

153. 膜ドメイン構成因子による細胞分裂軸制御

松村 繁

Key words : 細胞分裂軸, 紡錘体, 脂質膜, 細胞外基質

京都大学 ウイルス研究所
細胞生物学研究部門
構造形成学研究分野

緒 言

多くの臓器発生において細胞の分裂方向が一定方向に制御される現象が観察され, 適切な細胞分裂の配向が個体形成に重要な役割を果たしていることがわかってきた. 成体の幹細胞の未分化能維持においても, 細胞増殖と細胞分裂方向が厳密に制御されていることが明らかとなってきた. また, 細胞分裂軸の異常が癌化や多発性嚢胞腎において観察される. しかし, 細胞分裂方向を制御する分子機構はまだ未知のままである. 我々はこれまでにヒト培養細胞である HeLa 細胞を用いて, 哺乳類での細胞分裂方向を制御する因子の網羅的探索を行ってきた. 今回我々は得られた候補遺伝子のひとつ *pacsin3* が膜ドメイン構成因子 caveolin1 とともに細胞分裂方向の制御に役割を果たすことを報告する. 細胞外基質のパターンが分裂軸方向を制御することが報告されているが, この時の分裂軸制御因子の局在や分裂軸方向について, caveolin1 の関与を HeLa 細胞を用いた実験により解析した.

方法、結果および考察

細胞分裂軸の方向を制御することは即ち分裂期中期での紡錘体の軸方向を制御することである. 非対称分裂の研究から進化的に保存された, 紡錘体軸方向制御因子, *Gai1*, *LGN*, *NuMA*, *dynein* が同定されてきている^{1,2)}. これらの紡錘体軸方向の制御因子は, 分裂期の細胞膜表層にて複合体を形成し, ダイニンモーター蛋白質によって, 紡錘体から細胞膜へと伸びた星状体微小管を補足し, 制御因子複合体の局在位置へと牽引力を発生することで, 紡錘体を制御因子の局在位置へと向ける (図 1).

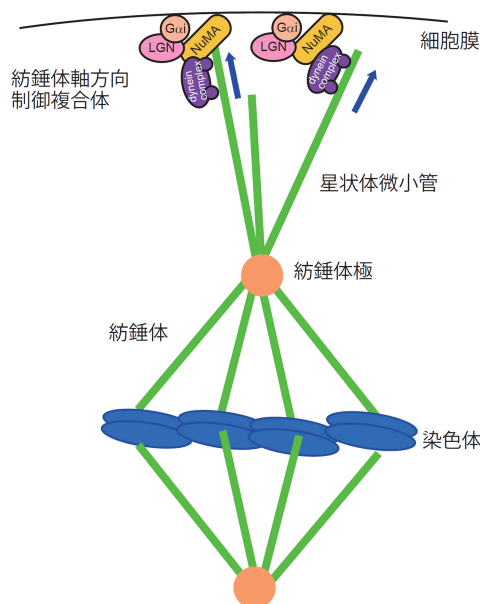


図1. 紡錘体軸制御機構.

紡錘体軸方向の制御因子は、分裂期の細胞膜表層にて複合体を形成する。ダイニンモーター蛋白質によって、紡錘体から細胞膜へと伸びた星状体微小管を補足し、制御因子複合体の局在位置へと牽引力を発生させる。牽引力のベクトルの和は、制御因子の局在の中央方向に一致し、紡錘体軸が制御因子複合体へと向く。

一方、HeLa 細胞を細胞外基質フィブロネクチンのマイクロパターンをコートしたカバーガラス上で分裂期に誘導すると、マイクロパターンの種類によって、ある一定の方向に分裂方向が制御されることが知られている³⁾。しかし、この分子機構は未知である。本研究ではこの分子機構の解明を試みた。我々は幅 $10\mu\text{m}$ の直線状フィブロネクチンをコートしたカバーガラスを用いて分裂軸を解析した。これまでの報告により予想された通り、直線の上で培養した HeLa 細胞は 90% の細胞が直線から 30 度以内の方向に紡錘体の方向が定められていた (図 2 B, D, F 右)。この時、分裂方向を制御することで知られる *Gai1*, *LGN*, *NuMA* を観察すると、紡錘体軸方向の細胞膜表層に三日月様に局在していた (図 2 A, C, E 及び B, D, F 左)。この時、*caveolin1* も紡錘体軸方向の細胞膜表層に局在していた (図 3)。

