

PAR-1/4が誘導する細胞-組織極性の制御機構

北海道大学 遺伝子病制御研究所 発生生理学分野

茂木 文夫

研究概要

多細胞生物では、細胞が空間パターンの対称性と非対称性をコントロールすることで、組織と器官のデザイン基盤を作る。この細胞の非対称性は「細胞極性」と呼ばれ、様々な生理機能に寄与するが、細胞極性の確立と維持、その破綻を誘導する分子機構の理解は不足しており、多くの未解決問題が残されている。本研究では、細胞と組織における細胞極性の恒常性を司る分子サーキットを包括的に解明することを目標とする。線虫 *C. elegans* をモデル生物として、極性形成に重要な PAR キナーゼのサプレッサー因子を単離し、それらの機能を個体発生ライフサイクルを通して解析することで、細胞極性の役割を「組織破綻を抑制するメカニズム」という類例のない観点から理解し、個体発生と恒常性の制御機構に新しい知見を提供する。本研究から得られる成果は、癌化をはじめとする極性異常が引き起こす疾患を抑制するための治療法開発へ繋がると期待できる。

研究背景と目的

多細胞生物における規則的な組織・器官パターンの形成と維持には、個々の細胞がつくる空間パターンである細胞極性が重要な役割を担う。細胞極性が破綻すると、組織や器官の構造が破綻するだけでなく、組織内の細胞に増殖異常が起こり癌化と癌細胞の浸潤が引き起こされる結果から、「細胞極性は組織恒常性に働き、様々な疾患を抑制する」というモデルが提唱された。しかしながら、細胞極性と恒常性を連携する分子メカニズムは十分に理解されていない。

細胞極性を制御する因子として、高度に保存された MARK ファミリーキナーゼである PAR-1 が同定された。PAR-1 は、線虫初期胚の細胞極性を制御する因子として同定され、後に哺乳動物では脾臓・乳腺等で癌化を抑制することが示された [1]。しかし、このキナーゼとそのシグナル伝達経路が細胞極性を制御する仕組みと、癌化抑制を制御するメカニズムには、未だ不明な点が多い。線虫において、PAR-1 の欠損は胚性致死に加えて、成体の老化過程で生殖細胞の減少と管腔組織の破綻を引き起こす [2-5]。PAR-1 キナーゼの活性は、上流の PAR-4 キナーゼによってリン酸化されて上昇することも示された。PAR-4 は高度に保存された LKB1 ファミリーキナーゼで、哺乳動物では広範な組織で癌化を抑制する。本研究では、PAR 依存的な細胞極性の欠損を抑制する分子群を同定することを目標とし、PAR-1 に対するサプレッサー変異の遺伝学的スクリーニングを遂行した。

研究結果 1 : PAR-1 温度感受性変異株の致死性を抑制するサプレッサー変異の単離

線虫を多細胞動物のモデル系に用いて、PAR-1 キナーゼの破綻による表現型を抑制する「サプレッサー遺伝子変異」を網羅的に同定した。PAR-1 の温度感受性変異体 *par-1(zu310)* は、キナーゼドメインに点変異 (I306N) を有し、飼育温度 25°C ではキナーゼ活性の低下によって 100% 胚性致死

を示す [3, 6]。この *par-1*(zu310) 変異体を 15°C で飼育した後に、0.04M メタンスルホン酸エチル 5 時間処理によって突然変異を導入し、第二世代以降に 25°C で生育する「致死性が抑制された」個体を単離した。突然変異処理した約 200,000 個体からは、24 種の個体が 25°C で生育可能となり、これらの個体に導入された変異を有する遺伝子群を *supo* (suppressor of *par-1*) と命名した。*par-1*(zu310) の 25°C における生育率は 5% 程度であるが、24 種の *par-1*(zu310);*supo* 二重変異体は最大 96% の生育率を示す (図 1)。ほとんどの *supo* 変異は劣勢変異であり、ヘテロ遺伝子変異では *par-1*(zu310) の 25°C における致死性を回復できなかった (図 1)。以上の結果から、PAR-1 キナーゼ失活による個体の致死性は、*supo* 遺伝子群の変異で顕著に抑制できることが証明できた。

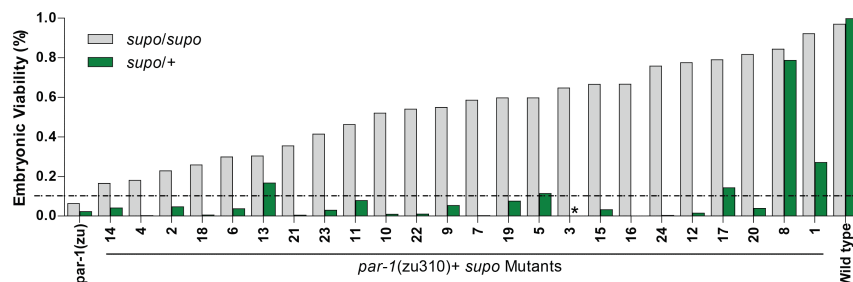


図 1. PAR-1 温度感受性変異体のサプレッサー変異 *supo* の単離。突然変異処理した *par-1*(zu310) 変異体約 200,000 個体から、25°C で生育可能な *par-1*(zu310);*supo* 二重変異体を 24 種単離した。

研究結果 2 : PAR-1 温度感受性変異を抑制するサプレッサー遺伝子変異の同定

ほとんどの *supo* 変異が劣勢であったことから、*supo* 遺伝子変異の同定には全ゲノムシーケンシング (WGS) 技術と一塩基多型 (SNP) を併用した遺伝学的マッピング手法を採用した。この手法で *supo* 変異 24 種中 16 遺伝子変異座が同定され、染色体 1-5 までの幅広い領域に観察された (図 2)。3 つの変異 (*supo-1*, 3, 19) は、PAR-1 キナーゼドメイン内に変異を有していたため、その後の機能解析からは除外した。同定した *supo* 変異は、ゲノム編集技術を活用して *par-1*(zu310) 変異株に再導入することで、*par-1*(zu310) の致死性の抑制が *supo* 変異のみに由来することの確認を行なっている。

