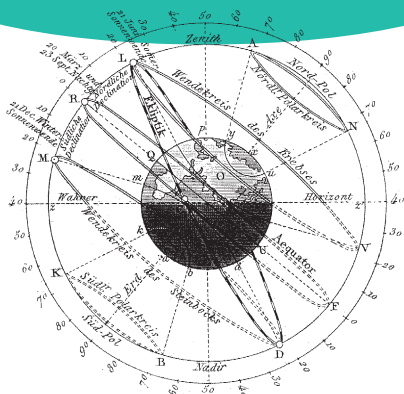




一次線毛動態による 新たな細胞増殖制御機構 トリコプレイン・オーロラAキナーゼ経路

猪子誠人^{*1}，稲垣昌樹^{*1, 2}

一次線毛 (primary cilia) は細胞膜上に生じる小さな不動性の突起物である。しかし一次線毛には細胞増殖を休止させる作用があり、増殖中はつとめてその組立が抑えられていることが培養細胞実験からわかってきた。この新たな仕組みの一つが、われわれの報告したトリコプレイン・オーロラAキナーゼ経路である。さらに一次線毛は、細胞種によっては多彩な機能をもつ。本稿では、一次線毛による新たな細胞増殖制御機構に重点を置きつつ、これまでの関連事項についても概説する。

はじめに

線毛研究の長い歴史では、クラミドモナスなど単細胞生物の可動性線毛 (鞭毛) が盛んであった^(1, 2)。これに対し、一次線毛は“動かない”線毛で細胞に1本のみ生じる特徴をもつ。「線毛病」と呼ばれる症候群の分子病態の解析は、これまで知られていなかった多細胞生物における線毛、特に不動性の一次線毛の病態への強い関与

を最近明らかにした^(3~5)。加えて、一次線毛形成と細胞増殖制御との分子レベルでの連関が培養細胞で明らかにされ、一次線毛の研究は学際的研究領域となりつつある^(6, 7)。以下はその概略である。

一次線毛の記載は19世紀後半に始まる⁽⁸⁾。一次線毛の構造の概略を図1に示す⁽⁹⁾。このように一次線毛は細胞に1本のみ生じる膜突起で、母中心小体 (基底小体) を核とした微小管骨格を軸糸とする構造をなす。この構造は線毛間で共通するが、不動性線毛である一次線毛が可動性線毛と異なるのは運動性に必要な構造物すなわちダイニンアームや中心小管などを欠く点である。

図2は線毛全体の概観と培養細胞の一次線毛の位置づけである^(1~5, 10)。線毛の存在は、ヒトからクラミドモナスに至るまで広く真核生物に認められる。特に脊椎動物以降では、体のほとんどの組織を構築する細胞で線毛の存在が確認されている⁽⁵⁾。線毛は組織ごとに独特な形状・機能を示す。このため、多細胞生物の体では調和のとれた組織分化に深くかかわると考えられている。その機能の解明については、2000年前後から飛躍的に進展している。マウスやヒトでの遺伝学的解析から、線毛の異常と病態との相関が明らかになってきたのである⁽²⁾ (図2最下段)。

A Novel Cell Cycle Regulation through Primary Cilia Kinetics: The Trichoplein-Aurora-A Pathway
Akihito INOKO, Masaki INAGAKI, ^{*1}愛知県がんセンター研究所 発がん制御研究部, ^{*2}名古屋大学大学院医学系研究科

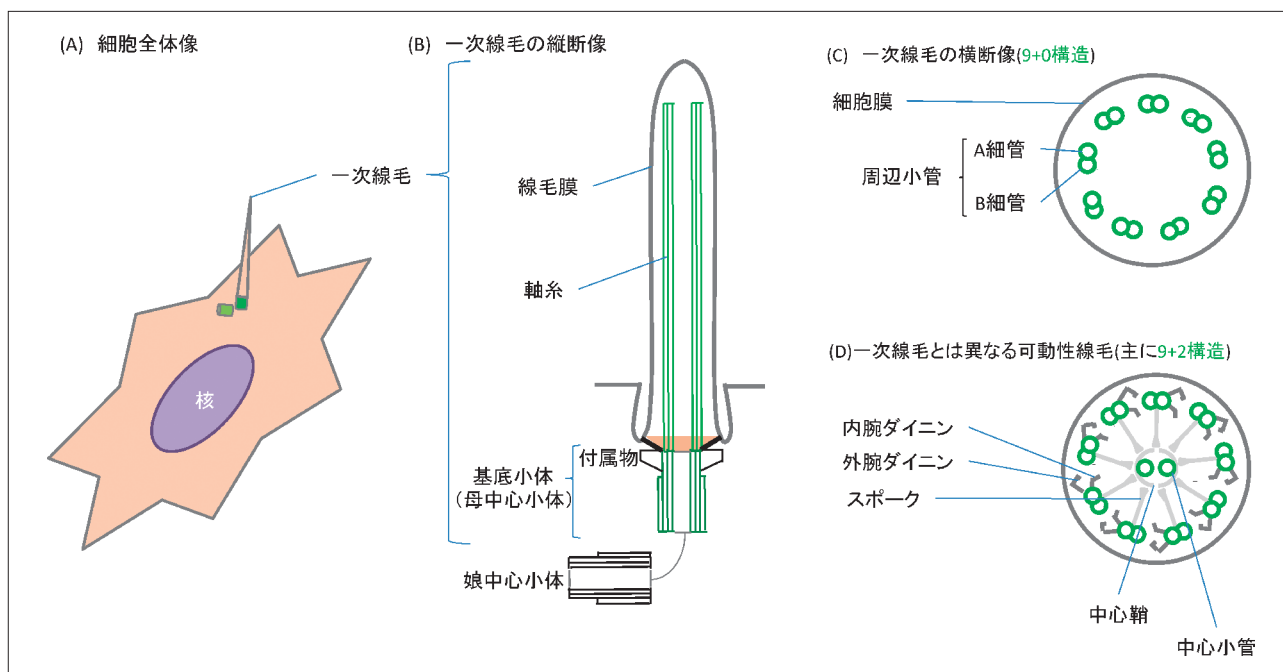


図1 ■ 一次線毛構造の概略（哺乳類培養細胞）

(A) 細胞全体像。一次線毛は不動性を特徴とし、細胞膜上に1本のみ突出する長さ5 μm ほどの突起で、母中心小体（濃い緑）から生じる。これは中心小体複製において娘中心小体の鋳型となった古い中心小体である。一次線毛を生じた母中心小体は基底小体とも呼ばれる。(B) 一次線毛の縦断像の拡大。基底小体（母中心小体）より生じた微細管骨格（軸系，axoneme）を軸とし、線毛膜で覆われている。基底小体には羽根のような付属物がつき、線毛形成に重要である。これらの構造は、線毛において基本的には高度に保存される。(C) 一次線毛の横断像の拡大。一次線毛の軸系（緑）は外周に9本、中心に0本の9+0構造をとる。不動性であり、運動性に寄与する構造物は欠く。(D) 可動性線毛は一次線毛と異なり、軸系は主に9+2構造をとる。また、運動性に必要なダイニンアームなどの付属物をもつ。
 （補足）線毛は医学分野における簡略表記で、繊毛と同義である。線毛と鞭毛は本質的に同じものである。歴史的には細胞あたりに多数あって短いものを線毛（cilia）、1～2本で比較的に長いものを鞭毛（flagella）と呼ぶ。同じ言葉でもバクテリアの細菌鞭毛は太さも細く、構造的も異なる。

