより組織の恒常性が維持される。表皮は、角質層、顆粒層、有棘層、基底層からなる重層構造をしており、このうち高い増殖能を有するのは基底膜に接する一層の細胞層からなる基底層の細胞である(図3)。

2005年 Fuchs らは、マウス胎児の皮膚基底細胞が基底膜に対して平行あるいは垂直に分裂することを報告した¹¹⁾。前者は対称分裂であり、二つの娘細胞は共に増殖能を維持して上皮シートの拡大に寄与する。後者は非対称分裂であり、基底膜から解離した娘細胞は増殖を停止し段階的に分化することで重層構造の形成に寄与する(図3)。興味深いことに、平行分裂と垂直分裂の割合は胎児の発生段階に従って変化する。皮膚形成過程の初期(E12.5)では平行分裂が多いが、発生が進むと(E16.5~E18.5)垂直分裂の割合が多くなる。このことは、組織形成過程の各段階において分裂軸を制御する分子メカニズムが変化することを示唆している。彼らは、非対称分裂の分裂軸を決める進化的に保存された制御因子である *Inscuteable* (*Insc*)、LGN、NuMA が基底細胞の非対称分裂(垂直分裂)にお

いて、細胞の apical 表層に局在することを報告した。さらに、細胞-基質間接着因子インテグリンや細胞-細胞間接着因子カテニンのノックアウトマウスでは、LGN が細胞表層上でランダムに局在し分裂軸も異常になることから、細胞-細胞外基質間接着と細胞-細胞間接着が LGN の apical 局在を規定し、垂直分裂を決定することを提唱した¹¹⁾。その後の研究で、レンチウイルスを用いた RNAi により LGN をノックダウンした皮膚基底細胞では、垂直分裂が抑制されほとんどの細胞が平行分裂すること、また基底細胞の分化や表皮の重層構造の形成が著しく抑制され、バリア機能も獲得できないことが分かった¹²⁾。これらのことから、基底細胞の非対称分裂では LGN が apical 側に局在することで分裂軸を垂直に保ち、これが皮膚の分化と重層化に必要なことが提唱された。

しかしながら、基底細胞では LGN に依存しない分裂軸制御機構も存在するようである。Lechler らは、基底細胞の対称分裂(平行分裂)においても LGN は apical 側に局在すること、すなわち平行分裂では LGN の極性軸と紡錘体軸が直交することを報告した¹³⁾。また、上記のように、LGN をノックダウンした皮膚では、分裂軸はランダムになるのではなく、ほとんどが平行分裂にシフトする¹²⁾。おそらく、平行分裂を制御する LGN 非依存的な分子機構が存在するのだろう。興味深いことに、平行分裂においては



(b)

	線虫	ハエ	哺乳類
	GOA1, GPA16	Gα i/o	Gα i/o
	GPR1, GPR2	Pins	LGN/AGS3
	LIN5	Mud	NuMA

図2 進化的に保存された紡錘体軸制御複合体

(a) LGNはC末端側のGoLocoモチーフ(薄灰色)とN末端側のTPRモチーフ(濃灰色)を介してGαとNuMAの両方にそれぞれ結合する。Gαによって細胞表層にアンカーされたLGN-NuMA複合体は、ダイニンを介して微小管と相互作用する。微小管の脱重合とダイニンのモーター活性により、微小管を牽引する力が生じると考えられている。

(b) Gα-LGN-NuMA複合体は線虫、ハエ、哺乳類まで進化的に保存されている。

表1 哺乳類組織で報告された分裂軸の方向性

器官	組織・細胞	分裂軸の方向	参考文献
前脳	神経幹細胞	神経上皮層に対して平行	4 他多数
乳腺	上皮細胞	基底膜に対して平行	5
脾臓	T細胞	抗原提示細胞との接着面に対して垂直	6
筋肉	サテライト細胞	筋繊維の基底膜に対して平行/垂直	7
心臓	心外膜細胞	基底膜に対して平行/垂直	8
肺	肺上皮細胞	気道の長軸に対して平行	9
		基底膜に対して垂直	10
皮膚	基底上皮細胞	基底膜に対して平行/垂直	11, 12, 13
小腸	腸陰窩上皮細胞	基底膜に対して平行	14, 15, 16
腎臓	尿細管上皮細胞	尿細管の長軸に対して平行	18, 19, 20

マウス、ラットの各組織において、現在までに報告された細胞分裂軸の方向性。神経幹細胞の研究は歴史が長く、文献4以外にも多数の文献がある。

NuMAがapical表層に局在しないことが報告されている¹³⁾。垂直分裂と平行分裂の振り分けは、NuMAの表層局在で決まるのかもしれない。発生段階に従った分裂パターンの振り分け機構の解明が今後の課題と思われる。

(2) 小腸における細胞分裂軸

小腸の管腔表面は多くの絨毛で被われ、栄養分の吸収にあずかる表面積を約10倍に広げている。絨毛と絨毛の間

には陰窩(腸腺)と呼ばれる上皮の落ち込んだ部分が存在する。絨毛や陰窩の表面は単層の円柱上皮細胞で被われている。陰窩の深部には幹細胞が存在し、中層部には分化に向かう途中の高い増殖能を維持した細胞群が存在する。この部分で増殖した細胞は5~7日間で絨毛の先端に到達し、剥脱すると考えられている。

2007年、KaplanとTirnauerらは、腸管上皮細胞の分裂軸が腸管上皮層に対して平行であることを報告した^{14,15)}。

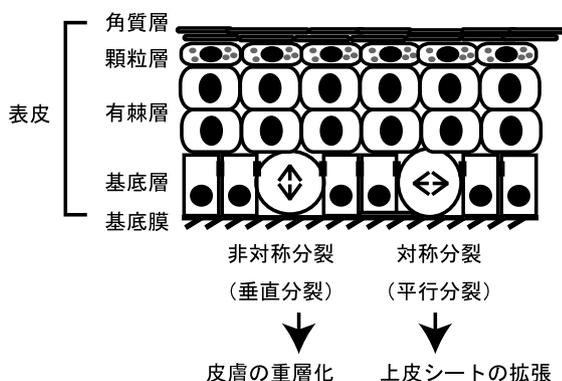


図3 皮膚表皮の組織構造と細胞分裂軸

皮膚表皮は、角質層、顆粒層、有棘層、基底層からなる重層構造をしており、このうち基底細胞が分裂能を有する。基底細胞は基底膜に対して平行あるいは垂直に分裂する。前者は対称分裂であり、二つの娘細胞は共に基底膜に接して増殖能を維持し、上皮シートの拡大に寄与する。後者は非対称分裂であり、基底膜から解離した娘細胞は増殖を停止し段階的に分化することで重層構造の形成に寄与する。

