

**Par 複合体による細胞極性再構成系の
極性形成プロセスにおける微細構造の解明**

河野 夏鈴

目次

要旨	3
1. 序論	4
1.1. 細胞極性の生理的な機能	4
1.2. Par 複合体の発見の歴史	4
1.3. Par 複合体と相互抑制による極性の形成	6
1.3.1. Par 複合体と Par-1 の相互抑制	6
1.3.2. Par 複合体と Lgl の相互抑制	7
1.4. 各細胞種における Par 極性形成のきっかけと生理的意義	7
1.4.1. 線虫の初期胚における Par 極性形成	7
1.4.2. 上皮細胞における Par 極性形成	9
1.4.3. ショウジョウバエ神経幹細胞における Par 極性形成	10
1.5. 本研究の目的	12
2. 対象と手法	13
2.1. 細胞の培養法	13
2.2. 細胞のライブイメージング	13
2.3. 免疫染色法	13
2.4. 超解像による撮影とその解析	14
2.5. 非対称度の定量	14
2.6. 細胞膜の曲率の定量	14
2.7. Par 複合体の凝集体サイズの定量	15
2.8. ウェスタンブロッティング	15
2.9. RNA 干渉法によるノックダウン	15
2.10. プラスミドのコンストラクション	16
2.11. 使用抗体	16
3. 結果	18
3.1. S2 細胞における Par 極性の再構成	18
3.1.1. S2 細胞は Par-3 の過剰発現によって Par 極性を持つ	18
3.1.2. Par 複合体の非対称な分布に関する評価指標の構築	20
3.1.3. S2 細胞の Par 極性形成における Lgl の役割の検討	20
3.1.4. S2 細胞の Par 極性の 3 次元観察による Par-island の発見	23
3.2. 人工的な Par 極性における極性形成過程	25
3.2.1. Par-island の形成および集合プロセスの観察システムの構築	25
3.2.2. Par-island の形成および集合プロセスの経時的変化	27
3.2.3. 定常状態における Par-island の動態	33
3.3. Par-island 内部の微細構造の解析	36
3.3.1. Par-island は細胞膜よりも高い曲率を持つ	36
3.3.2. SRRF 法を用いた Par-island の構造解析	38
3.3.3. STED 顕微鏡を用いた Par-island の構造解析	38
3.4. Par-island の形成と細胞周期の関係性	42
3.5. Par-island 構造の形成や動態に影響を与える分子間相互作用	44
3.5.1. Par-3 の自己重合と Par-island の関係性	44
3.5.2. Par 複合体の構成因子間の相互作用による影響	50
3.5.3. 細胞骨格系タンパク質および細胞膜が Par-island に与える影響の検討	50
4. 考察	52
4.1. S2 細胞における Par 極性の形成メカニズム	52
4.1.1. Par 極性形成が開始されるメカニズム	52

4.1.2.	ステップワイズな極性形成	52
4.1.3.	Par 複合体が集合するメカニズム	53
4.2.	S2 細胞における Par 極性の維持と崩壊のメカニズム	54
4.3.	Par 複合体の分子ネットワークと凝集体の性質の関係性	55
4.3.1.	極性形成で形成される凝集体の性質.....	55
4.3.2.	Par 複合体が凝集するメカニズム	58
4.4	S2 細胞の Par 極性の分布の状態が二相に分かれるメカニズム.....	59
5.	結論と展望	61
	文献.....	62

要旨

細胞はその構成成分を非対称に分布させることで、細胞に極性をもたらす。この細胞極性は、細胞移動や非対称細胞分裂などの方向性をもった細胞の振舞いや、上皮構造の形成・維持などの多細胞組織の秩序形成など、様々なスケールの生命現象に必須な役割を果たしている。中でも、Par-3、Par-6、aPKC から構成される Par 複合体を基盤とした細胞極性は、種を越えて保存された最も一般的な細胞極性システムである。

Par 極性の形成プロセスや挙動について様々なモデルシステム解析が進められた結果、Par 極性形成システムは、細胞接着や細胞分裂など細胞種ごとに様々な生体プロセスと共役することが明らかとなった。そのため、Par 複合体の挙動や Par 複合体の構成因子の振る舞いは細胞のタイプによって異なっている。従って Par 複合体の一般的な性質については未知な点が多く、その理解のためには、Par 複合体の挙動の多様性を生み出す要因である「細胞種に固有な機能との連携による Par 複合体の特殊性」をできるだけ排除した実験系の確立が求められる。

本研究では、Par 極性や接着性を持たない培養細胞である Schneider2 細胞 (S2 細胞、ショウジョウバエ胚由来) を用い、Par 極性の再構成系を樹立し、Par 極性の一般的な性質を理解することを目指した。S2 細胞は、Par 複合体の 3 因子を全て発現しているにも関わらず、それらは細胞質に分布するため、極性は形成されない。私はこの S2 細胞に対して Par 極性システムの構成因子の強制発現の効果を検討した。その結果、Par-3 の過剰発現により、Par 複合体が細胞表層に現れ、S2 細胞が自律的に極性を形成することを見出した。また、S2 細胞の Par 極性形成には、内在性の Lethal giant larvae (Lgl) が必須だったことから、*in vivo* と同様に、Par 複合体と Lgl の相互抑制が極性形成に重要であることが示唆された。

次に、この実験系を用い、Par 極性の形成過程をライブイメージングで追跡した結果、S2 細胞では (1) 細胞表層における Par 複合体からなる点状の凝集体の形成、(2) 不定形の構造「Par-island」への成長、(3) 細胞表層で Par-island の集合、という形態的に異なる状態を経て段階的に進行することが判明した。Par-island はこの再構成系の解析で初めて同定された構造体であり、定常状態においても、変形・集合・解離を繰り返すダイナミックな特徴を示す。さらに、超解像度顕微鏡観察により、Par-island は一辺の長さ約 400nm、幅約 200nm の基本構造からなるメッシュワークであることが判明した。このメッシュワーク構造の形成には、Par-3 の自己会合ドメインが重要な役割を果たす。Par-island と類似した構造はショウジョウバエ神経幹細胞にも観察された。従って、Par-island がこの人為的な極性形成に固有な産物ではなく、*in vivo* にも存在する構造であることが強く示唆された。以上の解析から、S2 細胞の Par 極性再構成系が示す諸性質は、極性形成時に Par 複合体が示す一般的な性質を反映していると結論づけた。

私が確立した Par 極性の再構成系とその方法論は、極性研究に新たなモデルシステムを提供し、*in vivo* システムの研究のみでは困難だった様々な角度から解析を可能にする。

1. 序論

1.1. 細胞極性の生理的な機能

多細胞生物は多様な機能を持つ細胞から構成されており、さらにそれらの細胞が適切に協調することで発生する。例えば、発生期における細胞分化に異常が生じて細胞の多様性が消失すると、個々の組織は形成されず個体は発生できない。成体で組織構造が破綻した場合、各組織は機能不全に陥って個体は死に至る。このような事態を避けるため、細胞は特定の分子を内部で局在させ「細胞極性」を形成し、それらの細胞機能が秩序正しく制御する。

細胞極性の存在は1800年代の観察結果から提唱されはじめた。Whitmanはヒルの卵の内部に二種の異なる層が存在し、さらに各ドメインが別々の娘細胞に分配されたことから、細胞極性の存在を提唱し、さらに娘細胞の運命決定との関連性について考察している (Whitman, 1878)。その後、ホヤの発生でもヒルの卵と同様の現象が観察されただけでなく (Conklin, 1905)、線虫、ショウジョウバエなどのモデル生物を利用した分子レベルの研究も進んでいった。その結果、細胞極性は二種の層は分子の局在によって形成されており、多様な運命の細胞産生につながっていることも明らかになった (Horvitz & Herskowitz, 1992; Goldstein & Macara, 2007)。その後、細胞極性は卵など発生期に特異的な細胞だけでなく、上皮細胞など成体でも機能することが示された (Suzuki & Ohno, 2006; Goldstein & Macara, 2007)。上皮細胞は Adherence junction および Tight junction (無脊椎動物では Septate junction) を介して細胞同士が接着し、密な単層構造を形成することでバリア機能を持つ (Rodriguez-Boulan & Macara, 2014)。上皮細胞はこのバリア機能を持つことで、内部の組織液の外部への流出や、外部環境からの有害因子の侵入を防いでいる (Rodriguez-Boulan & Macara, 2014)。Adherence junction および tight junction は細胞表層全域で形成されているわけではなく、細胞の一部に分子が凝集することで形成されている (Rodriguez-Boulan & Macara, 2014)。すなわち上皮を形成する細胞それぞれで無秩序に分子が凝集した場合、細胞間接着は形成されず単層構造は崩壊する。これを防ぐため、細胞は頂端側と基底側で異なる分子を局在させることで極性を形成し、細胞間で共通した位置に接着因子を局在させることを可能にしている (Suzuki & Ohno, 2006; Johnston, 2018)。このように、細胞極性は発生期や成体を問わず多細胞生物にとって重要な役割を果たす。

1.2. Par 複合体の発見の歴史

Par-titioning defective (*par*) 遺伝子群は、分子の中で線虫からヒトまで幅広い生物において、細胞極性の形成の基盤として働く。この遺伝子群は7つの遺伝子から構成されており、線虫の初期胚を利用したスクリーニングから同定された (Kemphues *et al*, 1988; Kemphues, 2000)。

Kemphues らは線虫の初期胚を利用し、発生の必須遺伝子のスクリーニングを行っている過程で、胎生致死となる遺伝子のうち1つが興味深い表現型を持つことを発見した (Kemphues *et al*, 1988)。通常の線虫の初期胚では、細胞の中心部に局在していた中心体が精子の貫入位置に近づき、その後卵割が起きることで非対称なサイズの娘細胞が産生される。スクリーニングによって発見された変異体では、その卵割位置が細胞の中央部分に寄っており、細胞質内の発生関連因子のP因子の分布にも異常が生じていた。その表現型の様子から Kemphues は同定した遺伝子を *par-1* と名付け、同様の表現型を示す *par* 遺伝子をその他に5つ同定した (Kemphues *et al*, 1988; Watts *et al*, 1996)。その後、線虫の初期胚を利用した機能解析によって、*par* 遺伝子群の重要な性質が二点明らかとなった。第一に線虫初期胚の細胞表層の前部には Par-3 と Par-6 が、後部には Par-1 と Par-2 が局在することで排他的な二種の層、すなわち細胞極性を形成していた点である (Kemphues,

2000)。第二に *par* 遺伝子は線虫の初期胚における極性の上流の制御分子であり、下流のタンパク質と協調して卵割位置や細胞質内のタンパク質や RNA を非対称に局在させていた点である (Colombo *et al*, 2003; Gotta *et al*, 2003; Srinivasan *et al*, 2003)。これらの結果から、*par* 遺伝子は線虫の初期胚における極性形成の主要因子であることが決定づけられた。

Par タンパク質は発見以来しばらく、線虫の初期胚で主に機能解析が進められてきていた。しかし 1998 年、ショウジョウバエにも *par* 遺伝子が発見されて以降、Par タンパク質は多細胞生物の極性形成を議論するうえで代表的な因子として注目を集め始めた。Kunichinke らは、ショウジョウバエ胚の上皮細胞の極性制御因子である Bazooka (Wieschaus *et al*, 1984; Müller & Wieschaus, 1996) が Par-3 のホモログであることを明らかにした (Kuchinke *et al*, 1998)。さらにショウジョウバエ神経幹細胞においても Bazooka が頂端側のみに局在し、その変異体では神経幹細胞の分裂方向に異常が生じることから、Bazooka が神経幹細胞の極性を制御することが示唆された (Kuchinke *et al*, 1998)。Izumi らはマウス胎児皮膚由来の NIHT3 細胞を利用して atypical protein kinase C (aPKC) と相互作用を持つ aPKC isotype-specific protein (ASIP) を同定し、ASIP が線虫の *par-3* のホモログであることを明らかにした (Izumi *et al*, 1998)。この ASIP はマウス成体の各組織や、ラット・ヒト・アフリカミドリザル由来の培養細胞でも発現していることから、哺乳類でも Par-3 が保存されていることが明らかとなった (Izumi *et al*, 1998)。さらにイヌ腎臓由来の培養細胞である MDCK 細胞およびラット腸の上皮細胞では、細胞極性の指標でもある細胞結合部位に aPKC と ASIP が共局在していたことから、ASIP-aPKC 複合体が細胞極性の形成や維持を制御することが示唆された (Izumi *et al*, 1998)。この研究をきっかけに、aPKC が Par 複合体の新規因子であり Par-3 や Par-6 と共局在していることが示された (Wu *et al*, 1998; Tabuse *et al*, 1998)。

aPKC と Par-3 が生物種を越えて保存されるだけでなく相互作用を持っていることから、線虫の初期胚において aPKC および Par-3 と共局在する Par-6 についても遺伝子の保存性が検討された。その結果、Par-3 や aPKC と同様に生物種を越えて保存されていることが明らかになった (Hung & Kemphues, 1999)。さらに、Par-6 も Par-3 や aPKC の非対称な局在に影響を与えることから、三者が複合体を形成していることが示唆された (Watts *et al*, 1996; Tabuse *et al*, 1998; Hung & Kemphues, 1999)。その後、実際に Par-6 が aPKC と Par-3 それぞれと結合することが明らかとなり (Joberty *et al*, 2000; Lin *et al*, 2000)、Par-3-Par-6-aPKC による複合体 (以下、Par 複合体。図 1 参照) の形成様式がタンパク質ドメインレベルで理解された。さまざまな生物種において Par 複合体の局在パターンが検討された結果、線虫の初期胚と同様に、ショウジョウバエや哺乳類の上皮細胞 (Joberty *et al*, 2000; Yamanaka *et al*, 2001; Suzuki *et al*, 2001)、ショウジョウバエの神経幹細胞 (Wodarz *et al*, 2000; Petronczki & Knoblich, 2001)、ニューロン (Shi *et al*, 2003; Nishimura *et al*, 2004; Shi *et al*, 2004) などのさまざまな細胞種において、Par 複合体が非対称に分布することで細胞極性を形成していることが明らかになった。

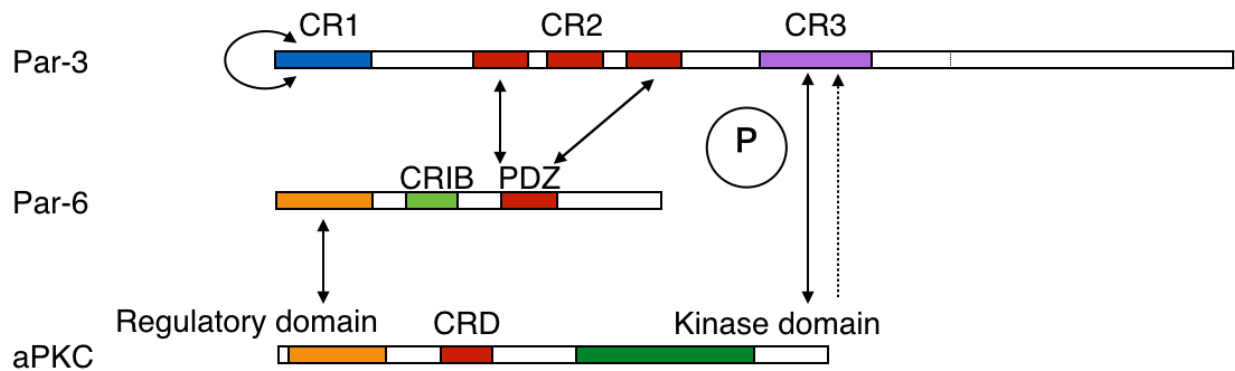


図 1. Par 複合体の構成因子の相互作用の概略図

各色の領域は保存されているドメイン構造を示しており、矢印は相互作用を持つドメインの関係性を示している。P はリン酸化を表す。

1.3. Par 複合体と相互抑制による極性の形成

Par 複合体がさまざまな細胞種で極性を形成することが明らかとなったことで、その形成メカニズムの解明に注目が集まった。線虫による *par* 遺伝子のスクリーニングの段階で、Par-2 変異体では全て前方の表現型、Par-3 変異体では全て後方の表現型が観察されたため、互いに排他的に働く 2 つの遺伝子グループが存在すると考えられていた (Kemphues *et al*, 1988)。その後、前部には aPKC、Par-3、Par-6 (Par 複合体) が、後部には Par-1、Par-2 のタンパク質が分布する二層が形成されていることが明らかになった (Etemad-Moghadam *et al*, 1995; Guo & Kemphues, 1995; Boyd *et al*, 1996)。その後、Par 複合体と Par-1 の相互抑制の分子メカニズムが理解されただけでなく、がん抑制因子 Lethal giant larve (Lgl) も Par 複合体と相互抑制を持つことも明らかになった (Motegi *et al*, 2011; Betschinger *et al*, 2003)。Par-1 および Lgl が Par 複合体と相互に抑制しあう分子機構の詳細を以下に述べる。また、その概略図を図 2 に示した。

1.3.1. Par 複合体と Par-1 の相互抑制

Par 複合体と Par-1 の相互抑制は、相手へのリン酸化による膜結合への阻害を互いに行うことで実現している (Goldstein & Macara, 2007)。Par 複合体中の aPKC は Par-1 が細胞膜に結合する際に用いる C 末端ドメイン内のスレオニン残基をリン酸化する (Matenia & Mandelkow, 2009; Motegi *et al*, 2011)。その結果、リン酸化された Par-1 は細胞質に分布し、リン酸化タンパク質の認識機能を持つ Par-5 (14-3-3 タンパク質の一種) によって認識され、細胞膜から解離する (Hurov *et al*, 2004; Suzuki *et al*, 2004; Motegi *et al*, 2011)。他方、Par-1 は Par 複合体の Par-3 をリン酸化することで、Par 複合体の細胞表層への分布を阻害する。Par 複合体の Par-3 が細胞膜へ結合するには自身の N 末端 Conserved Region 1 (CR1) ドメインを介した自己重合 (Feng *et al*, 2007; Li *et al*, 2010) と、C 末端領域における細胞膜構成成分との結合を用いており (Wu *et al*, 2007; Krahn *et al*, 2010b; McKinley *et al*, 2012; Yu & Harris, 2012)、いずれの反応も Par-1 からのリン酸化によって阻害される (Benton & St Johnston, 2003; Wu *et al*, 2007)。さらに、リン酸化 Par-3 は Par-5 と結合し、膜から解離する (Benton & St Johnston, 2003)。Par 複合体は膜に結合する Par 複合体中の Par-3 が足場となることで細胞表層に局在しているため、Par-1 による Par-3 排除機構の働きに伴って、Par-1 の局在領域から排除される。これらの aPKC による Par-1 排除機構、Par-1 による Par 複合体中の Par-3 排除機構の両者が働いた結果、Par 複合体と Par-1 は相補的な分布を持つようになる。非リン酸化 Par-1 アイソフォーム

の発現による aPKC の Par-1 排除機構の阻害や、kinase dead 型 Par-1 の発現による Par-1 の Par-3 排除機構の阻害、どちらの場合においても Par 複合体の非対称な分布は消失する (Doerflinger *et al*, 2010; Motegi *et al*, 2011)。

1.3.2. Par 複合体と Lgl の相互抑制

Par 複合体と Lgl の相互抑制は、(1) aPKC による Lgl のリン酸化、(2) Lgl による aPKC の酵素活性の制御の組み合わせによって実現している。Lgl による Par 複合体への抑制は、Par 複合体の aPKC の酵素活性を制御する事によって行われている。Lgl が aPKC-Par-6 と複合体を形成すると aPKC は酵素活性が阻害された「不活性化状態」になる。そのため、Lgl 結合型の aPKC は基質へのリン酸化を行わない。非リン酸化 Lgl アイソフォームの発現によって aPKC 活性の過剰な抑制は、Par 複合体の非対称な分布に異常を生じさせる (Hoege *et al*, 2010; Yamanaka *et al*, 2003; Hutterer *et al*, 2004; Yamanaka *et al*, 2006)。他方、Par 複合体による Lgl の抑制は膜結合への阻害によって行われる。Lgl は basic and hydrophobic (BH) モチーフを有しており、このモチーフを介して細胞膜のリン脂質と直接結合している (Bailey & Prehoda, 2015)。aPKC はこのモチーフ内のセリン残基をリン酸化することで、Lgl と細胞膜の結合を阻害して解離を促す (Betschinger *et al*, 2003; Yamanaka *et al*, 2003; Bailey & Prehoda, 2015)。その結果、aPKC を含む Par 複合体の局在する細胞膜から Lgl が解離する (Bailey & Prehoda, 2015)。in vivo の極性形成では、Cdc42 や Aurora-A の介入によって、aPKC が「活性化状態」へとスイッチし、Lgl の膜解離が促進されることが知られている (Yamanaka *et al*, 2003; Wirtz-Peitz *et al*, 2008)。

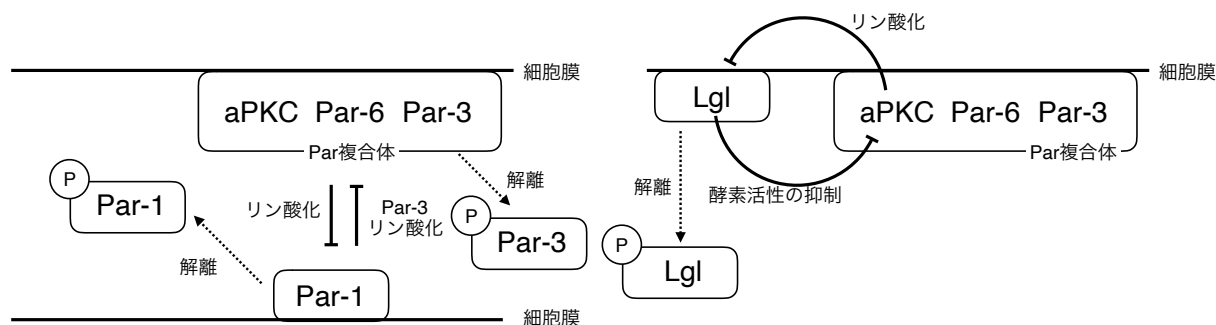


図 2. Par 複合体と抑制因子の相互抑制の概略図

(左) Par 複合体と Par-1、(右) Par 複合体と Lgl

1.4. 各細胞種における Par 極性形成のきっかけと生理的意義

Par 極性はさまざまな細胞種において形成されることから、前述のような形成メカニズムだけでなく、生理的な機能も各細胞種で詳細に研究されてきている。その結果 Par 複合体は相互作用を持つタンパク質を変化させることで、各細胞種に特異的な細胞機能を制御することが明らかとなった。さらに、Par 極性形成の根幹である「形成期の挙動」も細胞種によって大きく異なることが明らかになった。代表的な細胞種における Par 極性の詳細を以下に述べる。また、各細胞種における概要を図 3, 4, 5 に示し、表 1 では各種の特徴を比較した。

1.4.1. 線虫の初期胚における Par 極性形成

線虫の初期胚は、Par 複合体の前部への局在によって極性が形成されており、初期発生に重要な役割を果たしている (Goldstein & Macara, 2007)。この Par 極性は卵に貫入した精子が極性形成の「きっかけ」となり、その下流で二つのメカニズムを介して形成されている (図 3)。第一のメカニズムは初期胚の細胞表層において一方方向の流動が発生し、それに流されることで Par 複合体が前部

に局在するというものである。流動の発生には細胞表層に分布する F-アクチンとミオシンのネットワーク (以下、アクトミオシン) が関与している (Munro *et al*, 2004)。極性形成の前、アクトミオシンは細胞表層の全域に分布している。また、重合と脱重合を繰り返すことで収縮力を発生させる (Munro *et al*, 2004; Velarde *et al*, 2007; Levayer & Lecuit, 2012; Heisenberg & Bellaïche, 2013)。精子が貫入した後、アクトミオシンの収縮は精子由来の中心体によって局所的に阻害を受け、その結果として収縮が発生しない場 (極性形成後の後部にあたる) から収縮が発生する場 (極性形成後の後部にあたる) に向かう流動が生じるようになる (Schumacher *et al*, 1998; O'Connell *et al*, 2000; Hamill *et al*, 2002; Cowan & Hyman, 2004)。精子由来の中心体がアクトミオシンの収縮を阻害するメカニズムは長年明らかになってこなかったが、近年中心体近傍に局在する分裂期キナーゼである Aurora-A がシグナル伝達の実態であることが明らかになった (Klinkert *et al*, 2019; Zhao *et al*, 2019)。ミオシンの構成タンパク質 MLC-1 の変異体ではアクトミオシンの収縮の阻害がされ細胞表層の流動が消失する。しかしながら野生型の線虫よりも形成に時間を要するものの、MLC-1 変異体も Par 極性を形成できる (Goehring *et al*, 2011; Motegi *et al*, 2011)。これを可能にするのが、第二の Par 極性形成メカニズムである。この第二のメカニズムでは、細胞骨格タンパク質の微小管と、線虫でのみ保存されている *par* 遺伝子の一員である Par-2 が主要な役割を果たす。この Par-2 も Par-1 と同様に、aPKC からのリン酸化によって細胞膜から解離することが知られている。しかし、細胞後部に位置する精子由来の中心体を足場とする微小管が、Par-2 を aPKC のリン酸化から保護して膜からの解離を防ぐ。その結果、Par-2 は自身の RING ドメインを介して、細胞後部の細胞膜との安定した結合が可能になる。さらに、Par 複合体の排除機能を持つ Par-1 が Par-2 にリクルートされることで、Par 複合体は細胞の後部から排除され前部に局在する (Zonies *et al*, 2010; Motegi *et al*, 2011)。

Par 極性は第一卵割が終了するまで維持され、卵割後における娘細胞の運命決定のために働く (Kemphues, 2000)。この実現のため、Par 複合体は他の因子と協調して細胞質内の運命決定因子の分布と細胞の分裂位置を制御する (図 3)。運命決定因子の分布決定では、Par 複合体が間接的に細胞質に分布する mRNA 結合タンパク質 MEX-5 の分布を制御する。Par 極性の形成に伴って、細胞質内で均一に分布していた MEX-5 は後部に局在する Par-1 からリン酸化を受け、細胞後部に分布する MEX-5 特異的に動きやすい状態へと変化する (Tenlen *et al*, 2008; Griffin *et al*, 2011)。その結果 MEX-5 は細胞前部に集積して非対称な分布を持つようになる。MEX-5 の非対称な分布は、局所的なタンパク質分解、液液相分離によるタンパク質凝集などを引き起こし、運命決定因子である PIE-1 や P 顆粒を細胞質中で非対称に分布させる (Pellettieri *et al*, 2003; Nishi *et al*, 2008; Brangwynne *et al*, 2009; Saha *et al*, 2016)。

細胞分裂の位置決定は Par 極性が複数の酵素活性を介して、細胞表層の三量体 G タンパク質のシグナル伝達を制御することで行われている (Morin & Bellaïche, 2011)。ここではまず、Par 極性に従って casein kinase 1 (CSNK-1) が細胞前部に集積し、その後 PI(4)P5-kinase (PPK-1) も細胞後部に集積する。この PPK-1 の局在は、三量体 G タンパク質の活性を制御する GPR-1/2 を介して、GDP 結合型 $G\alpha$ の細胞後部への局在を促進する (Panbianco *et al*, 2008)。この GPR-1/2-GDP 結合型 $G\alpha$ 複合体は LIN-5 と複合体を形成することで、ダイニン-ダイナクチン複合体との相互作用が可能になり、紡錘体を引くことができる (Gotta *et al*, 2003; Srinivasan *et al*, 2003; Couwenbergs *et al*, 2007; Nguyen-Ngoc *et al*, 2007)。このメカニズムが働いた結果、細胞後部が紡錘体を引く力がより強くなるため、線虫初期胚の第一卵割は後部に寄った位置で発生する。このように、Par 極性は多様なタンパク質を制御することで、線虫初期胚の第一卵割で産生される娘細胞に非対称性を生じさせている。

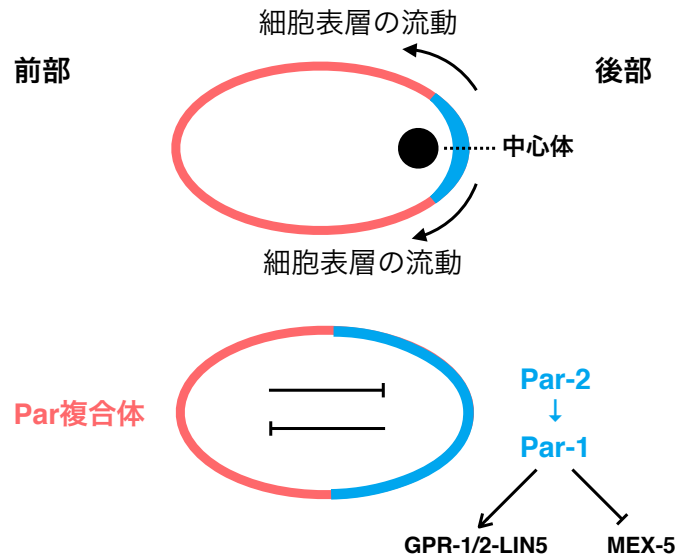


図 3. 線虫初期胚の Par 極性形成の概略図。

精子の貫入によって Par 極性の形成が開始する。前部に Par 複合体が、後部に Par-1 および Par-2 が局在し、紡錘体の位置や運命決定因子の局在を制御する。

1.4.2. 上皮細胞における Par 極性形成

上皮細胞は組織の外部と接する頂端側、隣接する細胞と接する基底側、頂端側と基底側の境界を決定する接着結合部位の三部位から構成されている (Lang & Munro, 2017)。上皮細胞の Par 極性の大きな特徴として、極性形成の初期では Par 複合体の構成因子すべてが共局在するが、Par 極性の形成が進行するにつれ、三因子の分布に乖離が見られる点が挙げられる (Suzuki & Ohno, 2006)。MDCK 細胞やショウジョウバエ胚盤胞を利用した解析の結果、上皮細胞の Par 極性の形成過程では、上皮細胞に特異的に発現している Crumb や、細胞間接着分子である E-カドヘリンとの相互作用が重要であることが明らかになっている (Suzuki & Ohno, 2006; Goldstein & Macara, 2007)。まず Par 極性の形成は、細胞表層において点状の E-カドヘリンとカテニンの集積した "Spot-like" Adherens junction (SAJ) が形成されることで開始する (Adams *et al*, 1996; Drees *et al*, 2005; Yamada *et al*, 2005)。その後、MDCK 細胞では SAJ からのリクルートによって (Ebnet *et al*, 2001; Itoh *et al*, 2001; Takekuni *et al*, 2003)、ショウジョウバエでは SAJ の形成と並行して (McGill *et al*, 2009)、細胞表層で点状に Par-3 が集積する。この Par-3 の集積はランドマークとして機能し、他の接着結合部位の構成因子や、Par-6-aPKC 複合体をリクルートする (Harris & Peifer, 2005; Horikoshi *et al*, 2009; McCaffrey & Macara, 2009; Achilleos *et al*, 2010; Franz & Riechmann, 2010; Krahn *et al*, 2010a; McKinley *et al*, 2012)。その後、低分子量 GTP アーゼ Cdc42 によって Par-6-aPKC 複合体のみが頂端側にリクルートされ (Hutterer *et al*, 2004; Martin-Belmonte *et al*, 2007)、それらが Crumb をリクルートすることで極性や細胞結合構造の形成を促進させる (Hurd *et al*, 2003; Lemmers *et al*, 2004; Segbert *et al*, 2004; Sotillos *et al*, 2004; Chalmers *et al*, 2005)。細胞質内の Par-3 は頂端側にアクセスすることも可能だが、aPKC からのリン酸化によって aPKC との結合能を下げられるため、頂端側から排除された状態が維持される (Morais-de-Sá *et al*, 2010; Walther & Pichaud, 2010; Tepass, 2012; Soriano *et al*, 2016)。その結果、Par-3 は細胞接着部位に安定して局在し、頂端側因子と共に細胞結合構造の形成を促進する (Chen & Macara, 2005)。また、これらの上皮細胞における Par 極性形成の概略図を図 4 に示した。

