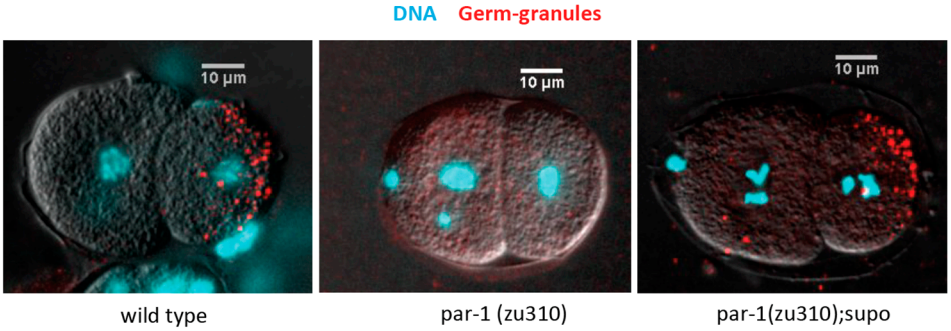
54　「細胞極性の欠損による疾患発症」を理解して抑制する	茂木　文夫

【目的】多細胞生物の発生では、細胞が空間パターンの「対称性」と「非対称性」をコントロールすることで、形態形成の基盤を作る。細胞の非対称性は「細胞極性」と呼ばれ、組織や器官の生理的機能の確立と恒常性に寄与すると示唆されるが、発生における細胞極性の確立と細胞極性破綻を誘導する仕組みの理解は不足しており、多くの未解決問題が残されている。本研究では、細胞と組織における極性確立と恒常性の両者を司る分子サーキットの全体像を明らかにすることを目標とする。線虫をモデル生物として利用し、極性形成に重要な PAR キナーゼのサプレッサー因子を単離し、その機能解析を個体発生ライフサイクル全体で行うことで、細胞極性の役割を「組織破綻を抑制するメカニズム」という類例のない観点から解析し、発生と恒常性の制御機構に新しい知見を提供する。本研究から得られる知見は、癌化をはじめとする細胞極性異常が引き起こす疾患を抑制するための治療法開発へ繋がると期待できる。

【方法】線虫 *C. elegans* を多細胞動物のモデル系に用いて、PAR キナーゼの破綻による表現型を抑制する「サプレッサー遺伝子変異」を網羅的に同定した。PAR-1 の温度感受性変異体 par-1（zu310）は、キナーゼドメインに点変異を有し、飼育温度 25℃ではキナーゼ活性の低下によって 100%胚性致死を示す。この par-1（zu310）変異体を 15℃で飼育した後に、突然変異を導入し、第二世代以降に 25℃で生育する個体を単離した。突然変異処理した約 200,000 個体から、24 種の個体が 25℃で生育可能となり、これらの個体に導入された遺伝子変異群を supo（suppressor of par-1）と命名した。これら supo 変異が発生に及ぼす影響を調べることで、PAR-1 と supo 変異の機能的関連を解析した。

【結果】ほぼ全ての supo 変異は劣勢変異であり、ヘテロ遺伝子変異では par-1（zu310）の 25℃致死性を回復できなかった。PAR-1 依存的に形成される生殖顆粒の形成を 25℃で生育した par-1（zu310）変異体と par-1（zu310）;supo 二重変異体において観察したところ、生殖顆粒は par-1（zu310）変異体では消失するが、ほとんどの par-1（zu310）;supo 二重変異体では観察された（下図）。興味深いことに、par-1（zu310）;supo 二重変異体における生殖顆粒形成と生育率との関係には必ずしも相関関係が見られなかった。この結果は、PAR-1 キナーゼ失活による胚性致死は、生殖顆粒の消失に依存していない可能性を示唆しており、胚発生における未知の PAR-1 機能を提示した。

