

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 年～2012 年

課題番号：23791265

研究課題名（和文） 皮膚形成における Ca²⁺制御と c-Abl による分裂軸の配向制御

研究課題名（英文） Control of spindle orientation in skin basal cells by c-Abl and possible role of calcium signaling in spindle orientation

研究代表者

松村 繁（Matsumura Shigeru）

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：60523511

研究成果の概要（和文）：これまでに全キナーゼの siRNA ライブラリを用いたスクリーニングを行い、候補遺伝子のひとつ、非受容体型チロシンキナーゼである c-Abl による細胞分裂軸の配向制御を解析してきた。培養細胞及び皮膚基底細胞において、c-Abl は紡錘体の方向を制御することを見出した。さらに c-Abl は、LGN 及び NuMA という紡錘体軸方向制御の中心的制御因子の膜局在を制御することで細胞の分裂軸方向を制御していることを示した。

研究成果の概要（英文）：We performed a genome-scale RNA-mediated interference screen of human kinases using the HeLa cell system and identified ABL1 tyrosine kinase as a novel regulator for spindle orientation in mammalian cells. We find that ABL1 regulates spindle orientation not only in HeLa cells but also in mouse epidermis. Furthermore, we found that ABL1 regulates spindle orientation through LGN and NuMA, which form an evolutionarily conserved regulatory complex for spindle orientation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：細胞分裂軸、皮膚基底細胞、ABL1

1. 研究開始当初の背景

臓器の形成・機能維持は幹細胞の適切な細胞運命決定機構に依存しており、その研究は再生医療の根幹の一つである。幹細胞の運命決定は微小環境が生み出す細胞極性と非対称分裂によって制御されることが明らかとなってきた。特に皮膚は再生力の高い組織であり、良い研究対象である。皮膚組織は、真皮層と表皮から成る。表皮は増殖する基底細胞とその増殖により供給される上層の分化細胞から成る。皮膚幹細胞の存在する基底層での非対称分裂の制御は多層構造形成に重要であることがマウス皮膚上皮形成において報告されてきた。本研究では、簡便な培養細胞系を用いた分裂軸制御機構の研究知

見を用いて、皮膚組織での基底層の非対称分裂の分子機構解明を目的とした。

2. 研究の目的

皮膚基底細胞での c-Abl による分裂軸制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

接着細胞は分裂期において細胞—細胞外基質接着面に対して平行に分裂する。これは、紡錘体軸の方向制御機構の存在を意味する。本研究は、この実験系を用いて全キナーゼの siRNA スクリーニングを行い、候補遺伝子 c-Abl を得た。c-Abl による分裂軸制御機構の解明に、培養細胞及びマウス胎仔皮膚基底細胞を用いて分子機構を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 我々は今回ヒト培養細胞である HeLa 細胞を用いて、分裂軸制御因子をヒトの全キナーゼに対して網羅的に探索し、c-Abl チロシンキナーゼが新規分裂軸制御因子であることを見出した (図 1)。