一方、家族性大腸線腫症の原因遺伝子である APC (adenomatous polyposis coli) に人為的に変異を導入したマウス (Multiple Intestinal Neoplasia マウス, 以下 APC^{min/+}マウス) では、腸管上皮細胞の分裂軸が異常になり、ランダムな方向に分裂した^{14,16}。APC は微小管プラス端結合因子である EB1 を介して微小管と結合し、紡錘体の形成や配置を制御することが知られている。Tirnauer らは、APC^{min/+}マウスの腸管上皮細胞では、紡錘体は形成されるが、紡錘体から延びる星状体微小管が細胞表層に接していないと報告している¹⁶。微小管のダイナミクスについてはより詳細な解析が必要であるが、APC が星状体微小管と細胞表層の接着を介して、腸管上皮細胞の分裂軸を決めると考えられる。

では、APC^{min/+}マウスで見られる分裂軸の異常は、家族性大腸線腫症でおこるポリープやがんの発症と関係があるのだろうか？ Kaplan と Tirnauer らはそれぞれ別の仮説を提唱している。Kaplan らは、紡錘体の細胞内での配置が不安定になることで細胞質分裂の異常が生じ、その結果 4 倍体や多数体の細胞が出現し、これが癌の特徴である染色体不安定性を引き起こすと主張している。一方、Tirnauer らは、上皮細胞が腸管上皮に対して垂直に分裂すると、陰窩の外側に異常な陰窩が余分に形成され、組織全体の構造異常さらには腫瘍形成を促進すると述べている。最近、Näthke らは、陰窩の深部に存在する幹細胞は、上記の増殖細胞とは異なり、腸管上皮層に対して垂直に分裂することを報告した¹⁷。また、この分裂は非対称分裂であり、古い DNA 鎖が幹細胞に残るという Immortal strand hypothesis に従った分裂様式であることを示した。さらに APC^{min/+}マウスでは、この幹細胞の分裂軸と非対称分裂に

異常が生じることから、APC の変異によるがん化は、腸管幹細胞の分裂軸異常を起因とする幹細胞の変異が原因であることを提唱した¹⁷。これらの報告はいずれも APC 変異により誘導される細胞がん化や腫瘍は、分裂軸の異常が原因であることを主張するものであり、がんの研究分野に新しい方向性を示すものである。

(3) 腎臓における細胞分裂軸

腎臓における分裂軸制御機構の存在は、多嚢胞腎症のモデルラットでの解析から明らかとなった。多嚢胞腎症 (polycystic kidney diseases; PKD) は腎臓に多数の嚢胞が生じて腎不全となる遺伝性疾患であり、常染色体優性多嚢胞腎症と常染色体劣性多嚢胞腎症に分類される。前者は多くが成人期に疾患を呈し、後者は幼年期に発症する。いずれも腎臓内での嚢胞 (シスト) 形成と尿細管の拡張を特徴とし、原因遺伝子として前者は PKD1 と PKD2、後者は PKHD1 が同定されているが、その発症機構は不明であった。

Pontoglio らは、尿細管を構成する細胞が尿細管の長軸に対して平行に分裂することを見出した¹⁸。PKD2 や PKHD1 の発現に必須の転写因子 HNF1β を腎臓特異的にノックアウトしたところ、尿細管の長軸に対して垂直に分裂する細胞が増加することを発見した。同様の現象は、PKHD1 に変異を持つ *pck* ラットでも観察された。この分裂軸の異常は、尿細管の拡張や嚢胞形成よりも前に認められるため、2 次的な影響ではないといえる。これらのことから、多嚢胞腎で見られる尿細管の拡張や嚢胞形成は、尿細管細胞の分裂軸の異常が原因であることが提唱された^{18,19}。McNeil らは、細胞平面極性 (planar cell polarity; PCP) を担うプロトカドヘリンファミリーの Fat4 が、尿細管細胞の分裂軸を制御することを報告した²⁰。Fat4 を腎臓特異的にノックアウトしたマウスでは、HNF1β ノックアウトマウスや *pck* ラットと同様に尿細管の分裂軸が異常となり、尿細管の拡張や嚢胞形成が誘発されることが示された。PDK や PKHD1 は細胞平面極性と紡錘体をつなぐタンパク質である可能性が考えられる。

多嚢胞腎症は他の遺伝性疾患でもしばしば認められる。例えば Von Hippel-Lindau 病 (VHL 病) は VHL がん抑制遺伝子の変異が原因で起こる疾患であり、脳や脊髄の血管芽腫やリンパ嚢胞腺腫に加えて多嚢胞腎を発症する²¹。VHL タンパク質の機能については様々な研究がなされているが、最近、紡錘体軸を制御する働きを持つことが報告された²²。分裂軸の制御は、尿細管などの管腔構造の形成には必須の現象であるのかもしれない。個々の分子の機能から、細胞極性および管腔形成までの組織構築過程の多段階をつなぐ解析が今後の課題である。

3. 培養細胞を用いた細胞分裂軸の解析法

上記のように、哺乳類個体において方向性のある細胞分裂の存在が明らかとなり、その生理学的重要性が認識されつつある。しかしながら、個体内では生化学的・細胞生物学的解析が困難であるため、その分子機構は不明な点が多い。これを解決するため近年、培養細胞を用いた分裂軸の解析法が確立されてきた。下記に四つの解析法を紹介する。

