

細胞形態形成研究チーム

Laboratory for Cellular Morphogenesis

チームリーダー 米村 重信

YONEMURA, Shigenobu

発生、分化の過程を通じて、細胞はダイナミックな形態変化を行う。その形態変化は細胞の機能に密接に関わっており、アクチン細胞骨格が、その変化を担っている。我々はアクチン細胞骨格の役割やその形成の分子機構を明らかにすることから、形態形成の仕組みを理解しようと考えている。細胞周期の中で非常に大きなイベントである細胞質分裂において、その分裂面の決定は、染色体を分離するための構造である、微小管からなる分裂装置が行っていることが分かっていた。我々は、アクチン細胞骨格を制御する低分子量 G タンパク質 Rho の細胞内の局在を正確に可視化する方法を開発し、微小管からどのような分子を介して Rho が分裂面決定に関わるのかを明らかにした。また細胞接着構造の形成における Rho の役割の解析を進め、モータータンパク質であるミオシンとアクチン繊維との相互作用で生じる張力がより直接的に重要であることを明らかにした。

1. 細胞質分裂における分裂面決定の分子機構の研究 (西村, 米村)

細胞質分裂における分裂溝は、アクチン細胞骨格の収縮の結果、細胞膜の落ち込みとして観察されるが、その分裂溝の進行には Rho タンパク質が必須であると報告されている。昨年度は、我々の開発した方法を用いて、まず細胞質分裂時の Rho タンパク質の局在を解析し、Rho は分裂溝が形成される赤道面表層にくびれが入る前から集積してくるのを見いだした。次いで、その集積は、Rho の活性に依存すること、また、正常な微小管系の存在に依存することを見いだした。さらに、分裂面決定に関与すると言われる、分裂装置 (主として微小管を含む) を構成する、central spindle microtubules と astral microtubules との重要性を検討し、両者は独立して分裂面決定のシグナルを細胞表層に伝えることができることを Rho の集積を可視化することから明らかにした。

このように、分裂面決定時には細胞表層に Rho の集積が見られ、それは Rho の活性と微小管の存在に依存していた。したがって、Rho の集積に関わる分子は central spindle microtubules と astral microtubules との両方に局在し、さらに、Rho の活性化に関与するということが推察された。そこで、本年度は、その分子をいくつかの候補の中から探り、機能を検証することを試みた。最終的には、Rho を活性化させる能力のある ECT2、Rho を不活化する能力のある CYK4、微小管に結合できるモータータンパク質 MKLP-1 の三者が有望であった。それらはみな、細胞質分裂に深く関与していると報告されていた。さらに、central spindle microtubules への局在が示されていた。我々は、CYK4、MKLP-1 が astral microtubules の先端にも局在することを見いだした。それぞれの分子の Rho の局在に対する役割を検証するために RNAi によってそれぞれのタンパク質の発現量を激減させると、全ての場合で、Rho の赤道面表層への濃縮が減少し、分裂も起こらず細胞は 2 核となった。さらに三者の相互関係を調べたところ、ECT2 が central spindle microtubules や赤道面表層へ局在するのには、CYK4、MKLP-1 がどちら

も必要なのに対し、CYK4、KLP-1 の局在には ECT2 は不必要であった。これらのことが示すように、central spindle microtubule と astral microtubules の先端にまず、CYK4、MKLP-1 (両者は複合体を作っていることが最近明らかになった) が集積し、それが、ECT2 を呼び、ECT2 がその場で Rho を活性化することで、Rho が赤道面表層に安定して集積を続ける、また、分裂溝が進行して central spindle microtubules に触れるようになると、そこに濃縮している三者は、分裂溝の安定した進行のために Rho の活性化、集積の安定化を行うという、分子機構の存在を明瞭に示すことができた。

Rho、また、その下流で働く、モータータンパク質ミオシンの活性がなくても細胞質分裂が行われる例が知られている。しかし、その例を詳細に検討すると、分裂の進行は遅く、分裂面が正確に定まらないことが分かっている。細胞は、Rho やミオシンに依存しない正確さに欠ける分裂機構を本来持っているが、それだけでは、多細胞生物の初期卵割に要求される速く正確な分裂面決定や分裂の進行は行えない。それを補うために細胞は Rho とその下流の分子を利用した分裂面決定の機構を作り出したのではないかと想像している。

2. 細胞間接着構造形成におけるアクチン細胞骨格の役割 (三宅, 木下, 渡邊*, 米村)