上皮細胞の Par 極性の役割は、主に細胞構造の形成に重要な役割を果たす。例えば、Par 極性の異常はマウス管状組織の内腔形成 (Hirose *et al*, 2006) や、Par-3 と PTEN の相互作用による細胞膜への PIP3 集積制御と微絨毛の産生 (Stein *et al*, 2005; Pinal *et al*, 2006)、シリアの形成 (Fan *et al*, 2004; Jaulin *et al*, 2007; Prulière *et al*, 2011) にも影響を与える。その他にも上皮細胞の Par 極性は、上皮構造を維持することで癌化した細胞の浸潤や転移を防いでいる。例えば、Par-3 変異体や、aPKC 非結合型 Par-3 の発現では頂端側における aPKC の局在が観察されなくなり、下流のシグナル経路に異常が生じてがん細胞の浸潤や転移を引き起こすことが知られている (Eder *et al*, 2005; Kojima *et al*, 2008)。

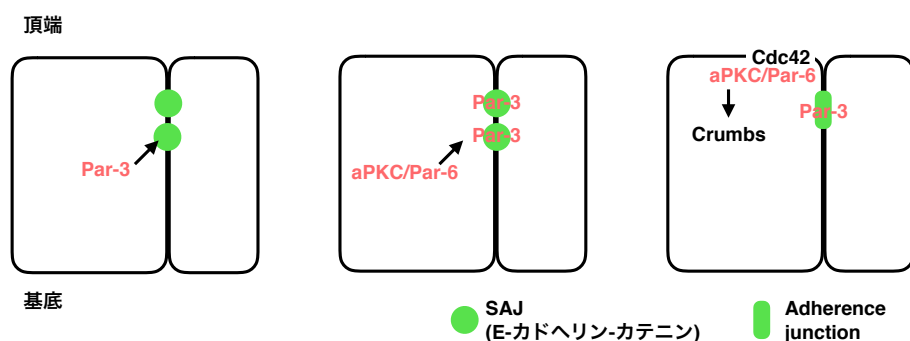


図 4. 上皮細胞の Par 極性形成の概略図。

細胞接着面に形成された SAJ に Par-3 がリクルートされることで極性が開始する。その後、aPKC-Par-6 も Par-3 にリクルートされるが、より頂端側へと移動する。Par-3 は Adherence junction に集積する。

1.4.3. ショウジョウバエ神経幹細胞における Par 極性形成

ショウジョウバエ神経幹細胞 (neuroblast, NB) は神経上皮細胞から離層することで形成される。ショウジョウバエ NB における Par 極性の形成様式の大きな特徴として、細胞周期ごとに極性の形成と崩壊を繰り返す点、その極性形成が細胞自律的である点が挙げられる。ショウジョウバエ NB は上皮細胞の Par 極性を受け継いだまま離層するため、離層直後の NB では頂端側に局在した細胞極性を形成している (Matsuzaki *et al*, 1998)。Par 極性は細胞分裂の終了時まで維持されるが、細胞分裂直後の NB において、Par 複合体は細胞表層を均一に覆った状態となり、細胞内で非対称な局在は検出されなくなる (Schober *et al*, 1999)。しかし、再び間期の後期になると Par 複合体は頂端側に局在して極性を形成する。興味深いことに、胚の NB を上皮細胞から単離して *in vitro* で培養した場合でも、Par 極性は形成され、その方向性はランダムになる (Broadus & Doe, 1997; Siegrist & Doe, 2006)。幼虫の NB では微小管からのシグナルによって Par 極性の方向が決定されているが (Rusan & Peifer, 2007; Januschke & Gonzalez, 2010; Januschke *et al*, 2013; Chen *et al*, 2016)、微小管を阻害してもランダムな方向に Par 極性が形成される (Januschke & Gonzalez, 2010)。これらの結果から、ショウジョウバエ NB における Par 極性形成は細胞自律的であると考えられている。近年、細胞分裂の分裂面が Par 極性の方向性決定に影響することも示されたが、その詳細なメカニズムは不明である (Loyer & Januschke, 2018)。

ショウジョウバエ NB は非対称細胞分裂を行っており、一度の細胞分裂で神経幹細胞と神経母細胞 Ganglion Mother Cell: GMC) の両者を産生する。非対称細胞分裂の実現のため、Par 極性は (1) 運命決定因子の分布、(2) 細胞分裂の方向のいずれをも制御する (図 5)。第一の役割である運命決定因子の分布決定では、複数の運命決定因子に対して aPKC がリン酸化を行うことが重要な役割を果たす。aPKC の第一の基質は、細胞膜や細胞質で均一に分布する Miranda (Mira) である (Ikeshima-Kataoka *et al*, 1997; Shen *et al*, 1997)。aPKC による Mira のリン酸化は、Mira の膜からの解離および

ミオシンVIによる基底側への輸送を促進する (Atwood & Prehoda, 2009; Petritsch *et al*, 2003)。Mira は Prospero (Pros) および Brat のアダプター因子であるため、Mira にリクルートされることで Pros および Brat も基底側に局在し、最終的に基底側の娘細胞のみに分配される。加えて、Mira は RNA 結合タンパク質 Staufen を介した Pros mRNA の基底側へのリクルートも行う (Knoblich, 2008)。aPKC の第二の基質である Partner of Numb (Pon) も、リン酸化を受けることによって基底側へ局在させられる (Smith *et al*, 2007; Wang *et al*, 2007; Wirtz-Peitz *et al*, 2008)。その結果、Pon のリクルートによって Numb が基底側へと局在して、基底側の娘細胞のみに分配される。これらの運命決定因子の分布制御を分裂期とリンクさせるため、ショウジョウバエ神経幹細胞における aPKC の酵素活性は分裂期キナーゼ Aurora-A によって、分裂期特異的に活性化される。その結果、分裂期において Pon および Numb が基質側へ局在させられている。ただし、Mira は Aurora-A 変異体でも正常な局在を示すことから、Par 複合体は基質ごとに異なるシステムを利用して運命決定因子の分布を制御する可能性も示唆されている (Wirtz-Peitz *et al*, 2008)。

第二の分裂方向の決定では、アダプタータンパク質である Inscuteable (Insc) を介して、Par 複合体が Pins を頂端側へリクルートする。Pins は線虫の GPR-1/2 のホモログで、ショウジョウバエ NB では二種類のメカニズムを介して紡錘体と相互作用を持つ (Yu *et al*, 2000; Parmentier *et al*, 2000; Johnston *et al*, 2009)。第一の経路は、Pins による Ga および Mud (線虫の LIN-5 ホモログ) を介したもので、Mud 変異体では分裂軸の方向がランダムになることが知られている (Izumi *et al*, 2006)。しかしながら、線虫の LIN-5 と異なり Mud とダイニン-ダイナクチンの相互作用の詳細は未解明である (Siller & Doe, 2009; Kiyomitsu, 2019)。第二の経路では、Pins が Discs-large (Dlg) をリクルートすることによって、微小管に分布するキネシン Kinesin-73 (Khc-73) を介した紡錘体との相互作用が可能になっている。上記のように、線虫初期胚とショウジョウバエ NB のいずれにおいても、Par 複合体は Pins/GPR-1/2 や Mud/LIN-5 と協調しているが、その局在関係や紡錘体制御の様式は大きく異なる。

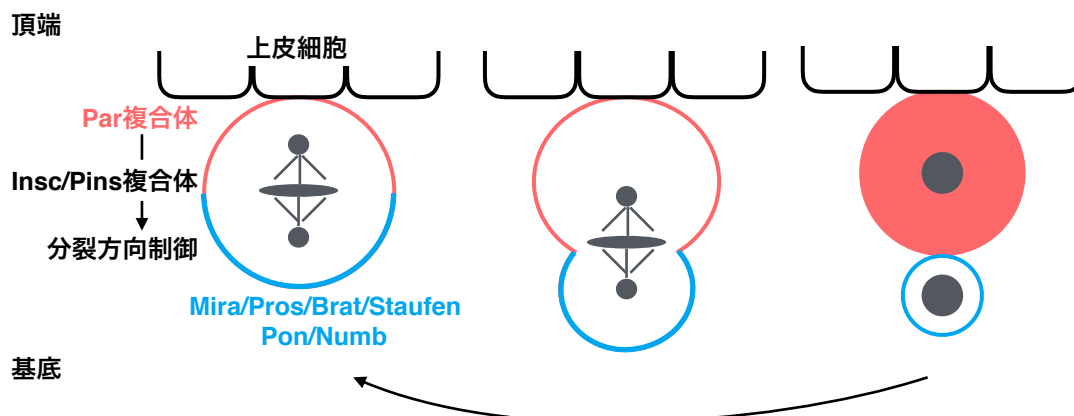


図 5. ショウジョウバエ NB の Par 極性形成の概要図

Par 複合体は、間期の後期に頂端側へ局在して極性を形成する。Par 極性は、運命決定因子の局在と分裂方向を制御する。分裂後、Par 極性は崩壊するが、分裂期に入ると再度形成される。

表 1. 各細胞種の Par 極性形成の特徴

	極性形成のきっかけ	共役する細胞機能	相互作用するタンパク質
線虫の初期胚	精子の貫入	紡錘体の位置制御 運命決定因子の局在	LIN-5/GPR-1/2 MEX-5
上皮細胞	SAJによるリクルート	上皮構造の維持	E-カドヘリン Crumbs
ショウジョウバエ NB	微小管 細胞分裂の分裂面	運命決定因子の局在 分裂方向の制御	Mira/Pros/Brat、Numb/Pon Pins 複合体/Insc

1.5. 本研究の目的

様々な細胞種の Par 極性形成について研究が進んだ結果、Par 複合体は多様な細胞で極性形成の主要因子として働いている一方で、Par 複合体の非対称な分布を誘導する因子や、Par 複合体がその下流で制御する細胞機能メカニズムなどは細胞種によって全く異なることが明らかになった。しかしながら、従来知られているような細胞機能との共役を持たない状態において、Par 複合体が自律的に極性を形成する過程の詳細は明らかになっていない。Par 複合体と細胞機能との共役を持たない状況において、細胞極性の形成プロセスで Par 複合体のダイナミクスを詳細に観察することは、細胞自律的な Par 極性の形成メカニズムについて本質的な理解を深めることにも貢献できると考えられる。

そこで本研究では、接着性を持たない浮遊性の培養細胞である Schneider 2 細胞 (S2 細胞、ショウジョウバエ中胚葉由来) (Schneider, 1972) を利用して、細胞自律的な Par 極性を再構成し、その極性形成プロセスにおいて Par 複合体がどのような構造を持ちながら極性を形成するのか、その過程を明らかにすることを目指した。これまでにも、培養細胞をモデルとした細胞極性の再構成は試みられてきた。Baas らはヒト結腸上皮由来の培養細胞では LKB-1 (哺乳類 Par-4 ホモログ) の mRNA 量が低下しているが、その培養細胞で LKB-1 を過剰発現させると、その一部では上皮細胞の極性に特有な構造が復活することを示した (Baas *et al*, 2004)。Johnston らは、接着因子 Echnoid の強制発現によって複数の培養細胞を人為的に結合させ、その結合領域に aPKC をリクルートすることで非自律的な Par 極性の再構成に成功している (Johnston *et al*, 2009)。しかしながら、これまでには細胞自律的な Par 極性の再構成は行われておらず、その形成プロセスも観察されていない (Baas *et al*, 2004; Johnston *et al*, 2009)。

再構成に向けた条件検討の結果、S2 細胞では Par-3 の過剰発現によって細胞自律的に Par 極性が形成されることを見出し、その過程では Par 複合体の重合によって複数種の構造が形成され、最終的には Par-island と呼ばれる内部構造を持った構造体が形成されることを示した。また、この構造体は *in vivo* にも存在しうる構造であることが示唆された。本論文では、Par 極性とはどのような構造によって形成されているのか、また、それらの構造の形成メカニズムについて議論する。

2. 対象と手法

2.1. 細胞の培養法

S2細胞 (Invitrogen: R69007) の培養および遺伝子導入は、Ogawaらの方法に準じた(Ogawa *et al*, 2009)。Schneider's *Drosophila* medium (gibco) に、10% FBS (Vitromex) および1% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (ナカライテスク) を加えた培地を用い、25°Cで培養した。また、3-4日ごとに1/10~1/20に希釈することによってS2細胞を境内した。

遺伝子導入は、6-well plateの各wellに、1.6mLのメディウムと 1×10^6 個の細胞の播種を行い1晩培養することによって細胞数の調整を行った。そこにEffectene (QIAGEN) のプロトコルに従って、遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、2日静置し、免疫染色およびウエスタンブロッティングによる解析を行った。*Metallothionein* (MT) プロモーターの発現誘導では、100mM CuSO_4 を最終濃度1mMになるように培養メディウムに添加した。

2.2. 細胞のライブイメージング

35mmガラスボトムディッシュに、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Poly-L-オルニチンを加え37°Cで1時間インキュベートすることでコーティングした。そこにS2細胞を添加し、25°Cで30分以上静置した後に観察を行った。観察および撮影は共焦点スキャナユニットYokogawa CSU-W1 (Yokogawa, Tokyo, Japan)、sCMOSカメラ (Andor, Belfast, Northern Ireland) と解析用ソフトウェアMetamorph NEO (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて行った。z方向の間隔は1 μm もしくは0.5 μm に設定した。

2.3. 免疫染色法

S2細胞の免疫染色では、まず22x24 カバーガラスを15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Poly-L-オルニチンを30分間静置によってコートした。Poly-L-オルニチンによってコートしたカバーガラスを、6-well dishの底にセットした。PBSによって2回洗浄したあと、遺伝子導入したS2細胞を添加し、30分静置することによってS2細胞をカバーガラスにマウントした。その後、4% paraformaldehyde/PBSによる15分の固定処理を行い、PBSで1回洗浄した。0.1% Triton-X/PBSによる15分の透過処理を行い、PBSで1回洗浄した。2% BSA/PBSによる30分のブロッキングを行ったあと、2% BSA/PBSで希釈した一次抗体溶液と30分間反応させた。その後、PBSで1度洗浄したあと、PBS中での10分間静置を2度繰り返し再度洗浄した。その後、2% BSA/PBSで希釈した二次抗体溶液と30分間反応させた。その後の洗浄は、一次抗体反応後の操作と同様に行った。免疫染色した細胞はPermaFluor (Thermo Fisher Scientific)によって封入し、共焦点顕微鏡LSM510 (Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察した。S2細胞の超解像顕微鏡による観察では、免疫染色した細胞はProLong Glass Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) で封入した。またこれらの処理は全て室温で行った。

ショウジョウバエNBの免疫染色では、まず3令幼虫から脳組織を取り出し、4% paraformaldehyde/PBS による20分の固定処理を室温で行った。室温で1時間のブロッキング処理のあと、一次抗体溶液と一晩4°Cで反応させ、二次抗体溶液とは室温で2時間反応させた。その後、サンプルはVectashield H-1000 (Vector Laboratories) によって封入し、共焦点顕微鏡FV1000 (Olympus, 東京、日本) で観察した。ショウジョウバエはy, w, Baz-GFP系統 (Bloomington *Drosophila* Stock Center, BDSC: 51572; FLYB: FBtc0099880) のものを用いた。使用した抗体は末尾の抗体リストに示した。

2.4. 超解像による撮影とその解析

時空間蛍光相関解析 (SRRF法: super-resolution radial fluctuations) では、*pMT-myc-Par-3-mKate2*、*pAct-Par-6-GFP*、*pAct-aPKC*をS2細胞に遺伝子導入した。その後、LSM880 (Zeiss)、対物レンズ Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27 (Zeiss) を使用し、ピクセルサイズ 53nm、露出時間は 160ms に設定し1細胞を200回撮影した。Drift-correction処理およびSRRF処理はImageJプラグインのNanoJ-SRRF(Gustafsson *et al*, 2016)を利用した。

SRRF処理をした画像では、メッシュワーク構造内部におけるPar-3の輪郭線の長さを手動で計測した。ソフトウェアはFijiを利用した。Par-3の輪郭の形状を明確にするため、各細胞の画像にSobel filterを利用することでメッシュワークの輪郭線を強調した画像を生成した。ヒストグラムおよび密度関数分布は、全ての細胞の輪郭線の長さから求めた。密度関数分布の形状は、7つのガウス関数の合計とよくフィットしており、全ピークの間隔の期待値はフィッティング結果における各分布の重みを考慮し、分布のピーク間の長さ (interval) と合計分布への寄与度 (weight) の積を合計することで求めた。このフィッティングはRを用いて非線形最小二乗法によって行った。密度関数分布を二回微分した結果のスペクトル密度の計算は、Rを用いて高速フーリエ変換を行った。

誘導放出抑制顕微鏡 (STED: Stimulated emission depletion) による観察では、*pMT-myc-Par-3-GFP*、*pAct-Par-6*、*pAct-aPKC*の組み合わせ、もしくは*pMT-myc-Par-3*、*pAct-Par-6-GFP*、*pAct-aPKC*の組み合わせの発現ベクターをS2細胞に遺伝子導入した。その2日後、CuSO₄添加を行い、添加から8時間後に細胞を固定した。STED撮影には TCS SP8 STED 3X microscope (Leica, Wetzlar, Germany) と対物レンズ HC PL APO 93X/1.30 GLYC (Leica) を利用した。デコンボリューション処理では Huygens Professional (version 17.10, Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands) を利用した。

デコンボリューション処理をしたSTED画像を利用して、Par-3のセグメントの長ささと太さの計測を行った。セグメントの長さとしては、Par-3の輪郭線の終端、角、分岐点の最短長を定義した。また、セグメントの測定はFijiによって手動で行った。セグメントの太さは、Par-3のセグメントと直行する線分の蛍光強度分布について、フィッティングしたガウス分布の半値幅として定義した。このフィッティングはRを用いて非線形最小二乗法によって行った。

2.5. 非対称度の定量

Asymmetry Index (ASI) の計算は、細胞の赤道面の画像で定量を行った。まず、0.5 μm 幅の線で細胞表層部分を手動でなぞり、線上の蛍光強度をFijiによって計測した。次に、細胞全周の長さ (2L) および、細胞の半周 (L) 上における蛍光強度シグナルの合計値 (A) をそれぞれ計算した。両者の蛍光強度の差から、もう一つの半周の蛍光強度シグナルの合計値 (B) を計算した。シグナルの合計値AおよびBの差を求め、細胞全周の蛍光強度の合計によって標準化した。細胞表層上のいずれかのピクセル (1ピクセル=0.108 μm) を開始点とした全パターンでこの計算を行い、その最大値をASIとして定義した。ASI値が0.35よりも高い細胞を「極性を持つ細胞」と定義した。各実験におけるASI値のヒストグラムは、それぞれ独立に二回実験しており、その結果を合算してヒストグラムを求めた。極性化した細胞の割合について、その統計解析はフィッシャーの正確確率検定を利用し、ボンフェローニ法で補正することで行った。統計解析にはR言語を利用した。

2.6. 細胞膜の曲率の定量

細胞の曲率半径の計算は、細胞の赤道面の画像を用いて行った。細胞膜は、memGFPのシグナルによって定義した。Par-island領域の1区間は、myc-Par-3-mKate2が1 μm 以上連続して局在している区間として定義した。non-neighboring領域の1区間は、Par-islandが観察される細胞において、Par-island領域から5 μm 以上離れている5 μm 以上の領域として定義した。non-island領域の1区間は、

Par-islandが観察されない細胞の細胞膜における5 μ m以内の領域として定義した。Par-islandが観察されない細胞では、1細胞に対して5~6領域の数値を取得した。曲率半径の計算では、領域の端点および中央点を手動で決定した。この3点を通る円を計算し、曲率を示す数値としてその円の半径を採用した。画像の計測ではFijiを利用した。データの計算と統計解析ではR言語を使用した。

2.7. Par 複合体の凝集体サイズの定量

細胞の底面の画像を解析に利用した。Fijiを利用し、Par複合体の凝集体の周縁部を手動でなぞり、着目領域 (ROI: region of interest) とした。各ROIの面積を測定し、Par複合体の凝集体のサイズとして示した (図24)。細胞の周縁部に接している凝集体は測定に使用しなかった。

2.8. ウェスタンブロッティング

S2細胞の抽出液を回収し、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis を行った後、一次抗体溶液に一晩、二次抗体溶液に1時間反応させた。タンパク質量の解析は、Chemi-Lumi One L (Nacalai tesque, 京都、日本) による化学発光法を利用し、定量にはLAS-3000システム (Fujifilm, 東京、日本) を用いた。Par-3のタンパク質量の定量において、異なる遺伝子導入システム間の比較や、過剰発現量と内在性の比較を行う場合には、その遺伝子導入効率による補正を行っている。遺伝子導入効率は、ライブイメージング画像による蛍光タンパク質が発現している細胞数と発現していない細胞数に基づいて計算した。使用した抗体は、末尾の抗体リストに示した。

2.9. RNA 干渉法によるノックダウン

S2細胞の遺伝子ノックダウンは、RNA長鎖 (dsRNAs) によるRNA干渉法 (RNAi) によって行った。dsRNAsの作成はBettencourt-Diasらの方法に準じた(Bettencourt-Dias & Goshima, 2009)。Par-6もしくはaPKCのノックダウンでは、MEGAscript T7 Transcription Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific) によってdsRNAを合成した。dsRNA合成時のテンプレートには、pBS-T7/Par-6/T7 (Par-6のORF全長の両側にT7プロモーター配列を持つコンストラクト)、もしくはpBS-T7/aPKC/T7 (aPKCのORF全長の両側にT7プロモーター配列を持つコンストラクト) を利用した。LglもしくはPar-3のノックダウンでは、LglのORF、Par-3のORFの一部 (906-1226a.a.) の両側にT7プロモーター配列を持つPCR増幅物を生成し、PCR増幅物のアニーリングによってdsRNAを合成した。テンプレートにはpUAS-Flag-Lgl、もしくはpUAS-myc-Par-3を利用した。それぞれのPCRプライマー配列は以下の通りである。

Lgl:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGATGGCAATAGGGACGCAAACAGGGGCTTTAAAAGTT-3'、

および

5'-TAATACGACTCACTATAGGGTTAAAATTGGCTTTCTTCAGGCGCTGTTTTTGGCGTTCCAA-3'

Par-3:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGTGAATCCATCAGGGAGAAGG-3' および

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCTCGGCCACCTTAGAGTCAC-3'

Par-3のノックダウン用のdsRNA配列は、DRSCのRNAiデータベースを参照した (DRSC25558)(Mohr *et al.*, 2015)。dsRNAは最終濃度が4.5 μ g/mlになるように培養メディウムに添加した。添加は発現ベクターの導入から2-3時間後に行った。

2.10. プラスミドのコンストラクション

actin (act5c) プロモーターによる発現ベクターのコンストラクションでは、Par-6、Par-3、aPKCそれぞれのORF、もしくは、Par-6、aPKC、Fynミリストイル化タグ (5'-ATGGGCTGTGT-GCAATGTAAGGATAAAGAAGCAACAAAACACTGACG-3') のC末端にGFPを接合した配列を、*pAc5.1/V5-His B*プラスミド (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) にインサートした。*pAct-Gal4xUAS* システムによる発現ベクターのコンストラクションでは、Par-3のORFのN末端側にMycもしくはFlagタグ、C末端側にmKate2を接合した配列を、もしくは、Lgl3AのN末端側にFlagタグを接合した配列を、*pUAST* プラスミド (Brand & Perrimon, 1993) にインサートした。また、ショウジョウバエ*gal4* のORFを*pAC-Gal4* プラスミドからサブクローニングし、*pDAMCS* プラスミドへインサートした。*DAMCS* プロモーターによる発現ベクターのコンストラクションでは、*pAct5C0* プラスミド (Thummel *et al*, 1988) の*BglII-XhoI* フラグメント (*actin 5C* プロモーター配列、ポリアデニル化配列、*hsp70* プロモーターの一部を含む) を*pUC19* プラスミドの*BamHI* 認識サイトと*SalI* 認識サイトの間にインサートした。その結果、複数のクローニングサイトを含んだ二重鎖オリゴヌクレオチドが *actin 5C* プロモーターとポリアデニル化配列の間に位置する*BamHI* 認識サイトにインサートされるコンストラクトになっている。

発現誘導システムで利用したPar-3の発現コンストラクトは、Par-3 ORFのN末端側にMycタグ、C末端側にmKate2もしくはGFPを接合した配列を*pMT* プラスミドにインサートした (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)。

RNAi無効アイソフォームのPar-3は、アミノ酸置換を伴わない配列変位を、Par-3 ORFのdsRNA標的配列 (906-1226a.a.) に加えることで設計した。設計したDNA配列は以下の通りで、変位箇所には下線を引いた。

```
5'-TGAAAGCATTAGAGAAAAAGACGGCGAGATGTTGTTGATTATAAATG-  
AATAITGGATCGCCCTTGGGCTTGACCGCCCTGCCCGATAAAGAACACGGAGGCGGTTTGCTGGT  
CCAGCACGTTCGAACCCGGAAGTCGCGCAGAAAGGGGCGCTTGCGCCGCGACGACCGCATTCT  
CGAAATTAACGGCATTAAATTGATCGGCCTGACGGAGAGCCAAGTCCAGGAACAGTTGCGCCG  
CGCCCTGGAGTCCAGCGAACTGAGGGTGCGGGTCTCCGCGGCGACCGCAACCGCCGCCAGCA  
ACGCGATTCCAAAGTCGCTGA-3'.
```

変異配列を含んだDNAフラグメント (GeneArt, Thermo Fisher Scientificにて作成) は、PCRによって増幅し、Par-3WT-GFPもしくはPar-3ΔCR1-GFPの対応配列と置換し、In-Fusionシステムを利用して*pMT* プラスミドにインサートした。

pAC-GAL4 は Liqun Luo 研究室より分与された (Addgene plasmid #24344; <http://n2t.net/addgene:24344>; RRID: Addgene_24344; (Potter *et al*, 2010))。 *pUbq-Spd2-GFP* は Jordan Raff 研究室 (University of Oxford, UK) より分与された。

遺伝導入に使用するプラスミドの精製は、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) もしくは、NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel, Düren, Germany) によって行った。

2.11. 使用抗体

使用した抗体とその詳細について、表2に示した。

表2. 本研究で使用した抗体の一覧

	供給元	製品番号	希釈率	宿主動物
Rabbit anti-aPKC	Santa Cruz	Santa_Cruz:sc-216	IHC (1:1000) WB (1:3000)	Rabbit poly
Mouse anti-Par-3	(Ohshiro <i>et al</i> , 2000)		IHC (1:100)	Mouse mono
Rabbit anti-Par-3	(Ohshiro <i>et al</i> , 2000)		IHC (1:1000) WB (1:3000)	Rabbit poly
Rabbit anti-Par-6	(Izumi <i>et al</i> , 2004)		IHC (1:1000)	Rabbit poly
Chicken anti-Myc	Bethyl	Bethyl:A190-103A	IHC (1:1000)	Chicken poly
Mouse anti-Miranda	(Ohshiro <i>et al</i> , 2000)		IHC (1:100)	Mouse mono
Rabbit anti-Lgl	(Ohshiro <i>et al</i> , 2000)		IHC (1:1000) WB (1:1000)	Rabbit poly
Guinea pig anti-Cdc42	Ulrich Tepass (University of Tronto)		IHC (1:100)	Guinea pig poly
Chicken anti-GFP	aves	aves:GFP-1020	IHC (1:1000)	Chicken poly
Mouse anti-GFP	chemicon	chemicon:MA B3580	IHC (1:1000)	Mouse mono
Rabbit anti-GFP	MBL	MBL:598	IHC for Larva brain (1:1000) WB (1:2000)	Rabbit poly
Mouse anti-Flag	Sigma	Sigma:F3165	IHC (1:1000)	Mouse mono
Alexa 488, Cyanin3, Cyanin5 secondaries	Jackson Immuno Research		IHC for S2 cells (1:4000) IHC for Larva brain (1:200)	Donkey poly
anti-alpha tubulin	sigma	Sigma:T9026	WB (1:15000)	Rat mono
horseradish peroxidase (HRP) 結合型マウス抗体	GE-Healthcare		WB (1:3000)	Sheep poly
HRP結合型ウサギ抗体	GE-Healthcare		WB (1:3000)	Sheep poly
HRP結合型ニワトリ抗体	GE-Healthcare	SA1-300	WB (1:250)	Donkey poly

3. 結果

3.1. S2 細胞における Par 極性の再構成

3.1.1. S2 細胞は Par-3 の過剰発現によって Par 極性を持つ

本研究では、細胞極性の形成におけるタンパク質の一般的な性質の理解を目指し、培養細胞で Par 極性の再構成に取り組んだ。細胞モデルとして利用した S2 細胞は接着性を持っておらず、さらに Par 複合体の構成因子が内在的に発現しているが Par 極性を持っていない培養細胞である (図 6A)。Par 極性の再構成の最初のステップとして、Par 複合体の構成因子の過剰発現が内在性の Par 複合体の分布に与える影響を検討するため、各因子を *actin* プロモーターの Gal4-UAS システム (*pAct-Gal4xUAS* システム) によって過剰発現させ、細胞の赤道面上の Par 複合体成分の分布を免疫染色で観察した (図 6B)。その結果、myc-Par-3 を過剰発現させると、myc-Par-3 は細胞表層に分布し、中には、細胞表層の一部に局在し、いわゆるクレッセント状に分布する細胞が出現した。これらの細胞では、内在性の Par-6 および aPKC も過剰発現した myc-Par-3 と共局在していた。他方、aPKC や Par-6 を *pAct-Gal4xUAS* システムで過剰発現させても、クレッセント状の分布は観察されなかった。このことから、Par 複合体構成成分のうち Par-3 を過剰に発現させた時のみ、内在性の Par-6 および aPKC を取り込んで、Par 複合体が細胞表層に形成されることが示唆された。

