

# 非対称細胞分裂研究グループ

## Laboratory for Cell Asymmetry

グループディレクター 松崎 文雄  
MATSUZAKI, Fumio

受精卵や神経幹細胞は細胞分裂を繰り返しながら多様な細胞を作り出す。このときに働く基本的な仕組みが、2つの異なる細胞を生じる非対称分裂である。では、同じ遺伝情報を受け継ぐ姉妹細胞はいかにして異なる運命を獲得するのだろうか。それは、細胞運命を左右する因子を一方の娘細胞へ不均等に分配することで実現できる。このような仕組みの背後には、分裂細胞に非対称性を与えるメカニズムが隠されている。我々は、非対称細胞分裂のメカニズムとその背後にある細胞極性を探求することによって、細胞の多様性を構築する原理を探索していきたい。当研究グループでは、神経系の発生と機能の遺伝的プログラムの解明という大きな目標のもと、とりわけ神経細胞の多様性の形成メカニズムを中心テーマとしている。我々はショウジョウバエを実験系とした遺伝学的解析を行う過程で、神経幹細胞の分裂に際し、細胞質の一部に局在した転写因子 *prospero* が姉妹細胞のみに分配されることを発見した。この現象は、細胞運命決定因子の不均等分配によって2つの娘細胞が互いに異なる遺伝子発現を行う端的な例であると同時に、細胞質の構成因子が細胞内に非対称に分布すること、すなわち、細胞の極性がこの現象の本質であることを浮彫りにしている。この発見を契機に、我々はショウジョウバエを対象に神経幹細胞の非対称分裂という現象を探索してきたが、さらに研究対象を脊椎動物に広げていく。また、このような神経幹細胞のシステムが神経系の機能的な構築にいかに関わっているかという問題にも取り組んでいきたい。

### 1. ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂に機能する因子の系統的スクリーニング（泉，久田，太田，斎藤）

ショウジョウバエ神経幹細胞の分裂に際して、Miranda分子はProsperoに直接結合し、その細胞内分布と不等分配を規定するアダプター分子であるが、この因子のダイナミックな細胞内の局在は、神経幹細胞の細胞極性を敏感に反映する。平成14年度までに、Mirandaの局在を指標として、神経幹細胞の極性の制御変異に関わる遺伝子の点突然変異を系統的に分離することを行った。主要な染色体3本のうち、X染色体と第二染色体について、ほぼ、サチュレーションするレベルまで点突然変異をスクリーニングした。その結果、Mirandaの局在に異常をきたした独立な突然変異が10以上分離されたほか、新たな表現型を示す変異体が多数分離できた。これらの変異系統のうち、以下の4つの突然変異グループに注目している。

(1) 神経幹細胞とその姉妹細胞の大きさがほぼ等しくなる形態的等分裂を行う突然変異

(2) 神経幹細胞が正常な極性を保持し、非対称分裂そのものは正常に進むものの、極性の方向がランダム化する変異

(3) 神経幹細胞の極性は正常であるが、分裂軸の方位がその極性と一致しない変異体

(4) 神経幹細胞の形態に異常を生じる突然変異

(1)の形態的な等分裂を引き起こす変異は、神経幹細胞の細胞軸上で、収縮環の位置を非対称に指定する遺伝子に異常をきたしていると考えられ、変異の原因遺伝子の解析が進めば、細胞内の位置情報という新しい概念を提供することが期待できる。本年度は、この変異グループに関して解析をさらに発展させるとともに(3)の変異体の解析が進み原因遺伝子が明らかになった。

### 2. ショウジョウバエ神経幹細胞の形態的に非対称な細胞分裂（泉，久田）

一般に、細胞質分裂の際、収縮環の位置が分裂軸上で中央からずれることによって、娘細胞の大きさは非対称になる。収縮環の位置は、紡錘体の両極から伸びる微小管がオーバーラップする「midzone」によって規定される。ショウジョウバエの神経幹細胞が分裂する際、紡錘体自身が形態的に非対称性となり、さらに紡錘体が細胞の中心からずれることによって、収縮環が細胞の対称面からはずれることが明らかにされているが、娘細胞の大きさの非対称性に対しては前者の寄与が大きい。昨年度の研究から、2つの突然変異の原因遺伝子はそれぞれ3量体Gタンパク質の $\beta\gamma$ サブユニットをコードするG $\beta$ 13F遺伝子とG $\gamma$ 1遺伝子であることが判明した。両者は胚の免疫沈降実験を行うと共沈殿してくることから、神経幹細胞内で複合体を形成し、G $\beta\gamma$ シグナルの主要な担い手として機能していると考えられる。