PAR-1 キナーゼの機能欠損による生殖顆粒（赤）の消失は supo 変異によって相補される



54. 「細胞極性の欠損による疾患発症」を理解して抑制する

茂木　文夫

北海道大学 遺伝子病制御研究所

Key words：細胞極性，非対称，PAR キナーゼ，サプレッサー遺伝子変異，線虫

緒　言

目的：多細胞生物の発生では、細胞が空間パターンの「対称性」と「非対称性」をコントロールすることで、形態形成の基盤を作る。細胞の非対称性は「細胞極性」と呼ばれ、組織と期間の生理的機能に寄与すると示唆されるが、発生における細胞極性の確立及び細胞極性破綻を誘導する仕組みの理解は不足しており、多くの未解決問題が残されている。本研究では、細胞と組織における極性確立と恒常性の両者を司る分子サーキットの全体像を明らかにすることを目標とする。線虫をモデル生物として利用して、極性形成に重要な PAR キナーゼのサプレッサー因子を単離し、その機能解析を個体発生ライフサイクル全体で行うことで、細胞極性の役割を「組織破綻を抑制するメカニズム」という類例のない観点から解析し、発生と恒常性の制御機構に新しい知見を提供する。本研究から得られる知見は、癌化をはじめとする細胞極性異常が引き起こす疾患を抑制するための治療法開発へ繋がると期待できる。

背景：多細胞生物の規則的な組織パターンの形成と維持には、個々の細胞がつくる空間パターン「細胞極性」が重要である。細胞極性が破綻すると、組織内の細胞に増殖異常が起こり、癌化や癌細胞の浸潤が引き起こされることから、「細胞極性は組織恒常性に働き、様々な疾患を抑制する」と提唱されてきた。PAR-1 は高度に保存された MARK ファミリーキナーゼであり、最初に線虫の細胞極性因子として同定され、後に哺乳動物の脾臓・乳腺等で癌化を抑制することが示された［1］。しかし、このキナーゼとそのシグナル伝達経路が細胞極性を制御する仕組みと、極性化と癌化抑制を連携するメカニズムには、未だ不明な点が多い。線虫 *C. elegans* において、PAR-1 の欠損は胚性致死に加えて、成体の老化過程で生殖細胞の減少と管腔組織の破綻を引き起こす［2〜5］。本研究では、「PAR キナーゼに対するサプレッサー変異の網羅的スクリーニング」を行うことで、これまでにどの生物種でも為されていない細胞極性の欠損を抑制する分子群を明らかにする。

方法および結果

1. PAR-1 温度感受性変異を抑制するサプレッサー遺伝子変異の単離

線虫を多細胞動物のモデル系に用いて、PAR キナーゼの破綻による表現型を抑制する「サプレッサー遺伝子変異」を網羅的に同定した。PAR-1 の温度感受性変異体 par-1（zu310）は、キナーゼドメインに点変異を有し（I306N）、飼育温度 25℃ではキナーゼ活性の低下によって 100%胚性致死を示す［3，6］。この par-1（zu310）変異体を 15℃で飼育した後に、0.04 M メタンスルホン酸エチル 5 時間処理によって突然変異を導入し、第二世代以降に 25℃で生育する個体を単離した。突然変異処理した約 200,000 個体からは、24 種の個体が 25℃で生育可能となり、これらの個体に導入された変異を有する遺伝子群を supo（suppressor of par-1）と命名した。par-1（zu310）の 25℃における生育率は 5%程度であるが、24 種の par-1（zu310）；supo 二重変異体は最大 96%の生育率を示すことが示された（図 1）。ほとんどの supo 変異は劣勢変異であり、ヘテロ遺伝子変異では par-1（zu310）の 25℃における致死性を回復できなかった（図 1）。以上の結果から、PAR-1 キナーゼ失活による個体の致死性は、supo 遺伝子変異によって顕著に抑制できることが証明できた。