S2 細胞で Par 複合体による極性が人為的に形成され得ることが判明したので、次にライブイメージングを行う条件を探索した。*actin* プロモーターに直接 Par-3 を繋いで発現させた場合、その発現量は *pAct-Gal4xUAS* システムを用いて発現量を増幅した場合に比べて格段に低い (図 6C)。*actin* プロモーターに直接 Par-6-GFP を繋いで発現させると、Par-6-GFP は細胞質に分布することがライブ観察で確認された。同じ条件下で Par-6-GFP の発現させるのと同時に、*pAct-Gal4xUAS* システムで Par-3 を過剰発現させると、Par-6-GFP がクレッセント状に分布する細胞が現れたのに対し (図 6D)、同様に *pAct-Gal4xUAS* システムで aPKC を過剰発現させても Par-6-GFP は細胞質に分布したままであった。この結果から、遺伝子導入によって *actin* プロモーターによる Par-6-GFP の発現を行えば、Par-6-GFP を指標に、*pAct-Gal4xUAS* システムによる Par-3 の過剰発現時のクレッセント形成をライブで観察できることが判明した。また、Par-3 を *actin* プロモーターに直接繋いで発現させても、Par-6-GFP の細胞質分布に影響が見られなかった。*actin* プロモーターに直接 Par-3 を繋いで発現させると、*pAct-Gal4xUAS* システムによって発現量を増幅させた場合よりも発現量が低い点を踏まえると、S2 細胞で Par 極性の形成を誘導するには、*actin* プロモーターによる Par-3 の発現量では不足していることが示された。

一方、内在性の Par-6 と aPKC が Par 極性の形成に必要なかを検討するため、Par-6-GFP をマーカーとして、Par-3 過剰発現下で内在性の aPKC をノックダウンしたところ、Par-6-GFP は細胞質に分布し、Par 極性は形成されなかった (図 6E)。aPKC-GFP をマーカーとして、内在性 Par-6 をノックダウンした場合でも同様の結果が得られた。これらの結果は、S2 細胞において Par 因子により極性を形成するには、Par 複合体の構成因子すべてが必要であることを示している。

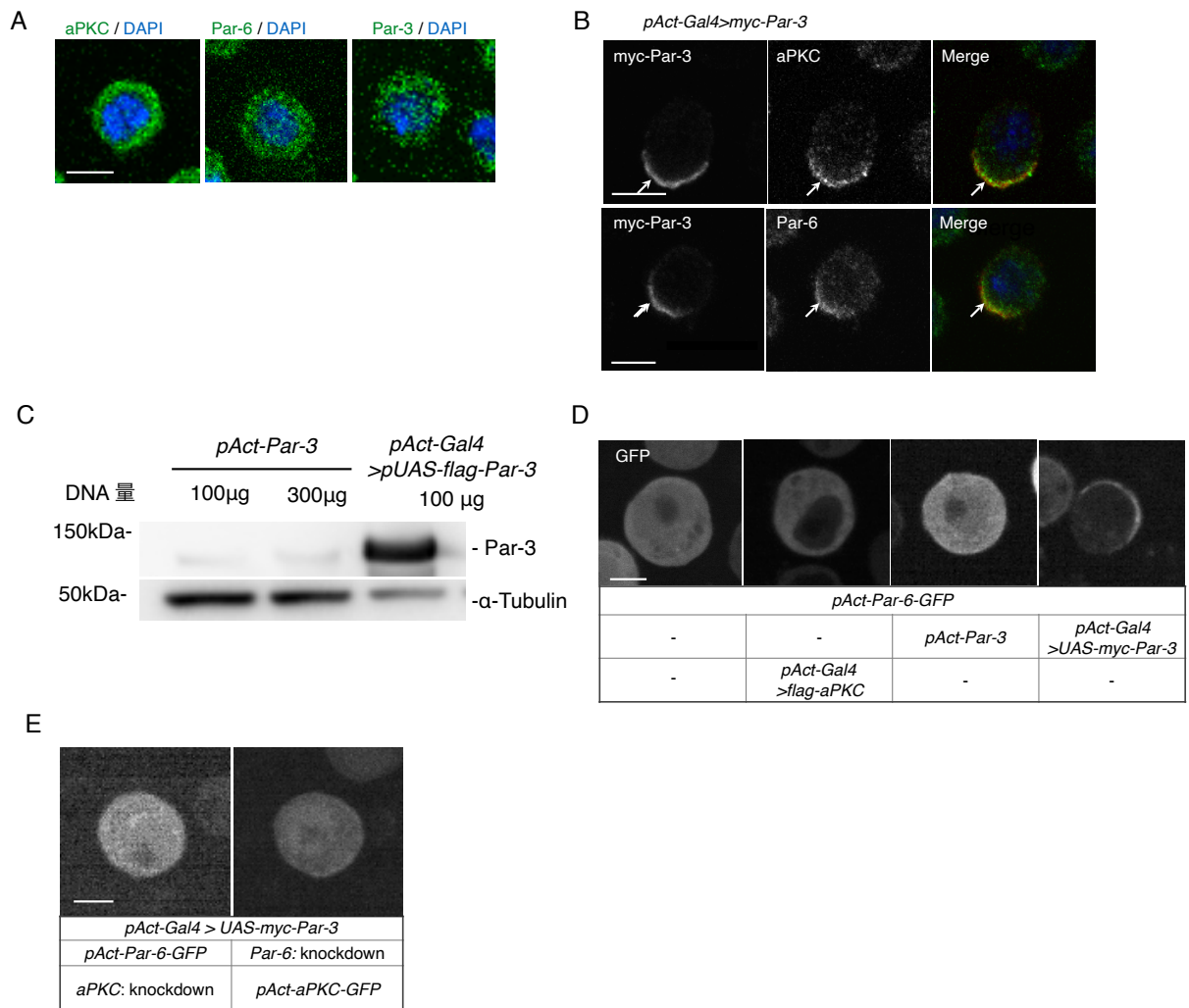


図 6. Par-3 の過剰発現によって S2 細胞は極性を形成する

(A) S2 細胞において内在性に発現している aPKC、Par-6、Par-3 の免疫染色写真。pUAST ベクターの遺伝子導入から 2 日後に固定染色を行った。(B) myc-Par-3 を過剰発現させた細胞における内在性の aPKC、Par-6 の局在。myc-Par-3 の遺伝子導入から 2 日後、細胞の固定および myc タグ抗体、aPKC 抗体、Par-6 抗体による抗体染色を行った。矢印は共局在している Par 複合体の構成因子を示す。(C) *pAct-Gal4xUAS* システムの両者を利用した場合の Par-3-GFP の発現量比較。*pAct-Par-3-GFP* (100μg および 300μg/10⁶ 細胞) もしくは *pAct-Gal4* と *pUAS-Par-3-GFP* の遺伝子導入から 2 日後にウエスタンブロットティングを行った。Par-3 抗体を用いたブロットティングによって、異なる発現システムによる Par-3 の発現量比較を行った。(D) S2 細胞における Par-6-GFP のライブイメージング画像 (上)。下の表に従った組み合わせでプラスミドを遺伝子導入し、2 日後に観察を行った。(E) Par-3 の過剰発現を行った細胞において、aPKC ノックダウン条件下の Par-6-GFP (左) および Par-6 ノックダウン条件下の aPKC-GFP (右) のライブイメージング画像。遺伝子導入から 2 日後に撮影を行った。

A-D の画像はすべて細胞の赤道面において撮影されている。スケールバーは 5μm を示す。

3.1.2. Par 複合体の非対称な分布に関する評価指標の構築

S2 細胞で Par 極性を再構成できる条件を見つけることができたが、遺伝子導入した細胞の Par 複合体の分布の偏りは細胞ごとに異なっていた。そこで、Par 複合体の分布の偏り度合いを数値化するため、赤道面の細胞表層における蛍光タンパク質分布の偏在度の定量的な指標 *asymmetry index* (ASI) を導入した (図 7A)。この指標を定義するにあたり、Derivery らが SOP 細胞において微小管分布の非対称性を定量した手法を参考にした (Derivery *et al*, 2015)。まず、均一な分布における ASI 値を検討するため、S2 細胞に *pAct-membrane-GFP* を遺伝子導入することで memGFP を過剰発現させ ASI を計測したところ、ASI は 0.17 ± 0.08 (平均値 \pm s.d.) を示し、その最大値は 0.35 だった (図 7B)。memGFP は細胞膜上で積極的に偏在する能力はないと考えられるので、原理的には ASI は 0 を示すと考えられる。しかし、実際は 0~0.35 の数値が観測された。これは mem-GFP の分布のゆらぎや、細胞上にランダムに分布する突起構造の存在が影響したためだと考えられる。この結果から、極性を持たない細胞でも 0.35 未満の ASI を持ちうることが予想された。この結果に基づき、ASI > 0.35 を示す細胞を「極性細胞」、それ以外の細胞を「非極性細胞」と定義することとした。この定義に基づき、myc-Par-3-mKate2 を過剰発現させた細胞群で分布の偏在度を検討した結果、ASI は 0.34 ± 0.18 (平均値 \pm s.d.) を示しており、39% の細胞が ASI > 0.35 の「極性細胞」に分類された (図 7B)。

3.1.3. S2 細胞の Par 極性形成における Lgl の役割の検討

ショウジョウバエ神経幹細胞や線虫の初期胚といった主要な *in vivo* のモデルにおいて、aPKC および基質の Lgl の相互抑制が Par 極性に必須であることが確認されている。そこで、Par 極性の再構成系においても、Lgl と Par 複合体の相互抑制が極性形成と関与するかを検討した。S2 細胞において、Lgl は内在性の発現を持ち細胞表層および細胞質に均一に分布していた (図 8A)。しかし、Par-3 の過剰発現によって Par-3 が細胞表層で偏った分布を持つ場合、Lgl は Par-3 と相補的な分布を示した (図 8B)。さらに、内在性の Lgl をノックダウンさせると、myc-Par-3-mKate2 の過剰発現を行っても Par 複合体の構成因子は細胞表層で均一に分布し、極性は形成されなかった (図 8C-E)。この結果から、S2 細胞の Par 極性には内在性の Lgl が必須であることが必須であることが考えられた。

aPKC と Lgl の相互抑制では、aPKC による Lgl のリン酸化が重要な役割を果たす。そこで、*pAct-Gal4xUAS* システムによって、Par-3 と非リン酸化型 flag-Lgl3A を過剰発現させ、Par 複合体の分布を検討した。その結果、flag-Lgl3A と Par-3 が過剰発現している細胞では、Par-3 が細胞質で均一に分布し、極性は形成されなかった (図 8E)。この結果から、S2 細胞の Par 極性形成には内在性の Lgl と特に aPKC の相互抑制が重要な役割を果たすことが示唆された。

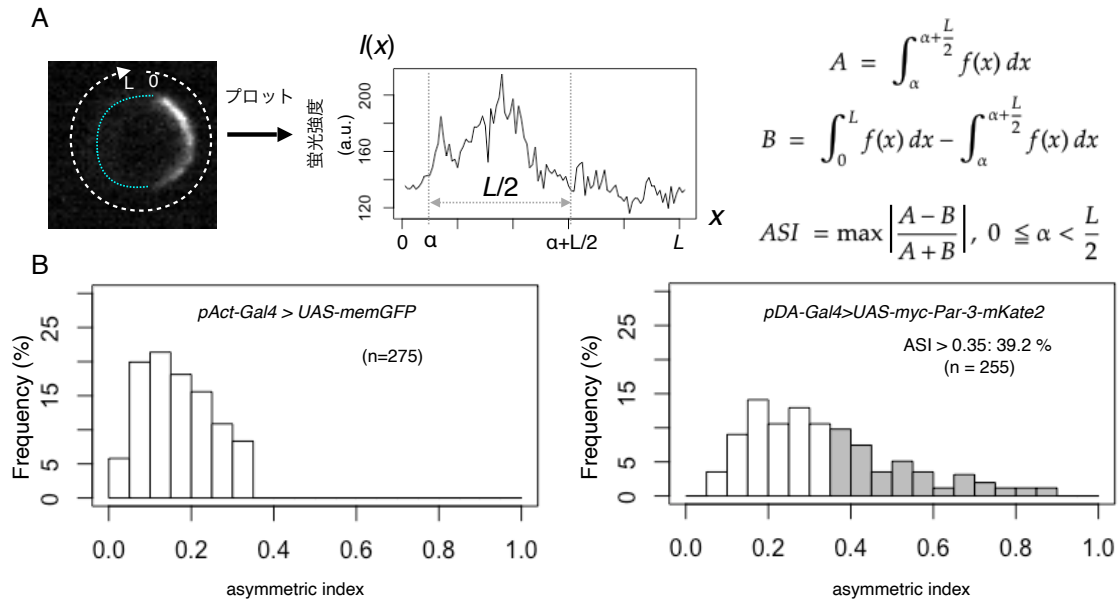


図 7. 細胞極性の定量

(A) 本研究で利用した細胞極性の指標 asymmetry index (ASI) の定義。細胞赤道面の表層について、任意の半周と残りの半周それぞれの蛍光強度の累積値を求め、その差を算出した。半周の開始点を移動させていき、蛍光強度の差が最大になる点 ASI として利用した。また、値は全周の蛍光強度の累積値で標準化した。(B) memGFP もしくは myc-Par-3-mKate2 を過剰発現させた S2 細胞群における ASI の分布。各プラスミドは *pAct-Gal4xUAS* システムを利用して過剰発現させた。memGFP を過剰発現させた細胞群における ASI 値はすべて 0.35 以下を示し、平均値 0.17 ± 0.08 (s.d.) を示す。Par-3-mKate2 が細胞表層に分布する細胞群における ASI 値の平均値は 0.34 ± 0.18 (s.d.) を示した。memGFP の結果に基づき、Par-3-mKate2 の分布は (1) memGFP と同じく ASI 値が 0.35 以下である非極性の細胞 (白色バー、60.8%)、(2) memGFP より高い ASI 値 (ASI>0.35) を示す細胞 (灰色バー、39.2%)、の二グループに分類した。(2) のグループに含まれる細胞群は平均値 0.52 ± 0.14 (s.d.) を示した。

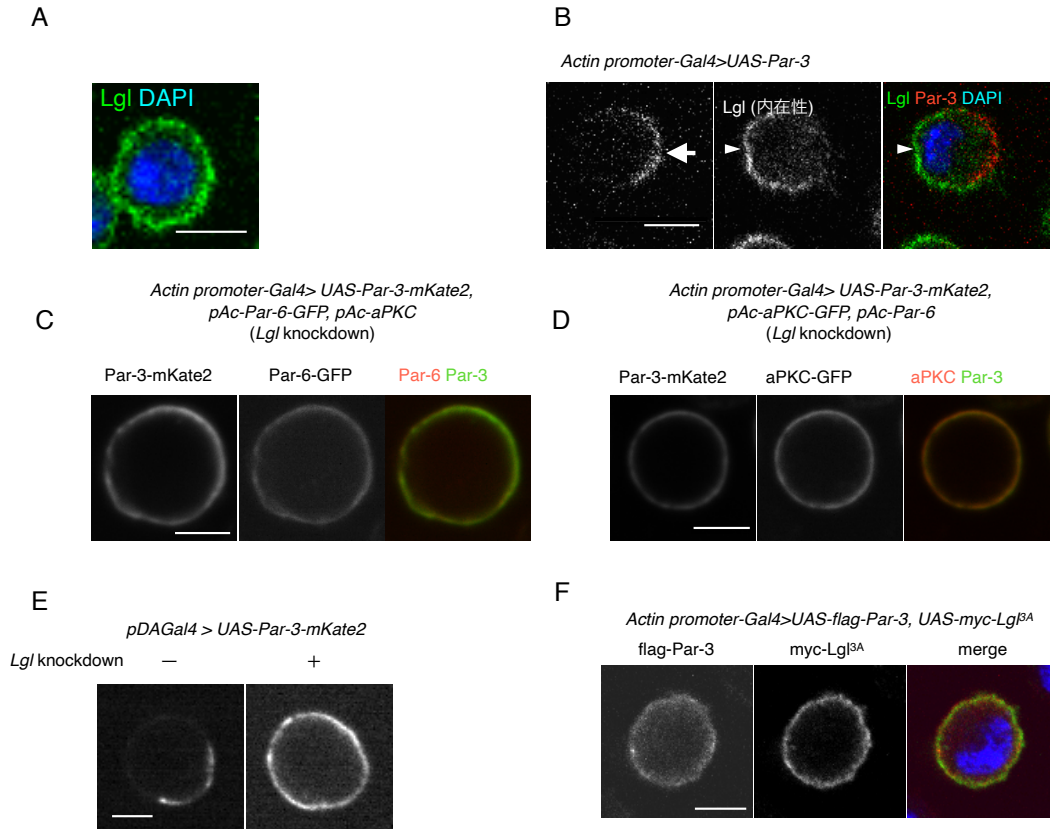


図 8. S2 細胞の Par 極性は Lgl を必要とする

(A) S2 細胞における内在性の Lgl の免疫染色写真。 *pUAST* ベクターの遺伝子導入から 2 日後に固定し、Lgl 抗体による染色をおこなった。(B) Par-3 と内在性の Lgl は相補的に分布した (71%, n=24)。過剰発現によって Par-3 が過剰発現している細胞に限定して Par-3 と Lgl の分布を観察した。矢印は Par-3、矢頭は Lgl、それぞれのクレッセント状の分布を示す。(C) RNAi による Lgl ノックダウン条件下における myc-Par-3-mKate2 および Par-6-GFP のライブイメージング画像。myc-Par-3-mKate2 は細胞表層で均一に分布し、Par-6-GFP との共局在は 100% の細胞で観察された (n=109)。遺伝子導入から 2 日後に撮影。(D) RNAi による Lgl ノックダウン条件下における myc-Par-3-mKate2 および aPKC-GFP のライブイメージング画像。myc-Par-3-mKate2 は細胞表層で均一に分布し、aPKC-GFP との共局在は 97.8% の細胞で観察された (n=137)。遺伝子導入から 2 日後に撮影。(E) 内在性 Lgl 発現下 (左) もしくは RNAi による Lgl ノックダウン条件下 (右) における myc-Par-3-mKate2 のライブイメージング。遺伝子導入から 2 日後に撮影。(F) flag-Par-3 および myc-Lgl^{BA} の過剰発現を行った S2 細胞において、flag タグ抗体および myc タグ抗体による免疫染色像。Lgl^{BA} は細胞表層で均一に、Par-3 は細胞質に分布していた。遺伝子導入から 2 日後に撮影。

A-F の画像はすべて遺伝子導入から 2 日後に固定、もしくはライブイメージング撮影を行っており、細胞の赤道面を撮影した。スケールバーは 5μm を示す。

3.1.4. S2 細胞の Par 極性の 3 次元観察による Par-island の発見

ここまで、S2 細胞における Par 極性の形成メカニズムについて、細胞の赤道面に限定した 2 次元観察のみで検討してきた。そこで、S2 細胞に Par-3 を過剰発現させ、3 次元タイムラプスで Par 複合体の動態を観察した。その結果、興味深いことに Par 複合体のクレセント状の分布の内部で Par-3-mKate2 は均一に分布しておらず、凝集体となって集合する様子が明らかとなった (図 9A)。さらに、この Par-3-mKate2 の凝集体はその位置関係やサイズを常に変化させながらダイナミックに動き続ける特徴を示した。私は、その形状的な特徴から凝集体を「Par-island」と名付けた。この Par-island は、従来の *in vivo* モデルを利用した研究では報告されていない構造体である。しかしながら、典型的な Par 極性のモデルであるショウジョウバエ神経幹細胞の Par 複合体の局在領域を免疫染色によって観察すると、内在性の Par-3 が Par-island と類似した凝集体を形成していた (図 9B)。この結果は、本研究で発見された Par-island が人工的な実験系によって発生した構造ではなく、*in vivo* にも存在する構造体であることを強く示唆している。

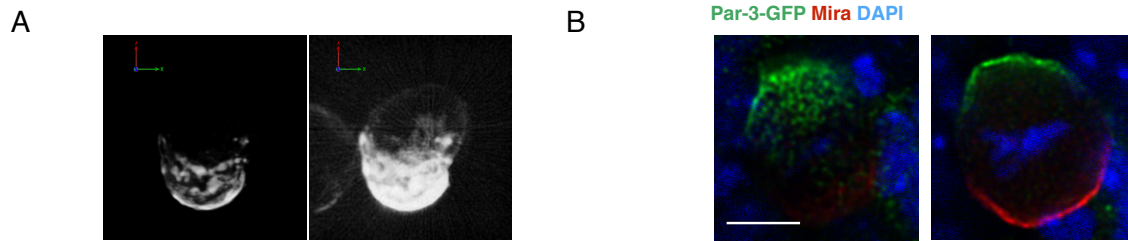


図 9. S2 細胞における Par 極性の三次元像および *in vivo* との比較

(A) myc-Par-3-mKate2 を過剰発現させた細胞のライブイメージングを行い、画像の三次元再構成を行った (左)。右パネルの画像では、左パネルの画像に対して、明暗およびコントラストを調整し、細胞の形状を可視化させている。(B) Par-3-GFP を発現しているショウジョウバエ脳の神経幹細胞の免疫染色画像。三令幼虫から脳組織解剖し、GFP 抗体 (緑) および Miranda 抗体 (赤, Ikeshima-Kataoka *et al*, 1997) による抗体染色を行った。撮影画像に対してデコンボリューション処理を行っている。この神経幹細胞は分裂期に入っているため Par 極性を形成している。視野に対して斜め方向に Par 極性が形成されている。Par 複合体が局在している頂端側の焦点面 (左)、細胞の赤道面の焦点面 (右) それぞれの画像を示した。スケールバーは 5 μ m を示す。

3.2. 人工的な Par 極性における極性形成過程

3.2.1. Par-island の形成および集合プロセスの観察システムの構築

S2 細胞を利用した Par 極性の再構成によって、新規の Par 複合体の凝集体である「Par-island」と呼ぶ構造体を同定し、この構造体が *in vivo* の Par 極性にも存在する可能性を見出すことができた。この Par-island の形成や集合のプロセスを明らかにすることは、Par 極性の一般的な性質の理解に大きく貢献できると考えられる。しかしながら、これまで利用していた *pAct-Gal4xUAS* システムによる一過性の Par-3 の過剰発現では発現開始のタイミングが制御できないため、それらのプロセスを一貫して観察することが困難だった。そこで私は、金属との結合によって誘導される *Metallothionein* プロモーター (*MT* プロモーター) を利用し、*myc-Par-3-mKate2* (*pMT-myc-Par-3-mKate2*) の発現開始タイミングを人為的に制御できる実験系を構築した。

しかし、*myc-Par-3-mKate2* のみをタイムラプスイメージングに用いた場合、*mKate2* の発色団形成に時間を要するため、Par-island の形成に至る過程、とりわけその初期過程を経時的に記録することが困難であることが判明した。そこで、Par-6-GFP を Par-3 の誘導以前から恒常的に発現させておき、Par 複合体のマーカーとして用いることを考えた。ただし、この場合、Par-6-aPKC 複合体は、Par-3 あるいは Cdc42 のいずれかと排他的に結合することが知られている (Rodriguez *et al.*, 2017) ため、Cdc42 と複合体を形成した Par-6-GFP を区別する必要がある。この区別が可能であるかどうかを検討するため、*myc-Par-3-mKate2* の発現誘導後に免疫染色を行い、Par-6-GFP、*myc-Par-3-mKate2* および内在性の Cdc42 の分布を観察した (図 10)。その結果、内在性の Cdc42 は細胞表層で斑点状に分布しており、S2 細胞でも先行研究と同様の分布パターンを示すことが判明した (Slaughter *et al.*, 2013; Sartorel *et al.*, 2018)。しかし、Par-6-GFP との共局在はほとんど観察されず、一部の Cdc42 が Par-6-GFP の凝集の周縁部に接しているのみだった。一方、*myc-Par-3-mKate2* は、その大部分が Par-6-GFP と共局在していた。これらの結果から、*MT* プロモーターを用いた Par-island の形成過程を細胞表層の Par-6-GFP を指標として観察することは妥当であると判断した。

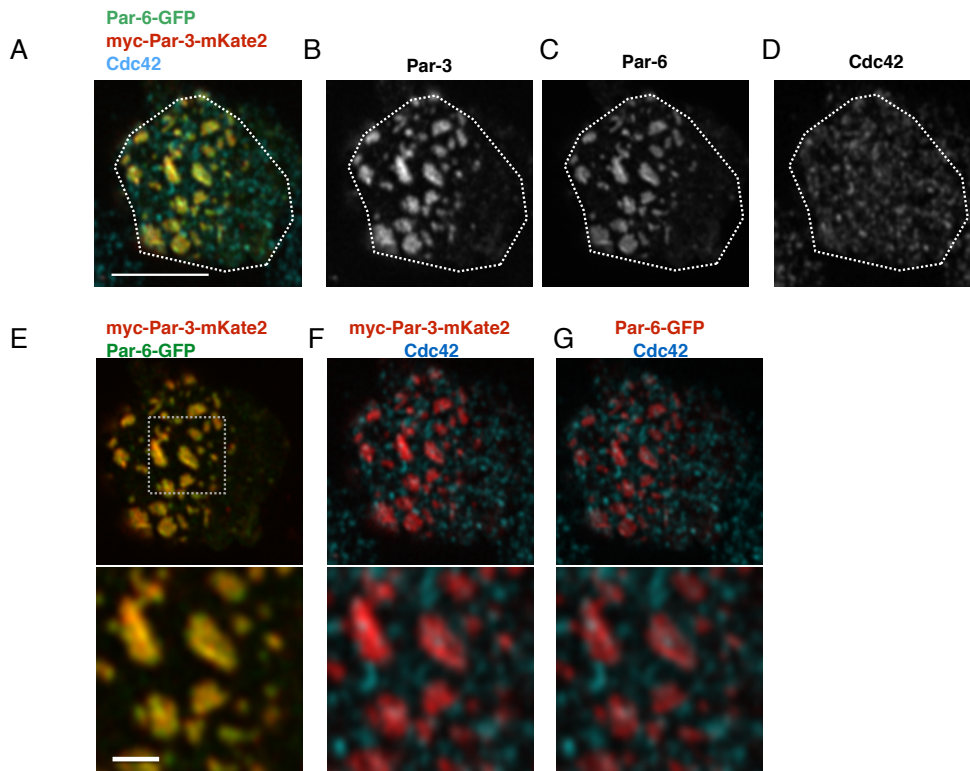


図 10. S2 細胞における Par-3、Par-6、Cdc42 の分布

(A-D) myc-Par-3-mKate2 および Par-6-GFP が発現している S2 細胞における、myc タグ抗体、GFP 抗体、Cdc42 抗体の免疫染色画像。S2 細胞には *pAct-Par-6-GFP*、*pAct-aPKC*、*pMT-myc-Par-3-mKate2* を遺伝子導入し、2 日後、CuSO₄ の添加によって myc-Par-3-mKate2 の発現を誘導した。CuSO₄ の添加から 3 時間後、細胞の固定および抗体染色を行っている。A. myc-Par-3-mKate2、Par-6-GFP、Cdc42 の三重染色写真。B-D. 各抗体の単色写真。A-D のいずれの写真も細胞表層面を撮影したもの。スケールバーは 5μm を示す。(E-G) E-G. A-D で示した画像の二重染色画像。E. myc-Par-3-mKate2 (赤) と Par-6-GFP (緑)。F. myc-Par-3-mKate2 (赤) と Cdc42 (青)。G. Par-6-GFP (赤) と Cdc42 (青)。上段パネルの点線部分について、拡大した図を下段に示した。スケールバーは 1μm を示す。

3.2.2. Par-island の形成および集合プロセスの経時的変化

MTプロモーターによる Par-3 発現誘導システムを利用して、Par-6-GFP によって Par-island の形成や集合の過程のタイムラプス観察を行った。このとき、*pAc-Par-6-GFP* および *pAc-aPKC* を *pMT-myc-Par-3-mKate2* と同時に S2 細胞へ遺伝子導入した。観察では、Par-6 や aPKC の発現量上昇の Par-island への影響を排除するため、Par-6-GFP および aPKC の発現量が定常状態となった S2 細胞を利用する必要があった。*actin* プロモーターによって過剰発現させた Par-6-GFP の蛍光量を測定すると、遺伝子導入から 2 日後には数値が安定しており、その発現は定常状態に達していた (図 11)。同じく *actin* プロモーターで発現させている aPKC の発現量も同様の状態であると推測されたため、*myc-Par-3-mKate2* の発現誘導およびタイムラプス観察は、遺伝子導入から 2 日後に開始した。また、MTプロモーターによる *myc-Par-3-mKate2* の発現量は、CuSO₄ 添加から 8 時間後にほぼ定常状態となり、このときの Par-3 の発現量は内在性の 20 倍の高さを示していた (図 12)。

硫酸銅の添加による Par-3 の発現誘導から 2-3.5 時間が経過した頃、それまで細胞質に分布していた Par-6-GFP は細胞表層に出現し、0.5 μm 程度の点状の凝集体 (Par-dot) を形成した (図 13A 3:30, 図 13B 1:45)。デコンボリューション処理を行って Par-dot を個別に観察した結果、Par-dot は内部に空洞などを持たない構造を持ち、また複数の Par-dot の結合や、結合を伴わない巨大化などの挙動を示していた (図 13C)。また興味深いことに、Par-dot の形成は細胞表層の一部から開始しており、その後、Par-dot の結合や巨大化と並行してその分布するエリアも拡大していった (図 13D)。Par-3 の発現誘導から 3.5 時間程度が経過すると、点状の Par-dot だけでなく楕円状の凝集体も観察され、デコンボリューション処理によって内部構造を持たず 0.5~1.0 μm 程度のヒモ状の構造であることが示された (図 13E)。また、デコンボリューション処理を行った画像では、それらのヒモが複数連なったようなコの字型の構造も頻繁に観察された (図 13E)。2 種類の異なる構造が混在した状態に観察されたものの、Par-dot がヒモ状の構造へと変化していくプロセスは観察されず、Par-dots の集合によってヒモ状構造が形成されたかは不明である。また、ヒモ状構造は細切れに分裂することなく、その構造を維持したまま細胞表層を移動していく様子が観察され、分裂する様子は観察されなかった。さらに時間が経過し、Par-3 の発現誘導から 2.5-6 時間が経過する頃には、複数のヒモ状の構造やコの字型の構造が結合し、不定形の構造体 Par-island へと成長した (図 13A 4:30, 図 13B 2:30)。Par-islands の形成過程でヒモ状の構造が結合する様子が観察された点や、Par-islands は不定形であるものの常に多角形の形状を示していたことから、Par-islands はヒモ構造が組み合わさったような構造を持つことが示唆された。また、Par-island は非常に動的な性質を持っており、近傍の Par-dot や Par-island との凝集だけでなく、Par-island 内部の分裂、Par-island 自身の変形など、Par-dot やヒモ状構造では観察されなかった振る舞いも示していた (図 13F)。Par-island が形成された細胞においても、ヒモ状構造や Par-dot は引き続き観察されたことから、Par-island はその形成過程で見られた Par-dot やヒモ状構造の集合によって形成された構造体であることが考えられた。さらに、Par-island からヒモ状構造が解離していく様子や、反対にヒモ状構造が Par-island へと結合する様子が観察された。この結果から、Par-island は点状あるいはヒモ状の構造が集合することで形成されており、それらの内部構造が個別に動くことで Par-islands の集合・分散・変形といったダイナミクスが発生していることが推測された。

