

研究課題別評価書

1. 研究課題名

細胞膜脂質による分裂軸方向の制御とがん化に伴う変化

2. 氏名

豊島 文子

3. 研究のねらい

生物が卵からその固有の形を作っていく過程では、個々の細胞が一定の軸方向に沿って分裂する現象が重要な役割を果たす。最近、細胞が分裂する方向、すなわち「細胞分裂軸」の異常は腫瘍形成や多発性嚢胞腎病の発症に関わることが明らかとなっており、細胞分裂軸を制御する分子機構の解明は、これらの病態発症のメカニズムを理解する上でも重要な研究課題となっている。細胞分裂の軸方向は、紡錘体と細胞表層に存在する因子との相互作用で決まる。これまでに、この分子機構には微小管やモータータンパク質などの細胞骨格関連因子が必須であることが、多くのモデル生物で明らかとなってきた。しかしながら、細胞膜脂質の役割についてはほとんど解析がなされていなかった。本研究では、細胞膜の脂質成分が分裂軸方向を制御する分子メカニズムを解明することを目指す。

4. 研究成果

細胞の分裂方向は、分裂期の紡錘体軸によって決まる。紡錘体軸の方向を決める要因としては、「細胞の形」「細胞極性」「細胞—細胞間接着」が知られてきた。我々は、哺乳類培養細胞において、紡錘体軸の方向を決める第4の要因として、インテグリンを介した「細胞—基質間接着」の存在を明らかにした。すなわち、HeLa 細胞などの通常の接着細胞をフィブロネクチンなどの細胞外基質上で培養すると、紡錘体が基質面に対して平行に配置されることを見出し(図1)、かつこの現象は、細胞—細胞間接着や重力には非依存的であり、インテグリンを介した細胞—基質間接着に依存することを明らかにした(図1)。更に、現象にはアクチン細胞骨格と微小管が必要であることを明らかにした(EMBO J 26, 1487-1498, 2007)。

次に、インテグリンがどのような因子を介して紡錘体軸を制御するかについて研究を行った。インテグリンの下流で活性化することが知られていた、幾つかの細胞内シグナル伝達因子に注目して調べた結果、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3 キナーゼ) が分裂期にインテグリン依存的に活性化することを見出した。また、PI3 キナーゼが作る脂質であるホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 PI(3,4,5)P3 が、紡錘体を基質面に対して平行に配置するのに必須であることを見出した。更に、PI(3,4,5)P3 は、分裂期の細胞の中央表層に局在し、微小管モータータンパク質であるダイニン・ダイナクチン複合体を中央表層に濃縮させることが分かった。PI(3,4,5)P3 が無い状態、あるいは、過剰にある状態にすると、ダイニン・ダイナクチン複合体が細胞表層全体に広がり、細胞表層上のいろいろな場所から紡錘体を引っ張るため、紡錘体がZ軸に沿って回転する(図2)。このことから、通常の状態では、PI(3,4,5)P3 がダイニン・ダイナクチン複合体を中央表層に濃縮させる結果、紡錘体を引っ張る力が細胞の中央領域で平衡化するため、紡錘体が基質面に対して平行に配置されることが示された(図3)。これらの結果は、細胞膜の脂質成分が、細胞分裂の方向を制御する機能があることを、世界で初めて明らかにしたものである(Dev. Cell 13, 769-811, 2007)。

これらの研究から、HeLa 細胞における紡錘体軸制御機構には、アクチン細胞骨格とPI(3,4,5)P3 が共に必要であることが分かった。しかしながら、アクチン細胞骨格とPI(3,4,5)P3 の協調的制御をおこなう分子の実態は不明である。そこで、低分子量 G タンパク質がこの分子機構を担う可能性について検討を行った。その結果、PI3 キナーゼの分裂期での活性化は、RhoA や Rac1 には非依存的であるが、Cdc42 に依存的であることを見出した。また、Cdc42 は HeLa 細胞における正常な紡錘体軸制御に必要であることが明らかとなった。しかしながら、Cdc42 を阻害した

場合と、PI3K を阻害した場合では、分裂期のアクチン細胞骨格への影響が違っていた。すなわち、PI3K を阻害した細胞ではアクチン細胞骨格への影響は認められなかったが、Cdc42 を阻害した細胞では、顕著な阻害が認められた。このことは、Cdc42 は PI3K- PI(3,4,5)P3 経路とは別の経路で、分裂期でのアクチンの再編成を制御しており、この二つの経路が共に紡錘体軸を制御することを示唆している。そこで、Cdc42 の下流で分裂期でのアクチン骨格の再編成を制御し、紡錘体軸を制御する因子の探索を試みた。その結果、p21-activated kinase (PAK2)が、この因子であることを突き止めた。この分子機構には、PAK2 のキナーゼ活性は必要ではなく、PAK2 は Cdc42 および Rac1 の GEF であるβPix への結合を介して、分裂期におけるアクチン細胞骨格の再編成と紡錘体軸制御を行うことを明らかにした。以上のことから、Cdc42 は PI3K- PI(3,4,5)P3 経路と PAK2/βPix 経路の二つの経路を介して、紡錘体軸を制御することが明らかとなった(図4) (submitted)。