これらの遺伝子の突然変異の解析から、ショウジョウバエ神経幹細胞がより小さな神経前駆細胞を生じるのは、分裂による体積の減少を最小限にすることで、神経幹細胞の性質を維持するためである可能性が示唆された。また、G $\beta$ 遺伝子とがん抑制遺伝子dlgの2重変異体では、神経幹細胞の2つの娘細胞の体積が等しくなるうえに、神経前駆細胞に不等分配されるはずの運命決定因子が等分配されてしまうため、等価な娘細胞を生じる。この事実を利用して、神経幹細胞が等分裂を行った結果生じた等価な娘細胞がどのような性質を持つかどうかを検討した。その結果、この娘細胞は、幹細胞と神経前駆細胞の両方の性質を併せ持つことが判明した。この娘細胞はどんどん分裂を続け、ある時点で神経を生じる。その結果生じた神経細胞は発生後期に

生じる神経の運命をたどり、発生初期に生じるはずの神経が欠落することから、神経幹細胞の非対称分裂の重要性は多様な神経細胞を生じるために必須の仕組みであることが示された。

### 3. ショウジョウバエ神経幹細胞の細胞極性を制御するシグナル伝達系 (泉, 久田, 太田)

神経幹細胞では, aPKC-Par3-Par6 複合体と Gai-Pins 複合体という 2 つのシグナル伝達系が apical 側に局在し, 細胞極性の制御に重要な機能を果たしていることが知られている。娘細胞のサイズの非対称性についても, 両者が平行して機能することが最近明らかにされた。この 2 つの apical シグナル伝達系と  $G\beta\gamma$  シグナルの関係を分析したところ,  $G\beta\gamma$  変異体では, Gai-Pins の局在は完全に非対称性を失うことが判明した。他方,  $G\beta\gamma$  変異は aPKC-Par3-Par6 複合体の局在にも影響を与え, 細胞表層のかなり広範囲に分布するようになる。しかし, 注意深く観察すると, それでもなおこの複合体の分布は非対称であることが見いだされた。興味深いことに,  $G\beta$  変異体や  $G\gamma$  変異体の神経幹細胞で, 娘細胞の形態の非対称性がほぼ失われても, なお運命決定因子の非対称分配がほぼ正常に起きる。このような解析から, aPKC-Par3-Par6 複合体が運命決定因子の局在を制御する主要なシグナル系と考えられ, 一方, Gai-Pins が分裂軸の方位の決定に必須であることが明らかになった。以上のことから, aPKC-Par3-Par6 と Gai-Pins という 2 つの apical シグナル系は互いに協調しながらも機能を分担していることが示された。さらに Pins と結合する因子を生化学的に調べた結果, 研究内容 1 で述べた (3) 神経幹細胞の極性は正常であるが, 分裂軸の方位がその極性と一致しない変異体の原因遺伝子であることが判明し, Gai-Pins が分裂軸の方位を決定する機構の解明に一步前進が見られた。

### 4. マウス神経前駆細胞の分裂 (塩井, 末次, 川口)

脊椎動物の神経系の発生の過程でも, 幹細胞としての性質を保持すると同時に, より分化した神経前駆細胞や神経細胞を生じる神経幹細胞も, 非対称な分裂を行う。そこで, Histone-GFP あるいは蛍光色素を導入することによって, 細胞をあらかじめラベルしたマウス胚から, 脳スライスや初代培養系を作成し, エレベーター運動を繰り返す幹細胞の *in vivo* の分裂パターンについて時間的空間的な情報を含めた観察を行った。このような解析から, 神経幹細胞からどのように神経細胞の系譜が形成されるのかを追求した。その結果, (1) 神経発生初期には, 形成されるニューロンの 60%以上が subventricular zone で最終分裂を行う前駆細胞から生じること, (2) 娘細胞の分裂能, 形態, 細胞分裂の位置を含めて考えると, 神経前駆細胞の多くが非対称な分裂を行うことが判明した。この観察結果は, 脊椎動物の神経前駆細胞がショウジョウバエの神経前駆細胞と同様に, 細胞系譜に依存した細胞運命の決定機構を持つことを示唆している。さらに, 神経幹細胞の維持に必要とされる Notch シグナルの影響をこの実験系で調べたところ, Notch シグナルのレベルによって, 神経幹細胞の分裂パターンが変化することを示唆する結果を得た。その変化の様子から興味深い仮説が導かれる。