Par-dot やヒモ状構造の集合によって形成された Par-island は集合・分散・変形といったダイナミクスを保ったまま、細胞の一部に集合するか (図 13A 5:30)、細胞表層の全体に分散する (図 13B 6:30) いずれかのパターンを示した。一連の極性形成プロセスの結果から、細胞自律的な Par 極性形成では、Par 複合体がまず点状やヒモ状に凝集し、それらが集合することでより大きな凝集体で

ある Par-island を形成する、というように重合のプロセスを段階的に経ていることが明らかになった (図 13F)。

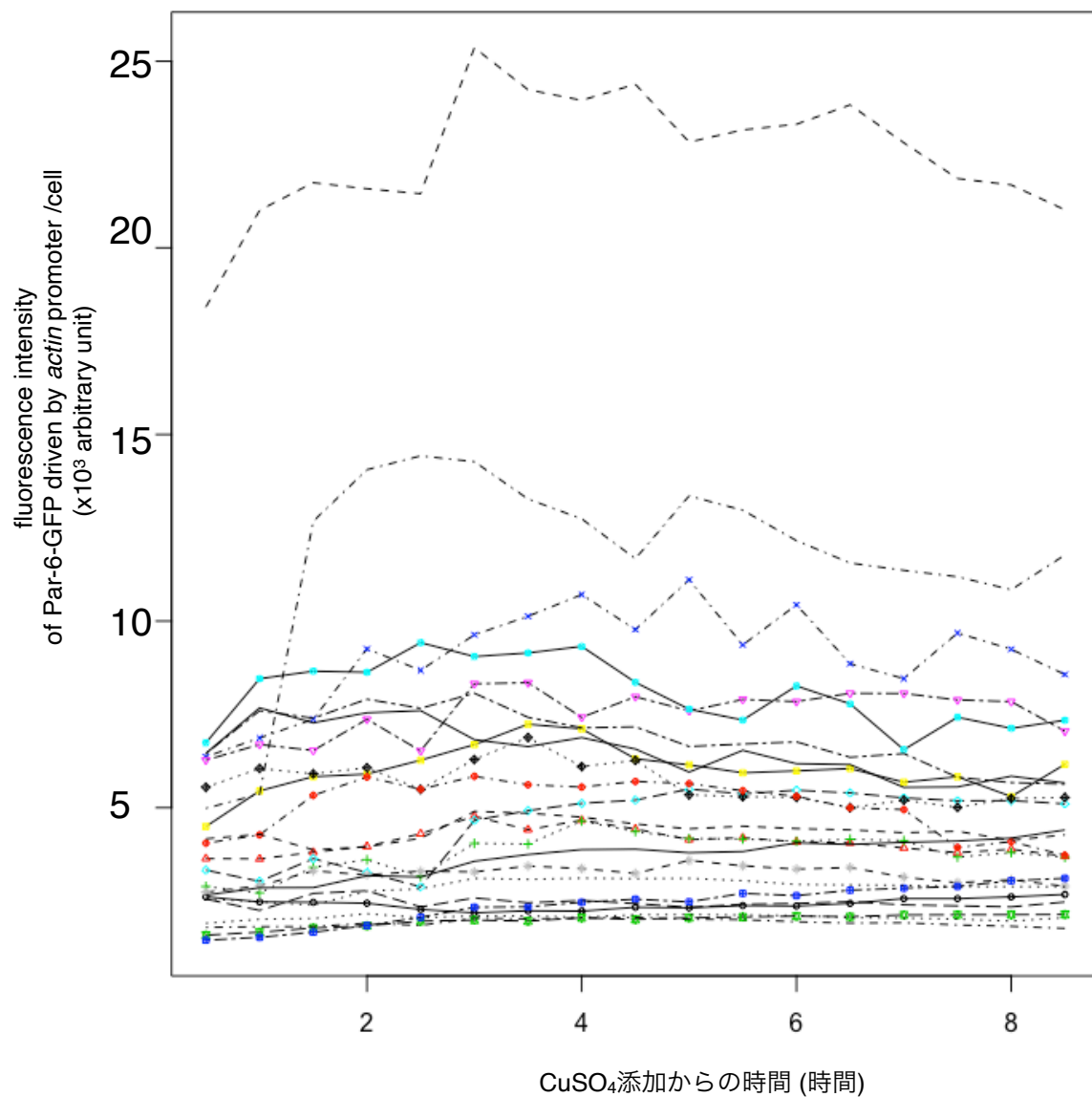


図 11. Par-6 発現量の時系列変化

pAct-Par-6-GFP, *pMT-myc-Par-3-GFP* を遺伝子導入した S2 細胞における Par-6-GFP の蛍光シグナルの時系列変化。Par-6-GFP の蛍光シグナルは、遺伝子導入の 2 日後、Par-3-mKate2 の発現誘導開始し、30 分おきに計測した。また、計測には 23 細胞を使用した。myc-Par-3mKate2 の発現誘導を開始しても、Par-6 の発現量にはほぼ変化がなかった。

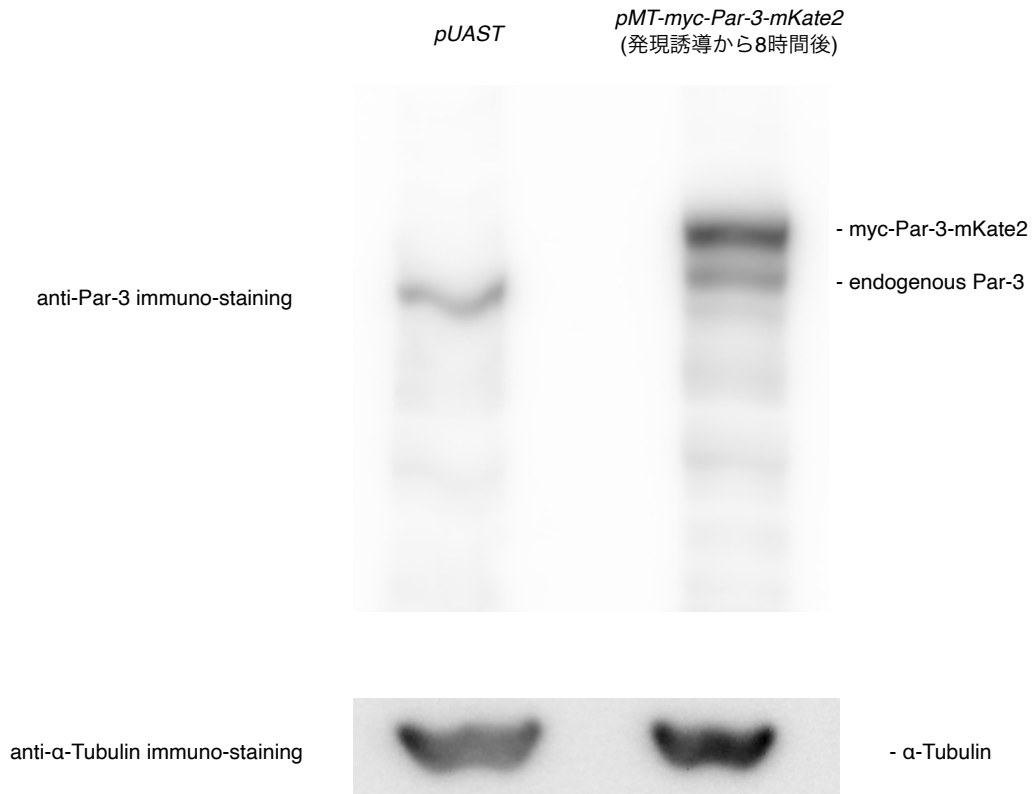


図 12. 内在性の Par-3 発現量と遺伝子導入による Par-3 発現量の比較

MT プロモーターで発現誘導した Par-3 と、内在性の Par-3 の発現量との比較をウエスタンブロッティングで行った。S2細胞は *pMT-myc-Par-3-mKate2* を遺伝子導入した2日後に CuSO_4 添加による *myc-Par-3-mKate2* の発現誘導を行い、添加から 8 時間後にウエスタンブロッティングを行った。(右レーン) *MT* プロモーターによって過剰発現させた *myc-Par-3-mKate2*、(左レーン) 空ベクター *pUAST* を遺伝子導入したコントロール。

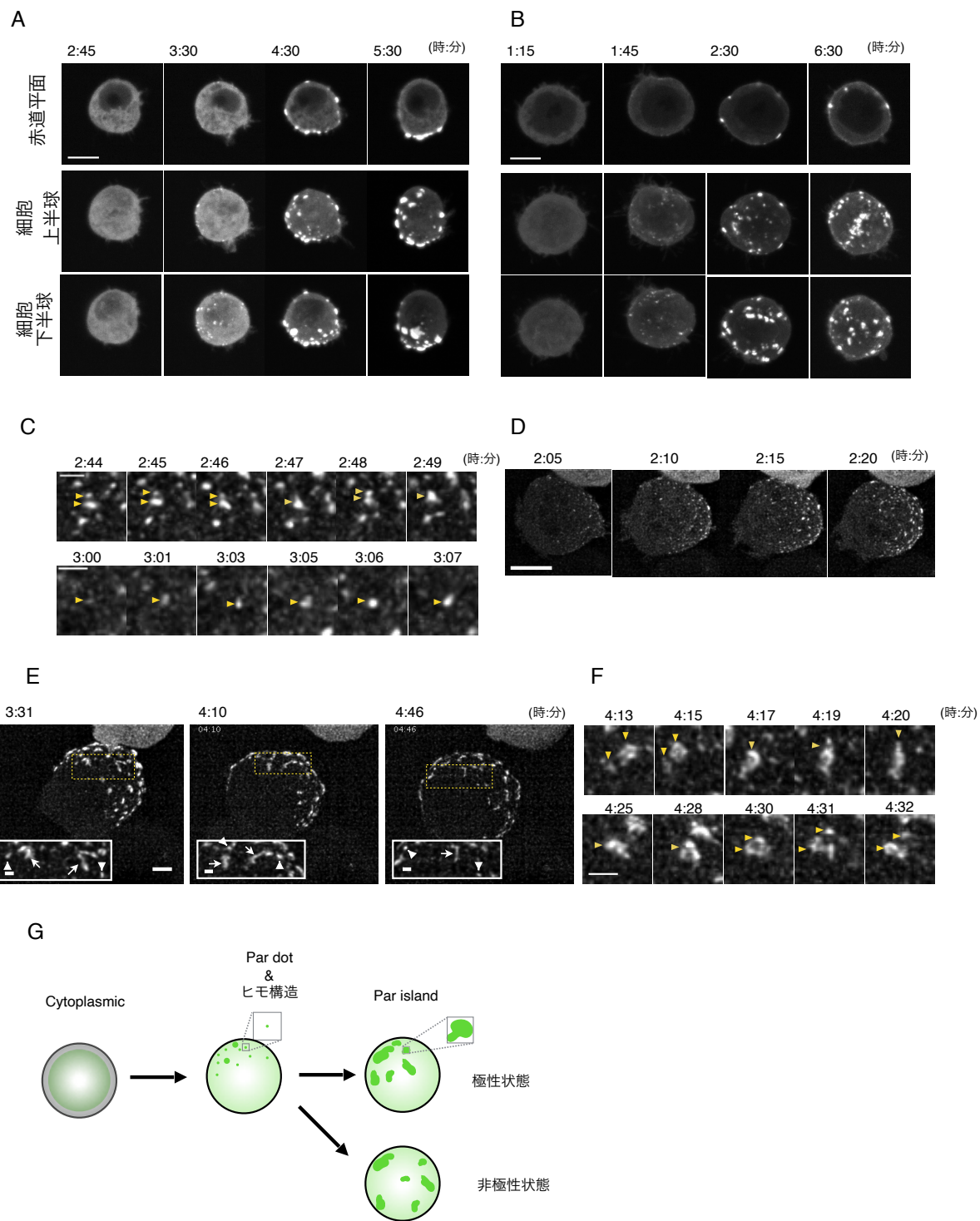


図 13. Par 複合体が集合するまでの時系列変化

図 13. Par 複合体が集合するまでの時系列変化

(A, B) *MT* プロモーターによって myc-Par-3-mKate2 を発現させた S2 細胞のタイムラプスイメージ。Par-island の分布は極性状態 (A) もしくは非極性状態 (B) のいずれかを示した。各パネルで示されている時間 (時: 分) は、CuSO₄ の添加からの経過時間を示している。各段のパネルはそれぞれ、細胞の赤道面 (上)、細胞の上半球の最大値投影処理画像 (中)、細胞の下半球の最大値投影処理画像 (下) を示している。スケールバーは 5 μ m を示す。(C-E) S2 細胞のタイムラプスイメージに対してデコンボリューション処理を行った場合の観察結果。(C) Par-6-GFP による Par-dot のタイムラプスイメージの拡大図。複数の Par-dot の結合 (上段、矢頭) や、単独の Par-dot の成長 (下段、矢頭) が観察された。(D) Par-6-GFP のタイムラプスイメージ。Par-dot が細胞表層に出現し、成長する様子が観察された。スケールバーは 5 μ m を示す。(E) Par-dot の形成や成長の過程で観察された Par-6-GFP のセグメントやヒモ構造。図 13D 示したものと同一細胞のタイムラプスイメージで、細胞の上半球の最大値投影処理を行った画像。スケールバーは 2 μ m を示す。パネル内部の画像は、黄色の点線部分の拡大図を示している。矢頭は Par-dot、矢印はヒモ構造を表す。拡大図のスケールバーは 0.5 μ m を示す。(F) Par-6-GFP による Par-island のタイムラプスイメージ。複数の Par-island の結合 (上段、矢頭) や、単独の Par-island から複数の Par-island への分離 (下段、矢頭) が観察された。(G) S2 細胞の Par 極性形成プロセスの概要図。C および F のスケールバーは 1 μ m を示す。

3.2.3. 定常状態における Par-island の動態

MT プロモーターを利用して Par 極性形成プロセスを観察した結果、myc-Par-3-mKate2 の発現誘導から数時間後には Par-island の分布は定常化している様子が得られた。このとき、定常状態となった細胞群において Par-6-GFP を用いて ASI を測定したところ、Par-island が集合し $ASI > 0.35$ を示す「極性細胞」が約 30%、Par-island が離散した分布を持ち $ASI \leq 0.35$ を示す「非極性細胞」が約 70%を示した(図 14A)。最終的な Par-island の分布を決定する因子を検討したものの、Par-3 の発現量やその増加量、また Par 複合体の構成因子の量比などは極性細胞と非極性細胞で差が見られなかった(図 14B-E)。

定常状態における myc-Par-3-mKate2 の発現量は、Gal4-UAS システムを利用した場合の約 1/16 だったが(図 15A)、Par-island の形状やサイズに大きな違いは見受けられなかった。このことから、内在性の発現量と比較して過剰量の Par-3 が存在するのであれば、その量に関わらず Par-island は形成されると考えられる。また、Par-3-mKate2 の発現量が定常状態となったあとの ASI の時系列変化を計測すると、「極性細胞」および「非極性細胞」の状態は 3 時間維持されていた(図 15B)。その一方で、個々の Par-island に着目すると、定常状態においても Par-island は集合・離散・変形のプロセスを繰り返した(図 15C)。これらの結果から、定常状態の Par-island は動的に変化するにも関わらず、その細胞表層における分布の傾向を維持するという特徴を持っていることが明らかになった。興味深い特徴として、複数の Par-island による凝集は観察されているにも関わらず、細胞表層上の Par-island はひとつに統合されることはなく、細胞表層上には常に複数個の Par-island が存在していた。

Gal4-UAS システムによる Par-3 の過剰発現の結果から、S2 細胞の Par 極性には内在性の Lgl が必須であることが示され、Par 複合体と Lgl は相補的に分布していた。そこで、*MT* プロモーターによる Par-3 の過剰発現においても、Par-island と内在性 Lgl の分布の極性を免疫染色によって観察した。その結果、極性細胞および非極性細胞のいずれでも Par-island と Lgl は相補的な分布を示していた(図 15D, E)。また、定常状態の Par-island では極性・非極性状態の遷移が発生しにくい。従って、内在性の Lgl が Par-island の分布を安定化するために働いている可能性が考えられる。

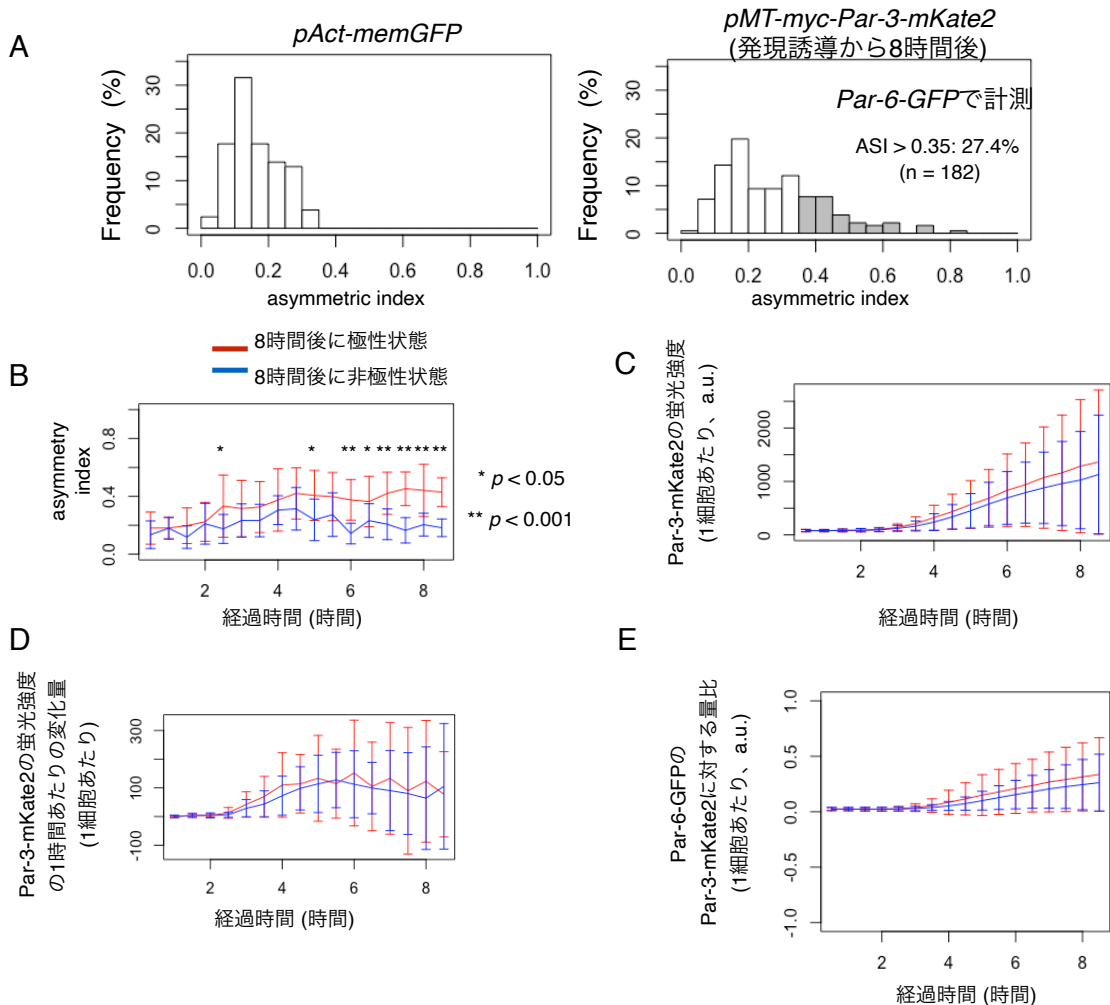


図 14. ASI および myc-Par-3-mKate2 の発現量の定常状態になるまでの経時的変化

(A) *Act5C* プロモーターによって memGFP を発現する S2 細胞 (左) と、*MT* プロモーターによって myc-Par-3-mKate2 を発現する S2 細胞 (右) の ASI 値のヒストグラム。各条件の ASI 値は、*pAct5C-memGFP* の遺伝子導入から 2 日後、もしくは、*pMT-myc-Par-3-mKate2* の遺伝子導入の 2 日後の CuSO_4 添加から 8 時間経過時に計測した。計測には細胞の赤道面の画像を利用した。ASI 値はそれぞれ、memGFP を発現する細胞では 0.17 ± 0.08 (平均値 \pm s.d., $n=209$ 細胞)、myc-Par-3-mKate2 が細胞表層に分布する細胞では 0.27 ± 0.15 (平均値 \pm s.d., $n=182$ 細胞) を示した。myc-Par-3-mKate2 が細胞表層に分布する細胞 (遺伝子導入された細胞の約 52%) のなかで、memGFP 発現細胞よりも ASI 値が高い (ASI > 0.35) を細胞は 27.4% 存在しており、その平均値は 0.43 ± 0.12 (s.d.) を示した。(B-E) myc-Par-3-mKate2 の発現を誘導した S2 細胞の経時的変化。それぞれ、B. ASI 値、C. myc-Par-3-mKate2 の蛍光強度、D. myc-Par-3-mKate2 の蛍光強度の変化率、E. Par-6-GFP と Par-3-mKate2 の蛍光強度の比を示している。測定はすべて、*pMT-Par-3-mKate2*、*pAct-Par-6-GFP* を遺伝子導入した 2 日後、S2 細胞に CuSO_4 を添加し、30 分おきに行った。時間 (時: 分) は CuSO_4 の添加からの経過時間を示している。赤線と青線はそれぞれ、 CuSO_4 の添加から 8 時間後に非極性細胞になるグループ ($n=10$, ASI < 0.2) の平均値、極性細胞になるグループ ($n=13$, ASI > 0.4) の平均値を示しており、エラーバーは標準偏差を示す。C, E. myc-Par-3-mKate2 の蛍光強度は、 CuSO_4 添加から 8 時間後には定常状態になっていた。極性細胞グループでは、myc-Par-3-mKate2 の蛍光強度が上昇開始 (CuSO_4 添加から約 2 時間後) の直後から ASI 値が上昇を開始し、そのまま数値が維持される (B, 青線)。非極性細胞グループでは、ASI 値が最初に上昇するものの、 CuSO_4 添加から約 5 時間後から徐々に減少していく (B, 赤線)。ASI 値が上昇するタイミングは、Par-dot が出現するタイミングと大まかに一致していた (CuSO_4 の添加から 2~4 時間後、図 12A, B, D を参照)。非極性細胞グループで ASI 値が減少するタイミングは、Par-island の形成の完了と大まかに一致していた (CuSO_4 の添加から 4~6 時間後)。各グラフの p 値は t 検定によって算出し、*は p 値 < 0.05、**は p 値 < 0.001 を示す。B において、 CuSO_4 の添加 6 時間後からの p 値はそれぞれ、 5.6×10^{-5} 、0.04、 5.5×10^{-4} 、 1.1×10^{-6} 、 5.5×10^{-4} 、 4.3×10^{-7} 。

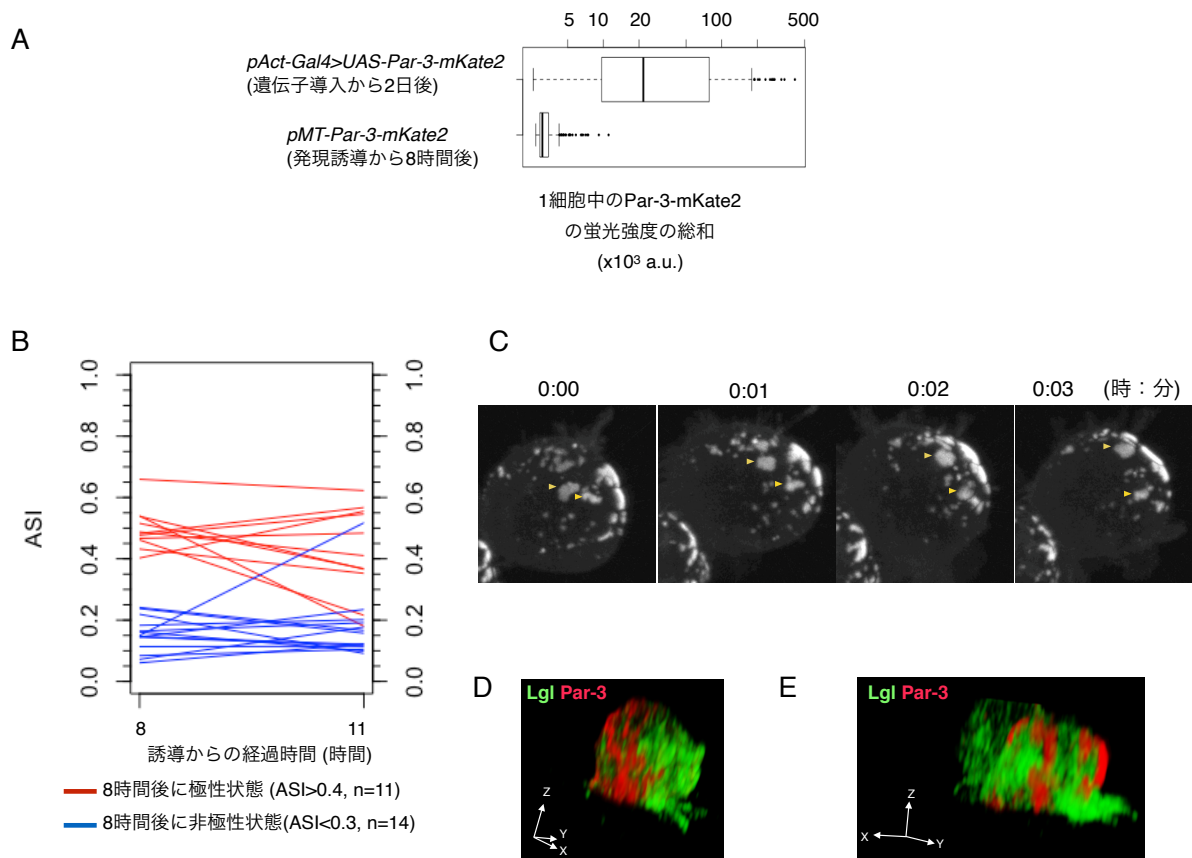


図 15. 極性細胞の定常状態における Par 複合体のダイナミクス

(A) *MT* プロモーターと *pAct-Gal4xUAS* システムとの *myc-Par-3-mKate2* の発現量の比較。各細胞の *mKate2* 蛍光強度の測定によって比較を行っている。*MT* プロモーターによる発現量は、遺伝子導入から2日後に CuSO_4 を添加して8時間後に計測した。*pAct-Gal4xUAS* システムによる発現量は、*pAct-Gal4* および *pUAS-myc-Par-3-mKate2* の遺伝子導入から2日後に計測した。*pAct-Gal4xUAS* システムによる *Par-3-mKate2* の発現 (平均値 $5.5 \times 10^4 \pm 7.1 \times 10^4$ (s.d.)) は、*MT* プロモーターによる発現 (平均値 $3.4 \times 10^3 \pm 9.8 \times 10$ (s.d.)) と比較して約18倍の高さを示した。(B) 極性細胞および非極性細胞の状態は数時間維持される。 CuSO_4 の添加から8時間経過時に極性状態の細胞 (赤線、ASI>0.4, n=11) と、非極性状態状態の細胞 (青線、ASI<0.3, n=14) で、 CuSO_4 の添加から11時間経過時のASI値を再計測した。ASI値は *Par-6-GFP* の蛍光シグナルによって計測した。(C) 定常状態の *Par-island* のタイムラプスイメージ。*pAc-Par-6-GFP*、*pAct-aPKC*、*pMT-myc-Par-3-mKate2* の遺伝子導入から2日後、 CuSO_4 添加を行った。観察は、 CuSO_4 添加による *myc-Par-3-mKate2* の発現誘導から8時間経過後に行っている。*Par-island* の可視化には *Par-6-GFP* を利用した。(D, E) *myc-Par-3-mKate2* (赤) と内在性の *Lgl* (緑) の細胞の免疫染色画像を三次元再構築した画像。*Par-3* の分布が集合している細胞 (D) と分散している細胞 (E) のいずれにおいても、*myc-Par-3-mKate2* と *Lgl* は相補的な分布を示した。

3.3. Par-island 内部の微細構造の解析

Par-island は、変形・離散・集合を繰り返す動的な性質を持っていた。この特徴的な性質の理解に向けて、個々の Par-island の形態について詳細な検討を行った。

3.3.1. Par-island は細胞膜よりも高い曲率を持つ

ライブイメージングの結果、Par-island は細胞表層から凸型に突出しており、Par-island が局在する領域の細胞膜は曲率が高くなっていることが示唆された。Par-island の局在による細胞膜への影響を定量するため、*pMT-myc-Par-3-mKate2*に加えて、*pAct-membrane-GFP*の遺伝子導入によって細胞膜を可視化して曲率半径を計測した (図 16A)。このとき、*pAct-Par-6*および *pAct-aPKC*も遺伝子導入し、また計測は *myc-Par-3-mKate2* の発現誘導から 8 時間後のサンプルにおける細胞の赤道面のライブイメージング画像を使用した。まず、S2 細胞の細胞膜上における任意の 3 点を通る真円の曲率半径を求めることで、S2 細胞の細胞膜の曲率を検討した。このとき Par-island による影響を除外するために、Par-island の端から 5 μm 以上離れた「Par-island 非接触領域」の内部で任意の 3 点の選択を行った。この計測の結果、細胞膜の曲率半径の中央値は 4.07 μm で S2 細胞の半径とよく一致した結果が得られた (図 16B, non-neighbouring region)。また、Par-island が形成されていない細胞でも細胞膜の曲率を検討した結果、曲率半径は 2.0-20 μm ($n = 76$, 13 細胞) でその中央値は 4.07 μm を示し、Par-island を持つ細胞との有意差は見られなかった (図 16B, non-island)。この結果から、Par-island が局在していない領域の細胞膜の曲率は、細胞の Par-island の有無に影響されないと考えられた。

