

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 器官のグローバルな非対称性と一細胞の極性をつなぐ機構の解明

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名 (研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

上村 匡 (京都大学理学研究科 教授)

主たる共同研究者

藤森 俊彦 (自然科学研究機構基礎生物学研究所 教授)

3. 研究実施概要

多細胞体の構築において、様々な細胞は所属する器官あるいは体の空間軸に従って、一定の向きに非対称性(極性)を発達させる。この極性の一つが平面内細胞極性 (planar cell polarity; PCP) であり、細胞の生体内機能の発現に重要な役割を果たす。本研究課題はPCP を生み出す動作原理を解明する目的で、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の翅(はね)表皮をモデル系として解析した。さらにこの系で解明された原理が脊椎動物の器官にもあてはまるかを検証した。

(上村グループ) PCP の形成に必要な2つの分子群が発見されており、それらは種を越えて保存されている。一つはコアグループと呼ばれ、Frizzled (Fz) や7回膜貫通型非典型的カドヘリンFlamingo(Fmi) が含まれる。コアグループは器官の特定の空間軸(翅では遠近軸)に対して限局した形質膜ドメインに分布し、この局在様式が PCP 獲得に誘導的に働く。しかし、その局在を支える仕組みは明らかにされていなかった。第2のグループには1回膜貫通型非典型的カドヘリン Fat (Ft) とDachsous (Ds) が含まれ、この Ft-Ds グループはコアグループより早期に機能すると考えられている。しかしコアグループとの関係には不明な点が多い。本研究では、微小管およびFz を含む小胞(Fz 小胞)のダイナミクスを生体内定量的イメージングにより解析し、以前に提唱したFz 小胞の極性輸送モデルを検証しつつ、その動作原理に踏み込んだ。その結果、Ft とDs による遠近軸に沿った微小管の配向と、微小管極性の非対称性の調節、そしてこれらの微小管ダイナミクスに依存したFz 小胞輸送の速さと向きに関する統計的性質を見いだした。さらにこの性質を取り込んだシミュレーションにより、Fz の限局した形質膜ドメインへの分布を再現できた。以上の結果から、Ft-Ds グループとコアグループとの機能的な関係を示し、「器官の空間軸⇒微小管極性の差⇒小胞の極性輸送⇒細胞極性の獲得」へとつながるシステムの全体像を提唱した。また、生体内定量的イメージングを用いたアプローチとは別に、新しい極性制御遺伝子の同定も同時に行った。まず遺伝学的スクリーニングを行い、2つの遺伝子が PCP を制御することを新たに発見した。また、上述した3つの非典型的カドヘリンの下流シグナル伝達経路はほとんど明らかにされていない。そこでそれぞれの細胞内領域に結合する分子を探索した結果、Fmi のカルボキシル末端側細胞内領域に結合する LIM ドメインタンパク質Espinasc (Esn) を単離し、その機能を明らかにした。Esn は、コアグループのメンバーである Prickle (Pk)と同じ分子ファミリーに属するが、Pk とは異なり神経系で強く発現するタンパク質であった。esnノックアウト個体などの神経系における表現型を単一細胞レベルで解析し、Fmi-Esn 複合体は同一神経細胞に由来する樹状突起同士間での反発(姉妹樹状突起の交差忌避)に働くこと、そして他のコアグループメンバーもこの複合体と共に交差忌避に機能することを示した。

(藤森グループ) 脊椎動物の平面内極性のモデル系として、脳室内上衣細胞および卵管上皮の繊毛運動に着目し、Fmi のマウスホモログ (Celsr1-Celsr3)の機能解析を行うと共に、コアグループや種々のオルガネラなどの動態をライブイメージングで追跡できるノックインマウスなどを作製した。野生型マウスの脳室では脳室上衣細

胞の繊毛運動により、脈絡叢 (choroidplexus) から放出された脳脊髄液がクモ膜下腔 (subarachnoid space) へと還流されるが、*Celsr2* あるいは *Celsr3* ノックアウトマウスでは繊毛形成自体と運動の異常により、脳室内で正常な還流が生み出されず水頭症を発症した。マウス卵管上皮での繊毛運動や繊毛形成過程についてはほとんど先行研究がなかったので、ハイスピードカメラの画像の輝度から繊毛運動の周波数を解析する方法などを独自に開発して解析した結果、成体マウスの卵繊毛運動は局所的に高い周期性が保たれていたものの、全体として周波数が統一されていないことが明らかになった。また、卵管上皮では繊毛形成前から *Celsr1* が発現しており、卵管の長軸にほぼ直交する細胞膜ドメインに局在した。*Celsr1* ノックアウトマウスの卵管上皮では、繊毛は形成されているものの、その運動方向は軸に沿わず、卵巣から子宮方向への一方向の流れが生み出されていないことを示した。興味深いことに、ノックアウトマウスの卵管上皮での表現型は、繊毛運動の極性化不全にとどまらず、一細胞から上皮シートの3次元構造までの複数の階層にまたがっていた。具体的には、野生型では個々の細胞は軸に沿って伸びる傾向があるのに対して、ノックアウトマウスの細胞は特定の方向に沿って伸びる傾向が見られず、その頂部面は円形に近い形態をとる。また、正常発生では管腔内にせり出してくるヒダは軸に並行に、そして直線状に形成されるのに対して、ノックアウトマウスではヒダが蛇行し異常な枝分かれをして、軸に対して平行に走らないヒダが形成された。このヒダの表現型を説明可能な数理モデルを構築中であり、*Celsr1* の役割について作業仮説を提案しようとしている。以上の解析から、ショウジョウバエ翅の表現型では予想できなかった、器官の3次元構築における7回膜貫通型カドヘリン *Fmi/Celsr* の役割を発見した。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

