

「生物の発生・分化・再生」

平成 12 年度採択研究代表者

上村 匡

(京都大学ウイルス研究所 教授)

### 「単一細胞レベルのパターン形成：細胞極性の制御機構の解明」

#### 1. 研究実施の概要

発生のあらゆる局面において、個々の細胞は外界からのシグナルなどを解読し、細胞骨格を何度も再編成させて様々なベクトルの極性を発達させる。この単一細胞レベルのパターン (single-cell patterning) が正しく形成されて初めて、誕生した器官に個体の行動や生存のために必要な巧妙な機能、例えば神経活動などが賦与される。本研究では、以下の3つの single-cell patterning に注目し、個々の細胞が、自分が置かれたフィールド内の位置をどのようにして解読し、どのような分子装置を駆動させて、細胞骨格を再編成させるのかを追究する。

- (1) 上皮細胞およびニューロンの突起形成
- (2) 上皮細胞の頂部-基部軸に沿った極性化および平面内極性化
- (3) 極性変換を伴うニューロンの運動

平成13年度の研究により、表皮細胞の突起構造が発達する際に、アクチン細胞骨格の再編成を調節するフォスファターゼ Slingshot (SSH) ファミリーを発見し、Actin depolymerizing factor (ADF)/コフィリンを基質とすることを示した。また、小脳の顆粒細胞の極性変換に関わる分子の候補として、膜タンパク質 DNER を分離した。これらの新規分子の機能解析を進める。

#### 2. 研究実施内容

上村グループ(京都大学・ウイルス研究所)

- (1) フォスファターゼ Slingshot によるアクチン細胞骨格系の制御: ADF/コフィリンの脱リン酸化

表皮細胞の突起構造が発達する際に、アクチン細胞骨格の再編成を調節するフォスファターゼ Slingshot (SSH) ファミリーを発見し、Actin depolymerizing factor (ADF)/コフィリンを基質とすることを示した。また、ヒト SSH フォスファターゼは、3つの遺伝子から作られることを明らかにした。ADF/コフィリンの脱リン酸化過程は、細胞外刺激に応答した細胞形態のダイナミックな変換と共役することが報告されていたものの、そのフォスファターゼの実体は長らく不明なままであった。本研究は、細胞生物学においてこの未解決の問題に突破口を与えた。また、SSH の発見は臨床応用の可能性を秘めている。ADF/コフィリンをリン酸化するキナーゼの一つである、LIM キナーゼ 1 (LIMK1) 遺伝子の欠失は、ウィリアムズ症候群とよばれるヒト遺伝病の視覚性空間認知障害と連鎖することが報告されている。LIMK1 の逆反応をつかさどる SSH の発見は、視覚性空間認知障害の原因

追究などに新たな攻め口を与えた。

## (2) 樹状突起のパターン形成を調節する分子機構

ショウジョウバエ胚に誕生する、複雑に分岐した樹状突起を発達させる神経細胞 (dendritic arborization neuron, da neuron) に注目し、樹状突起のパターン形成の分子機構を *in vivo* で追究している。複数の GFP マーカー系統の観察から、da neuron は、分岐の複雑さが顕著に異なる少なくとも2つのサブクラスに分類できることがわかった。各々のサブクラスについて突起形成を経時的に観察したところ、第一次枝の出芽直後からそれぞれに特徴的な伸長と分岐形成を示すことが明らかになった。樹状突起のパターン形成を調節する遺伝子を体系的に分離する目的で、突起パターンに異常を示す突然変異体の分離を目指したスクリーニングを開始している。

見学グループ(京都大学・理学研究科)

哺乳類小脳の顆粒細胞の直交性運動・極性変換を再現できる組織片培養系を用い、極性変換に関与する遺伝子の探索を開始した。直交運動を起こし始めた顆粒細胞と起こす前の細胞との間で、発現する遺伝子のレパートリーの違いを検出する手法を用い、新規膜タンパク質 DNER の機能を同定した。

田畑グループ(東京慈恵会医科大学・医学部)