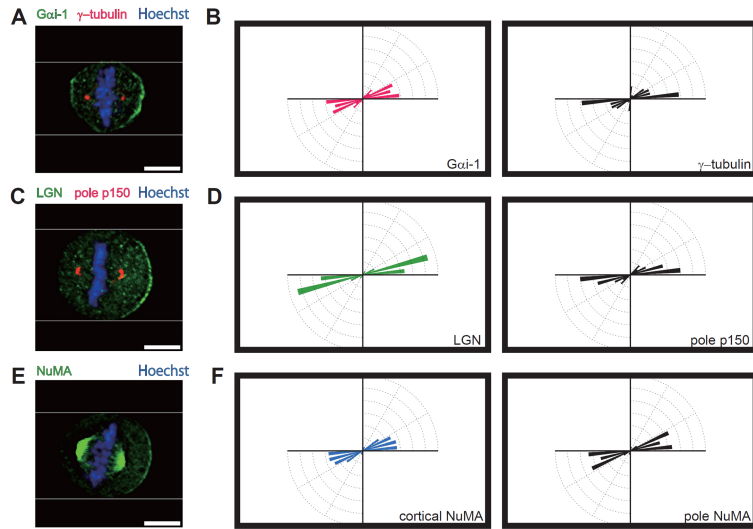


図2. フィブロネクチンの直線状マイクロパターンで培養した細胞の紡錘体軸制御因子の局在.

A, C, E) 直線状マイクロパターン上で培養した細胞の分裂期における蛍光染色像. A) *Ga1* 及び γ チューブリン, C) LGN 及び $p150^{glued}$, E) NuMA. $p150^{glued}$ はここでは紡錘体極局在のみ染色されている. 白線はマイクロパターンを表す. B, D, F) *Ga1*, LGN 及び NuMA は連続した膜局在の中央点と細胞中心点を結んだ線分がマイクロパターンの直線と為す角度を計測. γ チューブリン, $p150^{glued}$ 及び NuMA は2つ紡錘体極を結んだ線分が直線と為す角度を計測. 角度毎の細胞の割合をヒストグラムとした. 紡錘体軸方向は直線に沿った方向になり, 紡錘体軸方向制御因子は横側に局在した. Scale bars: 10 μ m.

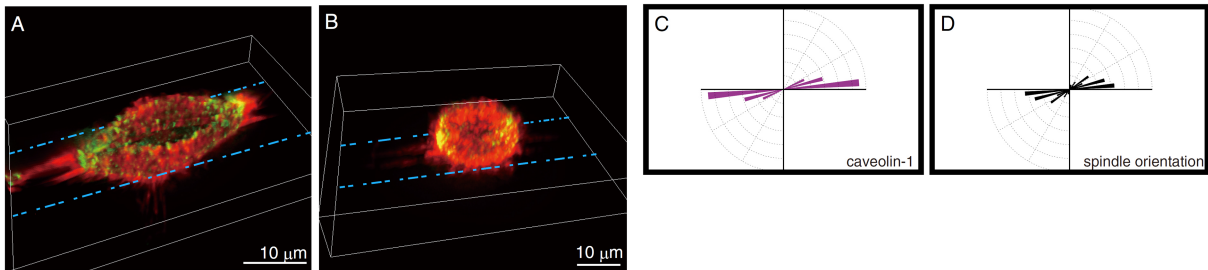


図3. フィブロネクチンの直線状マイクロパターン上で培養した HeLa 細胞での caveolin1 の膜局在.