(1) 三次元培養法を用いた分裂軸解析法

イヌ腎臓由来の MDCK 細胞をマトリジェルの上で培養すると、apical-basal 極性を持つ一層の細胞層からなるボール状のシストが形成される。Duらは、このシストを構成する細胞は apical-basal 軸に対して垂直、すなわち表層面に対して平行に分裂することを発見した (図 4a)²³⁾。これらの細胞では分裂期において LGN が lateral 側に局在した。shRNA を用いて LGN をノックダウンすると分裂軸が異常になり、その結果シスト全体の構造に異常が生じ、複数の内腔をもつ multilumen シストが形成された。これらのことから、MDCK 細胞のシストでは、LGN の lateral 局在が分裂軸の決定とシスト形成に必須の役割を果たすことが明

らかとなった²³⁾。さらにその後の研究で、MDCK 細胞のシストでは細胞極性因子 Par3 と aPKC が apical 表層に局在し、aPKC が LGN の Ser401 をリン酸化することで LGN と Gα の結合を阻害し、結果的に LGN を apical 表層から排除していることが報告された (図 4a)²⁴⁾。この排除機構が失われると LGN が表層全域に局在するため紡錘体を牽引する力が表層全体に広がり、結果的に分裂軸がランダムになり multilumen シストが形成されることが分かった²⁴⁾。このように、本解析法は細胞分裂軸と細胞極性を 3次元で解析する点において優れており、また分裂軸という 1細胞レベルの現象と組織構造という多細胞レベルの現象をつなぐ系として注目される。本解析法を用いて、Cdc42 や Tuba (Cdc42 の GEF) などいくつかの分子が分裂軸とシスト形成の両方に必要であることも報告されている^{25,26)}。本解析法の難点としては、分裂期の細胞を数多く得るのが困難であること、分裂軸の異常が multilumen シスト形成の唯一の原因であることを証明するのが困難であることが挙げられる。標的とする分子に照準を絞った上で、詳細に検討する場合に有効な解析法であると思われる。

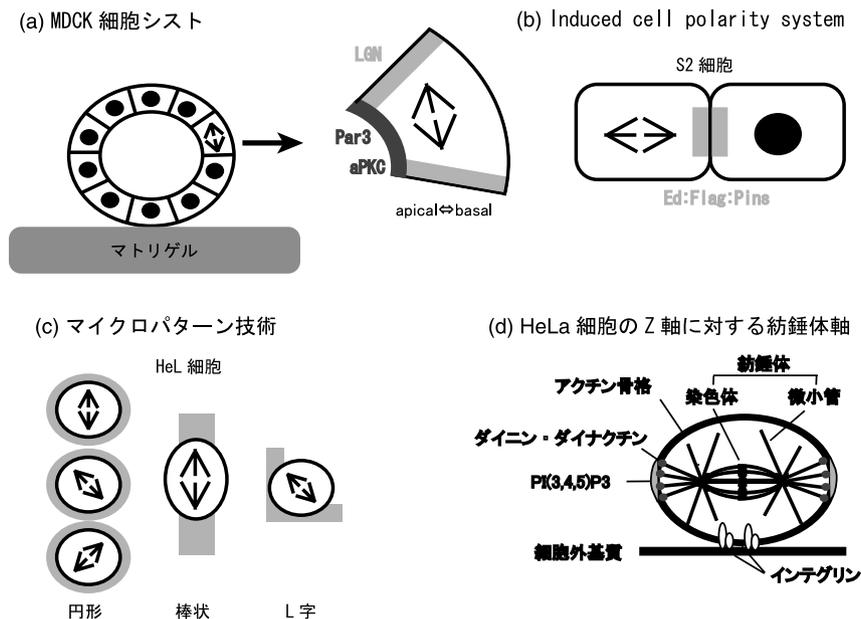


図 4 培養細胞を用いた分裂軸解析法

(a) MDCK 細胞シストにおける細胞分裂軸。紡錘体は細胞の apical-basal 極性軸に対して垂直に配置される。この方向性は lateral 側に存在する LGN に依存する。Apical 側には Par3 と aPKC が存在し、LGN を apical から排除している。(b) ハエ S2 細胞を用いた Induced cell polarity system と細胞分裂軸。紡錘体は細胞-細胞接着面に局在させた分裂軸制御因子 (Pins など) に向かって配置される。(c) マイクロパターン技術を用いた HeLa 細胞における細胞分裂軸。フィブロネクチンのパターン (円形、棒状、L 字など) によって紡錘体の配置が決まる。(d) HeLa 細胞における Z 軸に対する細胞分裂軸。紡錘体は細胞-基質接着面に対して平行に配置される。分子機構の詳細は本文を参照。

(2) Induced cell polarity system を用いた分裂軸解析法

Doe らは、細胞-細胞間接着を誘導するタンパク質である Echinoid (Ed) の cDNA にタグと目的タンパク質をコードする遺伝子を融合させたコンストラクトを作成し、それをハエの培養細胞 S2 細胞に強制発現させることで、細胞-細胞間接着面に目的タンパク質を濃縮させる“Induced cell polarity system”を開発した²⁷⁾。この系を用いて Pins (ハエの LGN オーソログ) を細胞-細胞間接着面に濃縮させると (Ed:Flag:Pins), $G\alpha$ 依存的に紡錘体が Pins 面に対して垂直に配置されることが示された (図 4b)。さらに Pins の様々な欠失変異体を用いてドメイン解析を行った結果、これまで知られていた Mud (ハエの NuMA オーソログ) との結合領域である N 末端側の TPR (tetratricopeptide repeat) モチーフ, $G\alpha$ との結合領域である C 末端側の GoLoco モチーフに加え、新たに Dlg (Discs large) との結合を担う Linker ドメインを同定した。Pins は TPR ドメイン-Mud-ダイニン/ダイナクチン経路を介した微小管の牽引と、Linker ドメイン-Dlg-Khc73 (キネシン) を介した微小管の捕捉の二つの経路を介して紡錘体の方向を決めていることが提唱された²⁷⁾。その後の研究で、細胞平面極性を担う Fz-Dsh 経路が Mud を介して分裂軸を制御することも本解析法を用いて明らかにされた²⁸⁾。さらに、ハエ神経幹細胞の非対称分裂に関与するスキヤフォールドタンパク質 Canoe が Ran-GTP と結合し、両者の結合が Mud の表層局在に必要であることも本解析法を用いて報告されている²⁹⁾。本解析法は、強制発現による人為的な系ではあるが、タンパク質間の相互作用やドメイン解析を行う上で強力なツールであると言える。