次に、Par-island と細胞膜の関係性を観察すると、Par-island は常に細胞膜の内側で形成されており、細胞膜は Par-island の形状に沿うように湾曲していた。Par-island の曲率を検討するため、*membrane-GFP*を利用して Par-island と接している湾曲部分の両端とその中点の座標の 3 点を通る真円を求めた。その結果、Par-island における曲率半径は 0.7-5.0 μm ($n = 69$, 34 細胞) で、細胞膜よりも大きな曲率を持つことが明らかとなった (図 16B, Par-islands)。

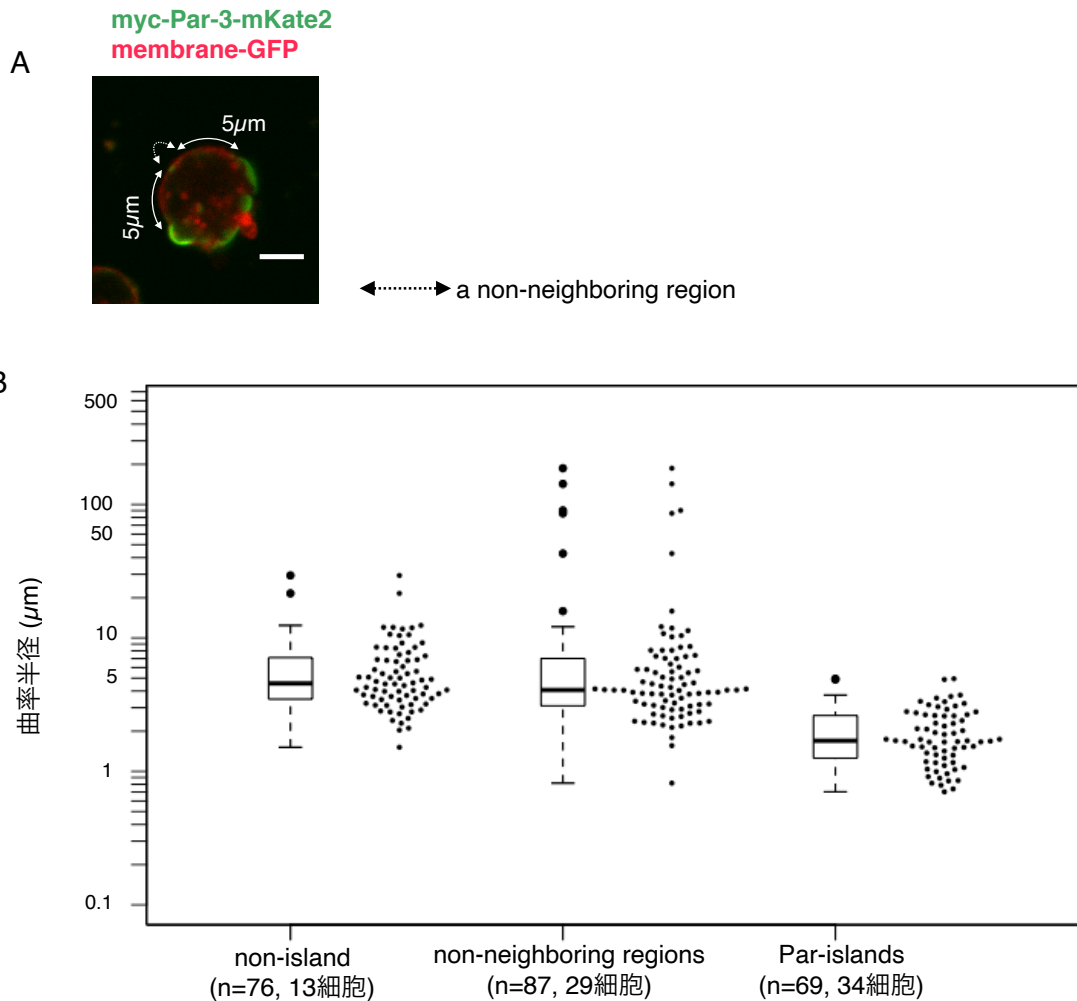


図 16. Par-island の曲率

(A) 曲率を求めた領域の概要図。memGFP によって細胞膜を可視化し、(1) Par-island、(2) neighboring、(3) non-neighboring、の 3 領域に分類した。Par-island 領域は、1μm 以上に渡って Par-3-mKate2 が局在しており Par-island が赤道面をまたいで分布する領域。non-neighboring 領域は、細胞の縁上で Par-island 領域の端から 5μm 以上離れた領域。各領域の曲率は以下のように算出した。まず、memGFP をマーカーとして各領域の端と中央点を選択し、その 3 点を通る円の曲率を、領域の曲率と定義した。Non-island 領域の曲率は、Par-island を持たない細胞から算出した (詳細は対象と手法に記載した)。計測には、CuSO₄ 添加 8 時間後の細胞のライブイメージング画像を利用しており、代表データを画像として示した。ほとんどの細胞において、同一の細胞から Par-island 領域ならびに non-neighboring 領域の両者の曲率が計測可能だった。スケールバーは 5μm を示す。(B) Par-island 領域、non-neighboring 領域、non-island 領域の曲率半径。それぞれの中央値は、non-island 領域では 4.56 μm (n=76, 13 細胞)、non-neighboring 領域では 4.07 μm (n=87, 29 細胞)、Par-island 領域では 1.70 μm (n=69, 34 細胞) を示した。Par-island 領域の曲率半径値の分布は、non-neighboring 領域と比較して有意に低かった ($p=6.55 \times 10^{-15}$, Kolmogorov-Smirnov 検定)。また、Par-island 領域の曲率半径値の分布は、non-island 領域と比較しても有意に低かった ($p=4.44 \times 10^{-16}$, Kolmogorov-Smirnov 検定)。

3.3.2. SRRF 法を用いた Par-island の構造解析

Par-island の形態をより詳細に検討するため、myc-Par-3-mKate2 と Par-6-GFP の共染色画像に対し、時空間相関解析に基づいた画像処理法である SRRF (Super-Resolution Radial Fluctuations, Gustafsson *et al*, 2016) 処理を適用し、超解像度の Par-island の画像を取得した。この超解像度での観察の結果、Par-island を形成している Par-3-mKate2 と Par-6-GFP ののいずれも内部で均一な分布を示しておらず、Par-island はメッシュワーク構造によって構成された多角形の形態を持つことが明らかとなった (図 17A)。これらの観察結果から、Par-island の内部には基本構造となる均質なセグメントによるメッシュワークが形成されている可能性が考えられた。この可能性の検討に向けて、myc-Par-3-mKate2 の染色画像でメッシュワーク構造の輪郭線の長さをそれぞれ計測し、その周期性の有無を解析した (図 17B)。メッシュワークの輪郭線の長さの密度関数分布を検討すると、分布は複数のピークを持っており周期性の存在が示唆された (図 17C)。実際に周期性を持つかを検討するため、メッシュワークの輪郭線の長さの密度関数分布についてスペクトル解析を行ったところ、そのスペクトル密度は $2.4^{-1} \mu\text{m}$ の単一のピークを示しており、メッシュワークの輪郭線の長さに $0.42 \mu\text{m}$ の周期が存在することが示唆された (図 17D)。次に、メッシュワークの輪郭線の長さの密度関数分布について、複数のガウス分布の近似でのフィッティングを検討したところ、7つのガウス分布の合成分布が得られた (図 17E, F)。図 17F で示した各ガウス分布の寄与度 (weight) を考慮し、各ガウス分布のピーク間距離について期待値を求めると $0.35 \mu\text{m}$ となり、スペクトル解析の結果と類似した数値の結果が得られ、メッシュワーク構造の輪郭線の長さには周期性が存在することが強く示唆された。また、ここで2番目のピークを持つガウス分布の寄与度が大きい理由としては、本解析では輪郭線が最長になるようトレースしたため、基本構造を 2~3 個含んだ線が多く得られた可能性が高い。なお、SRRF 法による画像解析は、藤田生水博士、下向敦範博士の協力のもとで行った。

3.3.3. STED 顕微鏡を用いた Par-island の構造解析

SRRF 処理により超解像化した画像の観察の結果、Par-island の内部にはメッシュワークが内部に存在しており、均一な基本構造から構成されていることが示唆された。しかし、SRRF 処理は計算による画像処理によって得られる画像であるため、アーティファクトな構造が観察している可能性が排除できない。そこで、計算や画像処理を使用せず超解像度蛍光顕微鏡の STED 顕微鏡 (Stimulated Emission Depletion microscope) を用いた場合でも、Par-island 内部にメッシュワーク構造が観察されるのか検討した。Par-3 を MT プロモーターによって発現させ、STED 顕微鏡で Par-island を観察すると、myc-Par-3-GFP と Par-6-GFP のどちらをマーカーとした場合でも、Par-island の内部にメッシュワーク構造が確認された (図 18A)。STED 画像にデコンボリューション処理を加えることで頂点を明確にし、このメッシュワーク構造の頂点間の距離を計測した結果、その平均は $0.39 \pm 0.09 \mu\text{m}$ (平均値 \pm s.d.) を示した (図 18B-F)。この結果は、SRRF 処理による超解像度画像の解析結果とよく一致していた。SRRF および STED の異なる手法における超解像度の画像解析から得られた結果が類似していることは、全長約 $0.4 \mu\text{m}$ (SRRF 法による画像解析では $0.38 \pm 0.06 \mu\text{m}$ 、STED 顕微鏡による解析では $0.39 \pm 0.09 \mu\text{m}$ 、共に平均値 \pm s.d.) の基本構造が組み合わさることで Par-island を形成している可能性を強く示唆している。また、Par-3-GFP 免疫染色サンプルを STED 顕微鏡で撮影した結果から、基本構造の太さを検討した。太さのデータは、それぞれの基本構造に直交する線分について、蛍光強度分布のピークの半値幅を計算することで取得した。その結果、ヒモ構造の太さは $0.22 \pm 0.03 \mu\text{m}$ (平均値 \pm s.d.) で均質であることが示唆された (図 18G-H)。これらの

結果から、Par-island の内部では、長さと太さが均質な基本構造が存在していることが示唆された。なお、STED 顕微鏡による解析は、岡田康志教授、藤田生水博士の協力のもとで行った。

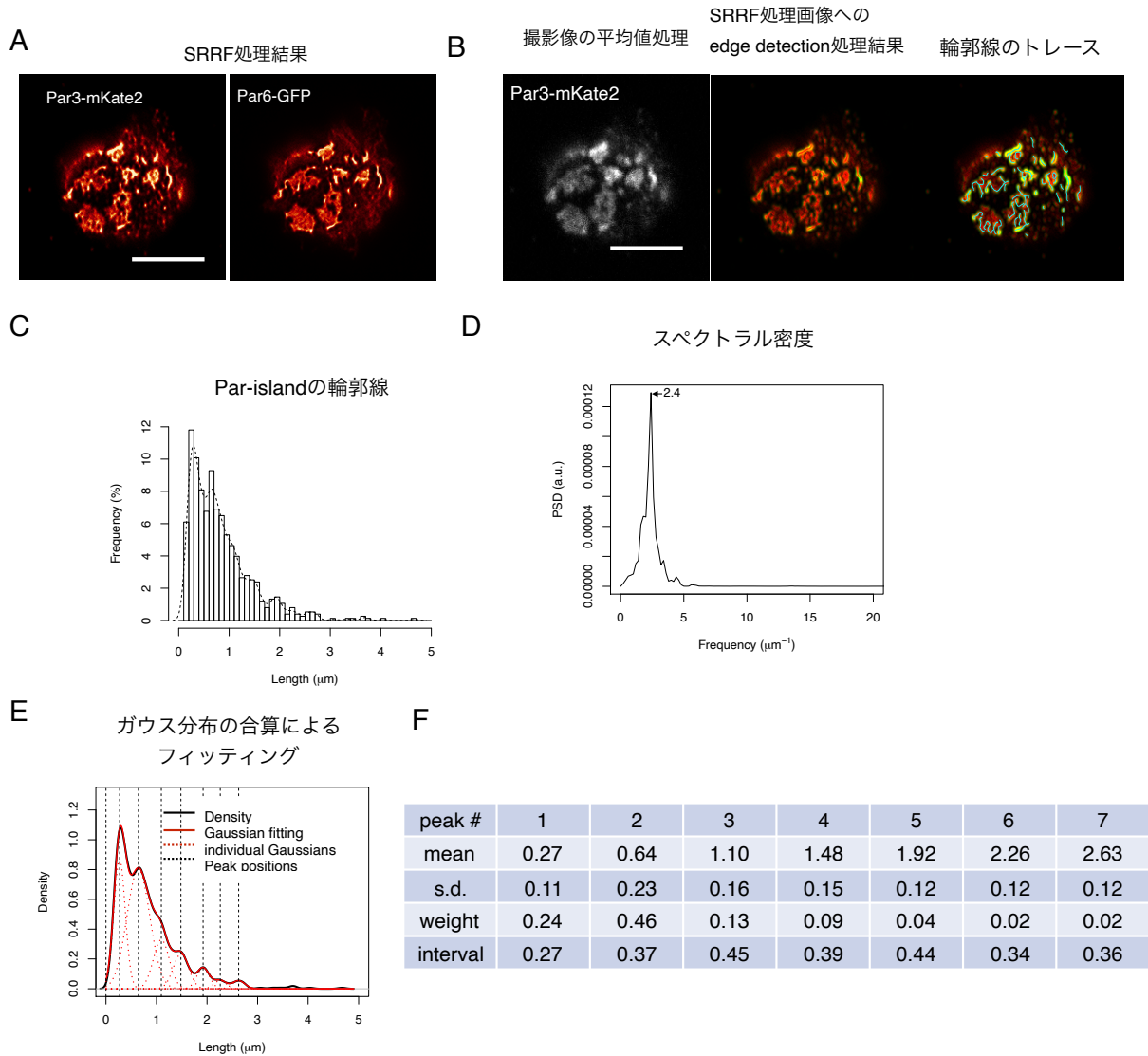


図 17. SRRF 処理画像の観察による Par-island 内部の単位構造の発見

(A) myc-Par-3-mKate2 と Par-6-GFP を発現する細胞の SRRF 処理画像。遺伝子導入の 2 日後に固定を行い、myc 抗体および GFP 抗体によって免疫染色を行い、画像に SRRF 処理を行った。(B) myc-Par-3-mKate2 と Par-6-GFP を発現している細胞 (図 17A で示した細胞と同一)。左パネルには、画像を 200 枚取得し平均値処理を行った画像を示した。この 200 枚の画像すべてを図 8A で示した SRRF 処理に利用している。中央パネルには、SRRF 処理を行った画像に edge detection 処理を行った画像を示した (詳細は対象と手法を参考)。この画像処理の結果、凝集体の輪郭 (緑) が明確になっている様子がわかる。右パネルには、実際に計測した輪郭線やヒモ構造を示した (水色の線)。中央パネルの画像を基に輪郭をなぞっている。(C) 図 17B の右パネルの水色線で示した輪郭線やヒモ構造の長さのヒストグラムと、その密度関数分布 (点線)。(D) 図 17C に示した密度関数分布の密度。密度関数分布を二回微分した結果からスペクトル密度の推定を行った。 $2.4\mu\text{m}^{-1}$ (周期 $0.42\mu\text{m}$) のピークが示された。(E, F) 図 8C の密度関数分布のガウシアンフィッティング。E. 密度関数分布は黒実線、フィッティング結果は赤実線で示した。最小二乗法による検討の結果、密度関数分布は 7 個のガウス分布の合計に近似しており、それぞれのガウス分布は赤点線で示した。個別のガウス分布のピーク (黒点線) の間隔は、寄与度を考慮した期待値で $0.35\mu\text{m}$ を示した ($n=754$, 28 細胞)。F. 近似に利用した各ガウス分布の詳細。A-B のスケールバーは $5\mu\text{m}$ を示す。

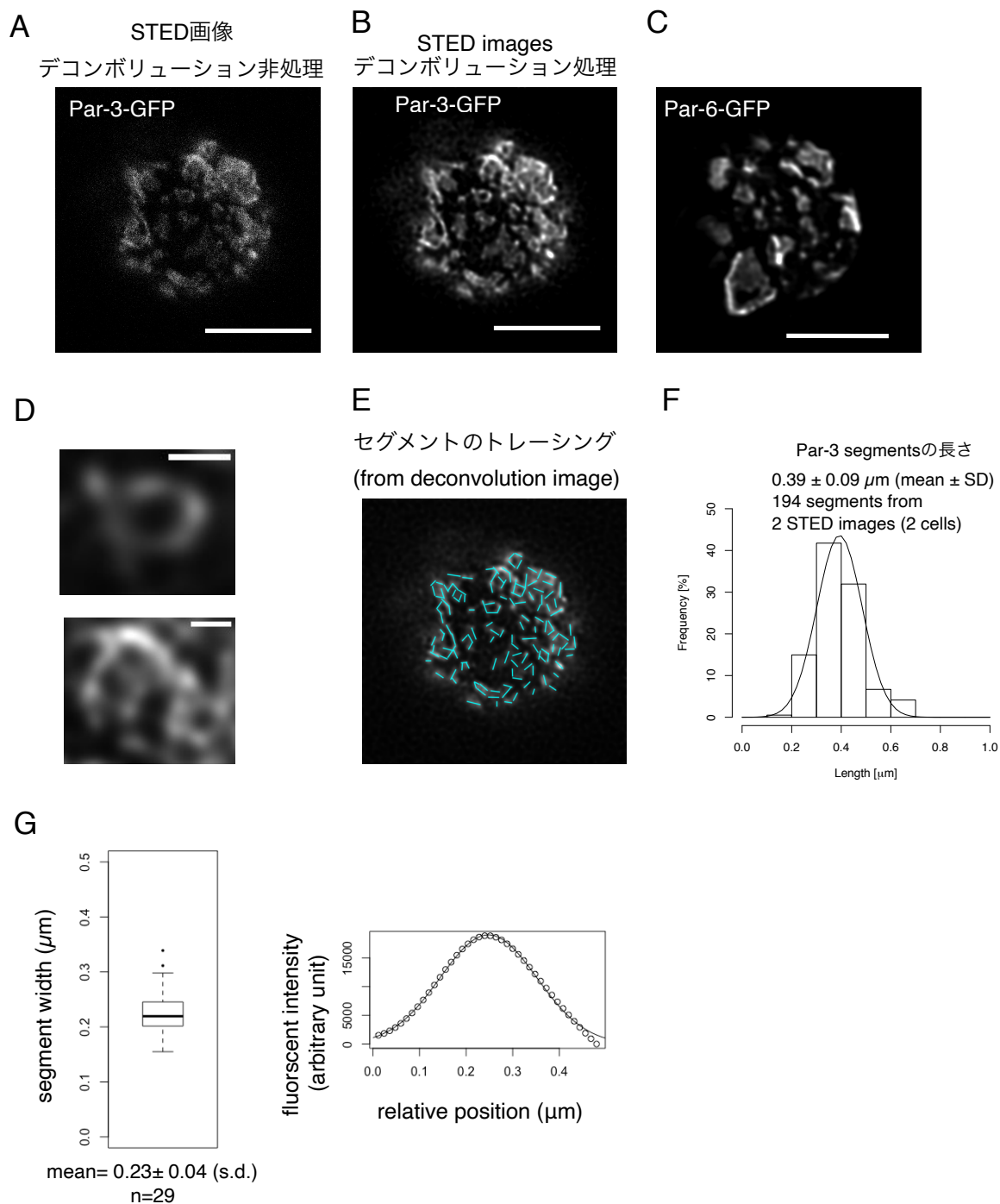


図 18. STED 顕微鏡による Par-island の内部構造の解析

A. Par-3-GFP を発現している S2 細胞の STED 画像。遺伝子導入の 2 日後、固定した細胞を GFP 抗体で免疫染色した S2 細胞を観察した。(B) STED 画像 (図 18A) にデコンボリューション処理を行った画像。(C) Par-6-GFP の STED 画像にデコンボリューション処理を行った画像。myc-Par-3 と Par-6-GFP を発現している細胞を固定し GFP 抗体で免疫染色した S2 細胞を観察した。A-C のスケールバーは 5 μm を示す。(D) STED 画像で観察された Par-island のメッシュワーク構造の拡大図 (元画像は図 18B)。セグメント構造によってメッシュワークが構成されている。スケールバーは 0.5 μm を示す。(E) デコンボリューション処理をした STED 画像 (図 18B) のなかで、長さを計測したセグメントを水色の線で示した。詳細は対象と手法に記載した。(F) Par-3-GFP の STED 画像で観察されたセグメント構造 (図 18E の水色線) の長さの分布。また、ガウス分布でフィッティングした結果を黒実線で示した。平均値は $0.39 \pm 0.09 \mu\text{m}$ (平均値 \pm s.d.) を示した (n=194、図 13A で示した細胞を含む 2 細胞で計測)。(G) Par-island 内部のセグメント構造の直径の推定結果。セグメント構造に直交する線分で GFP の蛍光強度の分布を測定し、その半値幅をセグメント構造の太さとした。ヒモ構造に直交する線分における蛍光強度の分布の一例 (左) とヒモ構造の直径のヒストグラム (右)。平均値は $0.23 \pm 0.04 \mu\text{m}$ (平均値 \pm s.d.) を示した (n=29、図 18A で示した細胞を含む 2 細胞で計測)。

3.4. Par-island の形成と細胞周期の関係性

ショウジョウバエ神経幹細胞など非対称細胞分裂を行うモデルでは、Par 極性の形成タイミングは細胞周期に依存している。そこで、S2 細胞においても Par 極性と細胞周期の関係性を検討するため、細胞周期を通して Par-island をタイムラプス観察した。その結果、Par-island は分裂期の初期からそのサイズが減少し、さらに分裂期中期には消失したことから、S2 細胞でも Par 極性は細胞周期と強い関連を持っていた。このとき、細胞質内においても Par 複合体の凝集は観察されなかった。また興味深いことに、細胞分裂の末期になると Par-dot が娘細胞の細胞表層で再び出現しており、さらにその出現位置は細胞の分裂位置の反対側に集中していた (図 19A, n = 11/14)。その後、娘細胞の両方で Par-dot は Par-island へと成長していった。この一連の挙動から、S2 細胞において Par-island の形成は細胞分裂期には阻害されている可能性が考えられる。

一般的に細胞分裂面の反対側には中心体が局在している。分裂面の反対側で Par-dot の再形成が観察されることは、S2 細胞において Par 複合体の局在が中心体に影響される可能性を示唆している。この可能性を検討するため、細胞分裂の末期や直後のみならず、間期においても中心体と Par 複合体のクレセント状の分布 (Par crescent) が近接するか観察した。中心小体マーカーの Spd-2-GFP を過剰発現させ、Par crescent との位置関係を観察した結果、多くの細胞において Par crescent の両端と細胞の中心を結んだ領域内に Spd-2-GFP が分布していた (図 19B-D, 80%, n=40)。これらの結果から、細胞周期を問わず中心体と Par 複合体の局在位置は近接しており、S2 細胞の Par 複合体が局在する位置は中心体と何らかの関係があることが示唆された。

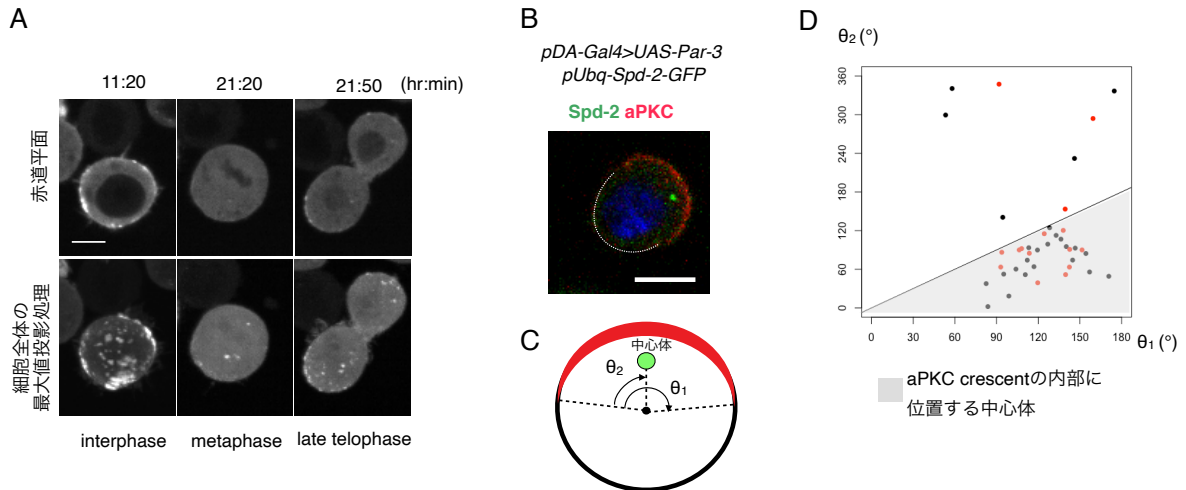


図 19. Par 極性は細胞自律的に形成される

(A) S2 細胞の細胞分裂期における Par-island の変化。 *pAc-Par-6-GFP* と *pMT-myc-Par-3-mKate2* の遺伝子導入から 2 日後に CuSO_4 を添加し、Par-6-GFP でライブイメージングを行った。各パネルで示されている時間 (時: 分) は、 CuSO_4 の添加からの経過時間を示している。S2 細胞の赤道面の画像 (上)、細胞の最大値投影処理画像 (下) を示した。スケールバーは $5\mu\text{m}$ を示す。(B-D) Par 複合体と中心体の位置関係。 *pUbg-Spd-GFP*、 *pAc-Gal4*、 *pUAS-Par-3* も遺伝子導入し、Spd-GFP で中心体を可視化している。B. aPKC と Spd-GFP の免疫染色画像。C. 計測の概要図。細胞の赤道面の画像から、クレセント状に分布する aPKC (aPKC crescent) について、中心角 (θ_1)、分布の端と中心体を結んだ角 (θ_2 、時計回りに計測) を求めた。D. Par crescent と中心体の位置関係。中心体は、弧が aPKC の分布、中心点が細胞の中心になる扇形の内部に分布していた (80%、 $n=40$)。黒点で示したデータは免疫染色画像から、赤点で示した点はライブイメージング画像から取得した。C の計測は遺伝子導入から 2 日後に行った。

3.5. Par-island 構造の形成や動態に影響を与える分子間相互作用

3.5.1. Par-3 の自己重合と Par-island の関係性

超解像度による観察の結果、Par-island の内部では均質なヒモ構造がメッシュワークを形成していたため、次にメッシュワーク構造の形成メカニズムを検討した。本研究で過剰発現させている Par-3 は、自己会合によって長さ数百 nm のらせん構造を形成することが *in vitro* で確認されている (図 20A, Zhang *et al*, 2013)。私は、その形状やサイズが Par-island 内部のヒモ構造と類似している点に着目し、Par-3 の自己重合がヒモ構造やメッシュワーク構造に与える影響を検討した。そこで、Par-3 の自己会合に必要な CR1 ドメインを欠失させた Par-3 Δ CR1 を *MT* プロモーターによって過剰発現させ (*pMT-Par-3 Δ CR1-mKate2*)、Par-6-GFP による Par 複合体の分布変化を観察した。Par-3 Δ CR1 発現誘導の以前には細胞質全体に Par-6-GFP が分布していたが、2 時間経過後から徐々にその分布が細胞表層全体で強まってくる様子が観察された。このとき、Par-dot に類似した Par-6-GFP の凝集体も細胞表層で散見された (図 20B 2:36, 3:48)。しかし、*MT* プロモーターによる過剰発現が定常状態になる時間帯においても Par-island の構造は明確には観察されず、小さな凝集体が細胞表層で分散していた (図 20B, 8:22)。この結果から、Par-3 CR1 ドメインは Par-island の形成に重要である可能性が考えられる。また、Par-3 Δ CR1 が発現する細胞で ASI を計測し、野生型 Par-3 の発現時と比較すると、極性細胞に分類される ASI > 0.35 を示す細胞の割合が 10.1%に減少していた (図 20C)。ショウジョウバエ卵母細胞においても、Par-3 CR1 ドメインの欠失は Par 極性形成の異常を引き起こす (Benton & St Johnston, 2003)。この結果から、*in vivo* と同様に Par-3 の CR1 ドメインは S2 細胞における極性形成にも必要であることが考えられる。

Par-3 Δ CR1 の発現誘導では Par-island は観察されなかったものの、細胞表層では Par 複合体の凝集体が形成されていた。この原因として、S2 細胞の内在性の Par-3 が持つ CR1 ドメインが凝集体の形成に寄与している可能性が考えられた。そこで、内在性 Par-3 の発現をノックダウンした状態で Par-3 Δ CR1 を過剰発現させ、Par 複合体の凝集に変化が現れるかを検討した。RNAi によって、内在性の Par-3 の発現量は約 10%に低下する (図 21)。過剰発現させる Par-3 Δ CR1 に対して RNAi が作用しないよう、RNAi の標的領域にサイレント変異を加えたコンストラクト *pMT-Par-3sm Δ CR1* を遺伝子導入し、同時に内在性 Par-3 の発現をノックダウンした。ウエスタンブロッティングによる検討の結果、サイレント変異は Par-3 の発現量に影響せず、また野生型の Par-3 に対する RNAi も作用しない (図 22)。

まず、Par-3sm-GFP の固定染色像を STED 顕微鏡で観察すると、野生型 Par-3 が発現した状態と同様に、Par-island 内部のメッシュワーク構造が観察された。そのため、サイレント変異はヒモ構造の形成や集合には影響を与えていないと考えられる (図 23A)。一方で、Par-3sm Δ CR1-GFP の過剰発現の固定染色像においては、蛍光強度が高いスポットも存在していたものの、メッシュワーク構造から形成される Par-island は観察されなかった (図 23B)。この結果は、Par-3 の CR1 ドメインがメッシュワーク構造の形成に必要であることを示唆している。Par-3 Δ CR1 でも Par-dot に類似した凝集体が形成される原因としては、(1) 未知の Par-3 ドメイン、(2) Par-6 や aPKC、(3) Par 複合体以外の因子、などのいずれかを介して Par 複合体が結合している可能性が考えられる。

次に、CuSO₄ 添加から 8 時間が経過して Par-3sm Δ CR1-GFP の発現が定常状態となった細胞について、Par 複合体の凝集領域の大きさを計測した。Par-3sm Δ CR1-GFP の凝集体は $0.44 \pm 0.37 \mu\text{m}^2$ (平均値 \pm s.d.) で、Par-3-sm-GFP の Par-island よりもサイズが小さく、また Par-3sm-GFP で観察されるような $3\mu\text{m}^2$ 以上の凝集体は観察されなかった。そこで、Par-3sm Δ CR1 の発現で形成される小さな凝集体は、野生型 Par-3 を発現させ Par-island が形成されるまでのどの状態にあたるのかを検討した。その結果、野生型 Par-3-mKate2 の発現誘導開始から 2.5 時間後に形成される凝集体が、Par-

