

「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、特に以下の3つの single-cell patterningに注目している。(1) 神経突起(樹状突起と軸索)のパターン形成。(2) 極性変換を伴うニューロンの運動。(3) 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。

7回膜貫通型カドヘリンが、樹状突起と軸索の伸長を制御していることを明らかにし、その作用が少なくとも部分的に Rho family GTPase と関わることを示唆する結果を得た。また、情報の入力や処理・蓄積に重要な役割を果たす樹状突起について、感覚細胞のクラス毎に著しく異なるパターン形成を記述し、その多様性を分子レベルで解析するために基礎を固めた。さらに、小脳の顆粒細胞の極性変換に伴う細胞移動ダイナミクスの変化を明らかにした。また極性形成期の顆粒細胞に発現する膜タンパク質DNERと細胞骨格因子Septin3の機能解析を進め、各々がニューロンの極性形成に関わることを示唆する結果を得た。

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) 7回膜貫通型カドヘリンはキノコ体ニューロンの突起形成を調節する

ショウジョウバエのキノコ体(mushroom body, MB)ニューロンにおいて、7回膜貫通型カドヘリンをコードする遺伝子 *flamingo* の役割を調べた。キノコ体ニューロンが *flamingo* の機能を失うとその樹状突起は過度に進展し、野生型のニューロンが占めるべき受容野を越えてしまった。また、Flamingoタンパク質を過剰に産生させると軸索の退縮を引き起こした。後者の現象は、RhoA の機能喪失表現型とよく似ていた。(Reuter ら、2003)

(2) 7回膜貫通型カドヘリンは光受容細胞の軸索-軸索間および軸索-標的細胞間の相

相互作用を制御している

ショウジョウバエの光受容細胞 (R cell) は、脳内の視葉にある3つの異なる層にある標的細胞に投射する。R1 から R6 までの光受容細胞はラミナ (lamina) に投射し、R7およびR8細胞はメダラ (medulla) 内の異なる2層に投射している。これらの層の中では、光受容細胞の軸索末端が、層に平行な曲面上に等間隔に配列している。我々は *flamingo* 遺伝子がR8細胞の軸索投射において2つの機能を持つことを強く示唆する結果を得た。一つは、光受容細胞の軸索間での競合的な相互作用を促すことによって正常な間隔で配列させる機能である。軸索が投射する微小領域が互いに重なり合わないように *flamingo* 遺伝子が機能しているらしい。もう一つは、R8細胞の軸索と、メダラに存在する標的細胞との安定な結合を促す機能である。(Senti ら、論文印刷中)

(3) 樹状突起パターン形成の多様性の研究

情報の入力や処理・蓄積に重要な役割を果たす樹状突起は、ニューロンのタイプ毎に著しく異なる形態をとるが、その分子機構はほとんど解明されていない。ショウジョウバエの胚後期で誕生し、胚期から幼虫期に樹状突起を発達させるdendritic arborization neuron (da neuron) は、分岐の複雑度の順に応じてクラスI-IVに分類されており、この問題の解析に優れたモデル系を提供する。我々はクラスIとIVのそれぞれに対するトランスジェニックGFPマーカーを作製し、経時観察とレーザーによる損傷の導入を組み合わせた実験を行った。クラスIに属するニューロンとは対照的に、クラスIVニューロンは、幼虫期を通してより高次の分岐を展開し続け、突起切断に対して高い反応性を示した。更にクラスIVニューロンは、互いに接するがほとんど重複することのない受容野を形成する。この受容野間の境界形成には、クラスIVニューロン間に特異的な抑制性の相互作用が必要かつ十分であり、かつ突起終末間で働いていることを明らかにした。樹状突起の多様性を生み出す分子機構を解析する目的で、クラス特異的に発現する遺伝子を探索している。(Hayashi ら、2002 ; Sugimura ら、論文印刷中)

見学グループ (京都大学・理学研究科)

顆粒細胞の直交性移動を再構成できる組織片培養系をタイムラプス共焦点顕微鏡を用いて観察し、方向転換前後での細胞移動のダイナミクスを比較解析した。その結果、方向転換の前後で先導突起の性質が変化し、異なる核移動ダイナミクスが用いられる事が明らかになった。また極性変換期に発現を開始する遺伝子として 同定したDNERとSeptin3の機能解析を行い、DNERは方向転換後の先導突起と樹状突起に特異的に発現する分子であることを明らかにした。またSeptin3が顆粒細胞を含むニューロンの軸索に強く発現する繊維タンパク質であることを明らかにした。(Eirakuら、2002)

田畑グループ (慶応義塾大学・医学部)

大脳皮質形成過程において、脳室周囲で誕生した神経細胞が、放射方向に長い双極性細胞から多極性細胞へと形態変化し、周囲を探索するような運動を行った後、再び放射方向への極性を獲得し、脳表面へ向けて直線的に移動することを観察した。

永渕グループ（熊本大学発生医学研究センター）

F9細胞に適したβカテニンおよびプラコグロビン発現ベクターを作成し、βカテニン欠損細胞、プラコグロビン欠損細胞、二重欠損細胞に導入した。それぞれの分子を発現させた細胞が元のF9細胞の性質を回復する事を確認した。βカテニン欠損細胞とプラコグロビン欠損細胞ではその増殖能が異なることを見いだした。

3. 研究実施体制

上村グループ

1. 上村匡（京都大学・ウイルス研究所、教授）
2. 樹状突起のパターン形成に関わる遺伝子の探索
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
平面内細胞極性の形成機構
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

見学グループ

1. 見学美根子（京都大学・理学研究科、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

田畑グループ

1. 田畑秀典（慶応義塾大学・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

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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- John E. Reuter, Timothy M. Nardine, Andrea Penton, Pierre Billuart, Ethan K. Scott, Tadao Usui, Tadashi Uemura, and Liqun Luo. A mosaic genetic screen for genes necessary for *Drosophila* mushroom body neuronal morphogenesis. *Development*, 130: 1203-1213 (2003).
- Shigeo Hayashi, Kei Ito, Yukiko Sado, Misako Taniguchi, Hiroko Takeuchi, Toshiro Aigaki, Fumio Matsuzaki, Hideki Nakagoshi, Teiichi Tanimura, Ryu Ueda, Tadashi Uemura, Motojiro Yoshihara, Satoshi Goto. GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis*, 34:58-61 (2002).
- Itsunari Minami, Mineko Kengaku, Peter S. Smitt, Ryuichi Shigemoto, Tomoo Hirano. Long-term potentiation of mGluR1 activity by depolarization-induced Homer1a in mouse cerebellar Purkinje neurons. *Eur. J. Neurosci.* 17,

1023-1032 (2003).

- Mototsugu Eiraku, Yutaka Hirata, Hiroshi Takeshima, Tomoo Hirano and Mineko Kengaku. Delta/Notch-like EGF-related Receptor (DNER), a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 25400-25407 (2002).
- Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima. Neurons tend to stop migration and differentiate along the cortical internal plexiform zones in the Reelin signal-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* 69: 723-730 (2002).

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：5件）