一次線毛上に局在するシグナルレセプターの異常により嚢胞腎、神経系の障害が起きる。また、発生期にはShhのシグナルが一次線毛に入るが、その障害では神経管や四肢形成異常が起きる⁽²⁾。これらのことから、生体内での一次線毛の重要な役割の一つは外的シグナルの受容であると考えられている⁽²⁾。一方、培養細胞では一次線毛形成は細胞増殖と相反して起こることが早くから知られていた。すなわち、一次線毛は血清飢餓による細胞周期休止期に出現し、増殖期には消失するという観察結果である^(6, 7, 11)。しかし、一次線毛動態と細胞周期制御のどちらが現象の上流に位置するのかを分子レベルで示した報告はなかった。

われわれのトリコプレインを含む複数のタンパク質群の解析結果は、細胞の一次線毛には細胞周期を休止させる作用があること、そして増殖中は積極的にその出現を抑える分子機構があることを新たに示した^(12, 13)。またこれらの一次線毛の制御経路を明らかにする過程で、意外なことに分裂期キナーゼとして報告されていたオーロラAキナーゼ（以下、オーロラA）が重要な役割を担う

ことが明らかになった⁽⁷⁾。これらの新発見は、休止期に含められる分化、老化、分化能維持などの重要な細胞現象を分子レベルで理解する新たな手がかりをもたらしとも言える。本稿では、このような一次線毛動態による細胞増殖制御機構の新展開について、哺乳類培養細胞、特に正常2倍体であるRPE1-hTERT細胞での知見に重点を置いて概説する。

一次線毛の動態にかかわる構造とタンパク質⁽⁶⁾（図3）

一次線毛の動態は大きくは組立と解体に大別される。一次線毛の直径は0.5 μm 、長さは5 μm ほどしかなく、イメージング技術の進歩は動態制御の鍵となる構造やタンパク質の同定に貢献している⁽¹⁴⁾。

その一つがタンパク質輸送システムである⁽⁹⁾（図3A）。線毛内輸送（Intraflagellar transport; IFT）は、クラミドモナス線毛を用いた高度なライブイメージングによって発見された。これは線毛動態制御に必須であり、IFTタンパク質複合体とモータータンパク質からな

種	脊椎動物								無脊椎動物				
	哺乳類 (ヒト・マウス)							魚 (ゼブラ フィッシュ)	虫 (ハエ)	線虫	原生生物 (単細胞 真核生物)		
可動性	不動					可動			可動	可動	不動	可動	
軸系構造	9+0			9+0	9+2	9+2, 9+0	9+2	9+2	9+0	9+2	9+2	9+0	9+2
線毛の 呼称	一次線毛			特殊線毛 (結合線毛)	特殊線毛	キノシリア	マルチプルシリア	鞭毛	ノード線毛	ノード線毛	鞭毛	感覚線毛	線毛
細胞 あるいは 組織の 種類	培養細胞 血清飢餓による 増殖休止で誘導 RPE1-hTERT (正常二倍体細胞) NIH3T3 (線維芽細胞) ES (胚性幹細胞)	腎尿管 上皮細胞	神経細胞 (視床下部)	網膜視細胞	嗅細胞	内耳 有毛細胞	気管上皮細胞	精子	原始結節	クッパー胞	精子	感覚子 アンフィド	クラミドモナス ゾウリムシ テトラヒメナ
イメージ (赤は 線毛部)													
線毛の 機能	細胞増殖抑制 (本稿)	メカノ センサー	ホルモン レセプター	光受容	匂い受容	平衡感覚	線毛運動による 外液の移動	運動	ノード流の 形成による 左右軸決定	マウスに 準ずる	運動	感覚受容	運動
主な病態	不要な線毛による 細胞増殖休止	嚢胞腎	摂食障害	視機能低下			気管支拡張症	不妊	内臓逆位	左右軸異常		行動異常	運動異常
主な責任 遺伝子あ るいは線 毛病名	トリコブレイン オーロラA Nde1 Tctex-1 遊走障害 PDGFR-α	Polycystin-1 Polycystin-2 IFT20 IFT88	BBS バルデー・ ビードル 症候群	BBS バルデー・ ビードル 症候群			カルタゲナー 症候群	カルタゲナー 症候群	カルタゲナー 症候群	Nde1			

図2 ■ 線毛全体の概観と培養細胞の一次線毛の位置づけ

(表: 左→右へ) 培養細胞の一次線毛は血清飢餓による増殖休止期に誘導され、増殖中は消失する。最近の知見は、一次線毛が細胞増殖を抑制すること、そして増殖中は積極的にその出現を抑える機能のあることを分子レベルで示している(本文参照)。一方、線毛全体を概観すると、脊椎動物以降の分化組織ではほとんどの細胞で線毛が確認され、多彩な形態・機能を示す。嚢胞腎や摂食障害はそれぞれの組織における一次線毛のシグナル受容障害で起こる。発生期のShhのシグナルも一次線毛に入るため、一次線毛の障害で神経管や四肢形成異常が起こる。つまり生体内で一次線毛は外的シグナル受容に与かる。視細胞や嗅細胞は感覚受容器官として非常に特化した線毛をもつ。可動性線毛は、気管や卵巣の線毛上皮で外液の移動に与かる。また精子の運動に寄与する。ノード線毛は9+0構造だが時計回りに回転する。胚の腹側の正中にできる原始結節で左向き水流(ノード流)を発生させることで体の左右軸を決定する。クッパー細胞は魚類での原始結節に相当する。例外的に線毛がないのは小腸吸収上皮や腺房である。

る2種類の組み合わせがそれぞれ順行性と逆行性の輸送を担っている。その積み荷タンパク質の一つに、コート(殻)タンパク質であるBBS(バルデー・ビードル症候群の原因遺伝子の翻訳産物)の複合体からなるBBSomeがある。一方、細胞質からの小胞輸送も一次線毛組立に関与し、その過程で母中心小体のdistal appendageへの線毛小胞の集積が見られる⁽¹⁵⁾(図3B)。この集積過程は、膜融合を促進するRab GTPaseであるRab8の経路の阻害により障害される⁽¹⁵⁾。Distal appendageに局在するOdf2とCEP164の機能欠失では一次線毛の組立が阻害される^(6, 16)。これらの分子生物学的知見と超微形態学観察により、distal appendageは基底小体が線毛小胞と融合するのに重要な部位であり、一次線毛の組立に必