(3) HeLa 細胞を用いた分裂軸解析系 I: マイクロパターン技術による X-Y 平面上での解析法

Bornens らは、細胞外基質フィブロネクチンを数マイクロメートルの規模でガラスプレート上に描く技術を開発した³⁰⁾。このマイクロパターン技術を用いて様々な形のフィブロネクチンパターンを作成し、その上に HeLa 細胞を一つずつ接着させたところ、フィブロネクチンの形と紡錘体の方向に相関があることを発見した。すなわち円形のフィブロネクチンパターンでは紡錘体はランダムな方向に向くが、棒状のパターンでは紡錘体は棒の長軸に沿った方向に向く。L 字パターンでは頂点を結んだ線に沿って並ぶ (図 4c)。この時、アクチン細胞骨格や微小管の重合を薬剤阻害すると、フィブロネクチンパターンと紡錘体軸の相関が見られなくなることから、細胞外基質への接着点と細胞骨格との相互作用が紡錘体軸を決めることが示唆された。実際、細胞接着シグナル伝達の一部を担う Src キナーゼファミリーの阻害剤 PP2 で細胞を処理すると、紡錘体軸の方向性が失われることも報告されている³⁰⁾。HeLa 細胞は分

裂期になるとドーム状の丸い形になるが、この時、細胞と細胞外基質はリトラクションファイバーと呼ばれるアクチン細胞骨格からなる針状の構造体でつながっている。彼らは、このリトラクションファイバーの根元の細胞表層に紡錘体を牽引する力が存在すると仮定した。リトラクションファイバーの分布は細胞外基質の形で決まる。そこで様々なフィブロネクチンパターンについて、細胞表層に存在する紡錘体牽引力の分布を求め、そこから紡錘体にかかる回転力の分布と、その結果としての紡錘体の向きを予測する計算式を立てた。各フィブロネクチンパターンについて、紡錘体軸の予測値と実測値は見事に一致し、紡錘体軸の制御機構を物理・数学的に解析すると新しい研究領域が生まれた³¹⁾。その後の研究で、リトラクションファイバーを一部レーザーカットすると、ファイバーの残っている方向に向かって紡錘体が回転することがマイクロパターン技術によって明らかにされ、細胞外基質がリトラクションファイバーを介して紡錘軸の方向性を決めていたことが証明された³²⁾。マイクロパターン技術は通常の実験室では導入困難であるが、現在は様々なフィブロネクチンパターンが描かれたカバーガラスが CYTOO 社から市販されている。とても高価ではあるが、細胞外基質の役割の解析や物理・数学的解析を行う際に大変優れた実験系である。

(4) HeLa 細胞を用いた分裂軸解析系 II: Z 軸上での解析法

マイクロパターンを用いた分裂軸の解析法は、カバーガラス上の X-Y 平面での方向性を定量化するものである。我々は HeLa 細胞を用いて、Z 軸に対する分裂軸の方向性を明らかにしてきた。HeLa 細胞をフィブロネクチンやコラーゲンの上で培養すると、紡錘体が細胞外基質の面に対して平行に配置されることを発見した³³⁾。この方向性は重力や細胞-細胞間接着には依存しなかった。しかし、偽基質であるポリリジン上で細胞を培養した場合や、インテグリン $\beta 1$ の機能を中和抗体や RGD ペプチド、RNAi で阻害すると、この紡錘体軸の方向性が失われた。その結果、細胞は基質面に対して傾いて分裂するため、分裂後一つの娘細胞が基質にすばやく結合できなくなる現象が観察された。このことから、インテグリン $\beta 1$ を介した細胞-基質間接着が紡錘体軸を基質に対して平行に配置する分子機構が存在し、これは足場依存的細胞増殖を保証するものであることが分かった。さらに、アクチン細胞骨格や微小管、およびミオシン X や微小管プラス端接着因子 EB1 がこの紡錘体軸制御機構に必要であることを示した (図 4d)³³⁾。水野らは、アクチン制御因子である LIM キナーゼとコフィリンもこの制御機構に必要であることを報告している³⁴⁾。我々はさらに、分裂期において PI3 キナーゼがインテグリン依存的に活性化して PI(3, 4, 5)P3 を産生するこ

と、PI(3, 4, 5)P3がPTEN依存的に細胞中央表層に濃縮することを見出した³⁵⁾。PI(3, 4, 5)P3はダイニン・ダイナクチン複合体を細胞中央表層にリクルートすることで紡錘体を牽引する力を中央表層で平衡化し、結果的に紡錘体を基質に対して平行に配置させることを提唱した(図4d)。その後、低分子量Gタンパク質Cdc42がPI(3, 4, 5)P3とアクチン骨格の両方を制御する鍵分子であることを見出し、Cdc42-PAK2/ β Pix-アクチンおよびCdc42-PI3キナーゼ-PI(3, 4, 5)P3との二つの独立したシグナル伝達経路が紡錘体軸を制御することを明らかにした³⁶⁾。興味深いことに、Cdc42やPAK2/ β PixあるいはミオシンXをノックダウンすると、いずれもリトラクションファイバーが減少する。リトラクションファイバーはX-Y平面上の紡錘体軸だけでなく、Z軸に対する紡錘体軸方向も制御するのかもしれない。本解析法は生理学的意義が不明であるとの弱点はあるが、定量化が容易であり、多数の分裂期細胞が得られ、安価であるなどの長所がある。分裂軸を解析するにあたり手始めに使えるお手頃な方法であると言えよう。実際、本解析法を用いて、がん抑制遺伝子VHLや繊毛タンパク質IFT88、ハンチントン病の原因遺伝子Huntingtinが分裂軸に関与することが報告されている^{22, 37, 38)}。

4. 分裂軸を制御する遺伝子のゲノムワイドスクリーニングと新規分裂軸制御因子ABL1の機能

HeLa細胞を用いたZ軸に対する分裂軸解析法は、大量のサンプル解析が可能であるためゲノムワイドスクリーニングに適している。同定された遺伝子について個体レベルでの解析を行えば、*in vivo*での役割の解明も可能となる。我々は最近このスクリーニングに成功し、新規分裂軸制御因子としてABL1を同定した³⁹⁾。以下にスクリーニングの概略とABL1の機構解析、皮膚組織での役割について紹介する。

