

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

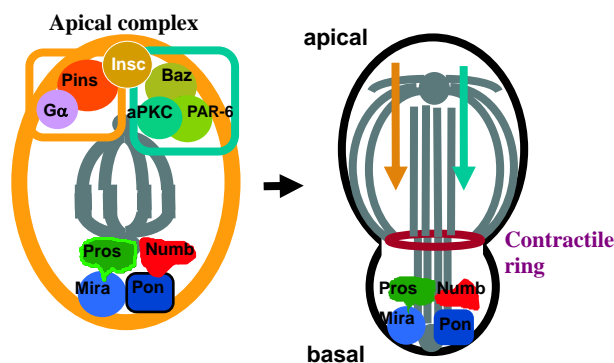
◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	MATSUZAKI FUMIO					
①研究代表者氏名	松崎 文雄			②所属研究機関・部局・職	独立行政法人理化学研究所・非対称細胞分裂研究グループ・グループディレクター	
③研究課題名	和文	非対称細胞分裂：細胞の非対称性から多様性を形成する機構の解析				
	英文	Asymmetric cell division: mechanisms creating cell diversity from cell asymmetry				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	20,500	19,000	19,000	19,000	16,200	93,700
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
松崎 文雄	独立行政法人理化学研究所・非対称細胞分裂研究グループ・グループディレクター	発生生物学	研究の総括			
泉 裕士	理化学研究所・基礎科学特別研究員	細胞生物学	突然変異体の解析と生化学的解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>細胞分裂を繰り返しながら多様な細胞を生じる個体発生にとって、“非対称な細胞分裂”は、細胞の多様性を作り出す基本的なプロセスであり、モザイク性を示す卵割や幹細胞システムなどの発生の様々な局面で重要な役割を果たしている。非対称分裂の典型的なメカニズムとして、細胞の運命を左右する因子が娘細胞に不等分配される現象が知られているが、ショウジョウバエの神経幹細胞は、Notch シグナルの抑制因子 Numb や神経の転写因子 Prospero の不等分配の発見以来、優れたモデル実験系として先端的な知見を提供してきた。この非対称分裂は、線虫の非対称な卵割や上皮細胞と共通する細胞極性の形成機構によって制御されていると考えられている。本研究では、ショウジョウバエの突然変異の大規模スクリーニングにより、非対称分裂の働く因子を系統的に同定する。とりわけ、次の4つの素過程：</p> <ol style="list-style-type: none"> （1）細胞極性を制御し、運命決定因子を局在させる機構 （2）細胞の分裂軸と細胞極性をカップルさせる機構 （3）大きさの異なる姉妹細胞を生じる機構 （4）細胞極性と細胞増殖を統一的に制御するメカニズム <p>に着目し、そのしくみを明らかにする。その知見をもとに、幹細胞の分裂、卵割、上皮細胞を制御する細胞極性を総合的に理解し、細胞の非対称性から多様性を生み出す発生過程の分子論を構築することを最終目標としている。</p>						

⑦研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

ショウジョウバエの神経幹細胞は、それ自身とより小さい姉妹細胞に非対称に分裂する。その際、神経の運命決定因子である転写因子 Prospero や Notch シグナルの制御因子 Numb を姉妹細胞である神経前駆細胞に不等分配する。Prospero を直接結合し、その非対称な細胞内分布と不等分配を規定するアダプター分子 Miranda の細胞内局在を指標として、神経幹細胞の非対称性に異常をきたす突然変異を系統的にスクリーニングすることを研究の核とした。

ショウジョウバエの主要な染色体3本のうち、X染色体と第二染色体について、それぞれほぼ飽和する程度まで致死突然変異のスクリーニングを行った (X染色体2147系統、第2染色体5552系統の致死系統)。第3染色体については、同様なスクリーニングを他の研究グループが開始したのでスクリーニングを行わなかった。われわれの変異スクリーニングからは、X染色体について5相補性グループ (独立な9系統)、第2染色体に関しても5つの相補性グループ (21系統) に分類される計10遺伝子座の Miranda 局在異常変異を分離することができた。



Chromosome	X		II	
	N. Fuse	Heidelberg screen	Y. Izumi	Heidelberg screen
Screens				
Lethal lines tested	2147	2711	5552	4217
No. of <i>Notch</i> alleles	15	12		
No. of <i>zipper</i> alleles			12	13
Abnormal Miranda localization	9 mutants (5 loci) including a <i>discs large</i> allele		21 mutants (5 loci) including 12 <i>giant larvae</i> alleles	
Other neuroblast phenotypes	27 mutants (4 categories)		42 mutants (5 categories)	