須の構造であることが明らかとなった。また、中心小体と軸系の境界は移行帯と呼ばれ、ここに局在するCP110, CEP97, Odf1などのタンパク質は中心小体の長さを決めている^(6, 17)(図3C)。

一次線毛に着目したプロテオーム解析や遺伝子ノックダウン法による網羅的スクリーニングも展開されている。例として、ATCR3, PTPN23やPLA2G3の分子および機能同定が挙げられる⁽¹⁸⁾(図3C)。ATCR3はpericentrosomal preciliary compartmentと呼ばれるリサイクリングエンドソームを不安定化することで一次線毛の組立を抑える。またこの小胞輸送を介して一次線毛を負あるいは正に制御するタンパク質としてそれぞれPLA2G3およびPTPN23が見いだされている。

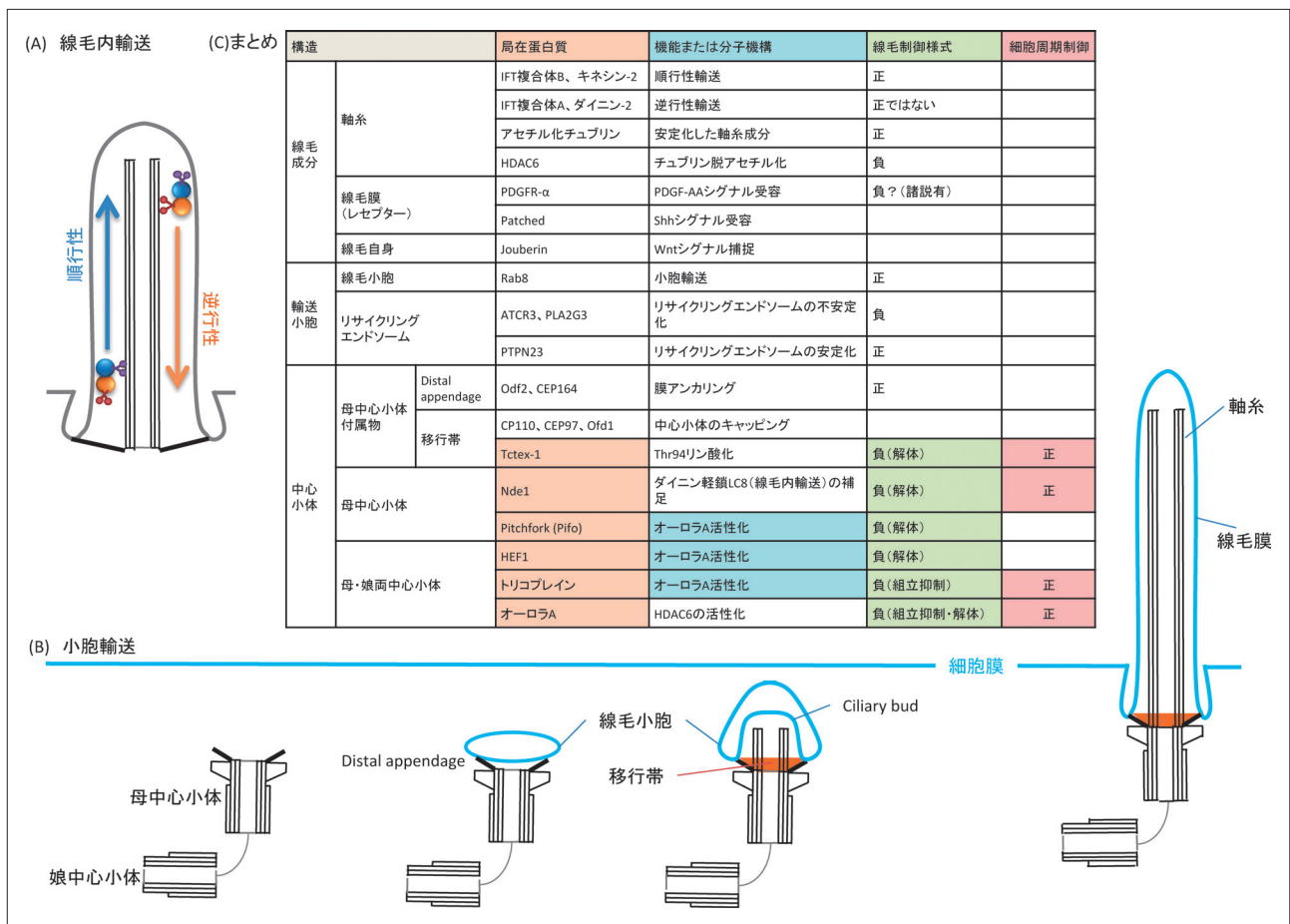


図3 ■ 一次線毛の動態にかかわる構造とタンパク質

(A) 線毛内輸送には方向性があり、一次線毛の組立と解体に大きく寄与している。分子レベルではIFTタンパク質複合体とモータータンパク質がそれぞれ2種類ずつ知られている。順行性(青)がIFTタンパク質複合体Bとキネシン-2、逆行性(橙)がIFTタンパク質複合体Aと細胞質ダイニン-2である。積み荷タンパク質にはコート(殻)タンパク質であるBBSが知られている。このような輸送のバランスが一次線毛の組立と解体を決める。(B) 細胞質からの小胞輸送も一次線毛組立に寄与する。(左→右) 線毛小胞が母中心小体上のdistal appendageに集積していく際、前者にはRab8が、後者にはOdf2, CEP164が局在し膜融合に寄与する。つづいて、移行帯から軸系が伸長する。最後に小胞が細胞膜と融合し、線毛膜の突出が完了する。また、リサイクリングエンドソームの安定化は一次線毛形成に寄与する。(C) 主要な構造とタンパク質の機能のまとめ。本稿で詳しく扱う一次線毛制御因子群は母中心小体に局在する(着色部)。これらは主に培養細胞で確認されているが、シグナル受容・捕捉の一部は、生体のデータによる。詳しくは本文参照。

本稿で詳しく扱う一次線毛制御因子群⁽⁷⁾は母中心小体に局在する(図3C, Tctex-1, Nde1, Pitchfork (Pifo), HEF1, トリコプレイン, オーロラA)。このうち、複数の活性化因子をもつオーロラAは両中心小体に局在し、一次線毛形成を負に制御する。最初の手がかりは2004年、クラミドモナスのオーロラAキナーゼ(CALK)は鞭毛解体に必須であるとの報告である。その後哺乳類細胞を用いた解析でもオーロラAを経由する分子経路が確認され、現在は上流の活性化因子としてトリコプレイン⁽¹²⁾, HEF1⁽¹⁹⁾, Pifo⁽²⁰⁾, カルモジュリン⁽²¹⁾が、下流因子としてはチュブリン脱アセチル化酵素であるHDAC6⁽¹⁹⁾が明らかとなっている(図3C)。