(1) 分裂軸を制御するキナーゼのゲノムワイドスクリーニング

我々はAmbion社から市販されているキナーゼに対するsiRNAライブラリーを用いてスクリーニングを行った(図5a)。このライブラリーは719個のキナーゼおよびキナーゼ関連因子を網羅しており、一つの遺伝子に対して3種類のsiRNAが設計されている。スクリーニングは2段階で行った。第1段階では、すべてのサンプル(719 \times 3=2,157個)について30個以上の分裂中期の紡錘体を観察し、それぞれの紡錘体の傾きを目視で3段階評価した。Mann-Whitney U testでP値を求め、一遺伝子3種類のsiRNAについて次の2条件を満たすものをポジティブな候補とした: 1) 2種類以上のsiRNAでP値が 2.3×10^{-5} (多重検定でのP値0.05)以下、2) 1種類以上のsiRNAでP値が

1.0×10^{-13} 以下。その結果、31種類の遺伝子が候補として得られた。このうち28種類の遺伝子を第2段階のスクリーニングにかけた。第2段階では、それぞれの遺伝子を2種類のsiRNAでノックダウンし、30個の分裂中期紡錘体の傾斜角度の実測値を求めた。Mann-Whitney U testでP値を求め、 9.0×10^{-4} (多重検定でのP値0.05)以下のものをポジティブとしたところ、2種類のsiRNAでもともポジティブとなった遺伝子が3個同定された。このうちP値の観点から最も有力な候補として同定されたのが、Src型チロシンキナーゼファミリーであるABL1であった。

(2) 分裂軸制御機構におけるABL1の機構解析と皮膚組織での役割

ABL1ノックダウンによる紡錘体軸の異常はsiRNA耐性のmouse ABL1を発現することによりレスキューされたが、キナーゼ活性を欠失したABL1-KD(kinase dead)ではレスキューされなかった。また、ABL1のキナーゼ阻害剤であるGlivecで細胞を処理した場合も紡錘体軸の異常が誘導されたことから、ABL1はHeLa細胞における紡錘体軸制御に必要であり、この機能はABL1のキナーゼ活性に依存することが分かった。ABL1は哺乳類組織での細胞分裂軸も制御するのだろうか?我々は皮膚について解析を行った。上述したように、皮膚基底細胞は基底膜に沿って水平あるいは垂直に分裂する。Glivecを妊娠マウスに腹腔投与したところ、胎児皮膚基底細胞の分裂軸方向がランダムになった。また、ABL1ノックアウトマウスの胎児皮膚基底細胞でも分裂軸に異常が生じた(図5b)。従ってABL1はHeLa細胞でのみならず、*in vivo*の皮膚基底細胞においても分裂軸制御に必要であることが分かった。

では、ABL1はどのようにして紡錘体軸を制御しているのだろうか?HeLa細胞の系では、PI3キナーゼとPAK2/ β Pixの複合体形成が紡錘体軸制御に必要であることを述べたが、ABL1をノックダウンしたHeLa細胞ではこれらに変化は認められなかった。そこで次にABL1とLGNの関連を調べた。分裂期のHeLa細胞ではLGNは細胞表層に局在するが、そのシグナルはそれほど強いものではなく、LGNをノックダウンしても紡錘体軸の方向は正常のままである。このとき、PI3キナーゼの阻害剤で細胞を処理すると、LGNノックダウン細胞でも紡錘体軸の異常が生じる。従ってHeLa細胞では通常の場合、Z軸に対する紡錘体軸制御はPI3キナーゼ-PI(3, 4, 5)P3経路が主要な役割を果たしており、LGNは大きな働きをしていないと考えられる。しかし、ABL1ノックダウン細胞ではLGNが細胞表層に強く濃縮し、Z軸方向にも広がって局在する現象が観察された(図5c)。MDCK細胞にLGNを高発現すると紡錘体軸が不安定になり、紡錘体が振動することが報告されている³⁾。同様にHeLa細胞にLGNを高発