このなかで、極性形成と運命決定因子の局在の両方に関与することが知られている *Discs large* (1系統) と *giant larvae* 遺伝子変異 (12系統)、および、極性形成と分裂軸の方位決定に働く *inscuteable* 変異 (4系統) などが、すでに非対称分裂に関与することが知られているものであった。これらの遺伝子変異を除き、本研究で新たに分離することができた変異は、以下4種の表現型に分類された。

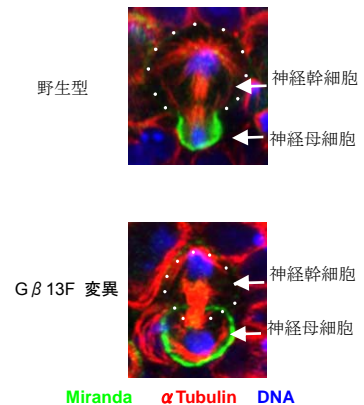
- 1) 運命決定因子の不等分配は正常であるが、娘細胞のサイズが等しい形態的等分裂を行う突然変異 (4系統、2遺伝子座)。
- 2) 神経幹細胞は正常な極性をもつが、分裂軸の方位がその極性と一致しない変異体 (5系統3遺伝子座)
- 3) 神経幹細胞は正常な非対称分裂を行うが、その方向がランダムになる変異 (1系統)
- 4) 運命決定因子の細胞内非対称局在に異常をきたす突然変異 (2系統2遺伝子座)。

このうち、(1)の変異体の解析から、これらの原因遺伝子が3量体Gタンパクの β および γ サブユニットをコードする遺伝子であることが判明し、細胞のサイズの非対称性には3量体Gタンパクシグナルがかかわることが明らかになった。また、(2)の遺伝子座のひとつは、成虫の脳の構造に異常をきたす変異の原因遺伝子 *mushroom body defect (mud)* であることが判明した。(3)および、(4)の変異の原因遺伝子の解析は進行中であるが、(4)に関しては線虫および酵母で細胞の極性にかかわることが知られている因子の変異であることが判明し、解析を急いでいる。(1)および(2)の成果の意義に関しては次の特記事項を参照のこと。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

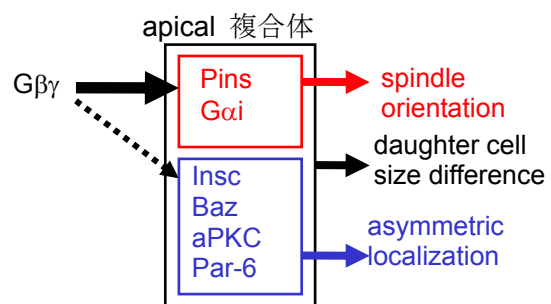
1. 形態的に非対称な細胞分裂を制御するシグナル系の同定

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、紡錘体の形態が非対称になり、さらに紡錘体が細胞の中心からずれる。この二つが原因で、細胞の対称面から収縮環が一方にずれ、小さな神経母細胞を生じることが知られている。我々が分離した娘細胞のサイズが等しくなる二つの突然変異の原因遺伝子はそれぞれ 3 量体 G 蛋白質の β および γ サブユニットをコードする $G\beta 13F$ 遺伝子と $G\gamma 1$ 遺伝子であることを明らかにした。これらの研究成果は、分裂装置の非対称性に 3 量体 G タンパクシグナルが関与していることを最初に示したものであり、細胞生物学の分野に大きなインパクトを与えた (Fuse et al. *Curr. Biol.* 2003, Izumi et al. *JCB* 2004)。



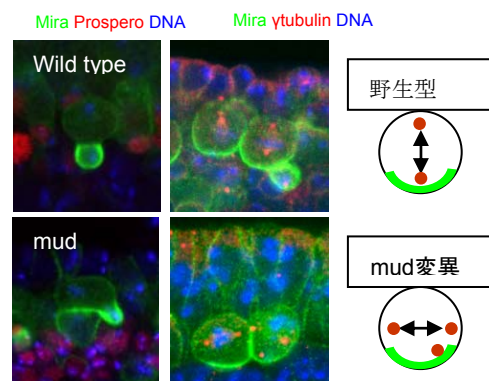
2. ショウジョウバエ神経幹細胞の細胞極性を制御するシグナル伝達系の役割

神経幹細胞では、二つの細胞内シグナル伝達系— aPKC-Par3-Par6 複合体および受容体非依存的 $G\alpha i$ -Pins 複合体—が apical 側に局在し、細胞極性を制御していることが知られている。娘細胞のサイズの非対称についても、両者が平行して機能することが最近明らかにされた。この二つの apical シグナル伝達系と $G\beta\gamma$ 複合体の関係を分析したところ、 $G\beta\gamma$ は二つの極性シグナルの上位に位置すること、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であるのに対し、受容体非依存的な $G\alpha i$ -Pins が分裂軸の方位の決定に機能することが明らかになった。これまで、渾然としていた aPKC-Par3-Par6 と $G\alpha i$ -Pins という二つの apical シグナル系の役割を明確に分離することができた (Izumi et al. *JCB* 2004)。



