

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657088

研究課題名(和文)人為的に極性化した細胞を用いた非対称分裂制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulation of asymmetric cell division by using the artificially induced polarization of HeLa cells.

研究代表者

花房 洋 (Hanafusa, Hiroshi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00345844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：非対称分裂は、幹細胞の増殖・分化を制御する重要な機構である。本研究では、本来極性のないHeLa細胞に細胞間接着分子Echinoidと極性分子とのキメラを発現させることで、人為的に極性を誘導し、非対称分裂に重要な因子の作用機構の解明を目指した。その結果、ROCOファミリーキナーゼLRRK1がM期スピンドル配向を制御することで、細胞の分裂軸決定に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Asymmetric cell division is an important mechanism that regulates growth or differentiation of stem cells. In this project, we tried to reveal the role of important factors in asymmetric cell division by using the artificially induced polarization of HeLa cells, in which expressed the chimera molecules between Echinoid, an cell-cell adhesion molecule, and a factor, which activates the polarization signal pathway. We found that ROCO family kinase LRRK1 plays an important role in the control of the axis of cell division by regulating the mitotic spindle.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝染色体動態

キーワード：細胞極性 LRRK1 スピンドル配向

## 1. 研究開始当初の背景

非対称分裂 (asymmetric cell division) は、神経前駆細胞や上皮前駆細胞などの増殖・分化の制御に必須の役割を果たしている。これら前駆細胞は非対称分裂により、娘細胞の一方は分化し、もう一方は幹細胞としての性質を残し自己増殖する。非対称分裂は幹細胞が自己増殖と分化を行う際の基本的なシステムの一つである。そのため、非対称分裂の破綻が原因となる症例は数多く存在する。例えば、大脳皮質脳室帯において神経前駆細胞は対称的に分裂することで自己増殖し前駆細胞のプールを増やす。十分な前駆細胞のプールを作り出した後は、非対称分裂することで娘細胞の一方が神経細胞へと分化することが知られている。これが異常になると、十分な前駆細胞のプールが形成される前に、不適切な時期での神経分化が生じる。その結果、最終的な神経細胞集団の数の減少をまねき、小頭症や滑脳症を生じることが知られている。本研究から、極性化した細胞でどのような分子機構が働き非対称分裂につながっていくのか明らかにできれば、これら臨床的に重要な問題に対する治療法の確立が期待できる。

非対称分裂は、細胞の極性化を介して細胞分裂期に紡錘体配向 (spindle orientation) が制御されることで生じる。紡錘体の配向は、中心体から伸びた星状微小管 (astral microtubules) と細胞膜との相互作用で制御されており、細胞膜上に極性を制御する分子が非対称的に局在することが重要である。これまでショウジョウバエや、線虫、マウスなどをモデルに、極性化の確立に重要な蛋白質として PAR3/PAR6/aPKC 複合体などが、極性決定因子として Miranda、Prospero、Numb などが、星状微小管と相互作用する膜局在蛋白質として Gai/LGN/NuMA 複合体などが同定されてきた。このように多数の構成因子が同定されたが、それらが織りなす作用機序については未だ不明な点が多い。モデル生物の利用は、構成因子の同定や、それらの生理的な重要性、遺伝学的な上下関係を検討するにはいいが、ある蛋白質の機能ドメインやリン酸化など、翻訳後修飾の重要性を検討する場合や、キナーゼ活性など酵素活性の重要性を検討するのは困難である。そこで本研究では、人為的に細胞を極性化することで、非対称分裂を制御する因子が織りなす作用機構の解明を目指す。

## 2. 研究の目的

申請者は、本来極性のない HeLa 細胞に細胞間接着分子 Echinoid と極性分子とのキメラを発現させることで、人為的に極性を誘導し、非対称分裂に重要な因子の作用機構の解明を目指した。このシステムのメリットは、極性細胞の持つ外部環境や内因性のシグナルからの影響を排除でき、かつ簡便に非対称

性分裂に対する効果を評価できることである。本研究では、このメリットを活かして新規極性因子の同定を試み、さらにそれらがどのようなメカニズムで細胞分裂軸の決定に関与しているのか明らかにする。