研究開始当初においては、ショウジョウバエ、哺乳動物間の研究の融合が十分ではなかったが、ハエの研究が進展したことによって哺乳動物の重要なメカニズムを明らかにするところに至っており、目標、研究計画に対して確実な成果を得ている。

ショウジョウバエの翅(はね)表皮細胞の平面内極性に関して、Fz小胞の微小管に沿った輸送のダイナミクスを1分子イメージングにより解析し、様々な技術的困難を克服して顕著な成果を上げている。観察された結果は、単純な *biased random walk* ではなく、細胞内のコンパートメントに依存してバイアス度が異なる *random walk* で説明出来ることを見いだしている。

また、こうした一連の研究からPCP確立メカニズムとして、(1)組織の遠近軸(global cue)にそったDsの発現勾配、(2)微小管のわずかな偏り、(3)Fz, Fmiを含む小胞の極性輸送の偏り、(4)それに従った非対称性の確立、という段階があることを示した。微小管に沿った小胞輸送の定量的な解析について独自性の高い進展があり、当該分野で重要な貢献を果たしている。Fmi/Celsrとの相互作用を起点に新規シグナル分子を同定するなど、細胞内分子メカニズムについても重要な進展があった。

研究目標であるglobal cueと各細胞の非対称性をつなぐメカニズムとして、Ds発現勾配がいかに分子的に説明され、微小管配向につながるかに関してさらなる進展を期待したい。また、このメカニズムが哺乳類でどこまで保存されているかも一つの焦点であり、この点についても研究の発展を期待したい。

Cell関連誌、Nature関連誌、Genes & Development、Scienceなどを含む15報の原著論文を国際誌に発表した。招待講演(国内会議12件、国際会議21件)や学会発表(国内会議7件、国際会議4件)、ポスター発表(国内会議14件、国際会議21件)など積極的に成果を発表していることは、評価される。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

生体内定量的イメージングを用いたアプローチや新しい極性制御遺伝子の同定も行うことにより非対称性に関する新しいモデルを提唱した。このように新しい研究のためのシステムを確立したこと、及び脊椎動物にも同

様な機序を見出し、ショウジョウバエと脊椎動物の両者のギャップを埋め、定量生命科学の発展に大きく貢献した。

生命系、数理解析グループが連携した優れた体制で行われており、つまり、実験系、理論系が適切に融合され、発生における組織構築の解析とメカニズムに関して今後の発展が期待出来る研究となっている。実験と理論の融合により、「生命システムの動作原理の解明と活用のための基盤技術を創出」という戦略目標に合致した成果を示した。

マウス卵管をモデル系とした7回膜貫通型カドヘリン **Fmi/Celsr** の機能解析から、従来の **PCP** 研究では予想できなかった器官の3次元構築における役割を発見するなど、細胞の極性の問題が様々な器官のグローバルな非対称性に深く関わっていることが本研究で明らかにされており、これらの成果は、再生医療等において、重要な理論基盤となると考えられ、今後さらに広範な問題に展開されることが期待される。

2009年度に財団法人井上科学振興財団より、第26回 井上學術賞「多細胞システムの機能発現を支える細胞極性化の調節機構」を受賞したことを特筆しておきたい。

また、日本発生生物学会・アジア太平洋発生生物学会ネットワーク国際合同大会(2010年6月21日(月)ー23日(水)国立京都国際会館)の大会長として、実行委員会を組織し、企画立案から実施までを担当しており、国際的にこの分野の第一人者として、リーダーシップを発揮している。

4-3. 総合評価

細胞の集団としての挙動として上皮全体で現れる表現型としての **PCP** について、細胞内制御、細胞間制御をショウジョウバエで巧みに機序を解明するとともに、さらに組織形態レベルの階層までに迫る興味深い知見を得られた。

上村グループは、ショウジョウバエの翅原基の表皮細胞に見られる極性を制御する新規な **Cadherin** 結合分子を多数見いだすなど、堅実な研究成果を挙げており、論文発表もしっかりしている。また、藤森グループは、高度なイメージング技術を用いて、**Cadherin** がマウス卵管上皮の極性形成に関わることを示し、マウス繊毛上皮から単層の *in vitro* 再構成系を作ったことは、「平面内極性の動作」に関わる因子のバイオアッセイ系としての価値が大きく、今後の研究の展開につながる大きな成果である。

両グループの生命系、数理解析の研究者が連携した優れた研究体制で行われ、今後の「生命システム」研究のよい事例なる。

今後は、研究目標に掲げられた「平面内極性の動作原理」について、分子生物学の主流を乗り越えて、より大胆な研究の展開により、さらに深く掘り下げることが望みたい。