一次線毛形成を負に制御する分子機構⁽⁷⁾ —オーロラAを中心に

もともとオーロラAは、細胞分裂時に紡錘体形成異常を示すショウジョウバエの原因遺伝子として1995年に同定された。哺乳類のオーロラAは中心体および紡錘体極に局在し、有糸分裂開始、中心体成熟・分離および双極紡錘体形成に寄与している^(22, 23)。クラミドモナスでの鞭毛解体機能の発見をきっかけに、哺乳類細胞でもオーロラAの活性化を介して一次線毛形成を負に制御するタンパク質が複数報告された。負の制御は2つの位相に区別される。①血清飢餓からリカバリーした細胞周期再進入時に起こる一次線毛の解体と、②血清存在下で細胞増殖中の持続的な線毛組立の抑制である(図4A

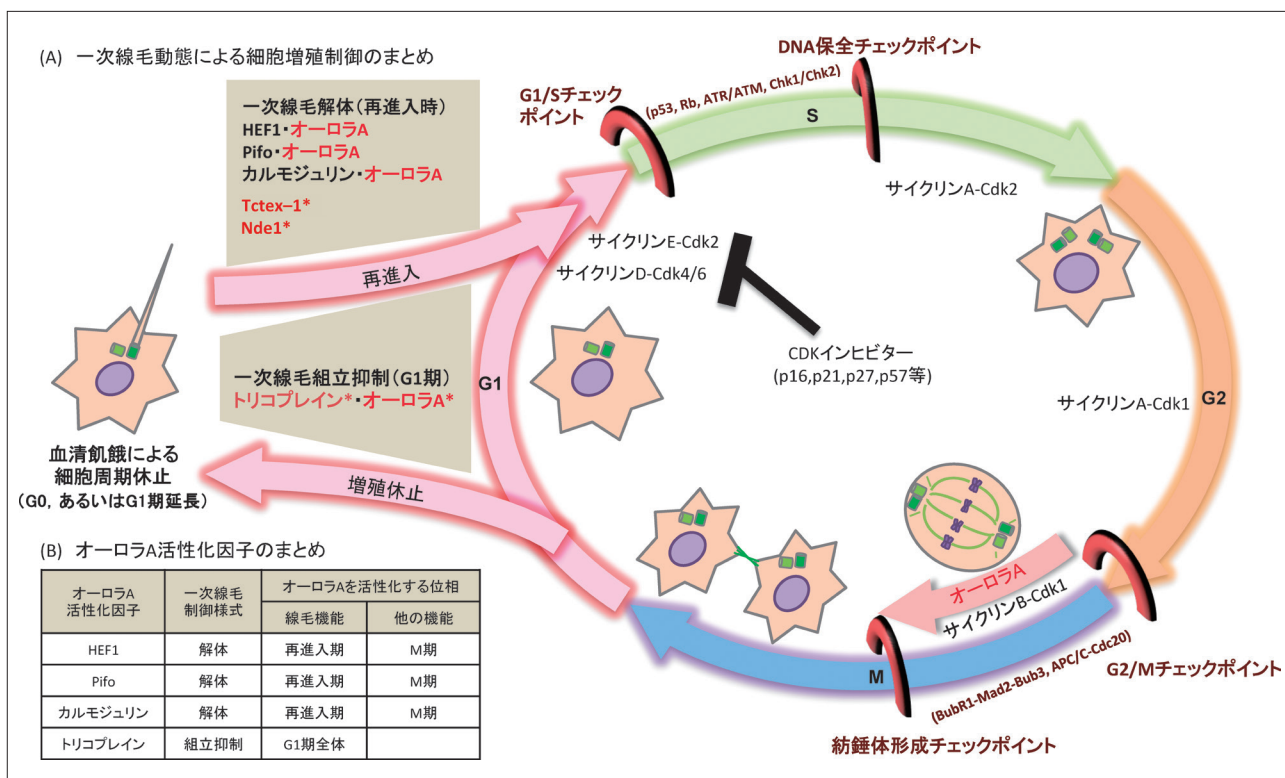


図4 ■ 一次線毛形成と細胞周期進行の相反

(A左) 一次線毛は血清飢餓により生じ、このとき細胞周期は休止する (G0, あるいはG1期延長とも言う)。血清添加により、一次線毛解体と細胞周期への再進入は共に起こる。一次線毛形成の負の制御 (灰色) は、再進入時の解体とG1期の持続的組立抑制の2つの位相からなり、それぞれの分子機構にオーロラAの関与が見られる。そのうち (*) の解析結果は一次線毛の存在自体がG1期を延長させることを新たに示した。このことは生体内で起こるさまざまな休止状態 (後述) を理解する手がかりを与える。詳しくは本文参照。(A右) 細胞周期進行制御の基本原則。4つの位相はそれぞれのサイクリン-Cdk複合体のキナーゼ活性がエンジンとなり、下流の分子や転写を制御することで進行する (例: オーロラA)。CDKインヒビターはそのブレーキとなる。チェックポイント機構は、DNA複製および紡錘体の質を保証する関門で、括弧内は主要な分子群である。G1/Sチェックポイントには特にp53とRbがかかわる。G1期の延長は、休止状態として生体内の分化細胞、老化細胞、幹細胞において認められるがその全容はまだまだブラックボックスである。詳しくは本文参照。(B) 一次線毛を負に制御するオーロラA活性化因子のまとめ。詳しくは本文参照。

左)。以下では、それぞれの位相で機能するオーロラA活性化因子の相違点と、オーロラAの下流に位置する微小管の修飾酵素について記載する。

1. オーロラAの活性化因子 (図4B)

一次線毛を負に制御するオーロラAの活性化因子として最初に報告されたのはHEF1である⁽¹⁹⁾。この報告では一次線毛の解体を観察するために、血清飢餓下のRPE1-hTERT細胞に血清を再添加する系を用いている (図4A左)。この系でHEF1のノックダウンやオーロラA阻害剤の添加をすると、一次線毛の解体が遅延した。それらを用いたタンパク質の定量解析と *in vitro* のキナーゼアッセイにより、HEF1依存的なオーロラAの活性化 (Thr288のリン酸化) が、一次線毛の解体の分子機構として示された。次いでPifoが報告された⁽²⁰⁾。細胞でのPifoノックダウンは一次線毛解体を遅らせた。こ

の表現型はオーロラAを活性化できないPifo変異体では回復しないことから、PifoはオーロラAの活性化を介して一次線毛の解体を起こすと報じられた。カルモジュリンもオーロラAを活性化し、これが一次線毛の解体に必要なことが明らかになった⁽²¹⁾。われわれが同定したトリコブレインは、オーロラAの活性化因子であることが *in vitro* および *in vivo* で確認されたが、機能する位相がHEF1, Pifo, カルモジュリンとは異なっている⁽¹²⁾。トリコブレインあるいはオーロラAのノックダウンでは血清存在下すなわち増殖条件下で一次線毛が出現したのである。このことはトリコブレインとオーロラAによる一次線毛組立の抑制が持続的であり、一過性の解体とは異なることを示している (図4A左)。このように、HEF1, Pifo, カルモジュリン, トリコブレインの4つが細胞レベルで一次線毛形成を負に制御するオーロラAの活性化因子として報告されたが、その作用機序の違