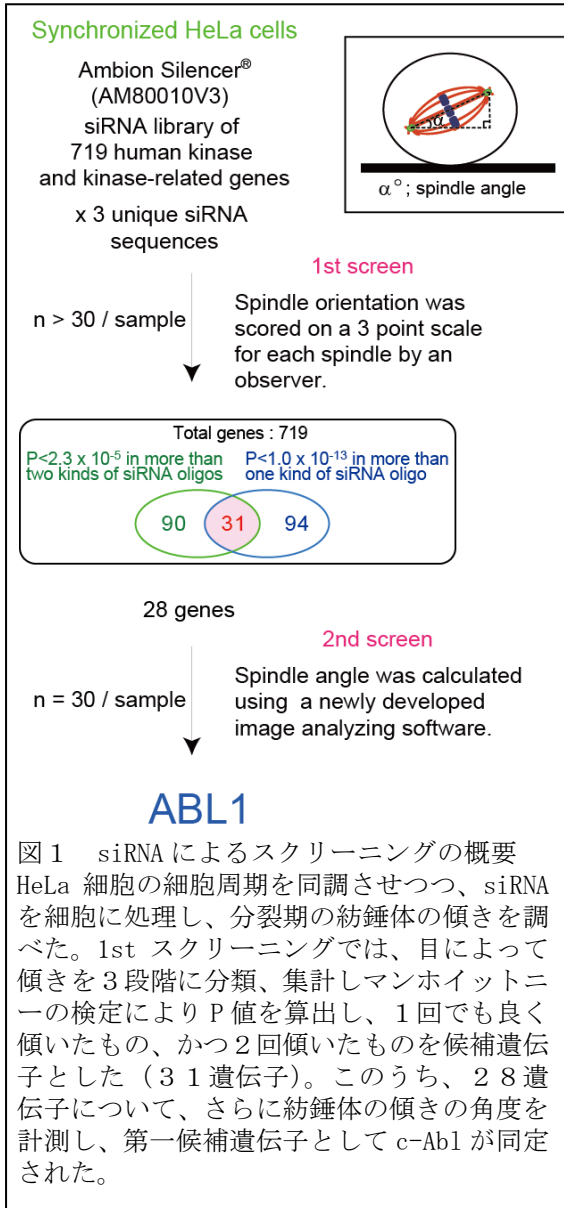


図1 siRNAによるスクリーニングの概要
HeLa 細胞の細胞周期を同調させつつ、siRNAを細胞に処理し、分裂期の紡錘体の傾きを調べた。1st スクリーニングでは、目によって傾きを3段階に分類、集計しマンホイットニーの検定によりP値を算出し、1回でも良く傾いたもの、かつ2回傾いたものを候補遺伝子とした(31遺伝子)。このうち、28遺伝子について、さらに紡錘体の傾きの角度を計測し、第一候補遺伝子としてc-Ablが同定された。

これまでの研究により、LGN, NuMAは進化的に保存された分裂軸制御因子であることが示されてきている。HeLa細胞においてc-AblのノックダウンはLGNの細胞膜局在を過剰にさせることで分裂軸の異常を引き起こしていた。またc-Ablノックアウトマウスの胎仔の皮膚基底細胞において、野生型では端頂側の細胞膜に局在するLGNが、端頂側に限定されることなくランダムに局在し分裂軸の異常を引き起こしていた(図2)。また、HeLa細胞において、c-AblはNuMAの1774番目のチロシンリン酸化をすることを見出した。1774番目のチロシンのリン酸化はNuMAが分裂期

中期に細胞膜に局在維持するのに必要であり、分裂期中期のNuMAの膜局在が、LGNの膜局在位置に正確に紡錘体を方向づける役割を果たしていることを見出した(図3)。

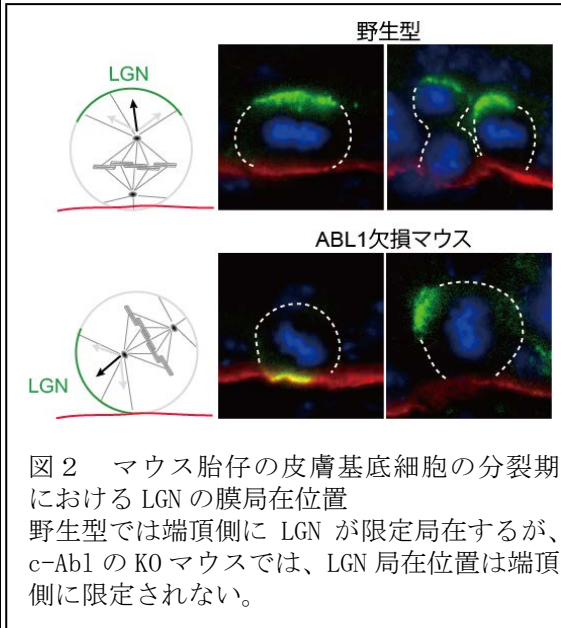


図2 マウス胎仔の皮膚基底細胞の分裂期におけるLGNの膜局在位置
野生型では端頂側にLGNが限定局在するが、c-AblのKOマウスでは、LGN局在位置は端頂側に限定されない。

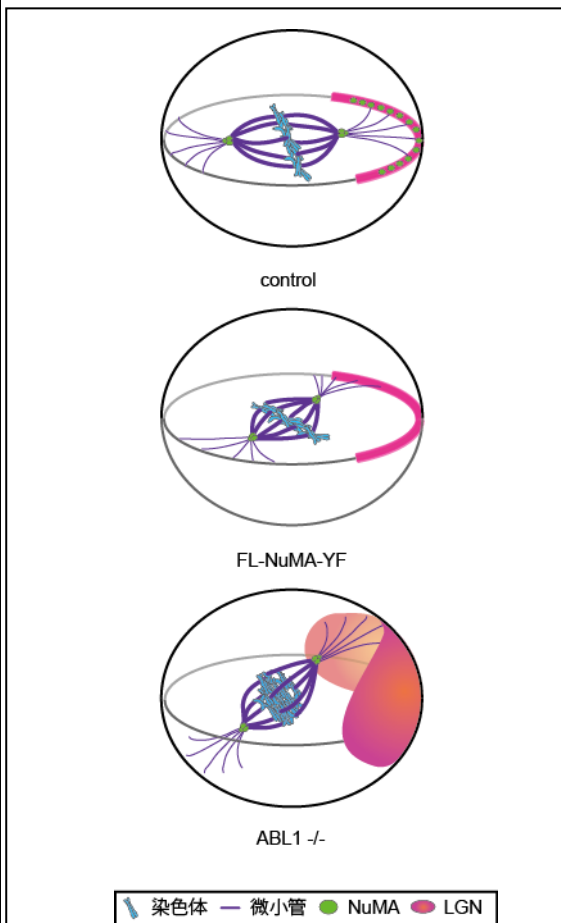


図3 モデル図
正常状態では、分裂期の細胞膜にLGN及びNuMAが三日月状に局在し、三日月局在の中心

方向に紡錘体は正確に方向づけられる。NuMAの1774番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したリン酸化されない変異体では、NuMAは膜局在できず、LGNの三日月状局在の中心ではなく端のほうに紡錘体は向いてしまう。c-Ablの発現抑制は、NuMAの膜局在を失わせるだけでなく、LGNの膜局在を過剰にさせるため、紡錘体は大きく傾く。