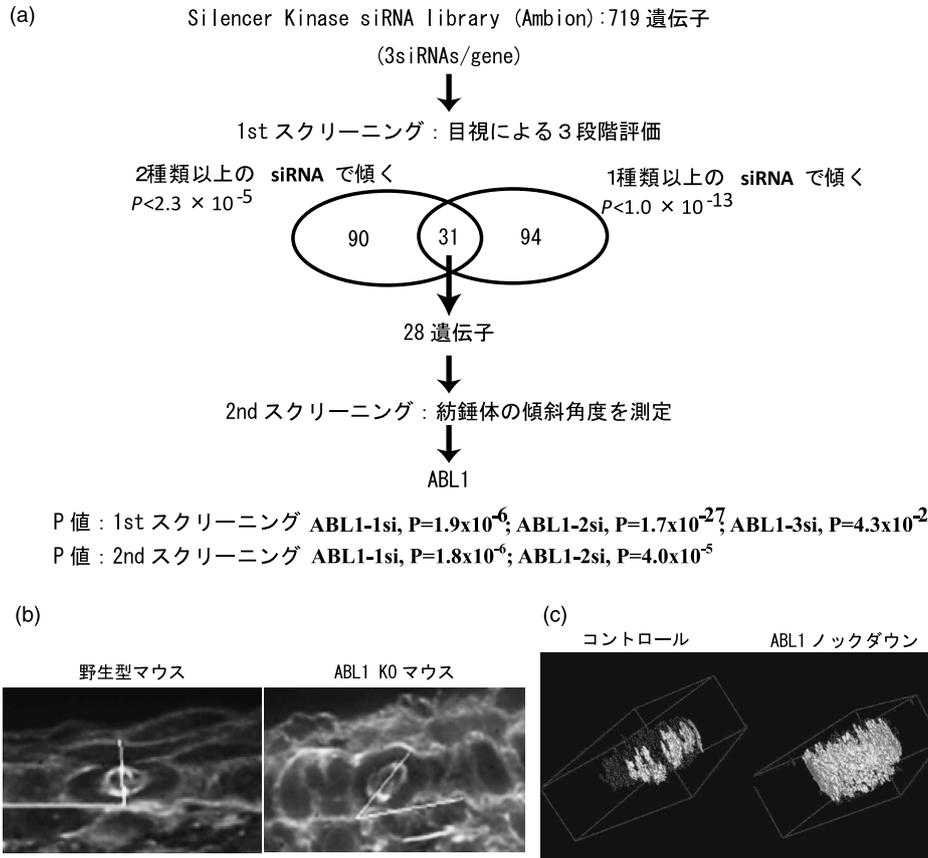


図5 HeLa細胞を用いた分裂軸制御因子のRNAiスクリーニング

(a) HeLa細胞における、Z軸に対する細胞分裂軸の解析法を用いて行ったスクリーニングの概略図。(b) 野生型マウスとABL1ノックアウトマウスの皮膚基底細胞の分裂様式。野生型では基底膜に対して垂直に紡錘体が配置されているが、ABL1ノックアウトマウスでは傾いている。(c) コントロールのHeLa細胞とABL1をノックダウンしたHeLa細胞におけるLGNの細胞表層局在。表層のLGNシグナルの3Dイメージを示す。

現すると、紡錘体の回転運動が誘導された。このことからABL1ノックダウン細胞で見られる紡錘体軸方向の異常は、LGNの細胞表層への濃縮が原因である可能性が考えられた。そこで、ABL1と同時にLGNをノックダウンしたところ、紡錘体軸方向の異常がレスキューされ、かつ紡錘体の回転運動も抑制された。また、ABL1と同時にDlgをノックダウンすることによっても回転運動が抑制された。LGNのタンパク質量自体には変化は見られなかったことから、ABL1ノックダウン下では、LGNが表層に濃縮し、その結果LGN-Dlg経路が過剰に働いて紡錘体軸に異常が生じることがわかった。つまり、HeLa細胞では通常、ABL1はLGNの細胞表層への蓄積を抑制し、LGN-Dlgによる紡錘体の過度な回転運動を抑えている。

次にマウス皮膚基底細胞でのLGNの局在を観察したところ、先行論文のとおり、野生型マウスではLGNはapical表層に三日月状に局在するのが認められた^{11,12)}(以下、LGN crescentと記す)。一方、Glivec処理したマウスやABL1ノックアウトマウスでは、LGN crescentは形成され

るが、apicalに限局しておらず、lateralやbasal側にも局在が認められた。また、LGN crescentが2カ所に見られる細胞も顕著に増加した。興味深いことに、これらの細胞ではほとんどの場合、異常な分布を示すLGN crescentに向かって紡錘体が配置していた。一方、野生型マウスでは、上述のLechlerらの報告¹³⁾の通り、平行分裂の場合はapical側のLGN crescentと紡錘体軸が直交しており、LGN crescentと紡錘体の軸が一致しない細胞がある割合で存在した。正常ではapical表層に生じるLGN依存的な強い力とlateral表層に生じる弱い力が紡錘体を牽引しており、この二つの力はベクトル方向が直交するため、紡錘体は回転せずに安定していると考えられる。一方ABL1ノックアウトマウスでは、LGNの分布が異常になりベクトル方向が乱れるため、より強い牽引力を発生するLGN crescentに向かって紡錘体が回転すると考えられる。以上のことからABL1はHeLa細胞と皮膚基底細胞の両方でLGNの表層局在を規定し、紡錘体軸を制御することが示された。

次に我々は、LGNの結合因子として良く知られる

NuMA について検討した。HeLa 細胞では分裂期前中期から NuMA の細胞表層局在が認められ、中期では LGN crescent と共局在した。また LGN をノックダウンすると、前中期、中期のいずれでも NuMA の表層局在が失われた。これらの結果は NuMA が LGN 依存的に表層に局在するとの先行研究³⁾と一致するものである。驚いたことに、ABL1 をノックダウンした中期の細胞では、LGN が表層に濃縮するにもかかわらず NuMA は表層に局在していなかった。同様の結果は、ABL1 ノックアウトマウスの皮膚基底細胞でも認められた。しかし前中期では、ABL1 ノックダウン細胞でも NuMA の細胞極在が認められた。このことは、NuMA の細胞表層へのリクルートは LGN 依存的であるが、表層へのアンカリングは ABL1 を介した別の分子機構に依存することを示唆している。

NuMA の C 末端側には ABL1 のリン酸化コンセンサス配列が存在し、この配列は脊椎動物で保存されていた。またこの部位 (Y1774) は分裂期の HeLa 細胞でリン酸化を受けることがプロテオミクス解析で報告されていた^{40,41)}。我々は *in vitro* キナーゼアッセイにより、ABL1 が NuMA Y1774 を直接リン酸化することを見出した。そこで非リン酸化型 NuMA-Y1774F と偽リン酸化型 NuMA-Y1774E の分裂期での局在を観察したところ、NuMA-Y1774E が前中期から中期まで表層に局在するのに対し、NuMA-Y1774F は前中期では表層局在を示すが、中期に入ると表層から速やかに消える現象が観察された。これらのことから、ABL1 は NuMA-Y1774 をリン酸化し、このリン酸化は NuMA の表層へのアンカリングに必要であることが分かった。

では、ABL1 による NuMA-Y1774 のリン酸化は紡錘体軸制御に関与するのだろうか？ HeLa 細胞では、NuMA をノックダウンしても、LGN ノックダウンと同様に、Z 軸に対する紡錘体の方向異常は誘導されなかった。つまり、HeLa 細胞では通常、LGN-NuMA 経路は Z 軸に対する紡錘体の方向制御には大きな働きを持たないといえる。そこで我々は、X-Y 平面上での LGN crescent に対する紡錘体の方向を解析した。正常な HeLa 細胞では LGN は表層に弱いながらも局在し crescent を形成している。LGN crescent の中点と紡錘体軸の間の角度を測定したところ、ほとんど細胞で 30 度以内に収まることが観察された。しかし ABL1 ノックダウン細胞では角度が大きくなる細胞の割合が顕著に増加し LGN crescent と紡錘体軸が一致しないことが分かった。そこで次に、NuMA ノックダウン下で NuMA-Y1774F あるいは NuMA-Y1774E を発現させたところ、NuMA-Y1774E 発現細胞では LGN crescent と紡錘体軸が一致したが、NuMA-Y1774F 発現細胞では一致しなかった。さらに ABL1 ノックダウン細胞において、Z 軸に沿った LGN の局在紡錘体軸方向を観察したところ、LGN は表層中央で crescent を形成するが紡錘体軸がこれに一致