いから一次線毛の解体 (HEF1, Pif1, カルモジュリン) から組立の持続的抑制 (トリコブレイン) の2つに大別される。

2. オーロラAの下流の分子機構

一次線毛の微小管は複数の翻訳後修飾 (アセチル化やポリグルタミル化) を受ける⁽²⁴⁾。チューブリン脱アセチル化酵素であるHDAC6は細胞の一次線毛解体にかかわるオーロラAの基質として最初に示された⁽²⁰⁾。オーロラAによるHDAC6の活性化はチューブリンを脱アセチル化し、一次線毛を解体する。一方、アセチル転移酵素である α -TAT1はこれと対をなしており、一次線毛の安定化に促進的に働く。これらは、一次線毛の動態制御にチューブリンのアセチル化・脱アセチル化が寄与することを示している。

一方で、テトラヒメナ、線虫、HDAC6のノックアウトマウスなどのモデル動物の報告からは、アセチル化だけでは説明し切れない可能性が示されている。チューブリンの翻訳後修飾にはアセチル化のほか、ポリグルタミル化やポリグリシル化もあり、これらの重要性についても一考する必要があるのかもしれない⁽²⁴⁾。

一次線毛動態による細胞増殖制御

1. 一次線毛形成と細胞周期進行の相反 (図4A)

増殖細胞の細胞周期は4つの位相からなり、G1 (ギャップ期) → S (DNA合成期) → G2 (ギャップ期) → M (有糸分裂期) の順に進行することが知られているが、その制御はエンジンとブレーキに相当する分子機構のバランスで成り立つ⁽²⁵⁻²⁷⁾ (図4A右)。各位相のエンジンは個別のサイクリン-Cdk (サイクリン依存性キナーゼ) 複合体のキナーゼ活性であり、その下流には各位相固有の分子機構や転写の制御がある。これを止めるブレーキとしてはp16, p21, p27, p57などのCDKインヒビターが知られている。加えて、細胞は正確な細胞複製をより一層保証するためにDNA複製や紡錘体形成の準備状況での問題発生を監視するための分子機構をもっており、このシステムをチェックポイント機構という。これらの要因によって細胞周期相の長さは変化する。特にG1期の延長は図2に示したような生体内の分化細胞、老化細胞そして幹細胞などの細胞周期休止として見られ、主要な細胞現象の基礎をなしている。この長期間のG1期をG0期と記載する研究者も多い⁽²⁸⁾。このようなG1期延長が示すさまざまな休止状態の分子機構については、老化にRbタンパク質が必要なことが報告されて

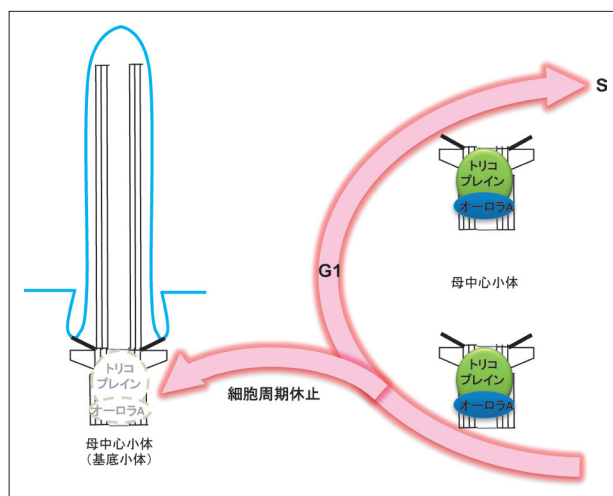


図5 ■ 増殖と休止のスイッチとなるトリコブレイン・オーロラA複合体

トリコブレインとオーロラAは増殖中のRPE1-hTERT細胞では母中心小体への局在を認めるが、血清飢餓による細胞周期休止で一次線毛が誘導されるとこの中心体局在は消失する。このような中心体局在の消失による一次線毛形成は、それぞれのノックダウンによっても確認された。また、この一次線毛形成に依存して細胞周期が休止した (本文参照)。このように、中心体のトリコブレイン・オーロラA複合体は、一次線毛の組立を抑制することで増殖細胞の円滑なG1期進行に寄与する。あわせて、その中心体局在の変化は一次線毛動態を介した細胞増殖と休止のスイッチにもなっている。

いるが、本態の解明にはまだ至っていないのが現状である^(29, 30)。

一次線毛形成と細胞周期進行との相反現象は、このように生理的にも重要な現象が起きるG1期延長への関与を強く示唆するものであった (図4A左)。以下に示すトリコブレイン・オーロラA複合体⁽¹²⁾, Ndel⁽³¹⁾, Tctex-1⁽³²⁾の解析結果は、正常2倍体細胞 (RPE1-hTERT細胞) においては一次線毛の存在自体がG1期延長に寄与することを新たに示した。あわせて、さまざまな休止状態を理解する手がかりをもたらしつつある。

2. トリコブレイン・オーロラA複合体, Ndel, Tctex-1 (図4A左*印)

これらのタンパク質の中心体局在は、一次線毛の出現と相反する。図5に一例を示す。トリコブレインとオーロラAは増殖中のRPE1-hTERT細胞では母中心小体への局在を認めるが、血清飢餓で一次線毛が誘導されるとこの中心体局在は消失する。ノックダウンによりトリコブレインあるいはオーロラAが中心体から欠失すると、増殖条件下にもかかわらず一次線毛が出現する。このときFACS解析により細胞が休止期にあることが確認された。この増殖休止は線毛を除去する操作で解除され

た。すなわち、一次線毛依存的に細胞が休止期に入った(G1期延長)と考えられた。このように、中心体のトリコプレイン・オーロラA複合体は、一次線毛の組立を抑制することで増殖細胞の円滑なG1期進行に寄与する。あわせて、その中心体局在の変化は一次線毛動態を介した細胞増殖と休止のスイッチにもなっている。

Nde1の母中心小体への局在も一次線毛の出現に伴って消失する。Nde1のノックダウンをRPE1-hTERTあるいはNIH3T3細胞で行うと、血清飢餓によって増殖休止期に形成される一次線毛が異常に長くなり、つづく血清の再添加では細胞周期への再進入が遅れた。この細胞周期再進入の遅れも一次線毛依存的であり、線毛除去により回避された。同様に、恒常活性型のRab8aやサイトカラシンDによるアクチン細胞骨格の破壊処理で一次線毛の長さを延長させると、それに依存するG0/G1-S遷移の遅延が確認された。このように、一次線毛の長さは細胞周期再進入の遅延を引き起こすようである。