## 3. 研究の方法

目的の3点について以下の計画をたてた。  
(1) 細胞間接着分子 Echinoid キメラを用いた HeLa 細胞の人為的な極性化  
ネクチン様細胞間接着分子 Echinoid は、ホモ親和性に細胞間を接着させる膜蛋白質である。GFP と融合させた Echinoid の細胞外ドメイン及び膜貫通領域 (Ed:GFP) を発現させると、隣り合った細胞の接着面にのみ強く局在する。このとき極性蛋白質と Ed:GFP とのキメラを発現させると、極性蛋白質を隣り合った細胞との接着面に人為的に局在させることができ、細胞に極性を持たせることができる。実際、ショウジョウバエ S2 細胞に Ed:GFP:Pins (ショウジョウバエ LGN ホモログ) キメラを発現させると、人為的に極性化を誘導できることが報告されている。そこでこの方法に倣い、HeLa 細胞に Ed:GFP:LGN を発現させ、人為的に極性を作り出すことを試みた。

(2) 誘導極性化細胞を用いた PLK1 及び LRRK1 による NuMA リン酸化の重要性の検討  
申請者はこれまでの研究から、分裂期キナーゼ PLK1 及び ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 が NuMA をリン酸化することを見出している。また PLK1 および LRRK1 の活性を阻害すると、NuMA の膜局在が消失し紡錘体配向が異常になる (未発表データ)。NuMA はダイニンとともに星状微小管と細胞膜との相互作用を制御し、紡錘体配向制御に機能していることが知られている。我々は LRRK1 がダイニンと相互作用し、ダイニン依存的な逆行輸送に関与していることを明らかにしてきた (Nature Commun. 2011; MBC 2012)。そこで LRRK1-NuMA-ダイニンの非対称分裂における作用機構の解明を試みる。

(3) 誘導極性化細胞を用いた各極性化シグナル下流因子の RNAi スクリーニングによる同定

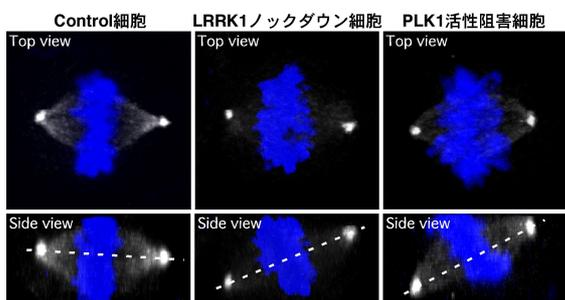
Ed:aPKC、Ed:Numb、Ed:LGN をそれぞれ発現させ人為的に極性化した HeLa 細胞に対し、siRNA ライブラリーによる RNAi スクリーニングを行う。このとき、紡錘体配向が異常になる表現型を示す遺伝子を同定することで、新規極性化因子の同定を試みる。極性化シグナルの各ステップを活性化させることで、パラレルに機能する経路や、重複して機能する経路なども同定できると考えている。

## 4. 研究成果

本研究では、非極性の HeLa 細胞に人為的に極性を持たせることが1つのポイントで

あった。文献的には細胞間接着分子 Echinoid と極性分子とのキメラで、隣り合った HeLa 細胞に極性を誘導できることになっている。しかし、我々が行った実験では、効率良く極性化した HeLa を得ることは非常に困難であった。そこで極性化による新規因子のスクリーニングから、これまでに予備的に得られていた因子による非対称分裂制御機構の解明へと、解析の比重をシフトさせることにした。我々は ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 が M 期キナーゼ PLK1 の下流で、M 期スピンドル配向を制御していることを見出していた。そのメカニズムを詳細に検討したところ、PLK1 は LRRK1 の Ser-1790 をリン酸化し、M 期中心体での LRRK1 の活性化に機能していることを明らかにした。さらに中心体で活性化した LRRK1 は、中心体構成因子をリン酸化することで、中心体の微小管形成活性を抑制し、星状体微小管の形成に重要な役割を果たしていた。

以上の結果から、LRRK1 は PLK1 の下流で中心体成熟（微小管形成活性）に機能し、星状体微小管の形成を介して、M 期スピンドル配向を制御していることを明らかにした。



## 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 1 件)

(1) Ishikawa, K., Nara, A., Matsumoto K., and Hanafusa, H. EGFR-dependent phosphorylation of leucine-rich repeat kinase LRRK1 is important for proper endosomal trafficking of EGFR. *Mol. Biol. Cell*, 23:1294-1306 (2012).

