

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007 ～ 2010

課題番号：19207017

研究課題名(和文) 非対称細胞分裂を制御する新規 Wnt シグナル伝達機構の研究

研究課題名(英文) Mechanisms of a novel Wnt signaling pathway regulating asymmetric division

研究代表者

澤 齊 (SAWA HITOSHI)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・教授

研究者番号：80222024

研究成果の概要(和文)：幹細胞は非対称に分裂し、異なる細胞を作り出します。線虫の非対称分裂の際、細胞外シグナル(Wnt)は、癌抑制タンパク APC の細胞膜近傍での非対称な局在を制御しています。我々は APC が非対称な紡錘体形成を介して、 β カテニンの非対称な核局在そして娘細胞間での異なる遺伝子発現を制御していることを明らかにしました。本研究により、細胞外シグナルが微小管を制御することで核に伝達される新しいシグナル伝達機構が明らかになりました。

研究成果の概要(英文)：Stem cells divide asymmetrically to produce distinct daughter cells. In the nematode, extracellular signals (Wnts) regulate asymmetric localization of tumor suppressor protein APC on the cell cortex. We discovered that APC regulates asymmetric nuclear localization of β -catenin and distinct gene expression between daughter cells by inducing asymmetry of the spindle structure. Our results show a novel mechanism of signal transduction in which extracellular signals are transmitted into nuclei by modulating microtubules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2008年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2009年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
総計	34,800,000	10,440,000	45,240,000

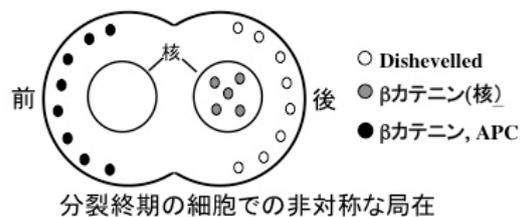
研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：非対称細胞分裂、Wnt、 β カテニン、紡錘体、微小管、線虫、細胞極性

1. 研究開始当初の背景

非対称細胞分裂は細胞の多様性を作り出す基本的機構である。線虫 *C. elegans* においては非対称分裂が β カテニンを介した Wnt シグナル伝達によって制御されている。細胞分裂の際、 β カテニンや APC などのシグナル分子が細胞表層に非対称に局在し、分裂の終期に β カテニン自身の非対称な核局在を制御している。



われわれは β カテニンの核局在が表層の β カテニンと APC によって制御されていることを明らかにしていた。しかし、APC がどのように β カテニンの核局在を制御しているかは明らかでなかった。

2. 研究の目的

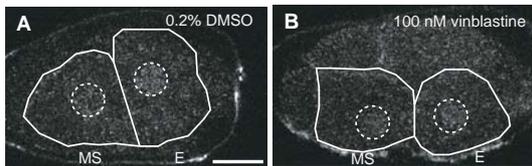
哺乳類の APC は微小管に結合しその安定性を制御していることが知られている。そこで、線虫の非対称分裂において、 β カテニンの核局在を制御する機構を微小管の役割に焦点を当てて明らかにする。

3. 研究の方法

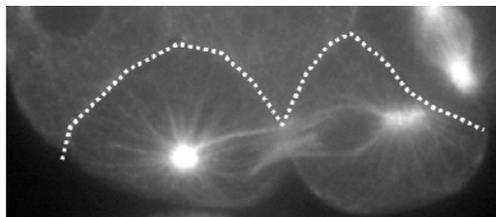
- (1) 非対称分裂に微小管が関与するか微小管阻害剤を加えて調べる。
- (2) 非対称分裂の際の微小管の構造、動態を詳細に観察する。
- (3) 野生型または Wnt や APC などを阻害して微小管への影響を調べる。
- (4) 微小管と非対称な遺伝子発現、細胞運命との関係を調べる。
- (5) 微小管をレーザーで操作して、 β カテニンの核局在への影響を調べる。
- (6) β カテニンの局在に対するキネシンの関与を調べる。

4. 研究成果

- (1) 微小管の関与を調べるために、微小管阻害剤を EMS 割球の非対称分裂 anaphase 特異的に加えたところ、 β カテニンの核局在の非対称性が失われ、微小管が必要であることが明らかになった。(下図)