3. 対称分裂と非対称分裂で分裂軸を定位する因子の同定

上皮細胞がその細胞極性に分裂軸を直交させることで等分裂を行うのに対して、ショウジョウバエの神経幹細胞は、細胞極性に平行に分裂することによって非対称分裂を行う。このように、細胞の分裂軸の方位は極性を持つ細胞の分裂が対称性か非対称であるかを決定する。我々の解析から、神経幹細胞と上皮細胞のどちらにおいても、 $G\alpha i$ -Pins 複合体が分裂軸 (紡錘体) の方向決定に必須であることがわかった。さらに、分裂軸の方位が細胞極性と一致しない変異



と生化学的解析から、どちらの細胞タイプでも Mushroom body defect (Mud) という遺伝子にコードされたタンパクが Pins に結合してその下流で機能することが判明した。この因子の機能相同因子が線虫や哺乳類にも存在することから、一般に、 $G\alpha i$ -Pin-Mud という受容体非依存的 G タンパク複合体経路が分裂軸の方位を決定する仕組みの中心と考えられる (Izumi et al. *Nat. Cell Biol.* in press)。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

学術誌等に発表した論文

- Izumi, Y., Ohta, N., Hisata K., Raabe, T. and Matsuzaki, F. Drosophila Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat. Cell Biol.*, in press.

Matsuzaki, F. *Drosophila* G-protein signalling: intricate roles for Ric-8?
Nat. Cell Biol. **11**, 1047-1049 (2005).

- 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).

Shirai, T., Maehara, A., Kiritooshi, N., Matsuzaki, F., Handa, H. and Nakagoshi, H. Differential requirement of EGFR signaling for the expression of defective proventriculus gene in the *Drosophila* endoderm and ectoderm. *Biochem Biophys Res Commun.*, **311**, 473-477(2003).

- Fuse, N., Hisata, K., Katzen, L.A. and Matsuzaki, F. Heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size asymmetry in *Drosophila* neuroblast divisions. *Curr. Biol.*, **13**, 947-954 (2003).

Hayashi, S., Ito, K., Sado, Y., Taniguchi, M., Akimoto, A., Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi, H., Tanimura, T., Ueda, R., Uemura, T., Yoshihara, M. and Goto, S. GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis*, **34**, 58-61 (2002).

Nakagoshi, H., Shirai, T., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F. Refinement of wingless Expression by a Wingless- and Notch-Responsive Homeodomain Protein, Defective Proventriculus. *Dev. Biol.*, **249**, 44-56 (2002).

国際会議発表

1. Matsuzaki, F.: Asymmetric divisions of *Drosophila* neural stem cells, Symposium "asymmetric cell divisions and cell fate decisions" Joint meeting of Japan Developmental Biology Society and Japan Cell Biology Society, Yokohama, May 22, 2002.
2. Matsuzaki, F.: Asymmetric division of neural stem cells. "New Horizons in Developmental Biology" Nobel Forum at Karolinska Institute in Stockholm, 日本学術振興会コロキウム, May 28-29, 2002.
3. Matsuzaki, F.: Asymmetric cell divisions of the *Drosophila* neural stem cells. The 13th EMBO Workshop on Molecular and Developmental Biology of *Drosophila*, Crete, June 23-29, 2002.
4. Izumi, Y., Ohta, N., Furuya-Ito, A., Saito, M., and Matsuzaki, F.: "G γ 1 subunit of heterotrimeric G proteins is required for neuroblast asymmetric division", CDB Symposium 2003 "Origin and Formation of Multicellular Systems" 3/24-26/2003、神戸
5. Fuse, N., Hisata, K., Katzen, A.L., and Matsuzaki, F.: "*Drosophila* heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size in neuroblast asymmetric divisions", CDB Symposium 2003 "Origin and Formation of Multicellular Systems" 3/24-26/2003、神戸
6. Matsuzaki, F.: "Asymmetric division of *Drosophila* neural stem cells" ショウジョウバエ研究会 第2回日韓シンポジウム, 7/31-8/1, 東京
7. Matsuzaki, F.: "Asymmetric division and polarity of *Drosophila* neural stem cells, International Symposium "Dynamics of Neural Development", Osaka, August 10-11, 2003.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