A, B) 蛍光二重染色像. 幅 10 μ m の直線状にコートされたフィブロネクチンの上で培養した HeLa 細胞の分裂期における caveolin1 の局在 (緑) とアクチン (赤). A) は分裂期前中期, B) は分裂期中期. 共に直線方向に caveolin1 の膜局在が認められる. C, D) 紡錘体の方向及び caveolin1 の局在位置方向の定量化. 各角度での細胞割合を示す. 紡錘体方向は核の整列方向から 90 度方向として算出. caveolin1 の位置は膜上の連続シグナルの中央点と細胞中心とフィブロネクチンの直線とのなす角度. Scale bars: 10 μ m.

caveolin1 は膜微小ドメインを形成することから, caveolin1 が分裂軸方向制御に関わる可能性が示唆された. 間期細胞において caveolin1 が形成する膜微小ドメインはカベオラと呼ばれ, 多くのシグナル受容体蛋白質がカベオラ膜領域に局在し, シグナル伝達の間として働くことが報告されている. その中には細胞接着分子のインテグリン分子や三量体 G 蛋白質が含まれる. 紡錘体軸方向制御因子の *Ga1* は三量体 G 蛋白質の α サブユニットである. そこで, 分裂期においても caveolin1 がインテグリンや *Ga1* の局在制御を行っている可能性について検討を行った.

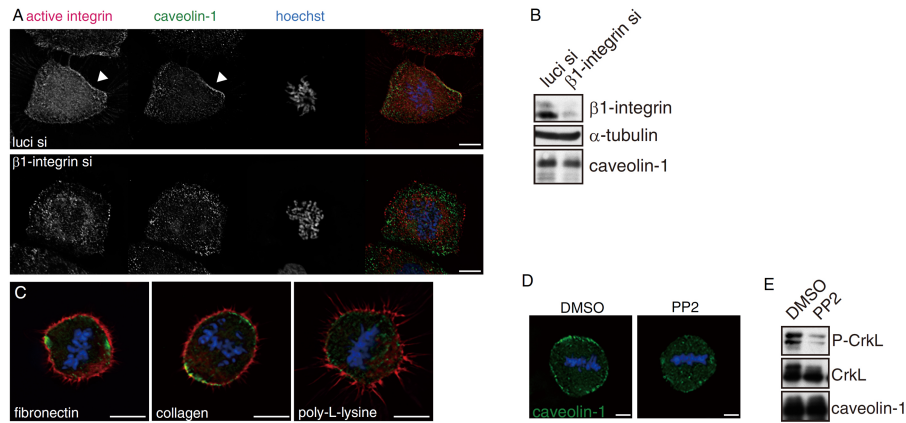


図4. 細胞接着による caveolin1 の局在制御.

A) 抗活性型インテグリン $\beta 1$ 抗体及び抗 caveolin1 抗体による蛍光二重染色像. 上段: luciferase siRNA 処理, 下段: インテグリン $\beta 1$ siRNA 処理. 分裂期前中期に細胞膜に一過的に活性型インテグリン $\beta 1$ の局在が見られ, 同時期同場所に caveolin1 の膜局在が見られる. インテグリン $\beta 1$ siRNA 処理により活性型インテグリン $\beta 1$ のシグナルが減弱し, 同時に caveolin1 の膜局在も減弱する. B) ウェスタンブロット. インテグリン $\beta 1$ siRNA 処理による発現抑制が確認された. C) アクチン (赤) 及び caveolin1 (緑) 蛍光二重染色像. 細胞培養するカバーガラスの細胞外基質を変化させて caveolin1 の膜局在を観察した. フィブロネクチン, コラーゲンを基質とした場合と異なりポリ L リジンを基質とすると, 適切な細胞接着ができず, caveolin1 の膜局在が減弱する. D) src キナーゼファミリーのキナーゼ活性阻害剤である PP2 処理した細胞での caveolin1 の蛍光染色像. PP2 処理により caveolin1 の膜局在が減弱. 細胞接着裏打ちシグナル伝達に重要な src キナーゼの活性が caveolin1 の膜局在に必要であることがわかった. E) src キナーゼの既知の基質 CrkL のリン酸化をモニターすることで src キナーゼのキナーゼ活性が阻害されていることを確認. Scale bars: A, C) $10 \mu\text{m}$, D) $5 \mu\text{m}$.