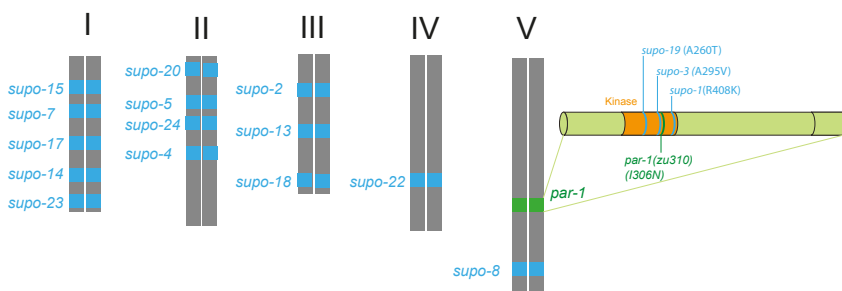


図 2. *supo* 遺伝子変異座の同定。全ゲノムシーケンシング (WGS) と一塩基多型 (SNP) を併用した遺伝学的マッピング手法で 16 遺伝子座が同定された。

研究結果 3 : *supo* 遺伝子変異の機能解析

supo 変異が *par-1*(zu310) 変異体の致死性を抑制する現象の特異性を検証するために、25 °C で生育した *par-1*(zu310) 変異体と *par-1*(zu310);*supo* 二重変異体において、生殖顆粒の形成を観察した。PAR-1 はキナーゼ活性を利用して、胚発生において生殖顆粒と呼ばれる液-液相分離構造を細胞質で形成する [7]。この生殖顆粒は *par-1*(zu310) 変異体では消失するが、ほとんどの

par-1(zu310);supo 二重変異体では生殖顆粒が観察できた (図 3a)。興味深いことに、par-1(zu310);supo における生殖顆粒形成と 25 °C 生育率との関係には相関関係が見られるものの、par-1(zu310);supo-2 と par-1(zu310);supo-13 ではこの両者に相関関係が見られない (図 3b)。この結果は、PAR-1 キナーゼ失活による胚性致死は、必ずしも生殖顆粒の消失によるものではないことを意味しており、胚発生における未知の PAR-1 機能を示唆している。

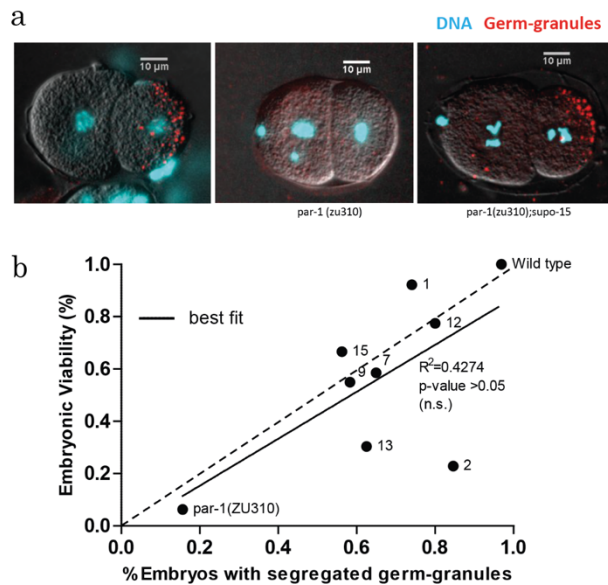


図 3. supo 変異が生殖顆粒形成に及ぼす影響の解析。

a) 野生型 (左)、par-1(zu310) (中央)、par-1(zu310);supo-15 (右) 二細胞期胚における DNA と生殖顆粒の局在性。スケールバー：10 μm。

b) par-1(zu310);supo 二重変異体では、生殖顆粒形成と生育率との関係に必ず相関関係が見られるわけではない。

文献

- 1) Wu Y, Griffin EE. Regulation of Cell Polarity by PAR-1/MARK Kinase. *Curr Top Dev Biol.* 2017; 123:365-397. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.11.001. PMID: 28236972
- 2) Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell.* 1988 Feb 12;52(3):311-20. doi: 10.1016/s0092-8674(88)80024-2. PMID: 3345562
- 3) Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell.* 1995 May 19;81(4):611-20. doi: 10.1016/0092-8674(95)90082-9. PMID: 7758115
- 4) Hurd DD, Kemphues KJ. PAR-1 is required for morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* vulva. *Dev Biol.* 2003 Jan 1;253(1):54-65. doi: 10.1006/dbio.2002.0866. PMID: 12490197
- 5) Inhibition of PAR-1 delays aging via activating AMPK in *C. elegans*. Wu D, Cai W, Zhang X, Lan J, Zou L, Chen SJ, Wu Z, Chen D. *Aging.* 2020 Nov 20;12(24):25700-25717. doi: 10.18632/aging.104180.
- 6) Ramanujam R, Han Z, Zhang Z, Kanchanawong P, Motegi F. Establishment of the PAR-1 cortical gradient by the aPKC-PRBH circuit. *Nat Chem Biol.* 2018 Oct;14(10):917-927. doi: 10.1038/s41589-018-0117-1. PMID: 30177850
- 7) Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoegge C, Gharakhani J, Jülicher F, Hyman AA. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science.* 2009 Jun 26;324(5935):1729-32. doi: 10.1126/science.1172046. PMID: 19460965