

受賞者

豊島 文子

京都大学ウイルス研究所 細胞生物学研究部門 構造形成学研究分野

研究テーマ

細胞分裂軸の制御機構におけるp21-activated kinase (PAK)の機能解析

1. はじめに

多細胞生物の発生過程では、細胞が決められた方向に沿って分裂する現象が様々な細胞種で見られ、個体の正常な形態形成に必須の役割を果たしている。しかしながら、細胞の分裂方向を制御する分子メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。我々はこれまでの研究で、細胞外基質上で培養した哺乳類細胞は分裂期において紡錘体を基質面に対して水平に配置する機構を持ち (EMBO J. 2007)、また、この機構における細胞膜脂質PtdIns(3, 4, 5)P3の重要性を明らかにしてきた (Dev. Cell 2007)。PAKは、進化的に高度に保存されたセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞骨格の制御を介して細胞運動・接着に関与することが知られている。本研究は、PAKが分裂方向の制御に関わるとの新しい予備的結果に基づき、分裂軸方向の決定におけるPAKの新規機能・動体解析と、そのシグナル伝達機構を解明することを目指した。

2. 方法

ヒト培養細胞であるHeLa細胞をフィブロネクチン上で培養すると、分裂期において紡錘体が細胞-基質接着面に対して平行に配置される現象を見いだした。そこで、分裂中期の紡錘体をZ軸方向の0.5・ μ mセクション画像で観察することにより紡錘体軸と基質面との間の角度を計測することを可能とし、紡錘体の配向性を定量化する系を確立した。本研究ではまず、この系を用いて、RNA干渉法により内在性のPAK1およびPAK2の発現を抑制したときの、紡錘体軸方向への影響を定量的に評価した。次に、siRNAのオフターゲット効果の可能性を排除するため、siRNAのターゲット配列にサイレント変異を入れたPAK変異体によりsiRNAの効果がレスキューされるかについて確認した。また、キナーゼ活性の無いPAK変異体によりsiRNAの効果がレスキューされるかについて検討した。さらに、分裂期におけるPAK1およびPAK2の細胞内局在について検討した。次に、PAKの上流因子について特に低分子量Gタンパク質Rac1、Cdc42に注目して解析した。まず、紡錘体軸制御機構におけるRac1、Cdc42の関与について、RNA干渉法を用いて検討し、またその細胞内局在を観察した。さらに、紡錘体軸制御におけるPAKの機能およびその細胞内局在がRac1またはCdc42に依存するかについて、Rac1、Cdc42に結合できないPAK変異体を用いて解析した。次にPAKの下流因子を解析するため、分裂期でPAKに結合する因子を同定し、紡錘体軸制御における、タンパク質間結合の必要性を変異体を用いて解析した。また、我々のこれまでの研究により明らかとなった制御因子(EB1、myosin-X、dynactin等)との相互作用についても解析し、PAKから紡錘体へ至る分子ネットワークの解明を試みた。

3. 結果 研究成果

HeLa細胞の紡錘体軸解析系を用いて検討した結果、RNA干渉法により内在性のPAK2の発現を抑制すると、紡錘体軸の方向が基質面に対してランダムになること、また傾いた紡錘体を持つ細胞では分裂軸

が傾くため、一つの娘細胞の基質への接着が著しく遅延することが観察された。このPAK2のsiRNAの効果は、siRNAのターゲット配列にサイレント変異を入れたPAK2変異体によりレスキューされたことから、PAK2が紡錘体軸方向、すなわち細胞の分裂方向の制御に必須であることが示された。また、PAK1の発現をsiRNAにより抑制した場合も紡錘体軸方向が異常となり、PAK1とPAK2の発現を共に抑制すると紡錘体軸の異常が更に促進されることから、PAK1とPAK2は相乗的に機能していることが示された。次に、PAKの上流因子について低分子量Gタンパク質の役割を解析した結果、RhoAの発現をsiRNAで抑制しても紡錘体軸は正常であるが、Rac1あるいはCdc42の発現を抑制すると、紡錘体軸に顕著な異常が認められた。更に、Rac1あるいはCdc42に結合できないPAK2変異体では、PAK2のsiRNAによる紡錘体軸の異常をレスキュー出来ないことから、Pak2はRac1またはCdc42依存的に総軸体軸を制御することが分かった。興味深いことに、キナーゼ活性のないPAK2変異体もPAK2siRNAの効果でレスキューされたことから、紡錘体軸制御にはPAK2のキナーゼ活性は必要ないことが分かった。そこで、PAK2と結合する因子に着目して検討した結果、PAK2と結合し細胞運動等に関与することが知られている・Pix (Rac1のGEF)が、紡錘体軸制御に必要であることが分かった。・Pixに結合できないPAK2変異体は、PAK2siRNAの効果でレスキュー出来ないことから、PAK2は・Pixとの結合を介して紡錘体軸を制御することが分かった。更に、Cdc42やPAK2は分裂期中期で細胞表層に局在し、活性化していることが明らかとなり、かつ、これらの因子の発現を抑制すると分裂期で見られる表層アクチン骨格の構造の減弱化が起こることから、Cdc42/Pak2/・Pix経路は、細胞表層のアクチン細胞骨格の編成を介して紡錘体軸を制御することが示唆された。

4. 考察 まとめ

本研究では、Pak2の新たな機能として、分裂期紡錘体軸制御の存在を明らかにした。PAK2による紡錘体軸制御には、PAK2のキナーゼ活性は必要でなく、Cdc42あるいはRac1及び・Pixへの結合に依存することが分かった。・PixはRac1のGEFであることから、Cdc42/Pak2/・Pix経路の下流でRac1が活性化する可能性が考えられる。最近、PAKはスキャフォールドタンパク質として機能し、AktとPDK1の結合を促進することが報告されており、紡錘体軸制御機構においても・PixとRac1の結合を促進するスキャフォールドとして役割を持つ可能性が考えられる。

Cdc42をノックダウンした細胞では、Rac1, PAK2, ・Pixそれぞれをノックダウンした細胞よりも強く紡錘体軸の異常を呈した。このことは、Cdc42の下流で、Rac1, PAK2, ・Pix以外の経路が存在することを示している。我々はこれまでの研究で、紡錘体軸制御における細胞膜脂質PtdIns(3, 4, 5)P3とその産生を触媒するPI3キナーゼの重要性を明らかにした。Rac1, PAK2, ・Pixそれぞれをノックダウンした細胞では、PI3キナーゼの活性に変化は無いが、Cdc42をノックダウンした細胞では顕著に抑制されたことから、Cdc42の下流でPAK2/・Pix/Rac1経路とPI3キナーゼ/PtdIns(3, 4, 5)P3経路の二つの経路が存在することが示唆された。最近、Cdc42は上皮細胞の3次元培養において紡錘体軸を制御し、組織構築に寄与することが報告された。Pak2/・Pix/Rac1経路およびPI3キナーゼ/PtdIns(3, 4, 5)P3経路がCdc42の下流で紡錘体軸を介して上皮組織構築を制御する可能性が考えられ、今後の検討課題である。

5. 発表論文、参考文献

Mitsushima, M. , *Toyoshima, F. , and Nishida, E.

Dual role of Cdc42 in spindle orientation in adherent cells.

Submitted