3sm Δ CR1 の発現で形成される凝集体のサイズの分布と一致した (図 23C)。野生型 Par-3 における誘導開始から 2.5 時間後は Par-dot から Par-island への成長過程の途中であることから、CR1 ドメインは Par-island のメッシュワーク構造を形成や、Par-dot から Par-island への成長に重要な役割を果たすことが示唆された。S2 細胞では Par-3 Δ CR1 の発現によって、Par-island の形成と極性形成の割合の両者に異常が生じることから、Par-island の形成は細胞極性の形成にポジティブに働くことが推測される。

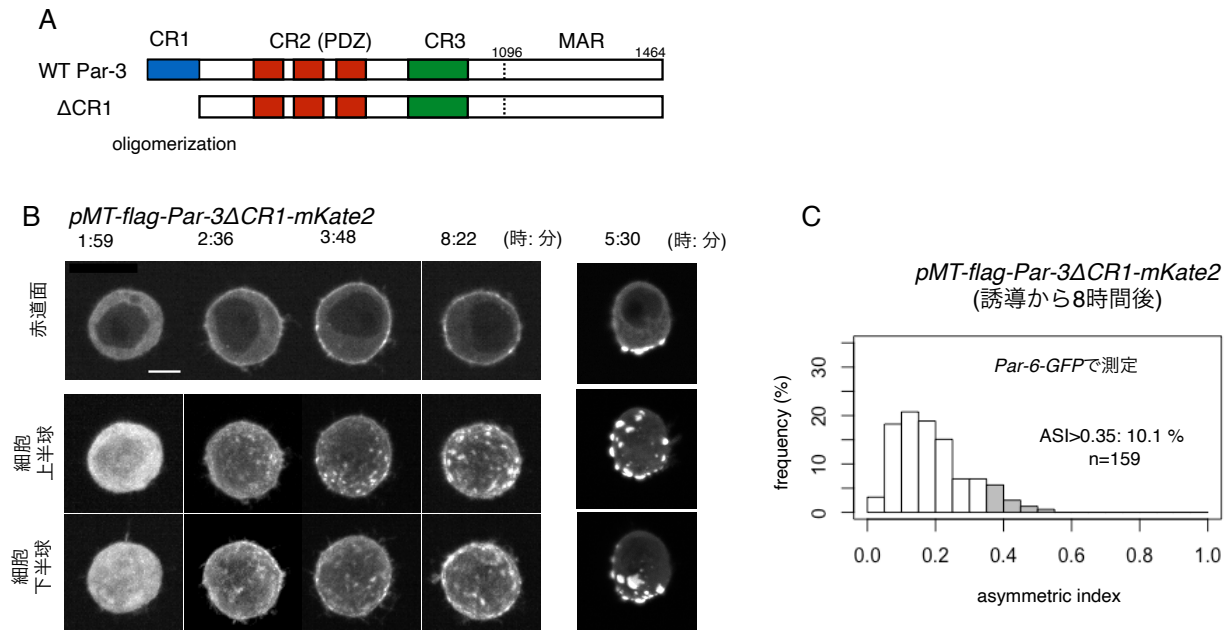


図 20. Par-3 CR1 ドメインは Par-island 内部のメッシュワーク構造に形成に必要である

(A) Par-3 のドメイン構造および Par-3 Δ CR1 の概要図。(B) Par-3 Δ CR1-mKate2 を発現させた細胞における、Par-6-GFP によるタイムラプスイメージング。pMT-Par-3 Δ CR1-mKate2 が発現する以外は、野生型 Par-3-mKate2 の観察と同様の条件で行っている。右列には、野生型 Par-3-mKate2 を発現させた場合の表現型を示した (図 13A と同一)。各パネルで示されている時間 (時:分) は、CuSO₄ の添加からの経過時間。各段のパネルはそれぞれ、細胞の赤道面 (上)、細胞の上半球の最大値投影処理画像 (中)、細胞の下半球の最大値投影処理画像 (下) を示している。スケールバーは 5 μ m を示す。(C) Par-3 Δ CR1-mKate2 を発現させた細胞における ASI 値のヒストグラム。平均値は 0.19 \pm 0.10 (s.d., n=159) を示した。灰色のバーは memGFP 発現細胞よりも高い ASI 値を持つ細胞群 (ASI>0.35、図 7A および 14A を参照)。細胞表層に Par-3 Δ CR1-mKate2 が局在する細胞のうち、10.1%が ASI>0.35 を示し、この割合は野生型 Par-3-mKate2 を発現させた場合より有意に低かった ($p=1.1\times 10^{-8}$ 、フィッシャーの正確確率検定、多重検定の補正にボンフェローニ補正を用いた)。ASI 値の測定は CuSO₄ 添加から 8 時間経過した細胞の撮影像を利用した。

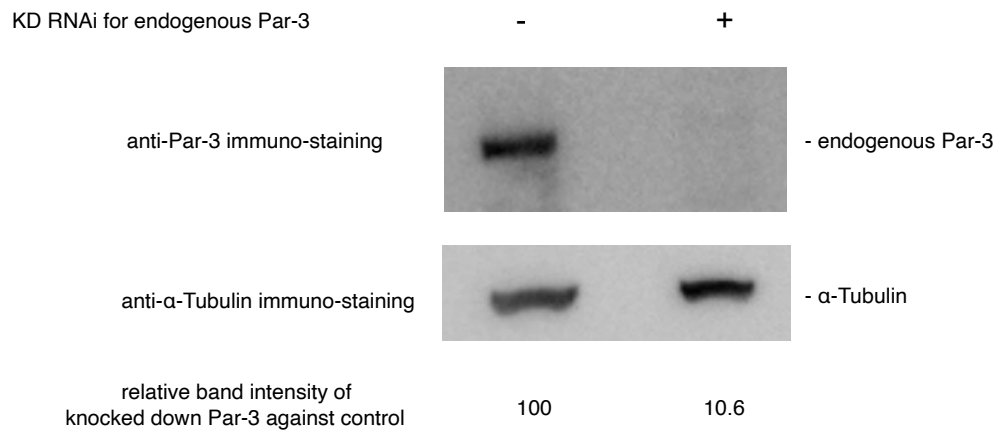


図 21. RNAi 法による内在性 Par-3 の発現の抑制

ウエスタンブロッティングによる内在性 Par-3 のノックダウン効率の検討。空ベクター (*pUAST*) を遺伝子導入した S2 細胞を利用しており、ウエスタンブロッティングは遺伝子導入および dsRNA 添加から 2 日後に行った。左レーン: dsRNA を添加していないコントロール。右レーン: RNAi による内在性 Par-3 のノックダウン。下の数字は、コントロールに対する Par-3 のバンドシグナルの定量結果 (α -tubulin で標準化)。

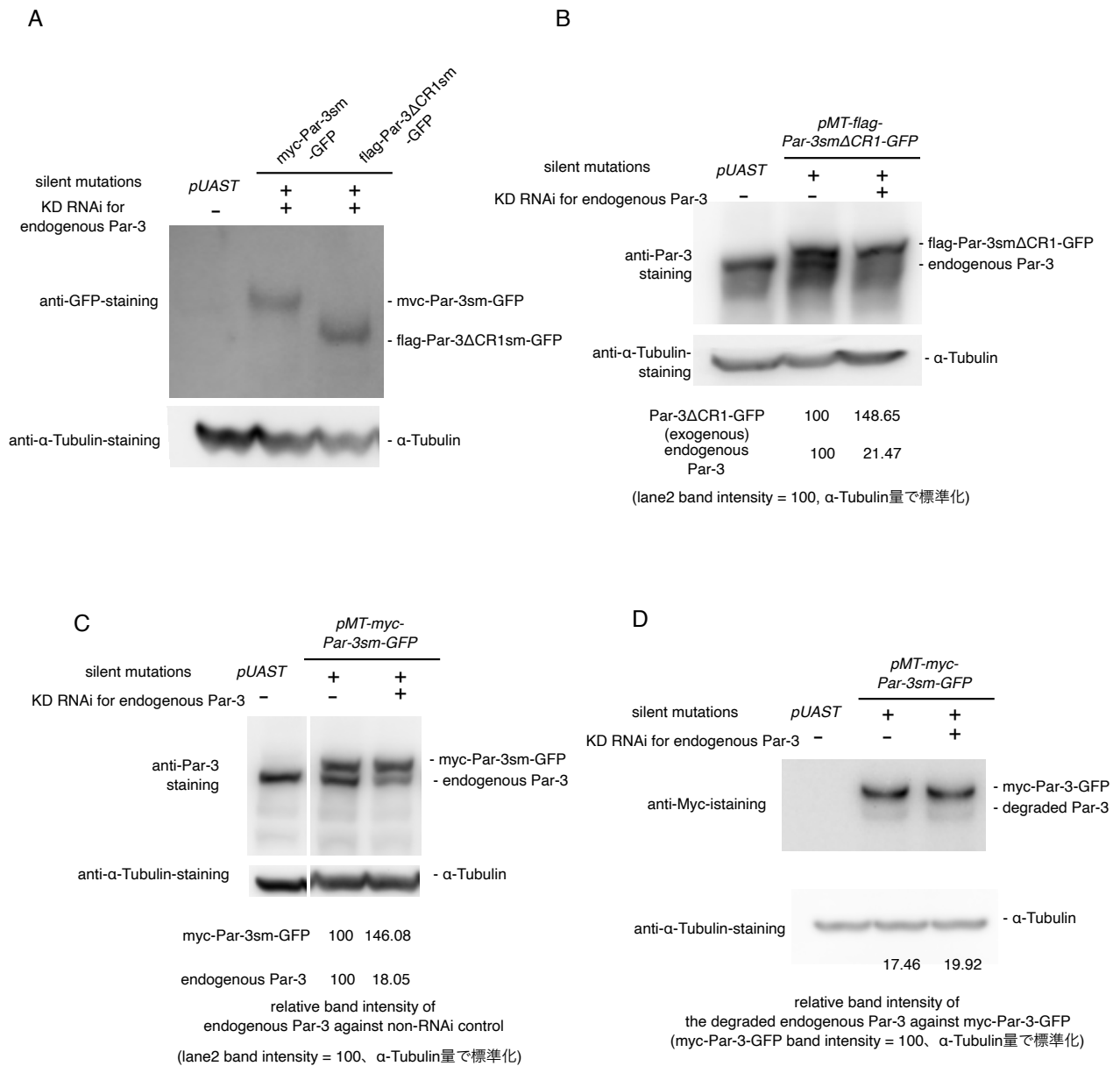


図 22. *myc-Par-3sm-GFP* と *flag-Par-3ΔCR1* の発現量および RNAi 法の影響

(A) Par-3smにおける内在性の Par-3 ノックダウン回避効率の検討。ウエスタンブロッティングは遺伝子導入および dsRNA 添加から 2 日後、CuSO₄ 添加から 8 時間後に行った。左レーン: *pUAST* を遺伝子導入したコントロール。中央レーン: *myc-Par-3sm-GFP* 発現細胞、右レーン: *myc-Par-3smΔCR1-GFP* 発現細胞。*myc-Par-3sm-GFP* と *flag-Par-3ΔCR1* のいずれも Par-3 ノックダウンを回避できていた。(B) 内在性の Par-3 と、*MT* プロモーターによって発現されている *Par-3ΔCR1* の発現量比較。定量はウエスタンブロッティングによって行った。*pMT-flag-Par-3smΔCR1-GFP* を遺伝子導入した 2 日後、CuSO₄ 添加から 8 時間経過した S2 細胞で行った。左レーン: *pUAST* を遺伝子導入したコントロール。中央レーン: Par-3 をノックダウンした細胞。右レーン: Par-3 をノックダウンしなかった細胞。下の数値は、中央レーンを 100 としたときの定量結果。(C) 内在性の Par-3 と *MT* プロモーターによって発現されている Par-3 の発現量の比較。定量はウエスタンブロッティングで行った。*pMT-myc-Par-3sm-GFP* を遺伝子導入した 2 日後、CuSO₄ 添加から 8 時間後経過した S2 細胞で行った。左レーン: *pUAST* を遺伝子導入したコントロール。中央レーン: *myc-Par-3sm-GFP* 発現細胞、RNAi 非処理。右レーン: *myc-Par-3sm-GFP* 発現細胞、RNAi 処理。下の数値は、中央レーンを 100 としたときの定量結果で、分解した *myc-Par-3-GFP* が内在性の Par-3 のバンドが重複するため、図 22D の数値を参考に補正を行っている。(D) ウエスタンブロッティングによる *myc-Par-3-GFP* の分解量の検討。サンプルは図 22C と同様のものを利用している。*myc-Par-3-GFP* は myc 抗体によって同定しているため、分解した *myc-Par-3-GFP* と内在性 Par-3 のバンドが重複しない。下の数値は、*myc-Par-3-GFP* に対して、分解した *myc-Par-3-GFP* 量の定量結果。

A Par-3sm-GFP B Par-3sm Δ CR1-GFP

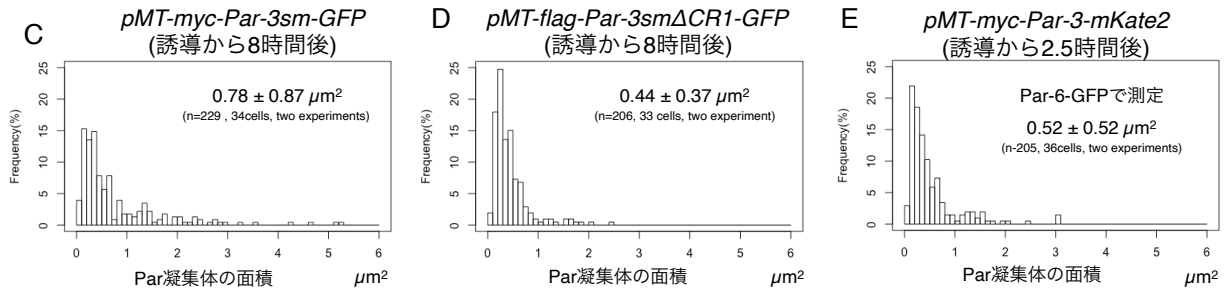
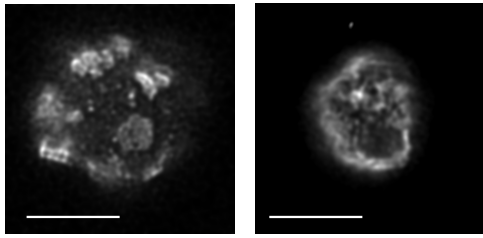


図 23. 内在性の Par-3 ノックダウン時における Par-island の解析

(A, B) 野生型 Par-3sm-GFP (A) および Par-3sm Δ CR1-GFP (B) を発現している細胞の STED 画像にデコンボリューション処理を行った画像。いずれの細胞も、内在性の Par-3 の発現は dsRNA によってノックダウンされている。GFP 抗体によって免疫染色した細胞を撮影に使用した。スケールバーは 5 μ m を示す。(C-E) Par 複合体の凝集体のサイズの分布。それぞれ C. flag-Par-3sm-GFP (平均値 $0.78 \pm 0.87 \mu\text{m}^2$ (s.d.), $n=34$)、D. flag-Par-3sm Δ CR1-GFP (平均値 $0.44 \pm 0.37 \mu\text{m}^2$ (s.d.), $n=33$) の発現時の結果。CuSO₄ の添加から 8 時間後に計測した。内在性の Par-3 の発現は dsRNA によってノックダウンされている。Par-3 Δ CR1 を発現している細胞の Par 複合体の凝集体は、野生型 Par-3 発現細胞の凝集体よりも有意に小さかった ($p=0.000207$, Kolmogorow-Smirnov 検定)。E. myc-Par-3-mKate2 を発現する細胞における Par 複合体の凝集体のサイズの分布。CuSO₄ の添加から 2.5 時間後、大半の Par 複合体の凝集体が Par-dot を示している状態における撮影画像を利用して定量した。平均値は $0.52 \pm 0.52 \mu\text{m}^2$ ($n=36$) を示しており、flag-Par-3sm Δ CR1-GFP を発現させた場合の Par 複合体の凝集体のサイズの分布 (図 23G) と有意な差を持たなかった ($p=0.63$, Kolmogorow-Smirnov 検定)。

F-H において、CuSO₄ の添加は遺伝子導入から 2 日後に行った。

3.5.2. Par 複合体の構成因子間の相互作用による影響

CR1 ドメインの欠失は、Par-island の形成や S2 細胞の極性形成に大きな影響を与えていた。このことから、Par タンパク質のドメインや Par 複合体の構成因子間の相互作用は Par-island の形成に強く影響されることが予想された。そこで、aPKC と Par-3 の相互作用に変異を加え、Par 複合体の挙動に生じる変化を検討した。aPKC は Par-3 の CR3 ドメインに結合し、S980 塩基をリン酸化する (図 24A, Nagai-Tamai *et al*, 2002; Morais-de-Sá *et al*, 2010)。また、リン酸化された Par-3 は aPKC から解離することが知られている。生体内で Par-3 の非リン酸化アイソフォームである Par-3S980A が発現すると、極性形成や Par 複合体の局在にも異常が生じる。pMT-Par-3S980A-mKate2 を遺伝子導入し、S2 細胞で Par-3S980A を発現させると、Par-dot の形成が明確には観察されず、Par 複合体の大きな凝集体の急速な形成、および細胞からの突出が観察された (図 24B, 3:20)。このとき、凝集領域内には個別の Par-island を観察することはできず、野生型 Par-3 の発現時と比較して Par 複合体が高密度に分布していることが予想される。その後、Par 複合体の密な凝集は徐々に解けていき、小さな Par-island が集合を形成した (図 18B, 4:20)。定常状態での ASI を計測すると、約 40% の細胞が ASI>0.35 を示しており、ASI 値の分布も高くなっていた (図 24C)。これらの結果から、密な構造の凝集体の形成と Par-island の分布には関係性があると考えられる。また、Par-3S980A では aPKC から解離しなくなるため、Par-3 と aPKC の結合と解離のターンオーバーが、Par 複合体のダイナミクスに影響することが示唆された。密な構造の凝集体が形成される様子は、上皮細胞で Par-3S980A が発現したとき、異常な adhesion belt が形成される様子と類似している (Morais-de-Sá *et al*, 2010)。

3.5.3. 細胞骨格系タンパク質および細胞膜が Par-island に与える影響の検討

Par-island は常に細胞表層で観察されたため、細胞膜との相互作用が Par-island の形成に与える影響を検討した。Par 複合体と細胞膜の相互作用を操作するため、Par-3 の膜結合領域 (図 24A) を欠損させたコンストラクト Par-3 Δ MAR を作製し、MT プロモーターと結合させた (pMT-myc-Par-3 Δ MAR)。myc-Par-3 Δ MAR の発現を誘導すると、Par 複合体は細胞表層に局在せず、細胞質内で球状の凝集体 (Par-sphere) を形成した (図 24D)。この結果から、Par 複合体の凝集は細胞表層や細胞質に関わらず発生する現象であると考えられる。興味深いことに、細胞表層の Par-island は単一の Par-island へと統合されなかったにも関わらず、Par-3 Δ MAR の発現時には Par 複合体の凝集がすべて統合された (図 24D, 7:30)。また、Par-island の特徴である解離現象も、Par-sphere では観察されなかった。この結果から、Par 複合体の変形・解離のダイナミクスや、Par-island が統合されない現象は細胞表層でのみ発生することが示唆された。

細胞表層における Par 複合体のダイナミクスには、細胞膜成分だけでなく細胞骨格系タンパク質も強く関わることを予想される。線虫の初期胚における Par 極性ではアクトミオシンネットワークの収縮が重要な役割を果たすことから、これらの要素が Par-island に与える影響を検討した。Par-island が定常状態となった S2 細胞に ROCK 阻害剤 Y-27632 を添加し、間接的にネットワーク阻害の影響を検討した。すると、S2 細胞の Par-island の動態に変化は観察されなかったため、ミオシンによる収縮は Par-island の動態に影響しないことが示唆された (図 24E)。次に、Latrunculin B の添加によってアクチンネットワークの破壊が Par-island に及ぼす影響を検討した。その結果、Par-island は不定形からボール状の構造へ変化し、Par-island 以上に細胞膜から突出する様子が観察された (図 24F)。この結果は、アクトミオシンネットワークが持つ弾性力が Par-island の曲率を下げる方向に働いていることを示唆している。また、Par-island がボール状の構造に変化したことから、Par-islands の構造を維持するためにはアクトミオシンネットワークの裏打ち構造が必要であることを示唆している。これらの解析は、柴田達夫教授の協力のもとで行った。

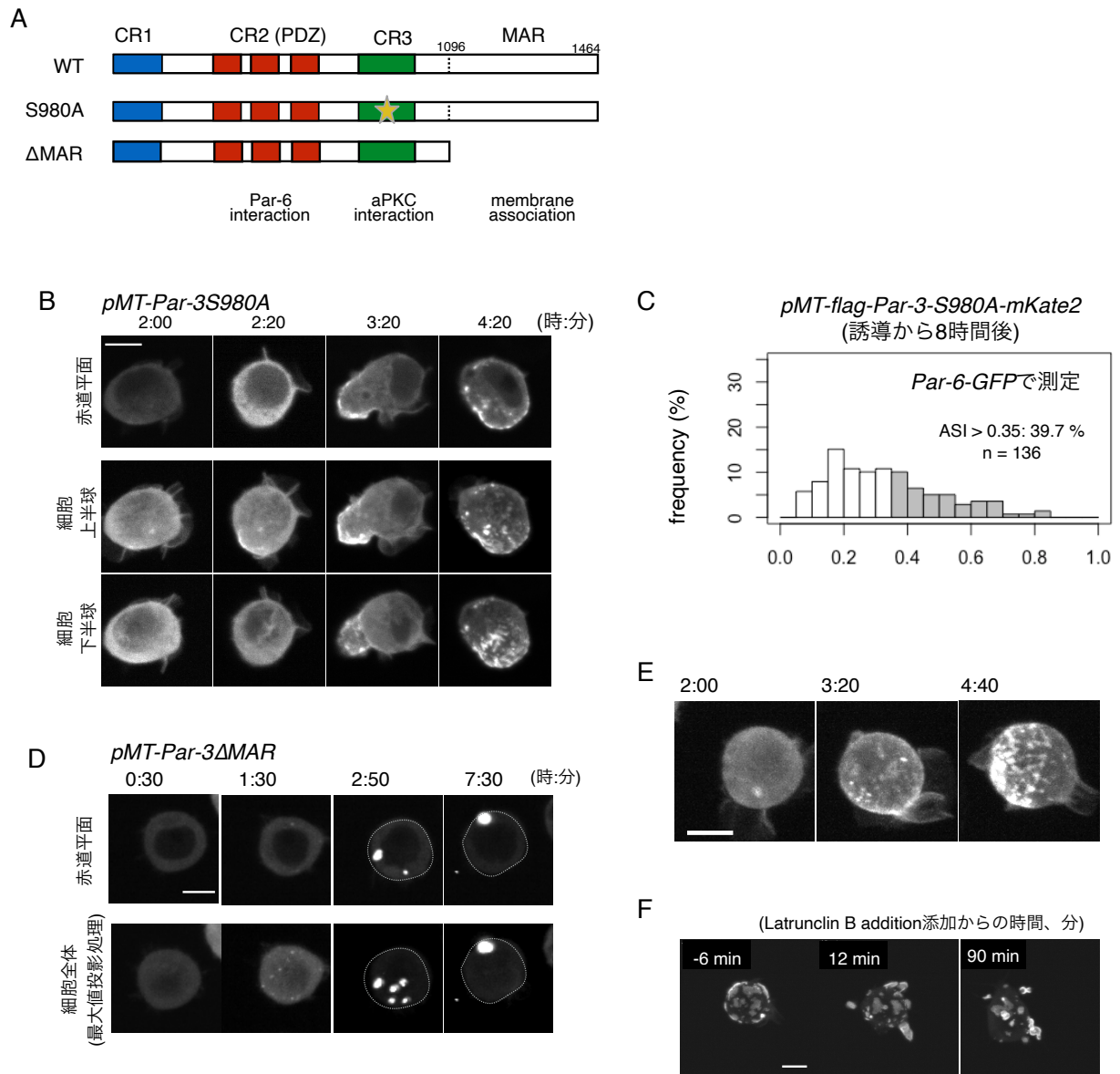


図 24. S2 細胞の Par 極性形成における Par-3 リン酸化および膜結合の役割

(A) Par-3 のドメイン構造および Par-3S980A、Par-3ΔMAR の概要図。(B) *MT* プロモーターで Par-3S980A-mKate2 の発現を誘導した細胞について、Par-6-GFP を利用したライブイメージング結果。各パネルで示されている時間 (時: 分) は、CuSO₄ の添加からの経過時間を示す。各段のパネルはそれぞれ、細胞の赤道面 (上)、細胞の上半球の最大値投影処理画像 (中) を示している。下段パネルは、細胞の下半球の最大値投影処理画像を示している。スケールバーは 5μm を示す。(C) Par-3S980A-mKate2 を発現している細胞の ASI 値の分布。平均値は 0.33±0.18 (s.d.) を示した (n=139)。灰色のバーは memGFP を発現する細胞よりも高い ASI 値を持つ細胞群 (ASI>0.35、図 7B および 14A を参照)。細胞表層に Par-3S980A-mKate2 が局在する細胞のうち、39.7% が ASI>0.35 を示し、この割合は野生型 Par-3-mKate2 を発現させた場合よりやや多かった ($p=0.04486$ 、フィッシャーの正確確率検定、多重検定の補正にボンフェローニ補正を用いた)。ASI 値の測定は CuSO₄ 添加から 8 時間経過した細胞の撮影像を利用した。(D) *MT* プロモーターで Par-3ΔMAR-mKate2 の発現を誘導した細胞について、Par-6-GFP を利用したライブイメージング結果。各パネルで示されている時間 (時: 分) は、CuSO₄ の添加からの経過時間を示す。各段のパネルはそれぞれ、細胞の赤道面 (上)、細胞の上半球の最大値投影処理画像 (中)、細胞全体の最大値投影処理画像 (下) を示している。スケールバーは 5μm を示す。(E) Par-island に対するミオシン阻害の影響。myc-Par-3-mKate2 および Par-6-GFP を遺伝子導入した細胞を Par-6-GFP で観察した。Y27632 (終濃度 1mM) を添加した 1 時間後に CuSO₄ を添加した。各パネルで示されている時間 (時: 分) は、CuSO₄ の添加からの経過時間を示す。(F) Par-island に対するアクチン阻害の影響。Par-3-mKate2 の発現誘導から 8 時間が経過した S2 細胞に対して Latrunculin B を添加し、ライブイメージングを行った。Par-island は急速に球状化し、膜上に突起を形成した。すべての撮影は遺伝子導入から 2 日後に行っている。スケールバーは 5μm を示す。

4. 考察

本研究では、Par 極性を持たない培養細胞をモデルとして細胞自律的な Par 極性の再構成に成功した。その結果、細胞間接着や細胞分裂といった他の生体プロセスと共役しない環境における Par 複合体の本質的な性質について検討できるようになり、Par 極性がどのような構造によって構成されているのか、またその構造はどのように形成されるかを明らかにすることができた。本章では S2 細胞における Par 極性の形成過程において、形成された構造体の挙動や微細構造の特徴について議論する。

4.1. S2 細胞における Par 極性の形成メカニズム

Par 極性の形成は一般的に、(1) 極性形成の開始、(2) 極性形成の進行、(3) 極性の維持、の段階に分けて考えることができる。これらの各項目について、S2 細胞の Par 極性の特徴について議論する。

4.1.1. Par 極性形成が開始されるメカニズム

S2 細胞は内在性の Par-3、Par-6、aPKC の発現を持っているにも関わらず、それらが細胞質に分布していた。Par-3 の発現量を上昇させると、Par 複合体が細胞表層で形成された。この理由としては、(1) 内在性の Par-3 の発現量では、Par 複合体の細胞膜への結合に不十分だった、(2) Par 複合体以外の因子に過不足があったが、Par-3 の過剰発現によってそれが補填された、などが考えられる。細胞表層に Par 複合体が形成されることで、それらが集合して極性を形成する、あるいは離散して極性を形成しない、といったパターン形成へと進むことができたと考えられる。ただし、極性を形成する細胞 ($ASI > 0.35$) と極性を形成しない細胞 ($ASI \leq 0.35$) を比較したとき、Par-3 の発現量には差が見られなかった。この結果から、Par 複合体が細胞表層の一部に局在する現象は、異なるメカニズムも共に働くことで実現していることが予想される(詳細は項 4.4 にて)。

S2 細胞において、Par 極性の形成は Par-dot と呼ばれる凝集体の出現から開始していた。その位置やタイミングは他の細胞との接触やディッシュとの接着に影響を受けておらず、Par 極性は細胞自律的に形成されていた。一方で、細胞内の因子は Par-dot の出現位置に影響を及ぼしている可能性がある。細胞分裂後に Par 複合体の凝集が再形成される場合、Par 複合体の凝集体は細胞分裂面の反対側に形成されていた。そのため、細胞分裂面や中心体は Par-dot の出現位置を誘導する可能性があると考えられる。上皮細胞では、中心体が Par 複合体の凝集位置を誘導することが報告されている(Jiang *et al*, 2015)。ショウジョウバエ神経幹細胞 (NB) では、細胞分裂面が自身と対極な位置へ Par 複合体の局在を誘導していることが示唆されている(Loyer & Januschke, 2018)。加えて、Par 極性とは異なるが古典的な細胞極性モデルである酵母では、細胞分裂面が極性形成位置のランドマークとして働いている(Johnston, 2018)。これらを踏まえると、細胞内の構造と Par 複合体の凝集体の位置は密接な関係を持っていることが予想される。

4.1.2. ステップワイズな極性形成

S2 細胞では Par-3 の発現量上昇によって Par 複合体が細胞表層に出現しはじめ、Par 極性の形成はステップワイズに進行していた。まず、細胞表層において Par 複合体が点状の凝集体 (Par-dot) を形成し、時間と共にそのサイズが成長していく。このとき、Par-dot の成長と並行してヒモ状の Par 複合体の凝集体も観察された。その後、Par 複合体の凝集体は不定形で離散と集合を繰り返す Par-island となり、各凝集体が細胞表層の一部に集合することで極性形成が完了する。すなわち、(1) Par 複合体の凝集体の形成、(2) 異なる性質の凝集体への成長、(3) 凝集体が一部に集合、という

複数ステップを経て Par 極性が形成されていた。凝集体が形成されはじめた後、異なる性質の凝集体へと成長する段階は、物理的な凝集体形成プロセスを反映していると考えられる。すなわち、凝集核が形成され、その後核が成長していくという一般的な凝集体形成が Par 複合体の凝集過程で観察されていると考えられる。