8. Izumi Y., Ohta N., Furuya-Ito A., Saito M. and Matsuzaki F.: "G γ 1 subunit of heterotrimeric G proteins is required for neuroblast asymmetric division", 44th annual Drosophila research conference, Chicago, USA, March 5-9, 2004.
9. Fuse N., Hisata K., Katzen, A.L. and Matsuzaki F.: "*Drosophila* heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size in neuroblast asymmetric divisions", 44th annual Drosophila research conference, Chicago, USA, March 6-8, 2004.
10. Matsuzaki, F., Izumi, Y. and Fuse, N., : "Cell size asymmetry and spindle orientation in asymmetric division of Drosophila neuroblasts", The 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop, 4 / 1 3 ~ 1 6 / 2 0 0 4、奈良.
11. Matsuzaki, F., Fuse, N., Izumi, Y., Hisata, K., Ohta, N., Saito, M. and Yamamoto, Y. : "Asymmetric division of neuroblasts", The Fourteenth International Workshop on the Molecular and Developmental Biology of Drosophila, Crete, Greece, June 20-26, 2004.
12. Izumi, Y., Raabe, T. and Matsuzaki, F.: Regulation of mitotic spindle orientation in Drosophila neuroblasts. 46th Annual Drosophila Research Conference, San Diego, California, March 30-April 3, 2005.

国内学会発表

1. 松崎文雄：神経幹細胞の非対称分裂：多様性の形成メカニズム. 戦略的基礎研究推進 事業「脳を知る」のシンポジウム“脳神経科学の最先端 2002” 1 1 / 2 5 ~ 2 6 / 2 0 0 2、京都
2. 泉裕士、古屋亜佐子、太田奈緒、斎藤麻衣、松崎文雄：ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂異常突然変異のスクリーニング、第 2 5 回日本分子生物学会年会、1 2 / 1 1 ~ 1 2 / 2 0 0 2、横浜
3. 布施直之、久田香奈子、松崎文雄：ショウジョウバエ神経幹細胞の不均衡分裂のメカニズム、第 2 5 回日本分子生物学会年会、1 2 / 1 4 / 2 0 0 2、横浜
4. Fuse, N., Hisata, K., Katzen, A.L., and Matsuzaki, F.: "*Drosophila* heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size in neuroblast asymmetric divisions", ショウジョウバエ研究会第 6 回研究集会、7 / 2 9 ~ 3 0 / 2 0 0 3、東京
5. Izumi, Y., Ohta, N., Furuya-Ito, A., Saito, M., and Matsuzaki, F.: "G γ 1 subunit of heterotrimeric G proteins is required for neuroblast asymmetric division", ショウジョウバエ研究会第 6 回研究集会、7 / 2 9 ~ 3 0 / 2 0 0 3、東京
6. 布施直之、松崎文雄：神経発生における幹細胞の不等分裂の役割、第 2 6 回日本分子生物学会年会、シンポジウム“個体と細胞の大きさを決める仕組み” 1 2 / 1 2 / 2 0 0 3、神戸
7. Matsuzaki, F., Izumi, Y. and Fuse, N. : "Cell polarity and asymmetric division of Drosophila neural stem cells", 第 7 7 回日本生化学会大会、1 0 / 1 3 / 2 0 0 4、横浜
8. 泉裕士、太田奈緒、松崎文雄：ショウジョウバエ神経幹細胞の紡錘体方向の制御機構、第 2 7 回日本分子生物学会年会、1 2 / 9 / 2 0 0 4、神戸
9. 塩井剛、末次妙子、川口綾乃、宮田卓樹、斎藤哲一郎、松崎文雄：“タイムラプスシステムを用いたマウス神経前駆細胞の分裂パターンの解析”：戦略的基礎研究推進事業「生物の発生・分化・再生」第 3 回公開シンポジウム、1 1 / 1 1 / 2 0 0 4、東京

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

10. 松崎文雄、泉裕士、布施直之：Cell polarity and asymmetric division in neurogenesis、第27回日本神経科学大会、9/21/2004、大阪
11. 松崎文雄、泉裕士、布施直之、久田香奈子：“Cell size asymmetry and spindle orientation in asymmetric division of *Drosophila neuroblasts*”、第27回日本分子生物学会、12/9/2004、神戸
12. 松崎文雄、泉裕士、Thomas Raabe：幹細胞の非対称分裂における分裂軸の制御機構、第38回日本発生生物学会大会、仙台、6/2 2005
13. 松崎文雄、泉裕士：ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称細胞分裂を制御する細胞極性、第5回日本蛋白質科学会、福岡、6/30 2005

特許取得：なし