〔学会発表〕(計 12 件)

花房洋、慶田城迅、渡辺崇、貝淵弘三、松本邦弘

The regulation of the intracellular trafficking of EGFR by ROCO family kinase LRRK1

第 65 回日本細胞生物学会年会

2013 年 6 月 19 日～21 日

ウイנק愛知

Haruka Ikeda, Hiroshi Hanafusa, Tomoki Nishioka, Kozo Kaibuchi, Kunihiko Matsumoto, Kyoko Shirakabe

LRRK1 regulates the maturation of autolysosome by phosphorylating Rab7

第 36 回日本分子生物学会年会

2013 年 12 月 3 日～6 日

神戸ポートアイランド

Shin Kedashiro, Hiroshi Hanafusa, Takashi Watanabe, Kozo Kaibuchi, Kunihiko Matsumoto

LRRK1 regulates EGFR intracellular trafficking by phosphorylating CLIP-170

第 36 回日本分子生物学会年会

2013 年 12 月 3 日～6 日

神戸ポートアイランド

小松日菜子、花房洋、松本邦弘

LRRK1 は M 期中心体の integrity 維持に必要である

第 35 回日本分子生物学会年会

2012 年 12 月 11 日～14 日

福岡国際会議場

佐井和人、花房洋、松本邦弘

PP5 は LRRK1 キナーゼ活性を負に制御することで紡錘体の多極化を防いでいる

第 35 回日本分子生物学会年会

2012 年 12 月 11 日～14 日

福岡国際会議場

伊藤裕志、花房洋、松本邦弘

LRRK1 はキネトコアとスピンドル微小管との接着を安定化する

第 35 回日本分子生物学会年会

2012 年 12 月 11 日～14 日

福岡国際会議場

慶田城迅、花房洋、高島成二、松本邦弘

LRRK1 は CLIP170 をリン酸化することにより EGFR の微小管上の輸送を制御する

第 35 回日本分子生物学会年会

2012 年 12 月 11 日～14 日

福岡国際会議場

花房洋、手塚基弘、豊島文子、松本邦弘

PLK1-LRRK1 経路による M 期紡錘体配向の制御機構

第 34 回日本分子生物学会年会

2012 年 12 月 13 日～16 日

パシフィコ横浜

石川光紀、花房洋、奈良篤樹、松本邦弘

EGFR 依存的な LRRK1 のリン酸化は適切な EGFR 細胞内トラフィックに重要である

第 34 回日本分子生物学会年会

2012 年 12 月 13 日～16 日

パシフィコ横浜

宇佐美学史、花房洋、松本邦弘  
LRRK1 は Prefoldin 複合体と相互作用することで星状体微小管の形成に機能している  
第 34 回日本分子生物学会年会  
2012 年 12 月 13 日～16 日  
パシフィコ横浜

佐井和人、花房洋、松本邦弘  
セリンスレオニンフォスファターゼ PP5 による LRRK1 キナーゼ活性の制御機構  
第 34 回日本分子生物学会年会  
2012 年 12 月 13 日～16 日  
パシフィコ横浜

崔恵蘭、花房洋、松本邦弘  
LRRK1 は aggregates の輸送を介して aggresome 形成を制御する  
第 34 回日本分子生物学会年会  
2012 年 12 月 13 日～16 日  
パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
[http://bunshi3.bio.nagoya-u.ac.jp/~bunshi6/matsumoto\\_japanese/](http://bunshi3.bio.nagoya-u.ac.jp/~bunshi6/matsumoto_japanese/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

花房 洋 (Hanafusa Hiroshi)  
名古屋大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：00345844