

「生物の発生・分化・再生」
平成12年度採択研究代表者

上村 匡

(京都大学大学院生命科学研究科細胞認識学分野 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、細胞は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。この細胞極性が正しく調節されて初めて、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つの細胞極性の調節機構に注目している。(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。

ほ乳類ニューロンにおいて、7回膜貫通型カドヘリンが樹状突起の形態維持に重要な役割を果たすことを明らかにし、その機能ドメインを解析した。すでに分離した結合分子の解析結果と結びつけば、7回膜貫通型カドヘリンの機能を分子レベルで明らかにできる。また、ニューロンのクラス毎に著しく異なる樹状突起パターン(伸長や分岐の複雑度)の、多様性を調節する転写因子を発見したので、その標的遺伝子の探索を開始する。上皮細胞の平面内極性については、詳細な電子顕微鏡観察を行い、微小管束の偏った配向が極性形成に重要な働きをすることを強く示唆する結果を得た。検出した微小管束の配向の意義を、直接的に問う実験を進めれば、極性形成における新しい分子作動機構を解明できる。

2. 研究実施内容

上村 匡(京都大学・生命科学研究科)

神経突起のパターン形成における7回膜貫通型カドヘリンと、その結合分子の役割

7回膜貫通型カドヘリンファミリーに属する Flamingo (Fmi) およびそのマウスホモログ Celsr2 の構造-機能解析から、これらの分子は神経突起形成において、未同定のリガンドとヘテロフィリックに結合するレセプターとして働く側面が示唆された。Celsr2 細胞外ドメインの一部と結合する、分泌因子あるいは細胞結合型分子を探索した。その結果、補体 C1q 様分子や新規サイトカイン様分子を分離した。また、ツーハイブリッド法により Fmi の細胞内ドメインに結合する因子を探索し、LIM ドメインタンパク質や Rac 活性化シグナル伝達経路に

属する因子を分離した。

平面内細胞極性における 7 回膜貫通型カドヘリンなどの細胞内局在化の機構

Fmi や Frizzled (Fz) などの平面内極性を調節する分子は、ショウジョバエの上皮細胞内で一過的に偏って分布し、この局在が極性形成に重要であることを支持する結果を得ていた。この細胞内分布の機構を明らかにする目的で、生細胞での経時観察を行い、極性形成に重要な発生段階（極性形成段階）に限局して、Fmi や Fz を含む粒子が細胞内を偏った向きに移動している事を示した。さらに標準電子顕微鏡および免疫電子顕微鏡解析から、極性形成段階に限って微小管が束となり偏った配向を示すこと、Fmi や Fz を含む粒子は脂質 2 重膜に包まれた小胞であること、そしてその小胞の少なくとも一部は微小管に近接して存在することを明らかにした。以上の結果は、検出した微小管束の配向が平面内極性形成に重要な役割を果たす可能性を強く示唆する。

樹状突起のパターン形成に関わる遺伝子の探索と解析

ニューロンのタイプごとに多様な、樹状突起パターン形成の分子的基盤を明らかにする目的で、ショウジョウバエの dendritic arborization (da) neuron を主なモデル系として引き続き解析をすすめた。da neuron は分岐の複雑度などの順に応じてクラス I から IV まで分類されており、そのクラス I ニューロンに選択的に、転写調節因子 Abrupt (Ab) が発現することを示した。さらに ab 機能喪失実験や強制発現実験から、この選択的な Ab の発現が、クラス I に特徴的な突起のパターン形成に中心的な役割を果たす事を明らかにした。Ab の標的遺伝子を探索する準備を進めている。

上皮極性形成においてアクチン線維の再編成制御システムが果たす役割の解析

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ファミリー Slingshot (SSH) を以前に発見し、アクチン線維脱重合因子コフィリンを脱リン酸化・再活性化することを明らかにしていた。ほ乳類に存在する 3 つの SSH ファミリーのメンバーのそれぞれについて、発現パターンを明らかにした。Ssh2 遺伝子の発現は神経系に限局する一方で、Ssh3 遺伝子は上皮組織や上皮由来の細胞株で発現が強かった。SSH-1 に結合する因子を探索したところ 14-3-3 を同定し、その結合によって脱リン酸化活性が負に調節されること、そして 14-3-3 と解離しアクチン線維と結合することで脱リン酸化活性が 10 倍に増強されることを示した。

見学美根子（理化学研究所・脳科学総合研究センター）

顆粒細胞の直角な方向転換を挟む二相性の細胞移動を再構成できる培養系を利用し、形態変化と移動ダイナミクスをタイムラプスレーザー共焦点顕微鏡で詳細に追跡した。そ

の結果方向転換の前後の移動相で、軸索と樹状突起にそれぞれ運命づけられた先導突起により異なる核移動ダイナミクスが駆動される事を明らかにした。また顆粒細胞の極性転換期に発現する分子DNERが神経分化誘導因子であるNotch受容体の基質として作用することを明らかにした (Kawajiら、2004)。

田畑秀典 (慶應義塾大学・医学部解剖学教室)