カドヘリンは多細胞生物の基本的な接着分子として働く膜タンパク質である。その細胞質領域では、カテニン等の結合タンパク質を介して、アクチン繊維と連結しているのが特徴であり、アドヘレンスジャンクション (AJ) という細胞接着構造を形成する。AJ の中には、点状に集積したカドヘリン/カテニン複合体に対して、細胞膜に垂直の角度でアクチン繊維の束が一本結合しているタイプのものがあり、この場合、細胞の周囲を点状の AJ が断続的に取り巻くことになる。一方で、極性を持つ上皮に特徴的な AJ は zonula adherens (ZA) と呼ばれ、ベルト状に細胞周囲を取り巻いており、アクチン繊維は細胞膜に平行して走ってい

る。AJの機能にアクチン細胞骨格への連結が重要であることが分かっているが、そのメカニズムについてはほとんど知られていない。頻繁に使用される培養上皮細胞では、アクチン繊維はAJ以外の細胞膜直下にも豊富に見られ、アクチン繊維とAJ形成との関係を明らかにするにはあまり有利ではなかった。我々は、アクチン繊維とAJとの関係が単純な、点状のAJを持つ培養繊維芽細胞であるNRK細胞を用いて、アクチン繊維の構築とAJ形成の関係、またRhoファミリータンパク質の関与の研究を開始した。これまでに、Rhoファミリータンパク質のうち、Rhoの活性が重要であることを明らかにした。しかし、異なる細胞では、Racないしは、Cdc42がより重要であるという結果も報告されている。Rho, Rac, Cdc42それぞれの下流の因子が、ミオシン軽鎖のリン酸化を介してミオシンを活性化することも報告されている。そこで、本年度はアクチン繊維により直接的に関係する、ミオシンの活性について検討してみた。

NRK細胞においては、ミオシンの活性の阻害である、Y27632, blebbistatinによって点状のAJコンポーネントである、カドヘリン/カテニン複合体、ビンキュリンなどは分散し、正常な点状のAJの形成にミオシン活性が必要であることが示された。MTD-1Aという培養上皮細胞においても、点状のAJの形成はミオシンの活性に依存していた。しかし、点状のAJ形成期を過ぎ、すでに極性化した上皮シートを作ったMTD-1A細胞におけるカドヘリン/カテニン複合体の分布や、タイトジャンクションのコンポーネントの局在には、ミオシン活性の阻害はほとんど影響を与えなかった。しかし、接着構造の形成期にミオシン活性を阻害すると、カドヘリン/カテニン複合体の分布やタイトジャンクションの形成が異常になり、接着構造の配置が逆転する等、上皮の極性が不完全であることが示された。この時、タイトジャンクションの形成自体が完全に阻害されるわけではなく、細胞周囲を隙間なく取り巻いて、機能的なバリアーを形成する段階が阻害されていた。これらのことから、AJ形成ばかりでなく、タイトジャンクションの正常な形成もミオシンの活性に依存することが分かった。ミオシンの活性、すなわち、アクチン繊維の張力に依存してAJに集積するコンポーネントとしてビンキュリンが見いだされた。ビンキュリンはカドヘリン/カテニン複合体に含まれるアクチン結合タンパク質である α -カテニンに結合することでAJに局在することが分かっている。今後は、張力依存性のビンキュリンの集積の分子機構を明らかにするとともに、ビンキュリンがどのようにAJの機能、タイトジャンクションの形成に関わるのかを明らかにしたい。

この研究の過程で、MTD-1A細胞とは異なり、一般的によく使われている上皮細胞である、MDCK細胞では、ミオシンの活性がなくてもほぼ正常にタイトジャンクションが形成されることが分かり、ビンキュリンが必ずしもAJのコンポーネントになっていないことが見いだされた。張力依存性のAJ形成が一般性を持つと考え、MDCK細胞には通常ではあまりミオシン活性がなく、タイトジャンクションは張力非依存的に形成されると仮定した。そこで、人為的に生理的な強度の張力をかけることを試みた。MDCK細胞の上皮シートの一部を傷付け細胞を殺傷すると、その周りの細胞にpurse stringと呼ばれる、アクチンとミオシン

からなる構造ができ、その収縮が周囲の細胞が傷口を協調的に塞ぐことに関与していることが知られている。そこで、レーザー光によって、上皮シート中の細胞1個を殺傷してみた。周囲の細胞の傷口に面した部分にはアクチン、ミオシンからなる構造が形成され、それらは、カドヘリン/カテニン複合体、ビンキュリンなどが濃縮する、典型的な点状のAJを介して連結していた。ミオシンの活性を阻害することで、それらのAJコンポーネントは分散した。以上の結果が示すように、MDCK細胞においても張力に依存したAJ形成の機構は共通して存在することが分かった。

