

**DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY
LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS**

1) Roles of Cdc42-Pak2 signaling pathway in the control of cell-division axis: T. MITSUSHIMA, F. TOYOSHIMA and E. NISHIDA.

The spindle orientation is regulated by the interaction of astral microtubules with the cell cortex. We have previously shown that spindles in nonpolarized adherent cells are oriented parallel to the substratum by an actin cytoskeleton- and phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃)-dependent mechanism. Here we show that Cdc42, a Rho family of small GTPases, has an essential role in this mechanism of spindle orientation by regulating both actin cytoskeleton and PtdIns(3,4,5)P₃. In metaphase cells, Cdc42 is localized and activated in the midcortex. Knockdown of Cdc42 by RNAi suppresses PI(3) kinase activity at M phase, reduces the accumulation of PtdIns(3,4,5)P₃ in the midcortex, and induces spindle misorientation. Moreover, knockdown of Cdc42 disrupts the cortical actin structures in metaphase cells. Our results show that p21-activated kinase (PAK) 2, a target protein of Cdc42 and/or Rac1, plays a key role in regulating actin reorganization and spindle orientation downstream of Cdc42. Surprisingly, PAK2 regulates spindle orientation in a kinase activity-independent manner. βPix, a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Rac1 and Cdc42, is shown to mediate this kinase-independent function of PAK2. This study thus demonstrates that spindle orientation in adherent cells is regulated by two distinct pathways downstream of Cdc42, and uncovers a novel role of the Cdc42-PAK2-βPix-actin pathway for this mechanism.

2) Genome-wide screening of the kinases required for the control of cell division axis: S. MATSUMURA, M. HAMASAKI, M. EBISUYA, T. YAMAMOTO, E. NISHIDA and F. TOYOSHIMA

Proper spindle orientation, which is crucial for the determination of cell division axis, is essential for morphogenesis and embryogenesis. Despite proposal that it has an important function in tissue organization in mammals, the mechanisms regulating spindle orientation have been little studied outside of the invertebrates *S. cerevisiae*, *C. elegans* and *Drosophila*. We have done a genome-wide screening of the kinases required for the spindle orientation in HeLa cells and identified five genes essential for this mechanism. Inhibition of one of the kinases with the specific chemical inhibitors results in the spindle misorientation in both HeLa cells and in the epithelium cells in the mouse skin, suggesting that this kinase plays an essential role in the spindle orientation not only in the cultured cells but also in the mouse epithelium.

3) Regulatory mechanisms for the integrin traffic during mitosis: A. ANRAKU, S. MATSUMURA and F. TOYOSHIMA

Integrins are the major cell surface adhesion receptors for ligands in the extracellular matrix and play essential roles for cell adhesion, migration and the maintenance of cell polarity. The importance of the endo/exocytic cycle of integrins as a key regulator of these functions is increasingly recognized. We have studied on the integrin traffic during mitosis, and identified the kinase that is required for the correct targeting of integrins to the adhesion sites and the cleavage furrow. This kinase has shown to be required for the integrin traffic during not only M phase but also in interphase. We are now trying to identify the substrates of this kinase during integrin traffic.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY

LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS

豊島文子: イノシトールリン脂質による細胞分裂軸の制御機構 蛋白質 核酸 酵素
第53巻 第1号 pp1345-1350 2007.

豊島文子 細胞の分裂軸を決定するメカニズム *Medical Bio* 第5巻 第4号
pp68-73 2008.