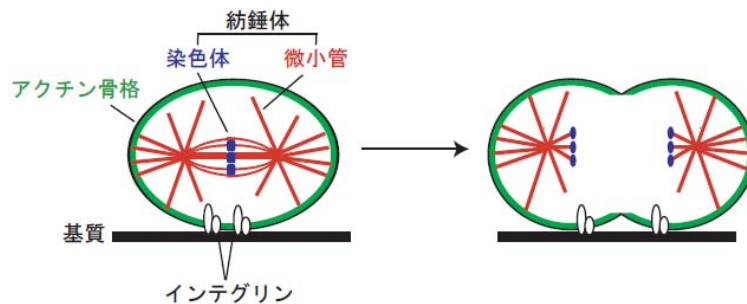


図1 接着細胞におけるインテグリン依存的な紡錘体軸制御機構

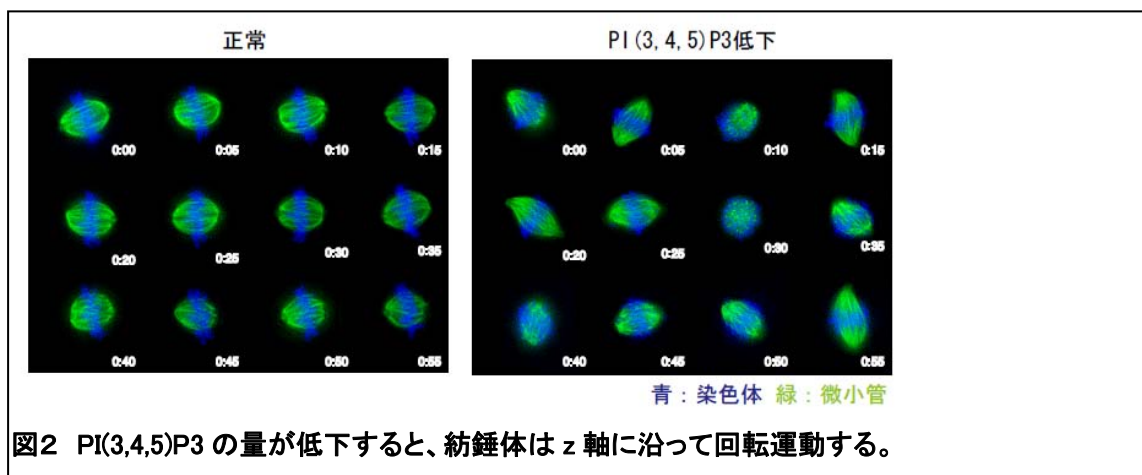


図2 PI(3,4,5)P3 の量が低下すると、紡錘体は z 軸に沿って回転運動する。

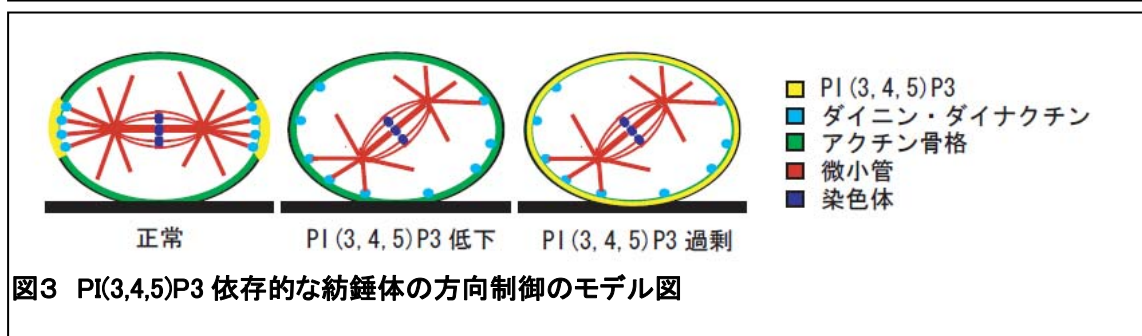
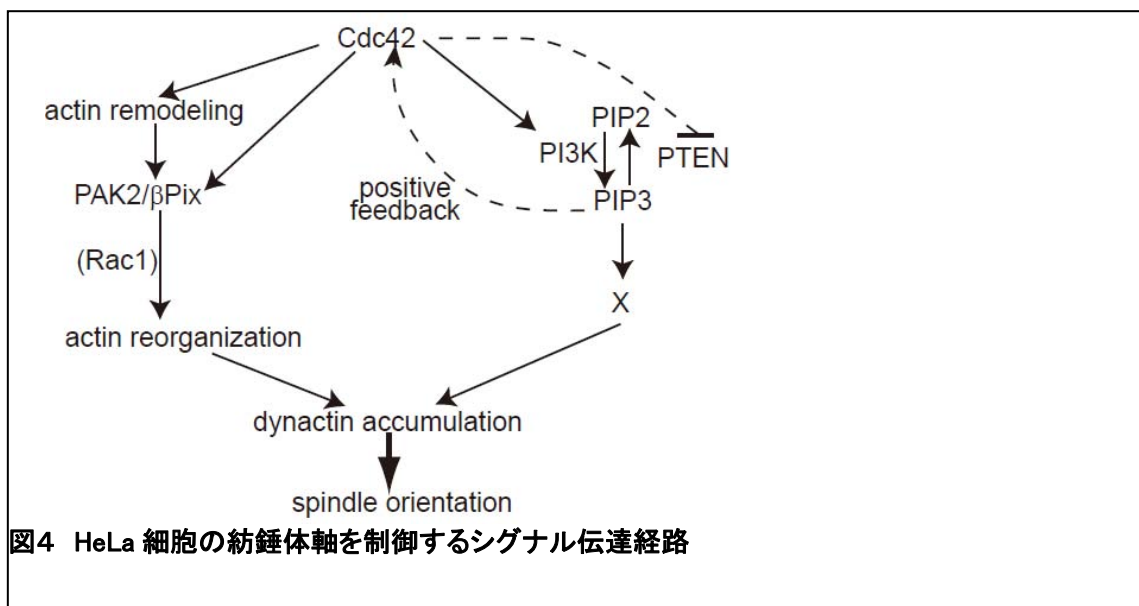