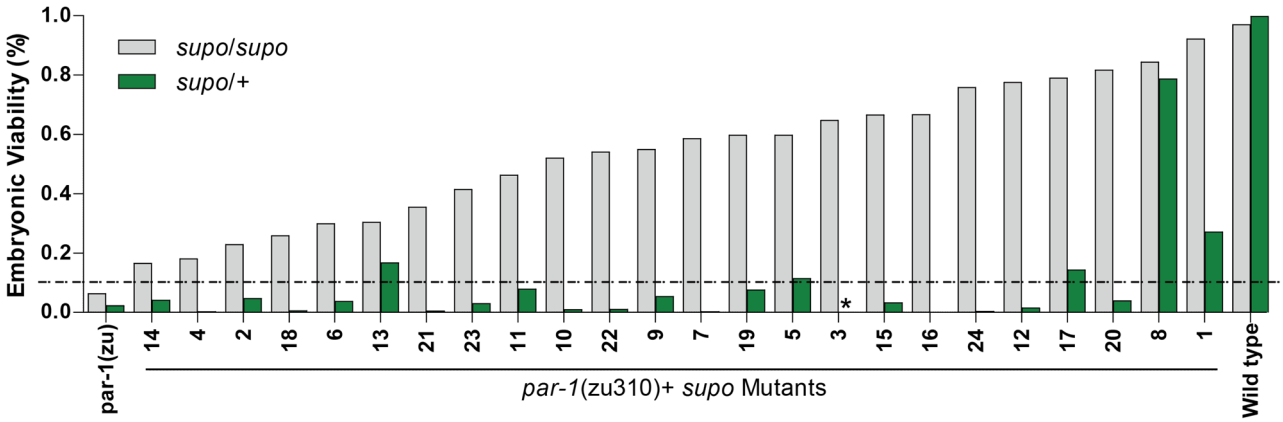


図 1. PAR-1 温度感受性変異体のサプレッサー変異（supo）の単離

突然変異処理した par-1（zu310）変異体約 200,000 個体から、25℃で生育可能な par-1（zu310）；supo 二重変異体を 24 種単離した。supo-8 を除いた全ての supo は劣勢変異である。

2. PAR-1 温度感受性変異を抑制するサプレッサー遺伝子変異の同定

ほとんどの supo 変異が劣勢であり、par-1 遺伝子領域外に位置していることから、supo 遺伝子変異の同定には「全ゲノムシークエンシング（WGS）と一塩基多型（SNP）を併用した遺伝学的マッピング手法を採用した（図 2）。この手法で supo24 種中 16 遺伝子変異座が同定され、染色体 1～5 番までの幅広い領域に観察された。そのうち 3 変異（supo-1, 3, 19）は、par-1 遺伝子内に変異を有していたため、その後の機能解析からは除外した。

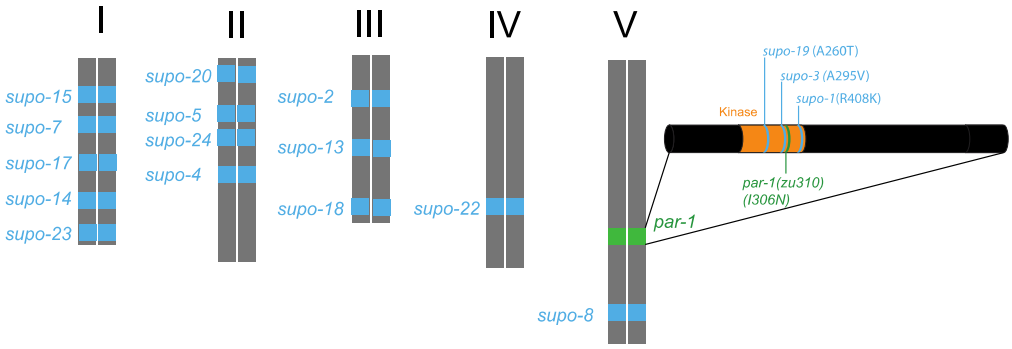


図 2. supo 遺伝子変異座の同定

全ゲノムシークエンシング（WGS）と一塩基多型（SNP）を併用した遺伝学的マッピング手法で 16 遺伝子座が同定された。

3. supo 遺伝子変異の機能解析

supo 変異が par-1（zu310）変異体の致死性を抑制する現象の特異性を検証するために、25℃で生育した par-1（zu310）変異体と par-1（zu310）；supo 二重変異体において、生殖顆粒の形成を観察した。PAR-1 はキナーゼ活性を利用して、胚発生において生殖顆粒と呼ばれる液-液相分離構造を細胞質内で形成する［7］。この生殖顆粒は par-1（zu310）変異体では消失するが、ほとんどの par-1（zu310）；supo 二重変異体では生殖顆粒が観察できた（図 3a）。興味深いことに、par-1（zu310）；supo における生殖顆粒形成と 25℃生育率との関係には相関関係が見られるものの、par-1（zu310）；supo-2 と par-1（zu310）；supo-13 ではこの両者に相関関係が

見られない（図 3b）。この結果は、PAR-1 キナーゼ失活による胚性致死は、必ずしも生殖顆粒の消失によるものでは無いことを意味しており、胚発生における未知の PAR-1 機能を示唆している。