複数ステップによる Par 極性の形成は、線虫の初期胚やショウジョウバエ NB でも観察されている。例えば、線虫の初期胚における極性形成では、その初期段階では Par 複合体は単量体を形成している。その後、極性形成の進行に伴って四量体以上の重合体が形成されることで、細胞表層における流動によって受動的に移動する。その結果、Par 複合体が細胞の前部に集合することで極性形成が完了する (Dickinson *et al*, 2017; Wang *et al*, 2017)。興味深いことに、この Par 複合体の単量体から重合体への変化は PLK-1 の活性の低下によって誘導される。PLK-1 の活性低下の結果、それまで抑制されていた Par-3 の自己重合が促進するため、Par 複合体の重合体が形成される (Dickinson *et al*, 2017)。ショウジョウバエ NB の極性形成における Par 複合体の挙動は、著者による S2 細胞における Par 極性の報告と同時期に報告された (Oon & Prehoda, 2019)。ショウジョウバエ神経幹細胞では、その Par 極性形成の初期段階では Par-dot に類似した“foci”が形成される。foci は徐々に巨大化し、Par-island と類似した“patch”へと成長する。その後、patch が頂端側に集合することで極性形成が完了する。patch が頂端側に集合するメカニズムとして、細胞表層の流動が示唆されているものの、細胞表層を引き起こすミオシンが関与するかは検討されていない。そのため、ショウジョウバエ NB における Par 極性と細胞表層流動との関係性については、さらなる解析が必要である。興味深いことに、ショウジョウバエ NB では aPKC の foci が形成される以前から Par-3 が細胞表層で foci を形成している。すなわち、Par 複合体の foci や patch の形成は、Par-3 による細胞質内の Par-6 や aPKC のリクルートに依存していることが考えられる。ショウジョウバエ神経幹細胞では、Aurora-A が aPKC の酵素活性を上昇させた結果、aPKC-Par-6 と Par-3 の複合体形成が可能になる (Wirtz-Priz 2008)。そのため、ショウジョウバエ NB では Aurora-A が Par-6 や aPKC の Par-3 へのリクルートを促進すると考えられる。つまり、Aurora-A による aPKC の酵素活性は凝集のステップを前に進める役割を持つ可能性がある。このように、線虫の初期胚およびショウジョウバエ神経幹細胞では、分裂期キナーゼが極性形成のステップを進行させる役割の一部を担っていると考えられる。S2 細胞においても、Par 複合体の凝集や Par-island への成長を促進するような因子が存在する可能性がある。

4.1.3. Par 複合体が集合するメカニズム

S2 細胞では細胞表層における凝集体の形成後、それらが細胞の一部で集合していた。線虫の初期胚では、細胞表層の流動によって Par 複合体の凝集体が集合することが知られている。しかしながら、S2 細胞では Y27632 を添加した場合でも Par-island が形成され、一部の細胞では Par-island の集合が観察された。また、Par-island が集合する過程や、定常状態の S2 細胞でも Par-island の一方向的な動態も観察されず、Par-island は細胞の一部に集合するよりも全体に離散する傾向が観察された。これらを踏まえると、Par-island の動態には細胞表層の動態が関与していないことが考えられる。細胞表層の流動の他に Par 極性の形成に関与するメカニズムとしては、近位の自己活性化 (self-activation) と遠位の相互抑制 (mutual-inhibition) の組み合わせによる反応拡散系が一般的に知られており、細胞表層の流動が細胞極性形成に大きく寄与する線虫の初期胚でも、細胞表層の流動がない場合は反応拡散系に依存して Par 極性を形成する (Goehring *et al*, 2011)。この点から、S2 細胞の Par 極性は反応拡散系によって形成している可能性が考えられる (詳細は項 4.3 にて)。

S2細胞における Par-island の集合が細胞表層の流動を必要とせず、反応拡散系のみで発生できると要因として、(1) S2細胞の直径が約 $10\mu\text{m}$ であること、(2) S2細胞の極性形成は数時間スケールである点、が挙げられる。逆に言えば、直径が大きな細胞において数分スケールで Par 極性を形成するためには細胞表層の流動が必要となると考えられる。それぞれの理由について、細胞表層の流動および反応拡散系が働くことで Par 極性が形成される線虫の初期胚を実例として考える。まず線虫の初期胚は直径が約 $50\mu\text{m}$ で、約 10 分間で Par 極性の形成が完了する。つまり、細胞の後部に分布する Par 複合体が細胞の前部へと約 $50\sim 100\mu\text{m}$ ほどの距離を 10 分間で移動する必要があるが、一般に細胞膜上の分子の拡散速度は約 $0.01\sim 0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$ と言われており、拡散だけで移動するのは困難である。そのため、反応拡散系だけでなく細胞表層の流動も働くことで Par 極性を形成していると考えられる (Goehring *et al*, 2011)。対して、S2細胞の直径は約 $10\mu\text{m}$ で反応拡散系だけで Par 複合体が一部に集合することが可能なスケールである。さらに、Par 極性の形成にかかる時間の点においても、S2細胞では数時間を要している。これらの点を踏まえると、S2細胞の Par 極性形成は細胞表層の流動が作用していないとしても不思議ではない。逆に言えば、数分スケールで極性形成を実現しようとする、反応拡散だけでは不十分であることが考えられる。このことから、ショウジョウバエ神経幹細胞の Par 極性形成では、数分スケールの極性形成の実現のために細胞表層の流動が関与している可能性も考えられる (Oon & Prehoda, 2019)。

4.2. S2細胞における Par 極性の維持と崩壊のメカニズム

定常状態となった S2細胞においても、各 Par-island では結合と解離が頻繁に発生していた。しかしながら、Par-island が集合した状態は数時間維持されているため、頑健なシステムによって S2細胞の Par 極性を維持されていると考えられる。一般的に、極性を持つ細胞では排他的な二層が互いに抑制作用を持つことで、極性を維持している。S2細胞では、Par 複合体と Lgl が相補的な分布を持つことで二層を形成しており、内在性の Lgl は Par 極性の形成に必須だった。加えて、Par 複合体の構成因子である aPKC は Lgl と互いに抑制作用を持つため、S2細胞における Par 極性の維持は、aPKC と Lgl の相互抑制によって実現していると考えられる。また、Lgl 以外にも Par 複合体と相互抑制を持つ因子として Par-1 が知られているが、本研究ではその役割について検証していない。

興味深いことに、S2細胞の Par 極性は細胞分裂期に消失する。言い換えれば、Par 極性の維持システムが細胞分裂期に崩壊している。その原因のひとつとして、細胞分裂期における Lgl の細胞膜からの解離が考えられる。この場合、Par 複合体を排斥する因子である Lgl が細胞表層から消失するため、Par 極性を維持するシステムが崩壊し、Par-island が細胞全域に離散することになる。しかしながら、分裂期の S2細胞では Par-island が離散するわけではなく、構造そのものが細胞表層から消失した。さらに、Par-island が消失した S2細胞では Par-6-GFP の細胞質内分布も増加している様子が観察された。そのため、Lgl だけでなく Par 複合体も細胞膜から解離している可能性が高い。従って、Par 極性の崩壊は Par 複合体の解離が要因であると考えられる。また、S2細胞と同様に上皮細胞も細胞分裂期に Par 複合体が頂端側から消失する。そのため、S2細胞と上皮細胞は類似したメカニズムで Par 極性が崩壊していることが予想される (Bergstrahl *et al*, 2013; Ragkousi *et al*, 2017)。細胞分裂期に Par 複合体が細胞膜から解離するメカニズムは不明だが、分裂期キナーゼが関与していることが予想される。なぜなら、Lgl は Par 複合体と同様に細胞分裂期に膜から解離するが、これは Aurora-A によるリン酸化が原因となっているためである (Wirtz-Peitz *et al*, 2008)。S2細胞における Par 複合体の膜結合は Par-3 が大きな役割を果たしている。そのため、細胞分裂期では、Par-3 の膜結合ドメインが分裂期キナーゼからリン酸化され、膜からの解離が促進されている

のではないかと予想する。一方で、ショウジョウバエ神経幹細胞など非対称細胞分裂を行う細胞種では、分裂期でも Par 極性が維持され、分裂終了と共に Par 極性が崩壊する。そのため、非対称細胞分裂をおこなう細胞種では細胞分裂期に Par 複合体の細胞膜からの解離を防ぐメカニズムや、分裂期キナーゼの働き方が異なっている可能性がある。

4.3. Par 複合体の分子ネットワークと凝集体の性質の関係性

項 4.1 で示したように、S2 細胞の極性形成の過程では複数種の Par 複合体の凝集体が観察された。その凝集メカニズムや、各凝集体の構造について以下に議論する。

4.3.1. 極性形成で形成される凝集体の性質

S2 細胞における Par 極性の形成過程では、複数種の凝集体が観察された。特に、Par-island のような不定形でダイナミックな挙動を持つ構造はこれまで報告されていない。しかしながら、ショウジョウバエ NB にも Par-island に類似する構造が確認された (Oon & Prehoda, 2019)。さらに、その挙動について詳述はされていないものの、線虫初期胚においても類似した構造が存在していた (Wang *et al*, 2017)。ショウジョウバエの上皮細胞や雌性卵祖細胞においても、Par 複合体が斑状に凝集することが知られている (Jiang *et al*, 2015; Inaba *et al*, 2015)。これらの点は、Par-island のような凝集体は人工的な系でのみ観察される構造ではなく、生体内にも存在することを示唆している。一方で、これらの凝集体の挙動や微細構造は、これまで検討されてきていなかった。そこで本項では、凝集体である Par-dot と Par-island のそれぞれについて、再構成系における挙動や微細構造などについて議論する。

4.3.1.1. Par-dot についての考察

極性形成の初期において観察される Par-dot は、線虫の初期胚やショウジョウバエの上皮細胞における Par 極性形成の初期段階でも類似した構造が発見されている。線虫において観察される Par 複合体の凝集体は、Par-6-aPKC-Cdc42 複合体、もしくは Par-6-aPKC-Par-3 複合体のいずれかによって構成されており、Par-3 と Cdc42 の共局在は観察されない。しかしながら、S2 細胞で観察された Par-dot はすべて Par-3-Par-6-aPKC が共局在する構造だった。つまり、Cdc42 と結合する Par-6 が観察されなかった。ショウジョウバエ神経幹細胞や上皮細胞では、活性状態の GTP 結合型 Cdc42 が Par-6-aPKC 複合体と結合することが知られている (Hutterer *et al*, 2004; Atwood *et al*, 2007)。これらの点から、S2 細胞では基本的に不活性状態の GDP 結合型 Cdc42 が多く存在しており、Par 極性形成への Cdc42 への関与は大きくないことが考えられる。

線虫の初期胚における点状の Par 複合体の凝集の直径は約 0.5 μ m を示し、その内部には 1 分子プルダウンアッセイによって 6~12 個程度の aPKC が含まれていることが示唆されている (Dickinson *et al*, 2017)。対して、S2 細胞の Par-dot の直径はおよそ 0.3~1 μ m 程度である。線虫の初期胚における凝集体の直径を踏まえると、S2 細胞の Par-dot は内部に 3~24 個程度の Par 複合体が含まれた重合体であることが予想される。

4.3.1.2. Par-island についての考察

Par 極性を構成している Par-island には (1) 均一な基本構造によるメッシュワークを内部に持つ、(2) 不定形でダイナミックに動く、(3) 曲率が高い、という特徴が観察された。以下では、それぞれの特徴について議論する。

4.3.1.2.1. 基本構造の存在

Par-island の内部では、長さ 0.4 μ m、幅 0.2 μ m のヒモ状の基本構造が繰り返し構造を持っていることが示唆された。Par 複合体の構成因子である Par-3 の CR1 ドメインは螺旋状に自己会合し、ヒモ状構造を形成することが *in vitro* で観察されている(図 25A-C; Zhang *et al.*, 2013)。さらに、Par-3 Δ CR1 の発現では Par-island が形成されなかった。これらの点から、Par-3 の自己重合による螺旋構造が Par-island のヒモ状の基本構造に内包されていることは十分に考えられる (図 25D に予想図を示した)。

Par-3CR1 ドメインによるヒモ状構造と Par-island の基本構造の幅を比較すると、それぞれ 10nm と 200nm で大きく差がある。このため、Par-3CR1 ドメインによるヒモ状構造が複数本集合して基本構造を形成している可能性が考えられる。ただし、構造解析がなされた Par-3 CR1 ドメインは 83 アミノ酸残基で、Par-3 全長の約 1/20 である。さらに、本研究でイメージングに使用しているのは C 末端に GFP が結合した Par-6 である。Par-6 は Par-3 CR1 よりも C 末端側のドメイン、すなわち螺旋構造の外側で Par-3 と結合するため、Par-island の基本構造が単一の Par-3 CR1 によるヒモ状構造から形成されている可能性は否定できない。蛍光タンパク質を Par-3 に結合させ基本構造の幅を検討するなど、さらなる構造解析が必要である。

Par-3CR1 ドメインによるヒモ状構造は、*in vitro* で数百 μ m の長さを持つことは示されているが、その長さの規則性や、ヒモ状構造が *in vivo* で取りうる長さなどは報告されていない。一方で、Par-island の基本構造は長さ 0.4 μ m であることが示唆された。基本構造の長さが均一になるメカニズムとしては以下の二つが考えられる。第一に、アクチンや微小管などのフィラメント構造に見られるような、重合と脱重合の平衡によって長さが決定されている可能性である。第二に、スペクトリンを代表とする細胞表層上に分布するひも状タンパクが定規の役割を果たしている可能性である。これらの可能性を検討するためには、定規となるタンパク質の候補の免疫染色などが必要である。長さを決定づける要素が明らかになれば、基本構造の形成メカニズムの解明にも寄与することが期待される。

Par-3 の CR1 ドメインを欠失させると、Par-island は形成されず極性状態の細胞も減少した。また、*in vivo* のショウジョウバエ卵母上皮細胞においても、CR1 ドメインの欠失によって細胞極性が形成されなくなる (Benton & St Johnston, 2003)。S2 細胞における Par-3 Δ CR1 の表現型を踏まえると、*in vivo* における Par-3 Δ CR1 発現による Par 極性形成の異常も Par 複合体の凝集や内部構造の異常から生じている可能性も推測される。一方で、S2 細胞で Par-3 Δ CR1 を発現させると Par 複合体の小さな凝集体も観察された。Par 複合体では、Par-3 による自己会合だけでなく、Par-6 と aPKC による相互作用による重合体の形成も示唆されている (Feng *et al.*, 2007)。従って、Par-3 の自己会合がないにも関わらず凝集体が形成されたのは、Par-6-aPKC 複合体の相互作用による重合体形成が原因である可能性が高い。

内在性の Par-6 や aPKC のノックダウンをした条件においても Par 複合体は形成されると考えることから、Par-6 や aPKC と同様に Par-3 も細胞質に分布しておりメッシュワーク構造は形成されていないと考えられる。ただし、実際には Par-3 の分布は未確認であり、ノックダウンにより Par 複合体形成能が破綻している可能性も否定できないため、抗体染色などによる Par-3 の分布検証は今後必要である。

Par-island が形成される過程では、単一の基本構造や、数個の基本構造が連なったヒモ状の構造が細胞表層上で形成されていただけでなく、コの字型の構造に対して基本構造が合体し、多角形の構造を形成する様子も観察された。この点から、基本構造は単独で動くことができ、基本構造間で結合できることが示唆され、基本構造が集合することで Par-island のメッシュワーク構造を

形成していると考えられる。このとき、基本構造がメッシュワークを形成するメカニズムとしては、基本構造は細胞膜上でメッシュ様に分布する細胞骨格系タンパク質と相互作用を持つ可能性などが考えられる。多数の基本構造がどのように組み合わせることでメッシュワーク構造が形成されるのかは今後も解析が必要である。

ヒモ状構造やメッシュワークを形成することから、基本構造はその端の部位でのみ他の基本構造と結合できると考えられる。そのメカニズムの詳細は不明だが、可能性として Par 複合体の構成因子間の相互作用が重要な役割を果たすことが考えられる。その場合、Par 複合体間の相互作用の変化によって、Par-island 内部のメッシュワーク構造にも影響が生じることが予想される。実際に、Par-3S980A の過剰発現によって Par-3 のターンオーバーが発生しない場合、Par 複合体の凝集体内部には基本構造やメッシュワーク構造は明確でなかった。これらの点から、Par-3 のターンオーバーといった Par 複合体の構成因子間の相互作用は、基本構造の結合や解離に影響を及ぼすことが考えられる。

細胞極性を形成する因子において、Par 複合体のようにメッシュワーク構造を持つものはこれまでに報告されていないが、細胞表層で凝集するタンパク質において Par-3 のようなヒモ状のポリマー形成能を持つ因子ならば、メッシュワーク構造を形成する可能性はある。メッシュワーク構造形成能が Par 複合体に特有なものであるかは非常に興味深い解析対象である。

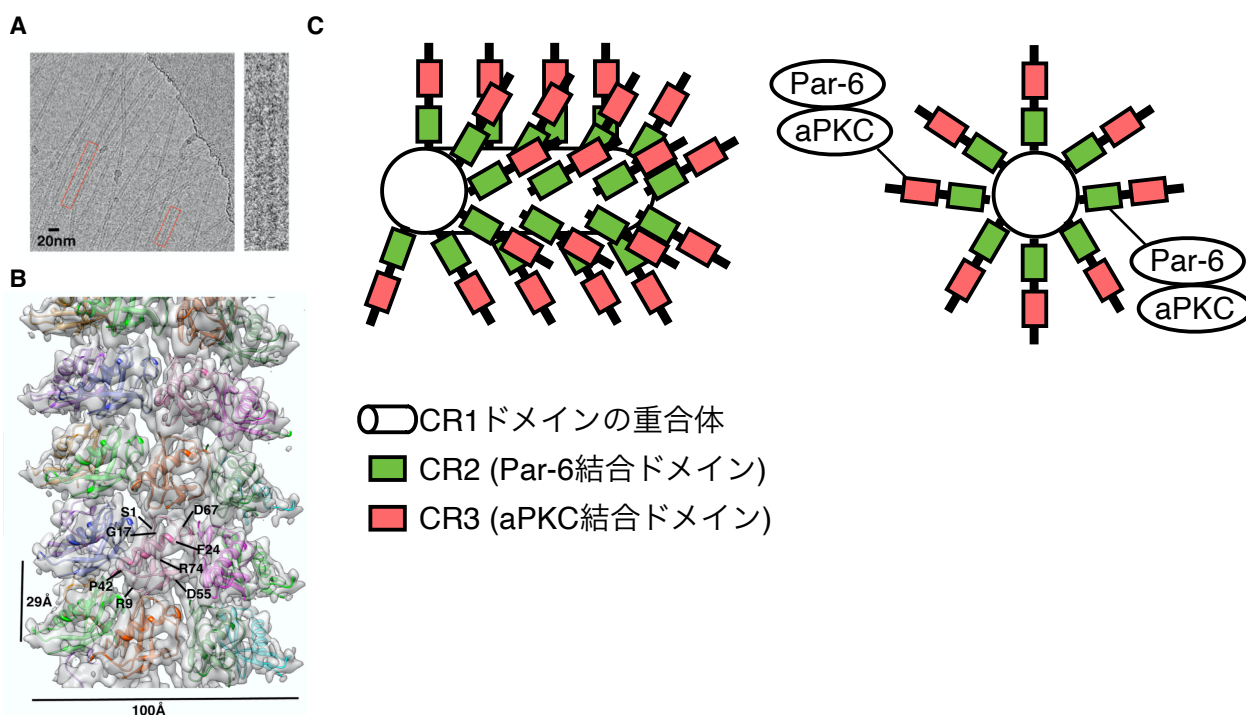


図 25. Par-3 CR1 ドメインの重合体と Par-island の基本構造の予想図

(A, B) Par-3 CR1 ドメインの自己会合によるヒモ状構造 (Zhang *et al*, 2013 より抜粋)。A. Par-3 CR1 ドメインによるヒモ状構造をクライオ電子顕微鏡で撮影したもの。右パネルは単一のヒモ構造の拡大図。スケールバーは20nmを表す。B. Aの撮影像から Par-3 CR1 ドメインの重合体を再構成し、横から見た図。各色のドメインが単一の Par-3 CR1 ドメインを表す。反時計回りの螺旋構造を持ち、螺旋の一周には 8.2 個の Par-3 CR1 単量体が含まれている。直径は 10nm、螺旋の周期は 2.9nm を示す。(C) Par-island の基本構造の想像図。Par-3 CR1 ドメインによる重合体が核となり、その周囲に Par-6 や aPKC が結合している構造が予想される。上段には重合体の長軸から見た想像図、下段には断面図の想像図を示した。CR1 ドメインの重合体の外側において、Par-3 の単量体それぞれに aPKC-Par 複合体が結合していると考えられる。このような構造が複数集合し、束になることで基本構造となっている可能性も考えられる。

4.3.1.2.2. 不定形の形態とダイナミックな動態

Par-island は常に変形・解離・集合を繰り返す特有の動態を持っていた。前項で取り上げた基本構造は、個別に Par-island から離脱や結合を行っている様子が観察されている。さらに、これらの基本構造は単独で動くことができている。これらの点から、Par-island とその周囲の間で基本構造の結合と解離が繰り返し発生している可能性が高い。Par-island の周縁部にいる基本構造が結合する角度が変わることで Par-island の変形が生じていることが予想される。これらの基本構造それぞれの動きによって、Par-island の特徴的な動態が発生していると考えられる。その詳細を明らかにするためにも、基本構造の結合メカニズムを解析することが必要である。

加えて、基本構造の動態についてもさらなる解析が求められる。物質が動くメカニズムとしては (1) 拡散によるランダムな動き、(2) 別の因子による動く方向の誘導、などが考えられる。まずいずれのメカニズムが働いているかについては、個別の基本構造の移動距離の平均二乗変位の解析などを行うことで検討できると考えられる。

4.3.1.2.3. Par-island はなぜ高い曲率を持つのか？

Par-island が結合している細胞膜は、通常よりも高い曲率を持っていることが示された。まず、Par 複合体の凝集体と細胞質では相が異なると予想される。また、Par 複合体が細胞内で凝集する様子から、Par 複合体は細胞質との相互作用よりも、自身との相互作用において自由エネルギーが小さくなると予想される。したがって、Par-island の表面部分では、自由エネルギーの最小化のために細胞質との相互作用を最小にする力、すなわち、Par-island の表面積を最小にする表面張力が働くことがと予想される。一方で、細胞表層にはアクトミオシンネットワークが存在しており、弾性力を持つ。従って、Par-island が分布する領域における細胞膜の曲率は、(1) 曲率を上げる方向に働く Par 複合体の表面張力、(2) 曲率を下げる方向に働くアクトミオシンネットワークによる弾性力、の両者がバランスを取ることで決定していると考えられる。前者は曲率を下げる方向に、後者は曲率を上げる方向に働く力である。Par-3 Δ MAR の発現によって Par-island が細胞膜に結合しない場合では、曲率を下げる方向に働く細胞表層からの力を受けなくなる。そのため、(1) の Par 複合体の表面張力のみが働いて Par 複合体が球状の凝集体を形成する。野生型の Par-3 が発現しており Par 複合体の凝集体が細胞膜に結合できる場合、Par 複合体が球状になろうとする力が細胞膜上で働き、曲率が上昇する。同時に、細胞表層の弾性力により、曲率を上昇させる力は抑制される。この両者の力の均衡が取れた結果、Par-island が結合する細胞膜はやや凸型の形状を持ち、通常よりも高い曲率を示すようになる。最後に、Par-island が細胞膜に結合した状態において、Latruncrin B の添加によってアクチンネットワークを破壊すると、細胞表層の曲率を下げようとする力が急激に弱まる (図 24F)。一方で、Par 複合体はそのまま細胞膜に結合するため、Par-island が球状になろうとする力だけが働く。その結果、Par 複合体がより細胞膜から突出した位置で球状の凝集体を形成したと考えられる。ショウジョウバエ神経幹細胞では、極性形成時に Par 複合体が頂端側に凝集しており、その局在領域が凸型になっている。これらの点は、Par 複合体の凝集がより球状になろうとする性質や、結合する細胞膜の曲率を上げる現象は Par 複合体の本質的な性質であることを示唆している。

4.3.2. Par 複合体が凝集するメカニズム

Par 複合体の凝集体である Par-island は不定形でダイナミックな挙動を持っている。さらに、Par-3 Δ MAR の過剰発現では時間経過と共に複数の凝集体が凝集し、球形の凝集体が形成されてい

く様子が観察された。これらの特徴は、液滴が持つ特徴と類似している。Par-island をはじめとする Par 複合体の凝集が実際に液体状の性質を持つかを検討するためには、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 法を用いた Par 複合体の凝集体における分子の流動性の計測や、精製タンパク質を利用した生化学的な解析などによる検討が必要である。また、Par-island はメッシュワーク構造を持っていた。この構造と Par 複合体の流動性がどのような関係にあるのかが理解できれば、Par 複合体の性質について新たな知見が得られると考えられる。

近年、細胞内で膜を持たないタンパク質の凝集が形成されるメカニズムとして、液液相分離が着目されている (Hyman *et al*, 2014; Banani *et al*, 2017)。Par 複合体は液滴と類似した振る舞いも示していたことから、Par 複合体と細胞質のあいだで液液相分離が発生することで、Par 複合体が凝集していても不思議ではない。仮に Par 複合体の凝集が液液相分離によって発生している場合、その発生タイミングは pH や ATP の濃度に影響を受けるため、一時的に凝集体を形成させることが可能である。特定のタイミングでのみ凝集体を形成できれば、例えば細胞分裂の開始と並行して凝集体を形成させることも容易であると予想される。そのため、他の細胞機能と Par 複合体の凝集を協調させるためにも、Par 複合体の凝集が液液相分離によって発生するメリットは大きいと考えられる。

Par 複合体と細胞質の液液相分離が発生している可能性を検討する際に、検討すべき点が二点考えられる。第一に、Par-3 Δ MAR は 368 残基を欠失させたタンパク質である点である。そのため、球状の構造は液滴ではなく、膜結合以外の機能も損害された Par-3 が凝集している可能性もある。この可能性を検討するためには、アミノ酸欠失以外の方法で Par-3 と細胞膜の結合を阻害した状態において、Par 複合体を観察する必要がある。Par-3 は MAR 領域で静電的な結合によって膜と結合する。そのため、MAR 領域にアミノ酸置換を加えた Par-3 変異体の過剰発現を行えば、細胞質で形成される Par 複合体の凝集が液滴状であるかを検討できると考えられる。第二に、細胞膜上に形成される Par 複合体の凝集体である Par-island も、液液相分離によって形成されている可能性が高い。液液相分離では、分子がすべてひとつの液滴へと凝集することが予想され、実際に細胞質内では Par 複合体がすべて集合しひとつの凝集体を形成していた。しかしながら興味深いことに、定常状態においても Par-island は単一の凝集体を形成せず、複数の凝集体が常に存在していた。この原因として、細胞質と細胞膜上では発生している液液相分離の様式が異なっている可能性が考えられる。実際に液液相分離には、相を構成する分子の粘性によって複数のパターンが生じることが示されている (Koyama *et al*, 2009)。Par-island が形成されている細胞膜上は二次元的な空間で、細胞質の三次元的な空間とは大きく状況が異なる。そのため、細胞質の凝集体と Par-island では異なるパターンの液液相分離を引き起こしていたとしても不思議ではない。これらの可能性を検討するためにも、まずは精製タンパク質を利用した生化学的な解析などによって、Par 複合体が液液相分離によって凝集可能であるかを検討する必要がある。

4.4 S2 細胞の Par 極性の分布の状態が二相に分かれるメカニズム

Par-island の分布は Par-3 の発現誘導から数時間後には定常状態となる。このとき、極性を持つ細胞と極性を持たない細胞の 2 つの状態が形成され、この状態は最低でも数時間は維持される。定常状態における各状態の細胞を比較したものの、Par-3 や Par-6 は定常状態の Par-island の分布を決定づけるパラメータではなかった。定常状態の Par-island の分布決定に働いていると予想されるメカニズムについて、以下に議論する。

S2 細胞における Par-island の分布は反応拡散系に依存している可能性が高いと考えられる。その根拠として、まず、二成分の反応拡散系によるパターン形成では、成分間の相互抑制によって

パターンが安定することが知られている。また、Par 複合体を含んだ相互抑制では、互いに細胞膜との結合を排除し、結果的に Par 複合体と抑制因子は互いに相補的な分布を持つことになる。S2 細胞において、Par 複合体の抑制因子である Lgl は常に Par-island と相補的な分布を示していた。従って、Lgl と aPKC の相互抑制を内包する反応拡散系が Par-island の分布を決定する基盤になっていると考えられる。

ASI の時系列変化を検討すると、Par-3 の発現誘導から 2.5 時間後では既に 2 状態の分岐が開始しているように観察された。この時間帯の S2 細胞は、Par-island が形成されず、Par-dot のみが細胞表層に分布している状態である。従って、この結果は Par-dot が形成段階から Par-island が形成されるまでの時間帯で定常状態の Par-island の分布が決定することを示唆している。また、反応拡散系では初期条件によって最終的に形成されるパターンに変化が生じる。Par-island が形成する位置によって初期条件が決定され、その初期条件に従って反応拡散系が働いた結果、Par-island が集合もしくは離散するパターンで定常状態となることが予想される。例えば、Par-island が十分に近い距離に形成された場合はより集合した状態で安定し、逆に Par-island が離れた位置に形成された場合には Par-island 同士が出会えず分散した状態で安定する、といったパターン形成が考えられる。これらの点を検討するため、今後は Par-dot から Par-island へ成長する過程の分布変化などを 3 次元的に解析し、定常状態における Par-island の分布との関係性を検討する必要がある。

再構成系である S2 細胞の Par 極性は、形成の成功と失敗が確率的にゆらいでいる様子が観察された。対して生体内の細胞種では、基本的に Par 極性の形成が失敗しない。これは他の生命現象の基盤である Par 極性を確実に形成させるシステムが細胞種ごとに備えられているためだと考えられる。例えば、線虫の初期胚における細胞表層の流動は、失敗しうる Par 極性を確実に成功させるための補助システムであるとも考えられる。今後、S2 細胞において Par 極性の形成がゆらぐメカニズムが解明されれば、人工的な実験系で頑健な Par 極性を形成する要素を理解できると考えられる。