さらに、このような張力依存性のAJ形成機構が発生における形態形成においてどのように働いているかを知るために、細胞接着装置を介しての隣接する細胞への張力の伝達が重要だと思われる神経管形成に注目し、ニワトリ胚を用いて、Rhoファミリータンパク質の役割の解析を始めた。興味深いことに、Rho, Rac, Cdc42のすべてが、収縮を示す細胞のアピカル面に強く濃縮することが分かってきた。

3. アクチン細胞骨格の制御におけるPKC調節領域の役割 (和田, 米村)

Cキナーゼ(PKC)ファミリーは、生体の主要なシグナル伝達に関わり、薬剤(TPAなど)によるその恒常的な活性化はがんのプロモーションを引き起こすことが知られている。TPAがアクチン細胞骨格を破壊することが知られており、PKCの基質がそれに関わると当然のように考えられてきたものの、その分子機構は全く不明だった。

最近我々は、細胞膜とアクチン繊維とを結合する能力のあるERMタンパク質のリン酸化を行う酵素の候補としてPKCの1つ、PKCデルタに着目し、その不活性変異型や恒常的活性型などが、ERMタンパク質のリン酸化の程度に変化をもたらすかを検討していた。その結果、全く意外なことに、不活性変異型のみならず、恒常的活性型の発現もERMタンパク質の脱リン酸化を誘導することが分かった。さらに、同時にアクチン細胞骨格が破壊されていた。PKCデルタは大きく分けてキナーゼ領域と調節領域とからなる。この調節領域内には、キナーゼの擬似基質となる配列が含まれており、PKCが不活性な状態では、この擬似基質がキナーゼの活性部位に結合している。生理的な活性化物質、ジアシルグリセロールなどの調節領域への結合により擬似基質配列がキナーゼの活性領域に結合できなくなり、キナーゼが細胞内のほかの基質をリン酸化できるようになることが知られている。この擬似基質配列を欠失させた調節領域でも同様の变化を細胞にもたらすことから、キナーゼ活性とは全く無縁に、調節領域だけによってアクチン細胞骨格の構築が調節されていることが明瞭になった。

重要な領域はC1と呼ばれる、ジアシルグリセロールやTPAと結合する領域を含む部分であることが詳細な解析により明らかになった。この部分がどのようにアクチン細胞骨格へ影響を与えるのかを調べるために、Yeast two-hybrid法を用いて、結合タンパク質を探索した。候補は数少なく、ほとんどダイニン軽鎖(DLC)と呼ばれる分子量8kDの非常に小さく、また、単細胞動物から哺乳類にいたるまで、非常に良く保存されているタンパク質であった。これには、ごくわずかに異なるDLC1, DLC2が含まれていた。これらはもともと、微小管上を走るモータータンパク質、ダイ

ニンのサブユニットとして見つかったが、その結合タンパク質は数多く、極めて多機能な分子であることが分かっている。

現在このDLCが実際に、PKCの下流でアクチン細胞骨格の制御に関与するかどうかを検討している。細胞内のDLCの発現をRNAiによって激減させると、アクチン細胞骨格は破壊され、PKCの調節領域を発現させた時に近かった。DLC存在が正常なアクチン細胞骨格の構築に必須であることがひとまずはっきりした。DLCがPKCの下流にあるかどうかについてさらに検討が必要である。

* 研修生

1. Molecular mechanism of the determination of cleavage planes

Microtubules determine the cleavage plane and Rho activity is required for progression of furrowing. We found that Rho accumulates at the cell equatorial cortex before the cleavage furrow appears dependent on both microtubule organization and Rho activity. Then we addressed the molecular mechanisms that link microtubules and Rho accumulation at the equatorial cortex. We presumed that responsible molecules localize microtubules and regulate Rho activity. Candidates for the molecules included ECT2 (RhoGEF), CYK4 (RhoGAP) and MKLP-1 (kinesin). All of them are necessary for proper cytokinesis reportedly and localize at microtubules. Depletion of these molecules by RNAi affected Rho localization at the equatorial cortex as well as furrowing. Depletion of either CYK4 or MKLP-1 affected ECT2 localization; ECT2-depletion did not affect either CYK4 or MKLP-1 localization, indicating that CYK4 and MKLP-1 determine the localization of ECT2. ECT2 localized at the equatorial cortex appears to activate Rho and support continuous Rho accumulation there during cytokinesis.

