

非対称分裂を制御する Wnt シグナルに関与する新奇遺伝子の研究

Studies on novel genes that are involved in Wnt signaling regulating asymmetric division

(日本発生生物学会推薦)

研究代表者 遺伝学研究所 澤 齊 National Institute of Genetics Hitoshi SAWA

Asymmetric cell division is a fundamental mechanism to produce cellular diversity during development of animals. In *C. elegans*, asymmetric cell division is regulated by a divergent Wnt signaling pathway in which signaling components localize asymmetrically in the cells. We showed that a tumor suppressor protein APC that localizes to the anterior cell cortex stabilizes microtubules to create asymmetry in the number of astral microtubules during the divisions. By manipulating microtubules by laser treatments, we showed that this microtubule asymmetry regulates asymmetry of nuclear β -catenin localization. Our results show novel link between APC and nuclear β -catenin mediated by microtubules. To further elucidate the mechanism of asymmetric division, we have screened genes required for it by the RNAi method. We found that *ppk-1* and *icd-1* encoding phosphatidylinositol-4-phosphate 5' kinase and beta-subunit of the nascent polypeptide-associated complex (β NAC), respectively, are involved in asymmetric division of epithelial stem cells by regulating asymmetric localization of the TCF transcription factor.

研究目的

受精卵から個体が発生するまでには、多様な種類の細胞が作られる必要がある。非対称分裂は1つの細胞から2種類の異なる性質の細胞を作る機構である。線虫 *C. elegans* の多くの体細胞は前後方向に非対称に分裂し異なる運命を持った娘細胞を作り出す。この非対称分裂は canonical な Wnt シグナル経路因子によって制御されている。canonical な Wnt シグナル経路は哺乳類において幹細胞の維持、分化など様々な発生現象に関与し、その異常は癌などの疾患につながる。例えば、大腸がんの主な原因遺伝子である APC (adenomatous polyposis coli) は canonical な Wnt シグナルの抑制因子である。通常の canonical Wnt シグナル経路では β カテニンの安定性が制御されている。Wnt シグナルがない場合は β カテニンや APC などの働きで分解されているが、シグナルが入力されると、APC の働きが抑制され β カテニンは安定化して核に移行して転写を活性化する。これに対し、線虫の非対称分裂制御において、 β カテニンの安定性でなく、その細胞内での非対称な局在が Wnt

シグナルによって制御されており、我々はこの経路を Wnt β カテニン非対称経路と名づけた。細胞の分裂の際、 β カテニンや APC は前方の細胞膜近傍(細胞表層)に局在する。細胞分裂が終期に入り核膜が再形成されると β カテニンが後方の核に、転写因子 TCF が前方の核に局在するようになり、前後の娘細胞の核内で遺伝子の転写が非対称に制御され、異なる運命を持つ二つの細胞が形成される。これまでに我々は前方の表層に局在する β カテニンや APC が β カテニンの非対称核局在を制御することを明らかにしていたが、具体的な機構は不明であった。哺乳類において APC は β カテニンの分解に加えて微小管を制御していることが知られており、線虫の APC が微小管を介して β カテニンを制御している可能性を検討した。またこの経路に関与する新規遺伝子を同定するため RNAi 法によるスクリーニングを行った。

研究経過

1. APC は微小管を介して β カテニンを制御する
微小管の関与を調べるため、初期胚の細胞に微小管

阻害剤を加えたところ、 β カテニンや TCF の核局在の非対称性が失われることがわかり、微小管が非対称性制御に関与していることが明らかになった。

微小管の動態を詳細に調べたところ、星状微小管の数が非対称であることを発見した。前方の中心体からの微小管の方が後方よりも二倍近く多い。この非対称性は、Wnt、 β カテニン、APC の変異体で消失し、Wnt シグナル経路によって制御されていることがわかった。微小管のプラス端の細胞表層への滞在時間を調べたところ、APC が局在している前方の方が長く滞在していた。APC の変異体では滞在時間の前後での違いが消失し、表層の APC が微小管のプラス端を安定化させることで、微小管の数の非対称性を作り出していることが明らかになった。

微小管の非対称性の役割を明らかにするために、レーザー照射による微小管の破壊実験を行った。微小管の数の少ない後方で微小管を破壊して非対称性を増強すると β カテニン核局在の非対称性は増強された。反対に微小管の多い前方にレーザーを照射し、微小管の非対称性を破壊すると、 β カテニン核局在の非対称性も消失した。さらに微小管の非対称性が失われる Wnt の変異体において、後方の微小管を破壊し、微小管の非対称性を人為的に作り出すと、TCF 核局在の非対称性が復活した。以上の結果から、表層の APC が微小管の非対称性を介して、 β カテニン核局在の非対称性を制御していることが証明された。

2. 非対称分裂に関与する新規遺伝子の同定

非対称分裂に関与する新規遺伝子を同定するため RNAi 法によるスクリーニングを行った。線虫においては特定の遺伝子の二重鎖 RNAi を発現する大腸菌を食べさせることで RNAi の効果を得ることが可能であり、線虫の 80% の遺伝子に対する RNAi library が使用できる。線虫の側面に存在する表皮幹細胞は自己複製的非対称分裂を繰り返し行う。この幹細胞の数の異常を指標にスクリーニングした結果、いくつかの候補遺伝子を得ることが出来た。この候補遺伝子が実際に Wnt 経路に関与しているか明らかにするため、TCF の非対称核局在を調べたところ、*ppk-1* および *icd-1* 遺伝子の RNAi 個体で非対称性に異常が認められた。そこでこれらの遺伝子の変異体を取り寄せ TCF の局在を調べたところ、やはり異常であることがわかり、これらの遺伝子が Wnt 経路を介した非対称分裂制御に関与していることが明らかになっ

た。

ppk-1 は膜脂質 PIP2 から PIP3 を作り出す酵素、phosphatidylinositol-4-phosphate 5' kinase をコードしている。*ppk-1* 変異体の非対称分裂異常は IP3 受容体 *itr-1* の機能獲得型変異体で抑制されることから、保存された IP3 シグナル経路を介して非対称分裂を制御していると考えられる。*icd-1* はリボソームで合成されたばかりの新生ポリペプチド鎖に結合する NAC 複合体 (nascent polypeptide-associated complex) の β 鎖をコードしている。現在これらの遺伝子がどのように非対称分裂に関与しているか解析している。

考察

これまでに p53 などが微小管に結合し、ダイニンモータータンパク質によって核へと移行することで遺伝子発現が制御されることが知られていた。一方で、微小管が細胞外シグナルによって制御されることも知られていた。しかし、両者のつながりは今まで示されてこなかった。我々は APC が細胞質の微小管を改変することで、 β カテニンの核局在を制御していることを明らかにした。この発見により、細胞外からのシグナルが微小管の制御を介して核内の遺伝子発現を制御するという仕組みが初めて明らかになった。同様の機構は、特に細胞外シグナルが細胞骨格と遺伝子発現を協調させて制御する必要のある、移動する細胞や、極性化した細胞において働いている可能性がある。

研究の発表

誌上発表

1. K. Sugioka, K. Mizumoto and H. Sawa: Wnt regulates spindle asymmetry to generate asymmetric nuclear β -catenin in *C. elegans*. *Cell* **146**, 942-954 2011
2. Y. Yamamoto, H. Takeshita and H. Sawa: Multiple Wnts redundantly control polarity orientation in *Caenorhabditis elegans* epithelial stem cells. *PLoS Genetics* **7**, e1002308 2011