しておらず、結果的に紡錘体は Z 軸に対して傾くことが観察された。この細胞に NuMA-Y1774F あるいは NuMA-Y1774E を発現させたところ、NuMA-Y1774E 発現細胞では LGN crescent と紡錘体軸が一致し、その結果として Z 軸に対する紡錘体の異常はレスキューされたが、NuMA-Y1774F 発現細胞ではレスキューされなかった。これらのことから、ABL1 による NuMA-Y1774 のリン酸化は、LGN crescent に紡錘体軸を一致させるのに必要であり、LGN-NuMA 経路の機能発現に重要な役割を果たすことが分かった。

以上の結果から、我々は紡錘体軸制御における ABL1 の二つの機能を提唱した。1) ABL1 は LGN の細胞表層への過剰な局在を抑制し、LGN-Dlg が誘導する紡錘体の回転運動を回避する。2) NuMA-Y1774 を直接リン酸化することで NuMA を細胞表層へアンカリングし、これにより LGN crescent に対する紡錘体の配置を促進する。NuMA-Y1774 のリン酸化は LGN の表層局在には関与しないとの結果が得られているため、この二つの機能は独立であるといえる。ABL1 が LGN の表層局在をどのように制御しているのかを解明することが今後の課題である。正常細胞、ABL1 ノックダウン細胞、内在性の NuMA を NuMA-Y1774F に置換した細胞における紡錘体軸の方向性と、LGN、NuMA の表層局在について図 6 にまとめる。

5. おわりに

哺乳類における細胞分裂軸制御機構の研究は、近年急速に進展している。疾患との関わりも明らかになりつつあり、そのシグナル伝達機構の解明は緊急の課題ともいえる。哺乳類の分裂軸制御機構には、ハエや線虫を用いた先行研究で同定された Insc, LGN, NuMA, Gα, Dlg などの進化的に保存された分裂軸制御因子以外にも、多数のタンパク質が関わることは明白である。培養細胞と個体レベルの解析を組み合わせることにより、その全容が解明されると期待できる。ただし、細胞はその場の環境や分化段階に従って分裂軸を決める要因を使い分ける可能性があるため、同定した分裂軸制御機構がすべての細胞で機能するとは限らない。分裂軸制御機構の時空間的な解析が今後の課題となるだろう。

謝辞

本稿で紹介した研究は、筆者が助教、さきがけ研究者として在籍した京都大学大学院生命科学研究科シグナル伝達分野、および当研究室において行われたものです。

学生時代から一貫してご指導を賜りました西田栄介教授(京都大学大学院生命科学研究科)に心より感謝申し上げます。また、本研究の後半は、西田教授ならびに当研究室の松村繁助教、京都大学 iPS 研究所の山本拓也助教、京都

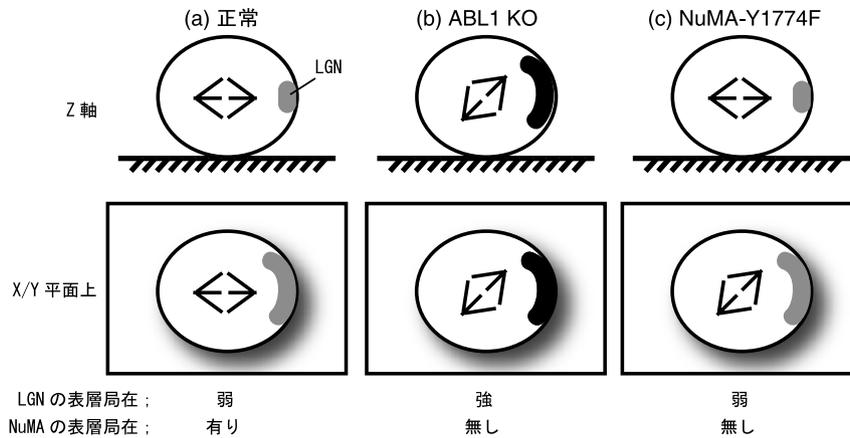


図6 HeLa細胞の分裂軸制御機構におけるABL1の役割

(a) 正常なHeLa細胞において、紡錘体はZ軸方向に関しては基質面に対して平行に配置され、X-Y平面上ではLGN crescentの中心に向かって配置される。Z軸に対する紡錘体軸制御はPI3キナーゼ-PI(3, 4, 5)P3経路が主要な役割を果たす。ABL1はLGNの細胞表層への過剰な局在を抑制し、LGN-Dlgが誘導する紡錘体の回転運動を回避する。LGN crescentに対する紡錘体軸制御はLGN, NuMAおよびABL1が触媒するNuMA-Y1774のリン酸化とそれに依存したNuMAの表層へのアンカリングが必要である。(b) ABL1ノックダウン細胞ではLGNが細胞表層への過剰に局在する。NuMAは表層に局在しないがDlgが局在するためLGN-Dlg依存的な紡錘体の回転運動が起こり、紡錘体軸方向が異常となる。(c) 内在性のNuMAをNuMA-Y1774Fに置換した細胞では、PI3キナーゼ-PI(3, 4, 5)P3経路が機能するためZ軸に対する紡錘体の方向性は正常であるが、NuMAが表層に局在しないため、LGN crescentに対する紡錘体の配置が異常になる。