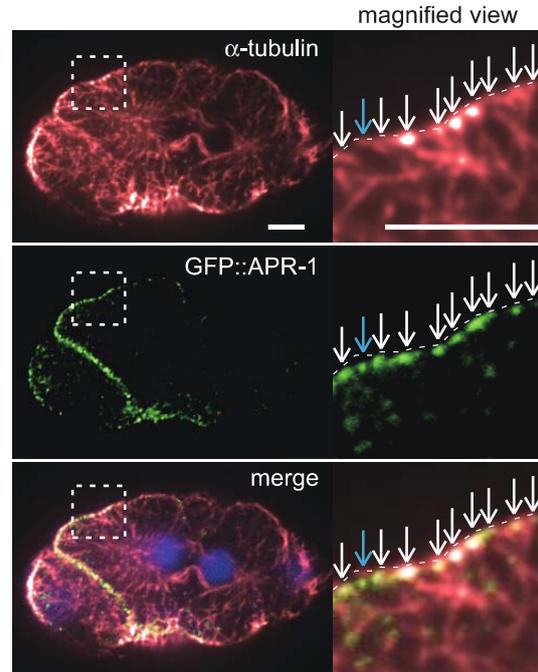


- (2) 非対称分裂の telophase に星状微小管の数が非対称である（前側の方が多い）ことを発見した。(非対称な紡錘体、下図)



また微小管のプラス端に結合する EB1 を用いて微小管の動態を調べたところ、微小管の伸長速度は前後で変わらないが、表層にプラス端がとどまる時間が前側の方が長いことがわかった。

- (3) このような微小管の数の非対称性は Wnt や APC の阻害で消失した。また APC は Wnt や β カテニン依存的に前側の表層に局在し、微小管と共局在していた。

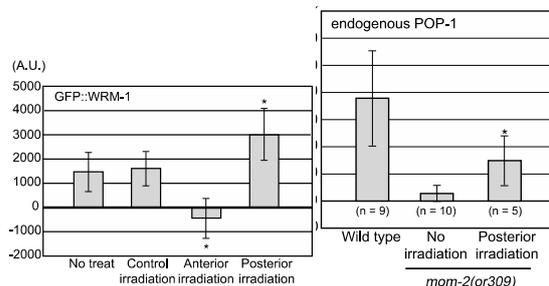


以上の結果表層の APC タンパク質が微小管を安定化することで非対称な紡錘体が形成されることが明らかになった。

- (4) 非対称な紡錘体の役割を調べるために、非対称分裂が低頻度に異常になる Wnt の機能低下型変異体において、紡錘体の非対称性と、非対称な遺伝子発現および細胞運命との関係を調べた。EMS 割球の非対称分裂では前側の MS 娘割球は中胚葉になり、後ろ側の E 娘割球は *end-1* 遺伝子を発現して腸を作る。Wnt の変異体において、正常に E 細胞が *end-1* を発現している場合や、腸を作る場合は紡錘体が非対称だが、*end-1* の発現や腸の形成が異常な場合は紡錘体が対称であることが明らかになった。非対称な紡錘体が非対称分裂を制御していることが強く示唆された。

- (5) 非対称な紡錘体の β カテニンの核局在に対する役割を明らかにするため、レーザーを用いた中心体の破壊実験を行った。微小管の数の少ない後側の中心体を破壊し(次項図左 Anterior irradiation)、微小管の非対称性を増強させると、 β カテニンの非対称性が増強され、反対に前側の中心体を破壊して(次項図右 Posterior irradiation) 微小管の非対称性を消失させると、 β カテニンの非対称性も消失した。さらに Wnt の変異体での β カテニンの局在異常が、レーザー処理によって人為的に微小管の非対称性を作ることで回復できることを明らかにした(次項図右)

Posterior irradiation)。以上の結果、非対称な紡錘体は β カテニンの非対称な核局在を制御していることが明らかになった。(下図で縦軸は前後の核の WRM-1/ β カテニン(左)、POP-1/TCF(右)の量の差)