Tctex-1は一次線毛解体に伴い移行帯に集積するタンパク質であるが、同様の実験により一次線毛依存的な細胞周期再進入の遅れが示された。

これらの一連の報告が示すのは、一次線毛の存在が培養細胞のG1期を延長させるということである。しかし、位相的には異質であり、Nde1とTctex-1のノックダウンの結果は血清再添加時に細胞周期再進入の遅れが生じたものであるが、われわれのトリコプレインのノックダウンによる細胞周期休止は通常の増殖条件下で生じたものである(図4A左)。

3. 一次線毛自体が細胞周期に影響する

一連の報告では注意深いいくつかの実験が行われ、これらの実験系においては、細胞周期への影響が一次線毛自体によることが示されている⁽⁷⁾。トリコプレインはミトコンドリアにも局在する報告がある。そこで、中心体に特異的に局在・機能する分子断片を用いた実験で、副次経路の可能性を慎重に除外している。線毛除去のためノックダウンしたIFT88はS-G2/M進行を制御する報告がHeLa細胞であるだけでなく、星状微細管の形成にも要求され紡錘体形成に寄与することが培養細胞から個体レベルで確認されている。同様に線毛除去のためノックダウンしたIFT20は一次線毛だけでなく、ゴルジ装置にも存在する。一次線毛の延長に用いたサイトカラシンDによるアクチン線維の破壊はRhoを含むいくつかのシグナル経路を活性化することが知られている。そのため、各報告では線毛操作に複数の方法と慎重な対照実験を追加することで、副次経路によらない一次線毛自体の

細胞周期への影響を明確にしている。

また、分子機構からも線毛あるいは中心体での特異性が示されている。トリコプレインの効果は中心体に局在するオーロラAの活性化による。Nde1の効果は一次線毛組立に必要なIFTに含まれるダイニン軽鎖のLC8を補足することによる。Tctex-1の移行帯への局在はThr94のリン酸化に依存する。

動物個体での再現性も確認された。マウス胎児を用いた子宮内電気穿孔法による放線状グリアでのTctex-1ノックダウンは脳皮質神経の早熟な分化に伴う神経前駆細胞の減少をもたらした。モルフォリノを用いたゼブラフィッシュ胚でのNde1欠失でも、クッパー胞で一次線毛の長さの延長と細胞増殖減弱が生じ、左右軸形成が障害されていた。これらの生体内での観察結果は、一次線毛形成が分化をはじめとしたさまざまな休止期の現象にも影響する可能性をうかがわせる。

一次線毛と細胞周期進行の将来的な接点

現時点ではまだ明らかになっていない、一次線毛と細胞周期進行の将来的な接点について分子レベルで考えてみる。

中心体の異常は、細胞周期を最終的にG1期停止に至らせる⁽³³⁾。一次線毛形成により細胞膜に係留された中心体の位置や構成タンパク質は増殖細胞のものとは明らかに異なった状態にある。そのため、中心体チェックポイント機構が機能している可能性は十分考えられる。その一つは中心体異常に伴って活性化されるp38によるp53のSer33のリン酸化を介したp21の発現誘導である^(34,35)。一次線毛形成がこのようなp53を介したチェックポイントを発動し細胞周期を停止させたり、また一次線毛の解体によってそれらが解除されたりするのかもしれない(図4A)。

Wntは器官形成の過程で繁用される細胞外シグナル因子で、標的遺伝子の転写活性化により細胞の分化や増殖、極性化に寄与する^(2,5)。Wntシグナルは細胞膜上のレセプターであるFrizzledから入力され、複数の細胞内シグナル経路をたどる。このうち、がん化や増殖に向かうとされるWnt/ β -カテニン経路を一次線毛が減弱させるとの報告がある⁽³⁶⁾。一次線毛内のJoubertin(Joubert症候群という線毛病の原因遺伝子の翻訳産物)は β -カテニンを捕捉する作用があるため、培養細胞を用いたWnt活性のレポーターアッセイでは一次線毛の存在に依存して転写が抑制された。しかし、この転写抑制による細胞増殖への影響やJoubertin機能の組織特異性につ

いては今後の課題であると思われる。

Shhは主に左右軸，神経管，四肢，体節のパターニングを担う細胞外シグナル因子で，そのレセプターであるPatchedは一次線毛膜表面に局在する^(2,5)（図3C）．この経路は最終的に活性化型Gliによる転写を誘導し，細胞増殖を促すと考えられている⁽⁷⁾．しかし遺伝子変異によりShh経路を活性化させた複数種の脳腫瘍形成モデルマウスを比較したところ，一次線毛の増殖への影響が責任変異遺伝子によっては逆の効果を示すことが示された⁽³⁷⁾．つまり，一次線毛はGli2変異によるShh経路の活性化には抑制的に働いたが，Smo変異によるShh経路の活性化には寄与していた．同様の結果は，基底細胞種のモデルマウスでも得られた⁽³⁸⁾．

このように，一次線毛と細胞周期制御の将来的な分子レベルでの接点としては中心体チェックポイント機構が，また組織・細胞種によっては亜型が認められるかもしれない．今後の発展的解析が待たれる．

一次線毛自体の動態を決めるシグナル

いくつかのシグナルが一次線毛自体を解体あるいは形成させる報告はあるが，それによる細胞周期への影響は詳細には検討されていない．

1. 細胞外シグナル

細胞外シグナルには一次線毛を解体させるWnt5a，成長因子そしてCaCl₂が知られている．Wnt5aはWnt/PCP（Planar Cell Polarity，平面極性）経路のリガンド

であり，その添加でRPE1-hTERT細胞の一次線毛解体が起こる⁽³⁹⁾．一方，PDGF（血小板由来増殖因子），FGF（線維芽細胞増殖因子）あるいはCaCl₂の添加が，血清飢餓下のBALB/c-3T3細胞にS期にはいたらない一次線毛解体を生じさせることが過去に報告されている⁽⁴⁰⁾．しかし，マウス胚性線維芽細胞の報告ではこのような成長因子の線毛解体への関与は認められていない⁽⁴¹⁾．また，NIH3T3細胞ではPDGF-AAのレセプターが一次線毛膜表面に局在し，そのシグナルを介した細胞移動に寄与することが知られているが⁽⁴²⁾，線毛解体や細胞増殖への影響の詳細は明らかになっていない．

2. 細胞内部のシグナル

細胞の全体的な形態変化は，細胞内部からの一次線毛の動態制御に関与している．培養細胞が密集して接触阻止を起こすと増殖条件下でも一次線毛を形成する．細胞外基質のマイクロパターン上にRPE1-hTERT細胞を接着させる“封じ込め実験”では，細胞が変形するほど基質が狭いとアクチン骨格の改変とともに一次線毛形成が誘導されたが，基質が広いとこれらは起こらなかった⁽⁴³⁾．このことから，細胞の形態制御にかかわるタンパク質群は一次線毛の動態制御にもかかわる可能性がある．