2. Roles of actin cytoskeleton in formation of cell-to-cell junctions

Cadherins act as essential adhesion molecules in multicellular organisms inducing cell-to-cell junction structure called adherens junctions (AJs). At the intercellular surface of AJs, the cytoplasmic region of cadherins bind to its associated proteins such as catenins. Catenins further recruit associated proteins vinculin and actin filaments. In polarized epithelial cells in tissues, AJs in the form of zonula adherens that encircle the cell-to-cell contact region near the apical surface formed like a belt where actin filaments run parallel to AJ membranes. In fibroblasts or cardiac muscles however, punctate and streaklike AJs, where actin cables are associated perpendicularly to the AJ membrane, are formed instead of zonula adherens. Even in epithelial cells bearing zonula adherens, such AJs are formed at the early stages and transformed to zonula adherens during the cell polarity establishment at least in several cases.

The importance of actin filament organization, although there was not enough data, have been widely accepted. We addressed the roles of tension applied on AJ through actin filaments in AJ assembly and function. When tension was reduced by inhibition of a motor protein, myosin II by its inhibitors, in cells bearing punctate AJs, AJ components disengaged and dispersed, indicating

that tension is required for punctate AJ assembly. Zonula adherens formation in terms of correct AJ component assembly was also tension-dependent in polarized MTD-1A epithelial sheet.

To reveal how a similar mechanism for tension-dependent AJ formation works in morphogenesis during development, we have started examining roles of Rho family members in the neural tube formation in chick embryos where tension transduction to neighboring cells through AJs appears important. Rho family members including Rho, Rac and Cdc42 were found to be concentrated at the apical region of cells forming a neural tube where active contraction appears to occur.

3. Roles of the regulatory domain of PKC in actin cytoskeleton organization

Protein kinase C (PKC) family is a gene family that is involved in main signal transduction in a variety of organisms; its constitutive activation by drugs such as TPA is known to induce tumor promotion concomitant with the disruption of actin organization. The molecular mechanism for the effect on actin organization, although assumed to be related to phosphorylation of certain substrates by PKC, has been totally unknown.

We recently found that expression of the regulatory domain of PKC-delta in cells induces the disruption of actin organization. We then narrowed down the responsible region to the region containing C1 domain that bind to PKC activators such as TPA and diacylglycerol. To reveal the role of this domain in actin organization, we searched for its binding molecules by the yeast two-hybrid assay and found dynein light chain (DLC)-1 and -2. DLC-1 and -2 are highly conserved among a variety of organisms and function not only as a subunit of dynein but also as regulatory molecules that have many binding partners.

Depletion of DLC-1 by RNAi, like expression of the regulatory domain of PKC-delta, induced the disruption of actin organization in HeLa cells, indicating that DLC-1 is essential for actin organization. Further examination as to whether DLC is situated exactly downstream of PKC signaling is planned.

Staff

Team Leader

Dr. Shigenobu YONEMURA

Research Scientists

Dr. Nagatoki KINOSHITA

Dr. Yukako NISHIMURA

Dr. Atsushi WADA

Technical Staff

Ms. Naoko INOUE

Ms. Kazuyo MISAKI

Ms. Yuka MIYAKE

Ms. Makiko F. UWO

Trainees

Ms. Yuko SHIMADA (Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

Mr. Toshiyuki WATANABE (Grad. Sch. Sci. Technol.,
Kobe Univ.)

誌 上 発 表 **Publications**

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Fujimoto M., Izu H., Seki K., Fukuda K., Nishida T.,
Yamada S., Kato K., Yonemura S., Inoue S., and Nakai
A.: “HSF4 is required for normal cell growth and dif-
ferentiation during mouse lens development”, *EMBO J.*
23, 4297–4306 (2004). *

Yonemura S., Hirao-Minakuchi K., and Nishimura Y.:
“Rho localization in cells and tissues”, *Exp. Cell Res.*
295, 300–314 (2004). *

Yasuda S., Ocegüera-Yanez F., Kato T., Okamoto M.,
Yonemura S., Terada Y., Ishizaki T., and Narumiya S.:
“Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to
kinetochores”, *Nature* **428**, 767–771 (2004). *

Enomoto H., Hughes I., Golden J., Baloh R. H., Yonemura
S., Heuckeroth R. O., Johnson E. M., and Milbrandt J.:
“GFR α 1 expression in cells lacking RET is dispensable
for organogenesis and nerve regeneration”, *Neuron* **44**,
623–636 (2004). *