大脳皮質発生過程において、皮質神経細胞がどのような過程を経て移動するのかを調べるため、子宮内電気穿孔法によりGFPベクターを導入し、移動神経細胞を可視化して、その動態を解析した。その結果、脳室帯を離れた大部分の神経細胞は多極性細胞の形態をとり、複数の細かな突起を伸縮させる特徴的な運動が見られた。これらの細胞は、速度と方向を頻繁に変化させながら全体的には2 μm /時間というゆっくりとした速度で脳の表面側へと移動していた。脳室下帯で留まった多極性細胞は中間帯を走る軸索束と平行に細胞の長軸を向けており、何らかの相互作用が示唆された (Tabataら、2003)。

永渕昭良 (熊本大学・発生医学研究センター)

*syn tax in 3*は多くの上皮細胞において頂端部に局在する。今回頂端部マーカーとしてGFP-*syn tax in 3*融合タンパク質の発現ベクターを作成し、F9細胞および β カテニン・プラログロビン二重欠損細胞に導入した。上皮分化したF9細胞ではGFP-*syn tax in 3*は予想通り頂端面への局在を示した。前年度までに β カテニン・プラログロビン二重欠損細胞を上皮分化誘導すると、単細胞状態で上皮分化マーカーを発現し、細胞体の上に球状の細胞質が乗ったような独特の形態をとることを示してきた。興味深いことに、GFP-*syn tax in 3*はこの球状部位に特異的に局在した。これはカドヘリン活性のない細胞が単細胞状態でも極性を形成出来る事を示している。

3. 研究実施体制

上村グループ

- ① 研究分担グループ長：上村匡 (京都大学・生命科学研究科、教授)
- ② 研究項目：樹上突起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 研究分担グループ長：見学 美根子 (理化学研究所脳科学総合研究センター、チームリーダー)
- ② 研究項目：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 研究分担グループ長：田畑 秀典（慶應大学医学部、助手）
- ② 研究項目：発生期脳における神経細胞移動と皮質形成の制御機構

永瀬グループ

- ① 研究分担グループ長：永瀬昭良（熊本大学発生医学研究センター、教授）
- ② 研究項目：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

- Kyoko Nagata-Ohashi, Yusaku Ohta, Kazumichi Goto, Shuhei Chiba, Reiko Mori, Michiru Nishita, Kazumasa Ohashi, Kazuyoshi Kousaka, Akihiro Iwamatsu, Ryusuke Niwa, Tadashi Uemura and Kensaku Mizuno. Activation of cofilin phosphatase Slingshot by actin filaments and its negative regulation by 14-3-3 proteins. *Journal of Cell Biology*. 165: 465-471(2004).
- Tadashi Uemura and Yuko Shimada. Breaking cellular symmetry along planar axes in *Drosophila* and vertebrates. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*. 134:625-30 (2003).
- Michiru Nishita, Yan Wang, Chinatsu Tomizawa, Akira Suzuki, Ryusuke Niwa, Tadashi Uemura, and Kensaku Mizuno. Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. *J. Biol. Chem.* 279:7193-7198 (2003).
- Kaoru Sugimura, Misato Yamamoto, Ryusuke Niwa, Daisuke H. Sato, Satoshi Goto, Misako Taniguchi, Shigeo Hayashi, and Tadashi Uemura. Distinct developmental modes and lesion-induced reactions of dendrites of two classes of *Drosophila* sensory neurons. *J. Neuroscience* 23:3752-3760 (2003).
- Kirsten-André Senti, Tadao Usui, Urs Greber, Tadashi Uemura#, and Barry J. Dickson#. Flamingo regulates R8 axon-axon and axon-target interactions in the *Drosophila* visual system. *Current Biology* 13:828-832 (2003). #: corresponding authors.
- Yusaku Ohta, Kazuyoshi Kousaka, Kazumasa Ohashi, Kyoko Ohashi-Nagata, Yasuyuki Shima, Ryusuke Niwa, Tadashi Uemura, and Kensaku Mizuno. Differential activities and expression patterns of three mouse members of Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes to Cells* 8:811-24 (2003).
- Noriko Kaji, Kazumasa Ohashi, Mika Shuin, Ryusuke Niwa, Tadashi Uemura, and Kensaku Mizuno. Cofilin activation by Slingshot is required to

complete cytokinesis in animal cells. *J. Biol. Chem.* 278:33450-5 (2003).

- Subramanian A., A.Prokop, M.Yamamoto, K.Sugimura, T.Uemura, J.Betschinger, J.A.Knoblich and T.Volk. Shortstop recruits EBI/APC1 and promotes microtubule assembly at the muscle -tendon junction. *Current Biology* 13: 1086-1095 (2003).
- Mitsuharu Endo, Kazumasa Ohashi, Yukio Sasaki, Yoshio Goshima, Ryusuke Niwa, Tadashi Uemura, and Kensaku Mizuno. Control of growth cone motility and morphology by LIM-kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J. Neuroscience*, 23:2527-2537 (2003).
- Kawaji K, Umeshima H, Eiraku M, Hirano T and Kengaku M: Dual modes of migration of cerebellar granule cells guided by axonal and dendritic leading processes. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 228-240, (2004)
- Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima
Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex, *Journal of Neuroscience*, 23, 9996-10001(2003)
- Takao Honda, Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima
Cellular and molecular mechanisms of neuronal migration in neocortical development, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 14, 169-174 (2003)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：5件）