今後の展望

これまでの知見を総合すると，少なくとも正常2倍体細胞に強制的に一次線毛を出現させると，細胞は増殖休

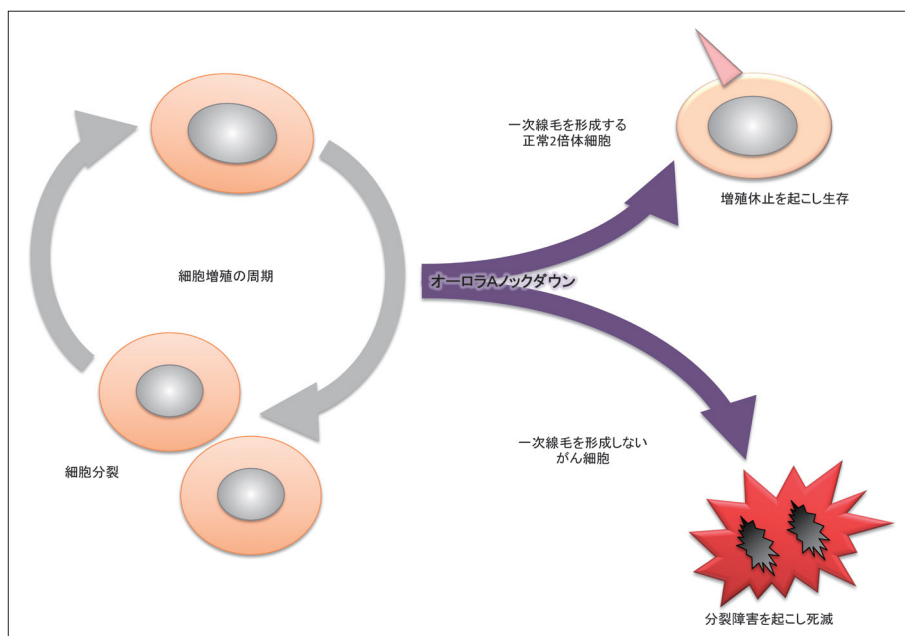


図6 ■ オーロラA阻害の反応性の違いによるがん細胞特異的傷害

オーロラAキナーゼは，細胞分裂に必須の酵素でもある．そのノックダウンによる発現抑制が，正常2倍体細胞では一次線毛形成を誘導し，その結果積極的に細胞増殖休止に至る．同じ操作でも，一次線毛形成能を失っているがん細胞（HeLa細胞）は増殖休止が起こらず分裂障害により死滅する．

止 (G1 期延長) に至る。この事実は、逆に一次線毛の欠失が細胞がん化の一因となっている可能性を浮かび上がらせる。実際、一次線毛形成能を失っているがんは多く^(6, 44)、嚢胞腎と膀胱がんは一次線毛欠失による過増殖のモデルとして知られている^(6, 44)。嚢胞腎は一次線毛欠失モデルマウスで認められるが、その形成には胚発生や創傷などによる増殖刺激が必要であることから、発症要因は一次線毛欠失による中心体の位置異常とそれに続く細胞分裂異常の両者であると考えられている。一次線毛の欠失した膀胱がんは膀胱特異的に K-ras の活性化したモデルマウスで生じるが、ras シグナルを阻害すると培養細胞レベルでは線毛が出現する。このことから、膀胱がんでは活性化 K-ras シグナルが一次線毛形成を抑制していると考えられる。これらは一次線毛欠失とがん化の関与を示すものであるが、その直接的な因果関係については今後の解析を待たなければいけない。

一方、われわれは、がん細胞では一次線毛形成能が欠失していることに加え、細胞分裂の遂行にオーロラ A が必須である点にも着目した (図 6)。オーロラ A ノックダウンを施したところ、がん細胞株である HeLa 細胞は分裂障害により死滅したが、正常 2 倍体細胞は一次線毛を形成し細胞周期が休止した。このがん細胞特異的な傷害性が普遍的であれば、オーロラ A は理想的ながん治療の標的分子となりうる⁽¹³⁾。

ほかにもさまざまな一次線毛制御様式が報告されている⁽⁶⁾。転写因子やマイクロ RNA も一次線毛形成に寄与する^(6, 45)。一次線毛の安定化に寄与するタンパク質もあり、E3 ユビキチンリガーゼの VHL (線毛病の責任遺伝子座である von Hippel-Lindeau locus にコードされる) や INPP5E⁽⁴¹⁾ (Inositol polyphosphate-5-phosphatase E, 線毛病の責任遺伝子の一つ) が含まれる。逆に細胞周期からの影響として増殖抑制経路に関与するキナーゼ NDR が Rab8 の GEF である Rabin8 の Ser272 をリン酸化することが一次線毛形成に決定的であることも見いだされている⁽⁴⁶⁾。これらのことから、生体内の一次線毛動態制御は多因子の組み合わせで成り立っている可能性があり、新規分子の同定も含めた全容の解明が待たれる。

今まで比較的接点の少なかった一次線毛動態制御の研究と細胞周期制御の研究が今融合しつつある。今後分子レベルでの理解が進み、一次線毛操作による細胞増殖分化制御の技術が向上すれば、新しい分子標的によるがん治療薬の開発や安定した分化誘導法による再生医療への貢献といった道も開けてくるのではなかろうか。