大生命科学研究系キャリアパス形成ユニットの戎家美紀助教との共同研究として行ったものです。みなさまに厚く御礼申し上げます。

文 献

- Knoblich, J.A. (2008) *Cell*, **132**, 583–597.
- St Johnston, D. & Ahringer, J. (2010) *Cell*, **141**, 757–774.
- Du, Q. & Macara, I.G. (2004) *Cell*, **119**, 503–516.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., & Matsuzaki, F. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 93–101.
- Taddei, I., Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., Petit, V., Bouvard, D., Medina, D., Fässler, R., Thiery, J.P., & Glukhova, M.A. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 716–722.
- Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., Killeen, N., Orange, J.S., Russell, S.M., Weninger, W., & Reiner, S.L. (2007) *Science*, **315**, 1687–1691.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., & Rudnicki, M.A. (2007) *Cell*, **129**, 999–1010.
- Wu, M., Smith, C.L., Hall, J.A., Lee, I., Luby-Phelps, K., & Tallquist, M.D. (2010) *Dev. Cell*, **19**, 114–125.
- Tang, N., Marshall, W.F., McMahon, M., Metzger, R.J., & Martin, G.R. (2011) *Science*, **333**, 342–345.
- El-Hashash, A.H., Turcatel, G., Al Alam, D., Buckley, S., Tokumitsu, H., Bellusci, S., & Warburton, D. (2011) *Development*, **138**, 1395–1407.
- Lechler, T. & Fuchs, E. (2005) *Nature*, **437**, 275–280.
- Williams, S.E., Beronja, S., Pasolli, H.A., & Fuchs, E. (2011) *Nature*, **470**, 353–358.
- Poulson, N.D. & Lechler, T. (2010) *J. Cell Biol.*, **191**, 915–922.
- Caldwell, C.M., Green, R.A., & Kaplan, K.B. (2007) *J. Cell Biol.*, **178**, 1109–1120.
- Fleming, E.S., Zajac, M., Moschenross, D.M., Montrose, D.C., Rosenberg, D.W., Cowan, A.E., & Tirnauer, J.S. (2007) *J. Histochem. Cytochem.*, **55**, 1173–1180.
- Fleming, E.S., Temchin, M., Wu, Q., Maggio-Price, L., & Tirnauer, J.S. (2009) *Mol. Carcinog.*, **48**, 592–598.
- Quyn, A.J., Appleton, P.L., Carey, F.A., Steele, R.J., Barker, N., Clevers, H., Ridgway, R.A., Sansom, O.J., & Näthke, I.S. (2010) *Cell Stem Cell*, **6**, 175–181.
- Fischer, E., Legue, E., Doyen, A., Nato, F., Nicolas, J.F., Torres, V., Yaniv, M., & Pontoglio, M. (2006) *Nat. Genet.*, **38**, 21–23.
- Simons, M. & Walz, G. (2006) *Kidney Int.*, **70**, 854–864.
- Saburi, S., Hester, I., Fischer, E., Pontoglio, M., Eremina, V., Gessler, M., Quaggin, S.E., Harrison, R., Mount, R., & McNeill, H. (2008) *Nat. Genet.*, **40**, 1010–1015.
- Nyhan, M.J., O’Sullivan, G.C., & McKenna, S.L. (2008) *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 472–478.
- Thoma, C.R., Toso, A., Gutbrodt, K.L., Reggi, S.P., Frew, I.J., Schraml, P., Hergovich, A., Moch, H., Meraldi, P., & Krek, W. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 994–1001.
- Zheng, Z., Zhu, H., Wan, Q., Liu, J., Xiao, Z., Siderovski, D. P., & Du, Q. (2010) *J. Cell Biol.*, **189**, 275–288.
- Hao, Y., Du, Q., Chen, X., Zheng, Z., Balsbaugh, J.L., Maitra, S., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., & Macara, I.G. (2010) *Curr.*

- Biol.*, **20**, 1809–1818.
- 25) Jaffe, A.B., Kaji, N., Durgan, J., & Hall, A. (2008) *J. Cell Biol.*, **183**, 625–633.
- 26) Qin, Y., Meisen, W.H., Hao, Y., & Macara, I.G. (2010) *J. Cell Biol.*, **189**, 661–669.
- 27) Johnston, C.A., Hirono, K., Prehoda, K.E., & Doe, C.Q., (2009) *Cell*, **138**, 1150–1163.
- 28) Ségalen, M., Johnston, C.A., Martin, C.A., Dumortier, J.G., Prehoda, K.E., David, N.B., Doe C.Q., & Bellaïche, Y. (2010) *Dev. Cell*, **19**, 740–752.
- 29) Wee, B., Johnston, C.A., Prehoda, K.E., & Doe, C.Q. (2011) *J. Cell Biol.*, **195**, 369–376.
- 30) Théry, M., Racine, V., Pépin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J.B., & Bornens, M. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 947–953.
- 31) Théry, M., Jiménez-Dalmaroni, A., Racine, V., Bornens, M., & Jülicher, F. (2007) *Nature*, **447**, 493–496.
- 32) Fink, J., Carpi, N., Betz, T., Bétard, A., Chebah, M., Azioune, A., Bornens, M., Sykes, C., Fetler, L., Cuvelier, D., & Piel, M. (2011) *Nat. Cell Biol.*, **13**, 771–778.
- 33) Toyoshima, F. & Nishida, E. (2007) *EMBO J.*, **26**, 1487–1498.
- 34) Kaji, N., Muramoto, A., & Mizuno, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 4983–4992.
- 35) Toyoshima, F., Matsumura, S., Morimoto, H., Mitsushima, M., & Nishida, E. (2007) *Dev. Cell*, **13**, 796–811.
- 36) Mitsushima, M., Toyoshima, F., & Nishida, E. (2009) *Mol. Cell Biol.*, **29**, 2816–2827.
- 37) Delaval, B., Bright, A., Lawson, N.D., & Doxsey, S. (2011) *Nat. Cell Biol.*, **13**, 461–468.
- 38) Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.L., Guillemot, F., Dragatsis, I., Bellaïche, Y., Saudou, F., Nguyen, L., & Humbert, S. (2010) *Neuron*, **67**, 392–406.
- 39) Matsumura, S., Hamasaki, M., Yamamoto, Y., Ebisuya, M., Sato, M., Nishida, E., & Toyoshima, F. (2012) *Nat. Commun.*, doi : 10.1038/ncomms1634.
- 40) Rush, J., Moritz, A., Lee, K.A., Guo, A., Goss, V.L., Spek, E. J., Zhang, H., Zha, X.M., Polakiewicz, R.D., & Comb, M.J. (2005) *Nat. Biotechnol.*, **23**, 94–101.
- 41) Dephoure, N., Zhou, C., Villén, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., & Gygi, S.P. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**, 10762–10767.
-