### 5. マウス中枢神経における非対称細胞分裂を介した細胞運命決定機構 (川口, 井川)

哺乳類の脳発生時における非対称分裂に関わる因子を探索し, 非対称な細胞分裂を介した細胞の運命決定機構を, 単一細胞レベルで明らかにすることを計画した。マウス胎生期の脳に含まれる前駆細胞は, その分裂によって, (1) 分裂能を持つ前駆細胞と分裂能を失ったニューロン, (2) 一對のニューロン, (3) 分裂能を持つ 2 つの前駆細胞, という 3 通りの娘細胞対を生じる可能性が考えられる。そこでまず, マウス胎生期脳から単一細胞を取り出し, その mRNA を単離して PCR 法により増幅し, 単一細胞由来の cDNA ライブラリを複数個得た。また, 単離した前駆細胞が上記 (1) から (3) のどれに属するかを判別できる候補遺伝子を, *in situ hybridization* 等の方法を用いて探索した。その結果, ニューロン対を生み出す前駆細胞を区別するためのマーカー遺伝子を複数個得ることができた。これら新たに同定したマーカー遺伝子の発現量と, 細胞増殖に関わる遺伝子の発現量とを組み合わせることによって, 先に得ていた単一細胞由来 cDNA をいくつかの種類に分類することができた。これらの cDNA ライブラリを用いて, 定量的 PCR で既知の遺伝子の発現量を比較すると同時に, マイクロアレイを用いて網羅的に発現遺伝子量を比較することにより, 前駆細胞の分裂の結果生じる 2 つの娘細胞間の運命の差を決定づけている因子の候補が同定できた。

Our group seeks to explore the molecular mechanisms underlying the organization of cells into highly ordered structures in the developing brain, where neural stem cells generate a large number of neurons of different fates at appropriate points in time. Asymmetric cell division is thought to play an essential role in this process. We have focused our study on the roles of asymmetric division and cell polarity in neural precursor cells in invertebrate (*Drosophila*) and vertebrate (mouse) systems.

Asymmetric cell division, in which daughter cells of different types are produced, is a process fundamental to the generation of cells of divergent types during proliferation. This type of division requires the polarized organization of mitotic cells when it occurs cell-autonomously, and depends on asymmetric microenvironments when the process is non-cell-autonomous. *Drosophila* neural stem cells, called neuroblasts, provide an excellent model system for the investigation of fundamental aspects of asymmetric division, including the cell polarity that promotes it. Neuroblasts typically undergo asymmetric divisions to produce two daughter cells: another neuroblast, and a smaller ganglion mother cell (GMC) to which neural fate determinants such as Numb and the Prospero transcription factor are asymmetrically partitioned. However, we do not yet understand a number of fundamental aspects of the asymmetric division of neuroblasts, such as the mechanisms responsible for asymmetrically sorting cellular components to the cortex, maintaining the neuroblast's cell polarity, and producing the smaller daughter GMC. We are addressing these issues using genetic screens for mutations affecting the asymmetric division of neuroblasts.

The vertebrate brain comprises a considerably larger number of neurons arranged in a vastly more complex functional network than that of *Drosophila*. However, in both the vertebrate and *Drosophila*, this huge number of neural

cells is generated from a relatively small number of neural stem cells. Previous work has shown that neural progenitor cells divide both asymmetrically and symmetrically to produce descendant neurons. Vertebrate homologs have been found for most of the components acting in the asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts, but the modes and roles of asymmetric division in vertebrate neurogenesis remain incompletely understood. Furthermore, little is yet known about how asymmetric division contributes to neuronal fate determination. We are investigating the problems of how asymmetric division is involved in neuronal fate decisions and in organizing the cellular architecture of the vertebrate brain.

### Research Subjects

1. Systematic analysis of asymmetric division of *Drosophila* neural stem cells by large scale mutagenic screens
2. Study on the roles for asymmetric divisions in vertebrate neural development

### Staff

#### Group Director

Dr. Fumio MATSUZAKI

#### Research Scientists

Dr. Naoyuki FUSE  
 Dr. Yasushi IZUMI  
 Dr. Go SHIOI  
 Dr. Ayano KAWAGUCHI  
 Dr. Toru YAMAMOTO  
 Dr. Woongjoon MOON

#### Technical Staff

Ms. Kanako HISATA

Ms. Taeko SUETSUGU  
 Ms. Nao OHTA  
 Ms. Mai SAITO  
 Ms. Tomoko IKAWA  
 Ms. Asako MORI  
 Ms. Misato IWASHITA

### Visiting Members

Ms. Maki MAEDA (Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

### Trainees

Mr. Yoshihiro YAMAMOTO (Grad. Sch. Natl. Sci., Kobe Univ.)

---

### 誌 上 発 表 Publications

#### [雑誌]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

- Miyata T., Kawaguchi A., Saito K., Kawano M., Muto T., and Ogawa M.: "Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells", *Development* **131**, 3133–3145 (2004). \*
- Araki Y., Miyagi N., Kato N., Yoshida T., Wada S., Nishimura M., Komano H., Yamamoto T., Strooper B. D., Yamamoto K., and Suzuki T.: "Coordinated metabolism of alcadein and amyloid  $\beta$ -protein precursor regulates FE65-dependent gene transactivation", *J. Biol. Chem.* **279**, 24343–24354 (2004). \*
- Izumi Y., Ohta N., Itoh-Furuya A., Fuse N., and Matsuzaki F.: "Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division", *J. Cell Biol.* **164**, 729–738 (2004). \*
- Kawaguchi A., Ogawa M., Saito K., Matsuzaki F., Okano H., and Miyata T.: "Differential expression of Pax6 and Ngn2 between pair-generated cortical neurons", *J. Neurosci. Res.* **78**, 784–795 (2004). \*