図3 PI(3,4,5)P3 依存的な紡錘体の方向制御のモデル図



5. 自己評価

本研究により、哺乳類培養細胞で分裂軸を基質接着面平行に配置する分子機構が存在することが明らかとなり、さらに細胞膜脂質の PI(3,4,5)P3 が重要な役割を果たすことが見出された。この研究は、細胞分裂軸の制御機構に細胞膜脂質が関与することを初めて示したものである。これまで細胞分裂軸の研究は、細胞骨格関連タンパク質を中心に進められてきたが、本研究により脂質の役割とダイナミクスを解析することが、その分子メカニズムを明らかにする上で必須であることが分かった。これまで細胞分裂時の脂質ダイナミクスはほとんど研究されておらず、その制御機構と生理的役割は不明な点が多い。本研究により、分裂と脂質の関連が明らかとなり、新しい研究領域の発端を提示することが出来た。

6. 研究総括の見解

細胞分裂時の紡錘体軸形成を制御する因子、メカニズムを明らかにした。Cdc42 依存的に、PAK2/betaPix-Rac1 を介するアクチン再形成、PI3K を介するダイナクチン集積の経路が示された。細胞膜の脂質成分が分裂軸方向を制御する分子メカニズムの解明を目的とした、基本的なメカニズムの解明についての成果は十分達成できたと考える。細胞の分裂軸方向の制御をリン脂質とインテグリンの関与という視点で解明したことは大いに評価できる。本研究ではがん細胞を用いての解析であるので、今後、増殖が制御されている正常細胞における機序との相異などの解明により、さらに大きな展開が期待できる。

7. 主な論文等

(A) さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表 * Corresponding author

1. **Toyoshima, F.***, Matsumura, S., Morimoto, H., Mitsushima, M., and Nishida, E. PtdIns(3,4,5)P3 regulates spindle orientation in adherent cells. *Dev. Cell*, 13: 796-811 (2007).
2. **Toyoshima, F.***, and Nishida, E. Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. *EMBO J.*, 26: 1487-1498 (2007).
3. Mitsushima, M., **Toyoshima, F.***, and Nishida, E. Dual role of Cdc42 in spindle orientation control in adherent cells. *Mol. Cell Biol.*, in press.

(2)特許

なし

(3)総説 * Corresponding author

1. **Toyoshima, F.***, and Nishida, E. Spindle orientation in animal cell mitosis: roles of integrin in the control of spindle axis. *J. Cell Physiol.*, 213: 407-411 (2007).
2. 豊島文子: イノシトールリン脂質による細胞分裂軸の制御機構 蛋白質 核酸 酵素 第53巻 9月号 pp1345-1350 2008.

(4)招待講演

1. **Toyoshima, F.** Integrin-mediated cell adhesion orients the mitotic spindle parallel to the cell-substrate adhesion plane. *Cell Regulations in Division and Arrest Workshop*, Okinawa, Japan, March, 2006.
2. **Toyoshima, F.** PtdIns(3,4,5)P3 plays a key role in the control of spindle orientation in mammalian cultured cells. *2nd International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest*, Okinawa, Japan, March, 2007.

(B)その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

1. Matsumura, S., **Toyoshima, F.**, and Nishida, E. Plk1 facilitates chromosome alignment during prophase through BubR1. *J. Biol. Chem.*, 282: 15217-15227 (2007).