謝辞：本稿を執筆する過程で助言をくださった、同研究室の後藤英仁博士をはじめ皆様に御礼申し上げます。

文献

- 1) 神谷 律：“太古からの 9+2 構造—繊毛のふしぎ”，岩波書店，2012。
- 2) 武田洋幸，廣野雅文編：“動くだけではない!? 繊毛の多彩な機能”，秀潤社，2009。
- 3) M. Fliegauf, T. Benzing & H. Omran: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 880 (2007)。
- 4) E. A. Nigg & J. W. Raff: *Cell*, **139**, 663 (2009)。
- 5) J. M. Gerdes, E. E. Davis & N. Katsanis: *Cell*, **137**, 32 (2009)。
- 6) T. Kobayashi & B. D. Dynlacht: *J. Cell Biol.*, **193**, 435 (2011)。
- 7) H. Goto, A. Inoko & M. Inagaki: *Cellular and Molecular Life Sciences*, (2013)。
- 8) R. A. Bloodgood: *Methods in Cell Biology*, **94**, 3 (2009)。
- 9) H. Ishikawa & W. F. Marshall: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 222 (2011)。
- 10) E. N. Kiprilov, A. Awan, R. Desprat, M. Velho, C. A. Clement, A. G. Byskov, C. Y. Andersen, P. Satir, E. E. Bouhassira, S. T. Christensen *et al.*: *J. Cell Biol.*, **180**, 897 (2008)。
- 11) R. W. Tucker, A. B. Pardee & K. Fujiwara: *Cell*, **17**, 527 (1979)。
- 12) A. Inoko, M. Matsuyama, H. Goto, Y. Ohmuro-Matsuyama, Y. Hayashi, M. Enomoto, M. Ibi, T. Urano, S. Yonemura, T. Kiyono, I. Izawa & M. Inagaki: *J. Cell Biol.*, **197**, 391 (2012)。
- 13) B. Short: *J. Cell Biol.*, **197**, 341 (2012)。
- 14) L. Schermelleh, R. Heintzmann & H. Leonhardt: *J. Cell Biol.*, **190**, 165 (2010)。
- 15) F. R. Garcia-Gonzalo & J. F. Reiter: *J. Cell Biol.*, **197**, 697 (2012)。
- 16) K. N. Schmidt, S. Kuhns, A. Neuner, B. Hub, H. Zentgraf & G. Pereira: *J. Cell Biol.*, **199**, 1083 (2012)。
- 17) D. A. Brito, S. M. Gouveia & M. Bettencourt-Dias: *Curr. Opin. Cell Biol.*, **24**, 4 (2012)。
- 18) J. Kim, J. E. Lee, S. Heynen-Genel, E. Suyama, K. Ono, K. Lee, T. Ideker, P. Aza-Blanc & J. G. Gleeson: *Nature*, **464**, 1048 (2010)。
- 19) E. N. Pugacheva, S. A. Jablonski, T. R. Hartman, E. P. Henske & E. A. Golemis: *Cell*, **129**, 1351 (2007)。
- 20) D. Kinzel, K. Boldt, E. E. Davis, I. Bartscher, D. Trumbach, B. Diplas, T. Attie-Bitach, W. Wurst, N. Katsanis, M. Ueffing *et al.*: *Dev. Cell*, **19**, 66 (2010)。
- 21) O. V. Plotnikova, A. S. Nikonova, Y. V. Loskutov, P. Y. Kozyulina, E. N. Pugacheva & E. A. Golemis: *Mol. Biol. Cell*, **23**, 2658 (2012)。
- 22) 福地大樹，寺田泰比古：“細胞周期フロンティア”，佐方巧幸，稲垣昌樹，岸本健雄編，共立出版，2010，p. 46。
- 23) A. R. Barr & F. Gergely: *J. Cell Sci.*, **120**, 2987 (2007)。
- 24) C. Janke & J. C. Bulinski: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 773 (2011)。
- 25) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter：“細胞の分子生物学 第5版”，中村柱子，松原謙一監訳，ニュートンプレス，2010。
- 26) 中山敬一：“キーワードで理解する 細胞周期イラストマップ”，羊土社，2005。
- 27) 中山敬一：“ヒトと医学のステージへ拡大する 細胞周期 2013”，羊土社，2013。
- 28) 中山敬一：“細胞周期の最前線—明らかにその制御機構”，中山敬一編，羊土社，2005，p. 16。
- 29) J. Sage, A. L. Miller, P. A. Perez-Mancera, J. M. Wysocki

- & T. Jacks: *Nature*, **424**, 223 (2003).
- 30) 洲崎悦生, 中山敬一: “細胞周期フロンティア”, 佐方巧幸, 稲垣昌樹, 岸本健雄編, 共立出版, 2010, p. 212.
 - 31) S. Kim, N. A. Zaghoul, E. Bubenshchikova, E. C. Oh, S. Rankin, N. Katsanis, T. Obara & L. Tsiokas: *Nat. Cell Biol.*, **13**, 351 (2011).
 - 32) A. Li, M. Saito, J. Z. Chuang, Y. Y. Tseng, C. Dedesma, K. Tomizawa, T. Kaitsuka & C. H. Sung: *Nat. Cell Biol.*, **13**, 402 (2011).
 - 33) S. Doxsey, W. Zimmerman & K. Mikule: *Trends Cell Biol.*, **15**, 303 (2005).
 - 34) V. Srsen, N. Gnadt, A. Dammermann & A. Merdes: *J. Cell Biol.*, **174**, 625 (2006).
 - 35) K. Mikule, B. Delaval, P. Kaldis, A. Jurczyk, P. Hergert & S. Doxsey: *Nat. Cell Biol.*, **9**, 160 (2007).
 - 36) R. Ajima & H. Hamada: *Nat. Cell Biol.*, **13**, 636 (2011).
 - 37) Y. G. Han, H. J. Kim, A. A. Dlugosz, D. W. Ellison, R. J. Gilbertson & A. Alvarez-Buylla: *Nat. Med.*, **15**, 1062 (2009).
 - 38) S. Y. Wong, A. D. Seol, P. L. So, A. N. Ermilov, C. K. Bi-chakjian, E. H., Jr. Epstein, A. A. Dlugosz & J. F. Reiter: *Nat. Med.*, **15**, 1055 (2009).
 - 39) K. H. Lee, Y. Johmura, L.-R. Yu, J.-E. Park, Y. Gao, J. K. Bang, M. Zhou, T. D. Veenstra, B. Yeon Kim & K. S. Lee: *EMBO J.*, **31**, 3104 (2012).
 - 40) R. W. Tucker, C. D. Scher & C. D. Stiles: *Cell*, **18**, 1065 (1979).
 - 41) M. Jacoby, J. J. Cox, S. Gayral, D. J. Hampshire, M. Ayub, M. Blockmans, E. Pernot, M. V. Kisseleva, P. Compere, S. N. Schiffmann *et al.*: *Nature Genetics*, **41**, 1027 (2009).
 - 42) L. Schneider, C. M. Stock, P. Dieterich, B. H. Jensen, L. B. Pedersen, P. Satir, A. Schwab, S. T. Christensen & S. F.

Pedersen: *J. Cell Biol.*, **185**, 163 (2009).

- 43) J. V. Shah: *J. Cell Biol.*, **191**, 233 (2010).
- 44) E. S. Seeley & M. V. Nachury: *J. Cell Sci.*, **123**, 511 (2010).
- 45) J. Cao, Y. Shen, L. Zhu, Y. Xu, Y. Zhou, Z. Wu, Y. Li, X. Yan & X. Zhu: *Nat. Cell Biol.*, **14**, 697 (2012).
- 46) S. Chiba, Y. Amagai, Y. Homma, M. Fukuda & K. Mizuno: *EMBO J.*, **32**, 874 (2013).

プロフィール



猪子 誠人 (Akihito INOKO)

＜略歴＞2002年3月京都大学大学院医学研究科分子医学系専攻博士課程修了／2002年4月～2003年9月同研修員／2003年10月～2007年3月愛知県がんセンター研究所研究員／2007年4月同主任研究員，現在に至る＜研究テーマと抱負＞培養細胞と生体のギャップを埋めたい＜趣味＞あれこれ考えること



稲垣 昌樹 (Masaki INAGAKI)

＜略歴＞1986年三重大大学大学院博士課程修了（医博）／同年愛知県がんセンター研究所研究員主任研究員／1992年東京都老人総合研究所神経生理部門部門長／1997年愛知県がんセンター研究所生化学部／発がん制御研究部部長／2007年より名古屋大学大学院医学系研究科客員教授（細胞腫瘍学講座）兼任／2009年より愛知県がんセンター研究所中央実験室室長兼任