分裂軸の方向制御は幹細胞研究において重要であることは広く認識されつつあるが、その解明はあまり進んでいなかった。それは、ハエや線虫を用いた変異体解析でのスクリーニングを哺乳類に応用していたからである。今回の我々の成果は培養細胞を用いた分裂軸制御機構の解析およびそれにより得られる知見が生体内の分裂軸制御機構に応用可能であることを示し、これまで哺乳類でできなかった分裂軸に関するスクリーニングを可能にし、この分野の研究速度を飛躍的に加速させるものである。今後、再生医療における幹細胞研究はますます重要になるが、分裂軸方向の制御の加速度的な解明が幹細胞研究に大きく影響すると思われる。

(2) 一方で、皮膚の分化にはCa²⁺の濃度が重要である。HeLa細胞において、分裂軸制御にCa²⁺が関与する可能性について検証を行った。CaMK2阻害剤であるKN-93やCa²⁺イオノフォアを用いて、細胞内Ca²⁺シグナルの阻害を行ったが、分裂軸の異常は観察されず、LGNの局在変化も有意な差は認められなかった。HeLa細胞において、ABL1欠損による分裂軸の異常はLGNをさらに欠損させることで分裂軸を正常に戻すことができた。そこで、ABL1/LGNのダブルノックアウトマウス(KOマウス)の作出を試みた。しかし、胎生の早期に致死となるのか、ダブルKO個体を得ることはできなかった。そこで、皮膚器官培養法においてshRNAレンチウイルスによる遺伝子発現抑制の系の立ち上げを試みたが、効率的なウイルス感染を行うことができなかった。今後はKOマウスではない皮膚での遺伝子発現抑制の方法を模索する予定である。

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2件)

1. Matsumura, S., Hamasaki, M., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Sato, M., Nishida, E., and *Toyoshima, F.
"ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin." *Nat. Commun.* 3: 626. doi:10.1038/ncomms1634 (2012).

(査読有)(online paperの為doiのみ)

2. Matsumura, S., and Toyoshima, F.
"ABL1 joins the cadre of spindle orientation machinery." *Cell Struct. Funct.* 37, 81-87 (2012). (査読有)

[学会発表] (計6件)

- ①第35回 日本分子生物学会年会 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡
平成24年12月11日~12月14日
Talk及びポスター発表

2W6III-2, (2P-0395) "Mitotic Plasma Membrane Domain Components Regulate Spindle Orientation" 「細胞分裂期の膜ドメイン構成因子による分裂軸制御機構」
Shigeru Matsumura, Fumiko Toyoshima

- ②19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Mokam Hall, Seoul National University, August 23 - 24, 2012, Seoul, Korea

Talk "Spindle orientation machinery in mammalian cells" Shigeru Matsumura

- ③定量生物学の会 第四回年会、名古屋、2012年1月7-9日 (ポスター)

細胞分裂期における紡錘体の位置決めを制御するメカニズムの解析
松村繁、豊島文子

- ④Exciting Biologies Cellular development, "Biology at the interface", Sep. 29 - Oct. 1, 2011, Kobe, Japan (oral, poster)

ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin
Shigeru Matsumura, Mayumi Hamasaki, Takuya Yamamoto, Miki Ebisuya, Mizuho Sato, Eisuke Nishida, Fumiko Toyoshima

- ⑤Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, "Stem Cell Biology", Sep. 20-24, 2011, New York, U.S.A. (poster)

ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin
Shigeru Matsumura, Mayumi Hamasaki, Takuya Yamamoto, Miki Ebisuya, Mizuho Sato, Eisuke Nishida, Fumiko Toyoshima

- ⑥第63回日本細胞生物学会大会、札幌、2011年6月27-29日 (ポスター) 2P-001 ABL1による細胞分裂軸方向の制御機構

松村繁、濱崎真弓、山本拓也、戎家美紀、佐藤みずほ、西田栄介、豊島文子

[図書] (計1件)

松村繁、豊島文子、羊土社、ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期、2013、8ページ
[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://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/modules/research/content0028.html>

京都新聞 (1 月 18 日 25 面)、日刊工業新聞 (1 月 19 日 25 面) および毎日新聞 (1 月 18 日 4 面) に掲載されました。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 繁 (Matsumura Shigeru)
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号：60523511

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：