5. 結論と展望

本研究では、S2 細胞をモデルとした細胞自律的な Par 極性再構成系を利用し、細胞間接着や細胞分裂などの生体プロセスと Par 複合体が共役しない環境において、どのように細胞極性が形成されるのか、特に Par 複合体が取りうる構造やダイナミクスを明らかにすることを旨とした。その結果、S2 細胞では Par-3 の過剰発現によって、細胞表層において点状やヒモ状などの異なった形状の凝集体が出現し、その集合により形成された Par-island が細胞の一部へと集合していく、という極性形成のプロセスを明らかにすることができた。一方で、Par-island が細胞表層の全体に離散する場合においても、同様に一連の Par 複合体の凝集プロセスは観察され、また Par-island の集合・離散を決定づける要素は本研究では特定できなかつた。つまり、再構成系において Par 複合体による極性が形成されるメカニズムについては未解明のままである。しかしながら、本研究では細胞自律的な Par 極性形成において Par 複合体から構成される面がどのように形成されるのか、特に Par 複合体の凝集体が示す構造的な特徴を含んだ新たなモデルを提唱できた。また、本研究で着目した Par 複合体が形成した凝集体の構造的な特徴は、Par-3 の自己重合によって Par 複合体の凝集体形成が進行する可能性を示唆している。

Par-islands が持つ構造的な特徴と、細胞極性が形成されるメカニズムの関係性は本研究では不明瞭であり今後の検討が必要である。Par-islands の形成に必要な Par-3 の自己重合ドメインは、シヨウジヨウバエ卵母細胞の Par 極性の形成にも必須であることから、Par-3 の自己重合に着目することで Par-islands による細胞極性の形成メカニズムの一端が明らかになることが期待される。

文献

- Achilleos A, Wehman AM & Nance J (2010) PAR-3 mediates the initial clustering and apical localization of junction and polarity proteins during *C. elegans* intestinal epithelial cell polarization. *Development* **137**: 1833–1842
- Adams CL, Nelson WJ & Smith SJ (1996) Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* **135**: 1899–1911
- Atwood SX & Prehoda KE (2009) aPKC Phosphorylates Miranda to Polarize Fate Determinants during Neuroblast Asymmetric Cell Division. *Curr. Biol.* **19**: 723–729
- Atwood SX, Chabu C, Penkert RR, Doe CQ & Prehoda KE (2007) Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6 aPKC. *J. Cell Sci.* **120**: 3200–3206
- Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, Batlle E, Koerten HK, Peters PJ & Clevers HC (2004) Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* **116**: 457–466
- Bailey MJ & Prehoda KE (2015) Establishment of Par-Polarized Cortical Domains via Phosphoregulated Membrane Motifs Article Establishment of Par-Polarized Cortical Domains via Phosphoregulated Membrane Motifs. *Dev. Cell* **35**: 1–12
- Banani SF, Lee HO, Hyman AA & Rosen MK (2017) Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**: 285–298
- Benton R & St Johnston D (2003) *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell* **115**: 691–704
- Bergstrahl DT, Lovegrove HE & St Johnston D (2013) Discs large links spindle orientation to apical-basal polarity in *drosophila* epithelia. *Curr. Biol.* **23**: 1707–1712
- Betschinger J, Mechtler K & Knoblich JA (2003) The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**: 326–330
- Bettencourt-Dias M & Goshima G (2009) RNAi in *Drosophila* S2 cells as a tool for studying cell cycle progression. *Methods Mol. Biol.* **545**: 39–62
- Boyd L, Guo S, Levitan D, Stinchcomb DT & Kemphues KJ (1996) PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development* **122**: 3075–3084
- Brand AH & Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401–415
- Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoegge C, Gharakhani J, Jülicher F & Hyman AA (2009) Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. **324**: 1729–1732
- Broadus J & Doe CQ (1997) Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in *Drosophila* neuroblasts. *Curr. Biol.* **7**: 827–835

- Chalmers AD, Pambos M, Mason J, Lang S, Wylie C & Papalopulu N (2005) aPKC, Crumbs3 and Lgl2 control apicobasal polarity in early vertebrate development. *Development* **132**: 977–986
- Chen K, Koe CT, Xing ZB, Tian X, Rossi F, Wang C, Tang Q, Zong W, Hong WJ, Taneja R, Yu F, Gonzalez C, Wu C, Endow S & Wang H (2016) Arl2- and Msps-dependent microtubule growth governs asymmetric division. *J. Cell Biol.* **212**: 661–676
- Chen X & Macara IG (2005) Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat. Cell Biol.* **7**: 262–269
- Colombo K, Grill SW, Kimple RJ, Willard FS, Siderovski DP & Gönczy P (2003) Translation of Polarity Cues into Asymmetric Spindle Positioning in *Caenorhabditis elegans* Embryos. *Science* **300**: 1957–1961
- Conklin E (1905) The Organization and Cell Lineage of the Ascidian Egg. Philadelphia: *The Academy of Natural Sciences Philadelphia*
- Couwenbergs C, Labbé J-C, Goulding M, Marty T, Bowerman B & Gotta M (2007) Heterotrimeric G protein signaling functions with dynein to promote spindle positioning in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* **179**: 15–22
- Cowan CR & Hyman AA (2004) Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in *C. elegans* embryos. *Nature* **431**: 92–96
- Davies J (2017) Using synthetic biology to explore principles of development. *Development* **144**: 1146–1158
- Derivery E, Seum C, Daeden A, Loubéry S, Holtzer L, Jülicher F & Gonzalez-Gaitan M (2015) Polarized endosome dynamics by spindle asymmetry during asymmetric cell division. *Nature* **528**: 280–285
- Dickinson DJ, Schwager F, Pintard L, Gotta M & Goldstein B (2017) A Single-Cell Biochemistry Approach Reveals PAR Complex Dynamics during Cell Polarization. *Dev. Cell* **42**: 416–434
- Doerflinger H, Vogt N, Torres IL, Mirouse V, Koch I, Nüsslein-Volhard C & St Johnston D (2010) Bazooka is required for polarisation of the *Drosophila* anterior-posterior axis. *Development* **137**: 1765–1773
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ & Weis WI (2005) Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**: 903–915
- Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S & Vestweber D (2001) The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *The EMBO Journal* **20**: 3738–3748
- Eder AM, Sui X, Rosen DG, Nolden LK, Cheng KW, Lahad JP, Kango-Singh M, Lu KH, Warneke CL, Atkinson EN, Bedrosian I, Keyomarsi K, Kuo W-L, Gray JW, Yin JCP, Liu J, Halder G & Mills GB (2005) Atypical PKC ζ contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 12519–12524
- Etemad-Moghadam B, Guo S & Kemphues KJ (1995) Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**: 743–752

- Fan S, Hurd TW, Liu C-J, Straight SW, Weimbs T, Hurd EA, Domino SE & Margolis B (2004) Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions. *Curr. Biol.* **14**: 1451–1461
- Feng W, Wu H, Chan LN & Zhang M (2007) The Par-3 NTD adopts a PB1-like structure required for Par-3 oligomerization and membrane localization. *The EMBO Journal* **26**: 2786–2796
- Franz A & Riechmann V (2010) Stepwise polarisation of the *Drosophila* follicular epithelium. *Dev. Biol.* **338**: 136–147
- Goehring NW, Trong PK, Bois JS, Chowdhury D & Grill SW (2011) Polarization of PAR Proteins by Advective Triggering of a Pattern-Forming System. *Science* **403**: 1137–1141
- Goldstein B & Macara LG (2007) The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization. *Cell* **13**: 529–536
- Gotta M, Dong Y, Peterson YK, Lanier SM & Ahringer J (2003) Asymmetrically Distributed *C. elegans* Homologs of AGS3/PINS Control Spindle Position in the Early Embryo. *Curr. Biol.* **13**: 1029–1037
- Griffin EE, Odde DJ & Seydoux G (2011) Regulation of the MEX-5 gradient by a spatially segregated kinase/phosphatase cycle. *Cell* **146**: 955–968
- Guo S & Kemphues KJ (1995) *par-1*, a Gene Required for Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser / Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed. *Cell* **81**: 611–620
- Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, Owen DM, Pereira PM & Henriques R (2016) Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nat. Commun.* **7**: 12471
- Hamill DR, Severson AF, Carter JC & Bowerman B (2002) Centrosome maturation and mitotic spindle assembly in *C. elegans* require SPD-5, a protein with multiple coiled-coil domains. *Dev. Cell* **3**: 673–684
- Harris TJC & Peifer M (2005) The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **170**: 813–823
- Heisenberg C-P & Bellaïche Y (2013) Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell* **153**: 948–962
- Hirose T, Karasawa M, Sugitani Y, Fujisawa M, Akimoto K, Ohno S & Noda T (2006) PAR3 is essential for cyst-mediated epicardial development by establishing apical cortical domains. *Development* **133**: 1389–1398
- Hoege C, Constantinescu A-T, Schwager A, Goehring NW, Kumar P & Hyman AA (2010) LGL can partition the cortex of one-cell *Caenorhabditis elegans* embryos into two domains. *Curr. Biol.* **20**: 1296–1303
- Horikoshi Y, Suzuki A, Yamanaka T, Sasaki K, Mizuno K, Sawada H, Yonemura S & Ohno S (2009) Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J. Cell Sci.* **122**: 1595–1606
- Horvitz HR & Herskowitz I (1992) Mechanisms of Asymmetric Cell Division: Two Bs or Not Two Bs, That Is the Question. *Cell* **68**: 1–10

- Hung TJ & Kemphues KJ (1999) PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* **126**: 127–135
- Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG & Margolis B (2003) Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat. Cell Biol.* **5**: 137–142
- Hurov JB, Watkins JL & Piwnicka-Worms H (2004) Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr. Biol.* **14**: 736–741
- Hutterer A, Betschinger J, Petronczki M & Knoblich JA (2004) Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev. Cell* **6**: 845–854
- Hyman AA, Weber CA & Jülicher F (2014) Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**: 39–58
- Ikeshima-Kataoka H, Skeath JB, Nabeshima Y, Doe CQ & Matsuzaki F (1997) Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* **390**: 625–629
- Inaba M, Venkei ZG & Yamashita YM (2015) The polarity protein Baz forms a platform for the centrosome orientation during asymmetric stem cell division in the *Drosophila* male germline. *eLife* **4**: 1–14
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T & Tsukita S (2001) Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J. Cell Biol.* **154**: 491–497
- Izumi Y, Hirose T, Tamai Y, Hirai S, Nagashima Y, Fujimoto T, Tabuse Y, Kemphues KJ & Ohno S (1998) An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J. Cell Biol.* **143**: 95–106
- Izumi Y, Ohta N, Hisata K, Raabe T & Matsuzaki F (2006) *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat. Cell Biol.* **8**: 586–593
- Izumi Y, Ohta N, Itoh-Furuya A, Fuse N & Matsuzaki F (2004) Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *J. Cell Biol.* **164**: 729–738
- Januschke J & Gonzalez C (2010) The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in *Drosophila* neuroblasts. *J. Cell Biol.* **188**: 693–706
- Januschke J, Reina J, Llamazares S, Bertran T, Rossi F, Roig J & Gonzalez C (2013) Centrobin controls mother-daughter centriole asymmetry in *Drosophila* neuroblasts. *Nat. Cell Biol.* **15**: 241–248
- Jaulin F, Xue X, Rodriguez-Boulan E & Kreitzer G (2007) Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells. *Dev. Cell* **13**: 511–522
- Jiang T, McKinley RFA, McGill MA, Angers S & Harris TJC (2015) A Par-1-Par-3-Centrosome Cell Polarity Pathway and Its Tuning for Isotropic Cell Adhesion. *Curr. Biol.* **25**: 2701–2708
- Joberty G, Petersen C, Gao L & Macara IG (2000) The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat. Cell Biol.* **2**: 531–539

- Johnston CA, Hirono K, Prehoda KE & Doe CQ (2009) Identification of an Aurora-A/PinsLINKER/ Dlg Spindle Orientation Pathway using Induced Cell Polarity in S2 Cells. *Cell* **138**: 1150–1163
- Johnston DS (2018) Establishing and transducing cell polarity: common themes and variations. *Curr. Opin. Cell Biol.* **51**: 33–41
- Kemphues K (2000) PARsing Embryonic Polarity. *Cell* **101**: 345–348
- Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG & Cheng NS (1988) Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**: 311–320
- Kiyomitsu T (2019) The cortical force-generating machinery: how cortical spindle-pulling forces are generated. *Curr. Opin. Cell Biol.* **60**: 1–8
- Klinkert K, Levernier N, Gross P, Gentili C, Tobel von L, Pierron M, Busso C, Herrman S, Grill SW, Kruse K & Gönczy P (2019) Aurora A depletion reveals centrosome-independent polarization mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *eLife* **8**: 316
- Knoblich JA (2008) Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* **132**: 583–597
- Kojima Y, Akimoto K, Nagashima Y, Ishiguro H, Shirai S, Chishima T, Ichikawa Y, Ishikawa T, Sasaki T, Kubota Y, Inayama Y, Aoki I, Ohno S & Shimada H (2008) The overexpression and altered localization of the atypical protein kinase C lambda/iota in breast cancer correlates with the pathologic type of these tumors. *Hum. Pathol.* **39**: 824–831
- Koyama T, Araki T & Tanaka H (2009) Fracture phase separation. *Phys. Rev. Lett.* **102**: 065701
- Krahn MP, Bückers J, Kastrup L & Wodarz A (2010a) Formation of a Bazooka-Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia. *J. Cell Biol.* **190**: 751–760
- Krahn MP, Klopfenstein DR, Fischer N & Wodarz A (2010b) Membrane Targeting of Bazooka/PAR-3 Is Mediated by Direct Binding to Phosphoinositide Lipids. *Curr. Biol.* **20**: 636–642
- Kuchinke U, Grawe F & Knust E (1998) Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr. Biol.* **8**: 1357–1365
- Lang CF & Munro E (2017) The PAR proteins: from molecular circuits to dynamic self-stabilizing cell polarity. *Development* **144**: 3405–3416
- Lemmers C, Michel D, Lane-Guermonprez L, Delgrossi M-H, Médina E, Arsanto J-P & Le Bivic A (2004) CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **15**: 1324–1333
- Levayer R & Lecuit T (2012) Biomechanical regulation of contractility: spatial control and dynamics. *Trends in Cell Biology* **22**: 61–81
- Li B, Kim H, Beers M & Kemphues K (2010) Different domains of *C. elegans* PAR-3 are required at different times in development. *Dev. Biol.* **344**: 745–757
- Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD & Pawson T (2000) A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.* **2**: 540–547

- Loyer N & Januschke J (2018) The last-born daughter cell contributes to division orientation of *Drosophila* larval neuroblasts. *Nat. Commun.* **9**: 1–12
- Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, Gerke V & Mostov K (2007) PTEN-Mediated Apical Segregation of Phosphoinositides Controls Epithelial Morphogenesis through Cdc42. *Cell* **128**: 383–397
- Matenia D & Mandelkow E-M (2009) The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* **34**: 332–342
- Matsuzaki F, Ohshiro T, Ikeshima-Kataoka H & Izumi H (1998) Miranda localizes staußen and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development* **125**: 4089–4098
- McCaffrey LM & Macara IG (2009) The Par3/aPKC interaction is essential for end bud remodeling and progenitor differentiation during mammary gland morphogenesis. *Genes Dev.* **23**: 1450–1460
- McGill MA, McKinley RFA & Harris TJC (2009) Independent cadherin–catenin and Bazooka clusters interact to assemble adherens junctions. *J. Cell Biol.* **185**: 787–796
- McKinley RFA, Yu CG & Harris TJC (2012) Assembly of Bazooka polarity landmarks through a multifaceted membrane-association mechanism. *J. Cell Sci.* **125**: 1177–1190
- Mohr SE, Hu Y, Rudd K, Buckner M, Gilly Q, Foster B, Sierzputowska K, Comjean A, Ye B & Perrimon N (2015) Reagent and Data Resources for Investigation of RNA Binding Protein Functions in *Drosophila melanogaster* Cultured Cells. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **5**: 1919–1924
- Morais-de-Sá E, Mirouse V & St Johnston D (2010) aPKC Phosphorylation of Bazooka Defines the Apical/Lateral Border in *Drosophila* Epithelial Cells. *Cell* **141**: 509–523
- Morin X & Bellaïche Y (2011) Mitotic Spindle Orientation in Asymmetric and Symmetric Cell Divisions during Animal Development. *Dev. Cell* **21**: 102–119
- Motegi F, Zonies S, Hao Y, Cuenca AA, Griffin E & Seydoux G (2011) Microtubules induce self-organization of polarized PAR domains in *Caenorhabditis elegans* zygotes. *Nat. Cell Biol.* **13**: 1361–1367
- Munro E, Nance J & Priess JR (2004) Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell* **7**: 413–424
- Müller HA & Wieschaus E (1996) armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **134**: 149–163
- Nagai-Tamai Y, Mizuno K, Hirose T, Suzuki A & Ohno S (2002) Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes to Cells* **7**: 1161–1171
- Nguyen-Ngoc T, Afshar K & Gönczy P (2007) Coupling of cortical dynein and G alpha proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* **9**: 1294–1302

- Nishi Y, Rogers E, Robertson SM & Lin R (2008) Polo kinases regulate *C. elegans* embryonic polarity via binding to DYRK2-primed MEX-5 and MEX-6. *Development* **135**: 687–697
- Nishimura T, Kato K, Yamaguchi T, Fukata Y, Ohno S & Kaibuchi K (2004) Role of the PAR-3–KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nat. Cell Biol.* **6**: 328–334
- O'Connell KF, Maxwell KN & White JG (2000) The *spd-2* gene is required for polarization of the anteroposterior axis and formation of the sperm asters in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *Dev. Biol.* **222**: 55–70
- Ogawa H, Ohta N, Moon W & Matsuzaki F (2009) Protein phosphatase 2A negatively regulates aPKC signaling by modulating phosphorylation of Par-6 in *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *J. Cell Sci.* **122**: 3242–3249
- Ohshiro T, Yagami T, Zhang C & Matsuzaki F (2000) Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature* **408**: 593–596
- Oon CH & Prehoda KE (2019) Asymmetric recruitment and actin-dependent cortical flows drive the neuroblast polarity cycle. *eLife* **8**: 723
- Panbianco C, Weinkove D, Zanin E, Jones D, Divecha N, Gotta M & Ahringer J (2008) A Casein Kinase 1 and PAR Proteins Regulate Asymmetry of a PIP2 Synthesis Enzyme for Asymmetric Spindle Positioning. *Dev. Cell* **15**: 198–208
- Parmentier ML, Woods D, Greig S, Phan PG, Radovic A, Bryant P & O'Kane CJ (2000) Rapsynoid/partner of inscuteable controls asymmetric division of larval neuroblasts in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **20**: 1-5
- Pellettieri J, Reinke V, Kim SK & Seydoux G (2003) Coordinate activation of maternal protein degradation during the egg-to-embryo transition in *C. elegans*. *Dev. Cell* **5**: 451–462
- Petritsch C, Tavosanis G, Turck CW, Jan LY & Jan YN (2003) The *Drosophila* myosin VI jaguar is required for basal protein targeting and correct spindle orientation in mitotic neuroblasts. *Dev. Cell* **4**: 273–281
- Petronczki M & Knoblich JA (2001) DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **3**: 43–49
- Pinal N, Goberdhan DCI, Collinson L, Fujita Y, Cox IM, Wilson C & Pichaud F (2006) Regulated and polarized PtdIns(3,4,5)P₃ accumulation is essential for apical membrane morphogenesis in photoreceptor epithelial cells. *Curr. Biol.* **16**: 140–149
- Potter CJ, Tasic B, Russler EV, Liang L & Luo L (2010) The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell* **141**: 536–548
- Prulière G, Cosson J, Chevalier S, Sardet C & Chenevert J (2011) Atypical protein kinase C controls sea urchin ciliogenesis. *Mol. Biol. Cell* **22**: 2042–2053
- Ragkousi K, Marr K, McKinney S, Ellington L & Gibson MC (2017) Cell-Cycle-Coupled Oscillations in Apical Polarity and Intercellular Contact Maintain Order in Embryonic Epithelia. *Curr. Biol.* **27**: 1381–1386

- Rodriguez J, Peglion F, Martin J, Hubatsch L, Reich J, Hirani N, Gubieda AG, Roffey J, Fernandes AR, St Johnston D, Ahringer J & Goehring NW (2017) aPKC Cycles between Functionally Distinct PAR Protein Assemblies to Drive Cell Polarity. *Dev. Cell* **42**: 1–16
- Rodriguez-Boulan E & Macara IG (2014) Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **15**: 225–242
- Rusan NM & Peifer M (2007) A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J. Cell Biol.* **177**: 13–20
- Saha S, Weber CA, Nusch M, Adame-Arana O, Hoegge C, Hein MY, Osborne-Nishimura E, Mahamid J, Jahnel M, Jawerth L, Pozniakovski A, Eckmann CR, Jülicher F & Hyman AA (2016) Polar Positioning of Phase-Separated Liquid Compartments in Cells Regulated by an mRNA Competition Mechanism. *Cell* **166**: 1572–1584
- Sartorel E, Ünlü C, Jose M, Massoni-Laporte A, Meca J, Sibarita J-B & McCusker D (2018) Phosphatidylserine and GTPase activation control Cdc42 nanoclustering to counter dissipative diffusion. *Mol. Biol. Cell* **29**: 1299–1310
- Schneider I (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **27**: 353–365
- Schober M, Schaefer M & Knoblich JA (1999) Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**: 548–551
- Schumacher JM, Ashcroft N, Donovan PJ & Golden A (1998) A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* **125**: 4391–4402
- Segbert C, Johnson K, Theres C, van Fürden D & Bossinger O (2004) Molecular and functional analysis of apical junction formation in the gut epithelium of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **266**: 17–26
- Shen C-P, Jan LY & Jan YN (1997) Miranda Is Required for the Asymmetric Localization of Prospero during Mitosis in *Drosophila*. *Cell* **90**: 449–458
- Shi S-H, Cheng T, Jan LY & Jan YN (2004) APC and GSK-3 β Are Involved in mPar3 Targeting to the Nascent Axon and Establishment of Neuronal Polarity. *Curr. Biol.* **14**: 2025–2032
- Shi S-H, Jan LY & Jan YN (2003) Hippocampal Neuronal Polarity Specified by Spatially Localized mPar3/mPar6 and PI3-Kinase Activity. *Cell* **112**: 63–75
- Siegrist SE & Doe CQ (2006) Extrinsic cues orient the cell division axis in *Drosophila* embryonic neuroblasts. *Development* **133**: 529–536
- Siller KH & Doe CQ (2009) Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* **11**: 365–374
- Slaughter BD, Unruh JR, Das A, Smith SE, Rubinstein B & Li R (2013) Non-uniform membrane diffusion enables steady-state cell polarization via vesicular trafficking. *Nat. Commun.* **4**: 1380

- Smith CA, Lau KM, Rahmani Z, Dho SE, Brothers G, She YM, Berry DM, Bonneil E, Thibault P, Schweisguth F, Le Borgne R & McGlade CJ (2007) aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *The EMBO Journal* **26**: 468–480
- Soriano EV, Ivanova ME, Fletcher G, Riou P, Knowles PP, Barnouin K, Purkiss A, Kostelecky B, Saiu P, Linch M, Elbediwy A, Kjær S, O'Reilly N, Snijders AP, Parker PJ, Thompson BJ & McDonald NQ (2016) aPKC Inhibition by Par3 CR3 Flanking Regions Controls Substrate Access and Underpins Apical-Junctional Polarization. *Dev. Cell* **38**: 384–398
- Sotillos S, Díaz-Meco MT, Caminero E, Moscat J & Campuzano S (2004) DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **166**: 549–557
- Srinivasan DG, Fisk RM, Xu H & Van den Heuvel S (2003) A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C. elegans*. *Genes Dev.* **17**: 1225–1239
- Stein von W, Ramrath A, Grimm A, Müller-Borg M & Wodarz A (2005) Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development* **132**: 1675–1686
- Suzuki A & Ohno S (2006) The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J. Cell Sci.* **119**: 979–987
- Suzuki A, Hirata M, Kamimura K, Maniwa R, Yamanaka T, Mizuno K, Kishikawa M, Hirose H, Amano Y, Izumi N, Miwa Y & Ohno S (2004) aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr. Biol.* **14**: 1425–1435
- Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M, Akimoto K, Izumi Y, Ohnishi T & Ohno S (2001) Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J. Cell Biol.* **152**: 1183–1196
- Tabuse Y, Izumi Y, Piano F, Kempthues KJ, Miwa J & Ohno S (1998) Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125**: 3607–3614
- Takekuni K, Ikeda W, Fujito T, Morimoto K, Takeuchi M, Monden M & Takai Y (2003) Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse. *J. Biol. Chem.* **278**: 5497–5500
- Tenlen JR, Molk JN, London N, Page BD & Priess JR (2008) MEX-5 asymmetry in one-cell *C. elegans* embryos requires PAR-4- and PAR-1-dependent phosphorylation. *Development* **135**: 3665–3675
- Tepass U (2012) The apical polarity protein network in *Drosophila* epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**: 655–685
- Thummel CS, Boulet AM & Lipshitz HD (1988) Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* **74**: 445–456
- Velarde N, Gunsalus KC & Piano F (2007) Diverse roles of actin in *C. elegans* early embryogenesis. *BMC Dev. Biol.* **7**: 142

- Walther RF & Pichaud F (2010) Crumbs/DaPKC-dependent apical exclusion of Bazooka promotes photoreceptor polarity remodeling. *Curr. Biol.* **20**: 1065–1074
- Wang H, Ouyang Y, Somers WG, Chia W & Lu B (2007) Polo inhibits progenitor self-renewal and regulates Numb asymmetry by phosphorylating Pon. *Nature* **449**: 96–100
- Wang S-C, Yu T, Low F, Nishimura Y, Gole L, Yu W & Motegi F (2017) Cortical forces and CDC-42 control clustering of PAR proteins for *Caenorhabditis elegans* embryonic polarization. *Nat. Cell Biol.* **19**: 988–995
- Watts JL, Etemad-Moghadam B, Guo S, Boyd L, Draper BW, Mello CC, Priess JR & Kemphues KJ (1996) par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Development* **122**: 3133–3140
- Whitman CO (1878) The Embryology of Clepsine Cambridge: *The Company of Biologist Ltd.*
- Wieschaus E, Nusslein-Volhard C & Jürgens G (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*: III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Wilehm. Roux. Arch. Dev. Biol.* **193**: 296–307
- Wirtz-Peitz F, Nishimura T & Knoblich JA (2008) Linking Cell Cycle to Asymmetric Division: Aurora-A Phosphorylates the Par Complex to Regulate Numb Localization. *Cell* **135**: 161–173
- Wodarz A, Ramrath A, Grimm A & Knust E (2000) *Drosophila* Atypical Protein Kinase C Associates with Bazooka and Controls Polarity of Epithelia and Neuroblasts. *J Cell Biol* **150**: 1361–1374
- Wu H, Feng W, Chen J, Chan LN, Huang S & Zhang M (2007) PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol. Cell* **28**: 886–898
- Wu S-L, Staudinger J, Olson EN & Rubin CS (1998) Structure, Expression, and Properties of an Atypical Protein Kinase C (PKC3) from *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **273**: 1130–1143
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI & Nelson WJ (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**: 889–901
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Izumi N, Suzuki A, Mizuno K & Ohno S (2006) Lgl mediates apical domain disassembly by suppressing the PAR-3-aPKC-PAR-6 complex to orient apical membrane polarity. *J. Cell Sci.* **119**: 2107–2118
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, Ishiyama C, Suzuki A, Hirose T, Iwamatsu A, Shinohara A & Ohno S (2003) Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr. Biol.* **13**: 734–743
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Suzuki A, Sugiyama Y, Kitamura K, Maniwa R, Nagai Y, Yamashita A, Hirose T, Ishikawa H & Ohno S (2001) PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes to Cells* **6**: 721–731
- Yu CG & Harris TJC (2012) Interactions between the PDZ domains of Bazooka (Par-3) and phosphatidic acid: *in vitro* characterization and role in epithelial development. *Mol. Biol. Cell* **23**: 3743–3753

- Yu F, Morin X, Cai Y, Yang X & Chia W (2000) Analysis of partner of inscuteable, a Novel Player of *Drosophila* Asymmetric Divisions, Reveals Two Distinct Steps in Inscuteable Apical Localization. *Cell* **100**: 399–409
- Zhang Y, Wang W, Chen J, Zhang K, Gao F, Gao B, Zhang S, Dong M, Besenbacher F, Gong W, Zhang M, Sun F & Feng W (2013) Structural Insights into the Intrinsic Self-Assembly of Par-3 N-Terminal Domain. *Structure* **21**: 997–1006
- Zhao P, Teng X, Tantirimudalige SN, Nishikawa M, Wohland T, Toyama Y & Motegi F (2019) Aurora-A Breaks Symmetry in Contractile Actomyosin Networks Independently of Its Role in Centrosome Maturation. *Dev. Cell* **48**: 631–645.e6
- Zonies S, Motegi F, Hao Y & Seydoux G (2010) Symmetry breaking and polarization of the *C. elegans* zygote by the polarity protein PAR-2. *Development* **137**: 1669–1677

謝辞

本研究を進めるにあたり、最高の研究環境を提供していただき、また常に親身なご指導と激励を賜りました松崎文雄教授に深く感謝いたします。研究の内容だけでなく、その造詣の深さや研究に取り組む姿勢から多くの事柄を学ばせていただきました。

吉浦茂樹博士には、実験テーマの立ち上げ、実験手法の基礎、結果の解釈の基礎など研究全般について多大なるご指導をいただきました。心より御礼申し上げます。藤田生水博士には常に本質的なご指摘と有意義な議論を賜っただけでなく、主論文の執筆では大変力になっていただきました。誠に感謝しております。下向敦範博士には、画像解析や統計解析の基礎などについてご教示いただきました。大変感謝しております。

理化学研究所・生命機能科学研究センターの岡田康志先生には、超解像顕微鏡によるイメージングでお力添えをいただきました。理化学研究所・生命機能科学研究センターの柴田達夫先生には、物理学的な視点から多くの助言をいただきました。本当に有難うございました。

理化学研究所・生命機能科学研究センターの林茂生先生、西村隆史先生にはプラスミドやハエの系統を供与いただいただけでなく、的確なご助言をいただきました。大変有難うございました。

副指導教官を務めてくださいました豊島文子教授、井垣達吏教授には、貴重なご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

研究室生活を送るにあたり、理化学研究所生命機能科学研究センター非対称細胞分裂研究チームの皆様には大変お世話になりました。また、事務面でサポートいただいた石外純子氏、吉田涼氏に心より感謝申し上げます。

最後に、研究生生活を送るにあたり、常に温かい支援をいただきました両親、刺激をくれた弟と妹、そして、家族としても研究者としても見守ってくれた夫に深い感謝の意を表して謝辞いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Kalyn Kono, Shigeki Yoshiura, Ikumi Fujita, Yasushi Okada, Atsunori Shitamukai, Tatsuo Shibata and Fumio Matsuzaki

Reconstruction of Par-dependent polarity in apolar cells reveals a dynamic process of cortical polarization
eLife, doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.45559>, 2019