満島勝、豊島文子、西田栄介: Dual role of Cdc42 in spindle orientation in adherent cell: 題6 1回日本細胞生物学会大会、横浜、2008年6月29日—7月1日

豊島 文子: 膜脂質によるスピンドル制御: 第67回 日本癌学会学術総会、名古屋 2008年10月28-30日

豊島 文子: 細胞分裂軸の制御機構: 第31回 日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会、神戸 2008年12月9-12日

2008年3月に豊島が教授として当分野に赴任した。本年度は、6月より松村が助教として赴任し、技術補佐員2名（濱崎真弓、堀恵美）と生命科学研究科修士2回の安楽亜貴子を加え、計5人で研究を立ち上げた。

当研究分野では、細胞分裂・分化と膜ダイナミクスを解明することを通じて、多細胞生物の形づくりのメカニズムを1細胞レベルで明らかにすることを目指して研究を行っている。現在、細胞分裂の軸方向を決める分子機構と、膜のリサイクリングシステムを中心に研究を行っている。

（1）細胞分裂軸制御機構における Cdc42-Pak2 経路の役割

ヒト培養細胞である HeLa 細胞は、フィブロネクチンなどの細胞外基質の上で培養すると、インテグリン依存的に細胞分裂が細胞-基質間接着面に対して平行に起こる。この分子機構におけるセリン・スレオニンキナーゼ Pak2 の機能解析を行った。RNA 干渉法 (siRNA) により内在性の Pak2 の発現を抑制すると、細胞は分裂軸方向を基質接着面に対して平行に保てなくなった。さらに Pak2 の siRNA の効果は RNA 干渉を受けない Pak2 変異体によりレスキューされたことができたことから Pak2 が分裂軸方向の制御に必須であることがわかった。次に PAK の上流因子について特に低分子量 G タンパク質 Rac1、Cdc42 の関与についても同様に RNA 干渉法を用いて解析し、両蛋白質とも分裂軸方向の制御に関わることが示された。また、Rac1、Cdc42 に結合できない Pak2 変異体では、Pak2 siRNA による分裂軸方向制御の異常をレスキューできなかったことから、Pak2 は Rac1 または Cdc42 依存的に分裂軸方向の制御を行っていると考えられる。興味深いことに、Pak2 のキナーゼ活性は分裂軸方向の制御には必要ないことがわかった。そこで、Pak2 と結合する因子に着目して検討した結果、Pak2 と結合し細胞運動などに関与することが知られている β Pix (Rac1 の GEF) が分裂軸方向の制御に必要であること、またその際 Pak2 と β Pix の結合が必須であることがわかった。Cdc42 や Pak2 は分裂期中期において細胞表層に局在し活性化していること、Cdc42 または Pak2 のノックダウンにより分裂期の細胞表層のアクチン骨格構造が減弱することから、Cdc42/Pak2/ β Pix 経路は細胞表層のアクチン骨格構造制御を介して分裂軸方向の制御を行っていることが示唆された（満島：生命科学研究科博士研究員）。

（2）細胞分裂軸制御に関わるキナーゼの網羅的スクリーニング

HeLa 細胞での細胞分裂軸方向の定量的化を利用しキナーゼの siRNA library を用いたスクリーニングを行った。スクリーニングの際、紡錘体の傾きを自動に測定するためのソフトを構築した。このソフトを利用して、候補となる遺伝子を5つ同定した。また、ヒト培養角化細胞である HaCat を用

いた3次元培養皮膚の実験系を立ち上げ、これら5つの候補の siRNA や阻害剤を用いて、多層化・角化への影響を観察し、皮膚組織構築との関連について解析している。また、候補遺伝子1つに対する阻害剤をマウスに投薬すると、皮膚基底層での細胞分裂軸方向に異常が生じることを見出した。現在、この分子機構の解明を試みている（松村）。

（3）分裂期におけるインテグリントラフィックの制御機構

インテグリンは細胞運動、細胞増殖、細胞分裂などの様々な細胞現象に関与している。また、我々は HeLa 細胞の細胞分裂軸の制御にも必須であることを見出して来た。インテグリンはエンドサイトーシスとエクソサイトーシスにより細胞膜—細胞質内をリサイクリングされており、このリサイクリングシステムは細胞運動や癌の浸潤、最近では細胞質分裂にも重要であることが分かってきた。細胞分裂期におけるインテグリントラフィックを制御するキナーゼを探索したところ、新規の制御キナーゼを見出した。また、このキナーゼは間期でのインテグリントラフィックにも必要であることが示唆された。現在、このキナーゼの基質の同定を試みている（安楽）。