(6) キネシンの阻害剤として知られている Aurintricarboxylic Acid によって β カテニンの非対称核局在が阻害されたことから、キネシンが関与していることが示唆された。機能しているキネシンを同定するため RNAi によって 18 種類のキネシンの阻害実験を行い、三種類のキネシン (ZEN-4, BMK-1, KLP-18) が関与していることを明らかにした。このうち KLP-18 を阻害した場合は非対称な紡錘体には変化が見られず、KLP-18 が紡錘体の下流で β カテニンの核局在に関与していることが明らかになった。KLP-18 によって β カテニンが核近傍から輸送されることで核外輸送が促進されるモデルが考えられる。

以上の結果、Wnt シグナルは微小管の非対称性を制御することで、 β カテニンの局在そして非対称な遺伝子発現を制御していることが明らかになった。これは細胞外シグナルが微小管構造を変化させることで核に伝わる初めての例である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件) (査読有)

- ① Extracellular control of PAR protein localization during asymmetric cell division in the *C. elegans* embryo. Arata Y., Lee J.Y., Goldstein B. and Sawa H. Development 137, 3337-3345 (2010)
- ② Double bromodomain protein BET-1 and MYST HATs establish and maintain stable cell fates in *C. elegans*. Shibata Y., Takeshita

H., Sasakawa N. and Sawa H. Development 137, 1045-1053 (2010)

- ③ Regulation of asymmetric positioning of nuclei by Wnt and Src signaling and its roles in POP-1/TCF nuclear asymmetry in *C. elegans*. Sugioka K. & Sawa H. Genes to Cells, 15, 397-407 (2010)
- ④ Specification of neurons through asymmetric cell divisions. Sawa H. Current Opinion in Neurobiology 20, 44-49 (2010)
- ⑤ Complex network of Wnt signaling regulates neuronal migrations during *C. elegans* development. Zinovyeva A. Y., Yamamoto Y., Sawa H. and Forrester W. C. Genetics 179, 1357-1371 (2008)
- ⑥ β -Catenin asymmetry is regulated by PLA1 and retrograde traffic in *C. elegans* stem cell divisions. Kanamori T., Inoue T., Sakamoto T., Gengyo-Ando K., Tsujimoto M., Mitani S., Sawa H., Aoki J. and Arai H. EMBO Journal 27, 1647-1657 (2008)
- ⑦ Two β s or not two β s: regulation of asymmetric division by β -catenin Mizumoto, K. & Sawa, H. Trends in Cell Biology 17, 465-473 (2007)
- ⑧ RMD-1, a novel microtubule-associated protein functions in chromosome segregation in *Caenorhabditis elegans*. Oishi K., Okano H. and Sawa H. Journal of Cell Biology 179, 1149-1162 (2007)
- ⑨ Cyclin E and CDK2 repress the terminal differentiation of quiescent cells after asymmetric

division in *C. elegans*. Fujita M., Takeshita H.
and Sawa H. PLoS ONE 2, e407 (2007)

[学会発表] (計 6 件)

① Hitoshi Sawa: A network of multiple Wnts and their receptors synchronizes polarities of epithelial stem cells in *C. elegans*
October 29, 2010, European Wnt meeting at Stockholm

② Yuko Yamamoto, Hisako Takeshita Hitoshi Sawa Multiple WNTs regulate polarities of seam cells during asymmetric divisions in *C. elegans*.
EMBO Conference Series: *C. elegans*: Development and Gene Expression June 19, 2010 Heidelberg, Germany

③ 澤 齊
Wnt による非対称分裂制御機構
日本生化学会年会 (2009) 10 月 24 日神戸

④ Hitoshi Sawa
Regulation of asymmetric cell division by Wnt signaling through asymmetric spindle microtubules in *C. elegans*
Kenji Sugioka and Hitoshi Sawa
国際発生生物学会 エジンバラ UK (2009) 9 月 8 日

⑤ Hitoshi Sawa
Regulation of Asymmetric Cell Division by Wnt Signaling in *C. elegans*
CDB Symposium "Shape & Polarity" (2009) 神戸)

⑥ Hitoshi Sawa
Life without Wnts; Wnt dependent and independent regulation of beta-catenin by Frizzled in cell polarization
Wnt-Signaling in Development and Disease
2007 年 9 月 14 日 Berlin, Germany

[図書] (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.nig.ac.jp/labs/MultiOrg/Multicellular/>

Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤 齊 (SAWA HITOSHI)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・教授

研究者番号 : 80222024