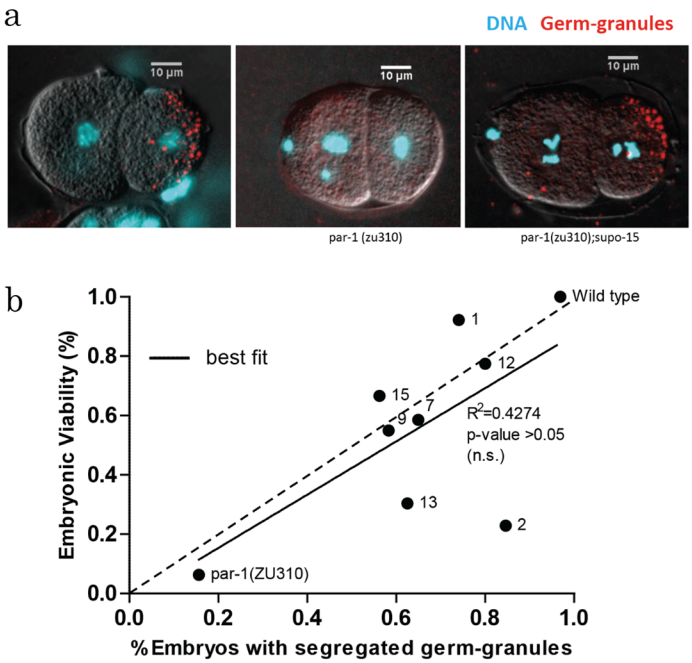


図 3. supo 変異が生殖顆粒形成に及ぼす影響の解析

a) 野生型（左）、par-1（zu310）（中央）、par-1（zu310）; supo-15（右）二細胞期胚における DNA と生殖顆粒の局在性（スケールバー：10 μ m）。

b) par-1（zu310）; supo 二重変異体では、生殖顆粒形成と生育率との関係に必ず相関関係が見られるわけではない。

考　察

本研究によって、細胞極性の確立に必須な PAR-1 のキナーゼ活性欠損を相補することのできる遺伝子変異 supo を単離・同定可能であることが証明できた。supo 変異 24 種類のうち、supo-1、3、19 は par-1 遺伝子内に変異を有していたが、その他の supo 変異は par-1 以外の遺伝子座にマッピングされたことから、supo 変異候補は複数存在しており、それぞれが直列または並列に働くことで、PAR-1 キナーゼ活性（またはそのシグナル伝達経路の下流で機能する因子）の亢進に寄与していると示唆される。現在は supo 遺伝子群の機能を解析することで、par-1 サプレッサーの全体像を体系的に解明することを目指している。PAR-1 は高度に保存されたキナーゼであり、またほとんどの supo 遺伝子もヒトを含む哺乳動物に保存されていることから、PAR-1 と supo 遺伝子群の機能解析を、哺乳動物で遂行することが可能となる。発生から老化に亘って PAR キナーゼの破綻を抑制する分子の探索は初めてであり、これまでに無い癌化・老化抑制因子の発見と、極性異常が引き起こす疾患を抑制するための新しい概念の創出が期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究は、北海道大学遺伝子病制御研究所の西村有香子博士と国立シンガポール大学の Warren Tan 氏の支援を受けて遂行されました。また本研究で使用した線虫遺伝子変異株 par-1 (zu310) は、C. elegans Genetic Center から供与して頂きました。

文　献

1) Wu Y, Griffin EE. Regulation of Cell Polarity by PAR-1/MARK Kinase. Curr Top Dev Biol. 2017; 123:365-397. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.11.001. PMID: 28236972

2) Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early C. elegans embryos. Cell. 1988 Feb 12;52(3):311-20. doi: 10.1016/s0092-8674(88)80024-2. PMID: 3345562

3) Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell. 1995 May 19;81(4):611-20. doi: 10.1016/0092-8674(95)90082-9. PMID: 7758115

4) Hurd DD, Kemphues KJ. PAR-1 is required for morphogenesis of the Caenorhabditis elegans vulva. Dev Biol. 2003 Jan 1;253(1):54-65. doi: 10.1006/dbio.2002.0866. PMID: 12490197

5) Inhibition of PAR-1 delays aging via activating AMPK in C. elegans. Wu D, Cai W, Zhang X, Lan J, Zou L, Chen SJ, Wu Z, Chen D. Aging. 2020 Nov 20;12(24):25700-25717. doi: 10.18632/aging.104180.

6) Ramanujam R, Han Z, Zhang Z, Kanchanawong P, Motegi F. Establishment of the PAR-1 cortical gradient by the aPKC-PRBH circuit. Nat Chem Biol. 2018 Oct;14(10):917-927. doi: 10.1038/s41589-018-0117-1. PMID: 30177850

7) Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoege C, Gharakhani J, Jülicher F, Hyman AA. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. Science. 2009 Jun 26;324(5935):1729-32. doi: 10.1126/science.1172046. PMID: 19460965