発生期の脳において、移動神経細胞がどのように極性を獲得しながら移動終了地点にまでたどりつくのかを観察するために、タイムラプスシステムを確立した。この方法を用いて神経細胞が細い突起を活発に伸縮させながら移動する局面を通過することを発見した。

永渕グループ(熊本大学発生医学研究センター)

プラコグロビン欠損細胞の作成に成功しその上皮形成過程を調べることにより、デスモソームがタイトジャンクション形成に関与する可能性を示した。また  $\beta$  カテニン欠損細胞の作成にも成功した。

## 3. 研究実施体制

- (1) 上村グループ
  1. 上村匡(京都大学・ウイルス研究所、教授)
  2. アクチン細胞骨格系を調節するフォスファターゼの機能解析  
神経突起のパターン形成での7回膜貫通型カドヘリンの役割  
樹状突起のパターン形成に関わる遺伝子の探索  
平面内細胞極性の形成機構
- (2) 見学グループ
  1. 見学美根子(京都大学・理学研究科、1月より講師)
  2. マウス小脳顆粒細胞の移動極性を調節する内在性因子の探索
- (3) 田畑グループ
  1. 田畑秀典(東京慈恵会医科大学・医学部、助手)
  2. 発生期脳における神経細胞移動と皮質形成の制御機構
- (4) 永渕グループ
  1. 永渕昭良(熊本大学発生医学研究センター、教授)
  2. 上皮細胞分化と上皮極性形成の分子機構

#### 4. 研究成果の発表

##### (1) 論文発表

###### 1. 上村グループ

- Ryusuke Niwa, Kyoko Nagata-Ohashi, Masatoshi Takeichi, Kensaku Mizuno, and Tadashi Uemura. Control of actin reorganization by Slingshot, a novel family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*, 108: 233-246 (2002).
- Youichi Iwai, Yuki Hirota, Koichi Ozaki, Hideyuki Okano, Masatoshi Takeichi, and Tadashi Uemura. DN-Cadherin is required for spatial arrangement of nerve terminals and ultrastructural organization of synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 19: 375-388 (2002).
- Yasuyuki Shima, Neal G. Copeland, Debra J. Gilbert, Nancy A. Jenkins, Osamu Chisaka, Masatoshi Takeichi, and Tadashi Uemura. Differential Expression of the Seven-pass Transmembrane Cadherin Genes *Celsr1-3* and Distribution of the Celsr2 Protein during Mouse Development. *Developmental Dynamics*, 223: 321-332 (2002).
- Yuko Shimada, Tadao Usui, Shinichi Yanagawa, Masatoshi Takeichi, and Tadashi Uemura. Asymmetric colocalization of Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, and Dishevelled in planar cell polarization. *Current Biology* 11: 859-63 (2001).
- Youhei Kataoka, Masatoshi Takeichi, and Tadashi Uemura. Developmental roles and molecular characterization of a Drosophila homologue of Arabidopsis *Argonaute1*, the founder of a novel gene superfamily. *Genes to Cells* 6:313-25 (2001).

###### 2. 見学グループ

- Takao Yamasaki, Kousuke Kawaji, Katsuhiko Ono, Haruhiko Bito, Tomoo Hirano, Noriko Osumi, and Mineko Kengaku. *Pax6* regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. *Development* 128: 3133-3144 (2001).

###### 3. 田畑グループ

- Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: Visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience* 103: 865-872 (2001)
- 田畑秀典、仲嶋一範. 子宮内マウス胎仔脳に対する電気穿孔法を用いた遺伝子導入法と神経細胞移動の可視化. *実験医学*, 19(10), 1251-1255, 2001.
- 田畑秀典、仲嶋一範. 発生期の脳における神経細胞移動の可視化. 「クローズアップ実験法 1999-2001」羊土社、3月1日、2001.

###### 4. 永渕グループ

- 永渕昭良. カドヘリン・カテニン複合体とシグナル伝達関連因子  
*実験医学 増刊 20 巻 2 号 119-124 頁 2001.*

##### (2) 特許出願

国内 3件  
国外 1件