caveolin1 は分裂期開始となる核膜崩壊直後の前中期の早い段階で膜の一部に局在が見られる. この時, 細胞外基質に結合し活性型となったインテグリン分子を蛍光染色によって検出すると, caveolin1 と共局在が観察された (図4 A 上段). これは *Gail* も同様であった. インテグリン $\beta 1$ の発現抑制を行うと, 活性型インテグリンの局在シグナルは減弱したが, caveolin1 のシグナルも減弱することが観察された (図4 A 下段). 直線のマイクロパターンの結果 (図3) から細胞外基質によって caveolin1 の膜局在が制御されていることが示唆されたが, この結果も仮説を支持する. そこで, 細胞外基質を変化させたときの caveolin1 の膜局在を検討した. フィブロネクチン, コラーゲンを細胞外基質とした際には caveolin1 の分裂期での膜局在が見られたが, ポリ L リジンの場合には caveolin1 の膜局在は見られなかった (図4 C). ポリ L リジンは静電的にプラスに帯電し, 細胞が培養面に静電的に引き寄せられるため適切な細胞-細胞外基質接着が形成されないためと考えられる. 細胞接着の分子機構は多くの研究が為されている. 細胞接着の裏打ちで起こるシグナル伝達には src キナーゼが重要な役割を担っている. そこで, 間期の細胞接着からの適切なシグナルを阻害するため, src ファミリーキナーゼの広範なキナーゼ活性阻害薬である PP2 を用いてその影響を検討した. 活性阻害は src キナーゼの基質である CrkL のリン酸化程度をモニターすることで確認した (図4 E). 細胞を PP2 で間期から 10 時間程度阻害すると分裂期の caveolin1 の膜局在が阻害されることが観察された (図4 D). これらの結果は, 間期の細胞接着が分裂期における caveolin1 の局在を制御していることを示している.

そこで caveolin1 の発現抑制を行い, 細胞分裂方向に与える影響について L 字型のマイクロパターンを用いて検討を行った. L 字型のマイクロパターンにおいては, 対角線に沿った方向に細胞分裂方向が制御された (図5 A, C). この時, caveolin1 の発現抑制を行うと, 紡錘体軸方向がランダムになることが観察された (図5 B, D). このとき, *Gail* は変わらず三日月様であり, その位置は紡錘体軸方向と一致していた. つまり, caveolin1 の発現抑制下においても, *Gail* を含む紡錘体軸制御複合体は機能しており, その局在位置へと紡錘体を方向づけていることを示している. このことは, 細胞外基質のマイクロパターンによる制御と細胞内の分裂軸制御因子とのリンクに caveolin1 が必要であることを強く示唆している. 今後, リンクがどのような分子メカニズムで行われているのかを明らかにしていきたい.

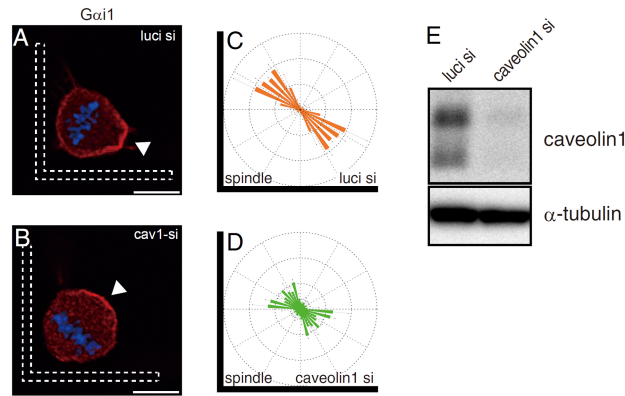


図5. caveolin1 は細胞外基質と細胞内細胞分裂軸制御因子をリンクする.

A, B) L字のフィブロネクチンマイクロパターン上で培養した HeLa 細胞の *Gai1* (赤) の蛍光染色像. A) luciferase siRNA 処理細胞, B) caveolin1 siRNA 処理細胞. 矢頭は *Gai1* の局在位置を示す. C, D) A, B の定量化. 分裂軸方向の細胞の割合. L字の45度方向への分裂軸が caveolin1 siRNA 処理によって乱れることが観察された. E) ウェスタンブロット. caveolin siRNA 処理による発現抑制の確認. Scale bars: 10 μ m.

本稿を終えるにあたり, 本研究を御支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます.

文 献

- 1) Siller, K. H. & Doe, C. Q. : Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.*, **11** : 365-374, 2009.
- 2) Morin, X. & Bellaiche, Y. : Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev. Cell*, **21** : 102-119, 2011.
- 3) Theyry, M., Racine, V., Pepin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J. B. & Bornens, M. : The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat. Cell Biol.*, **7** : 947-953, 2005.