

「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) 上皮細胞の頂部-基部軸に沿った極性および平面内極性。(3) 極性変換を伴うニューロンの運動。

上皮細胞の平面内極性について、平面内の特定の軸に沿って配向する微小管に依存した細胞内膜輸送が、極性調節因子群の分布を調節することを明らかにした。また、ほ乳類ニューロンにおいて、2つの7回膜貫通型カドヘリンが神経突起形成において異なる役割を果たすことを明らかにし、その機能の違いは細胞内セカンドメッセンジャー系との共役の仕組みが違うことを示唆する結果を得た。さらに、ニューロンのクラス毎に特徴的な、樹状突起のサイズや分岐の複雑度を調節する新たな転写因子を発見した。

#### 2. 研究実施内容

上村 匡(京都大学・大学院生命科学研究科)

##### 平面内細胞極性を制御する微小管依存的な膜輸送

上皮細胞において、頂部基部軸に直交する平面内に発達する極性(平面内細胞極性)は、細胞の機能発現に重要な役割を果たす。我々は、ショウジョウバエの翅表皮における遠近軸に沿った平面極性をモデルとして研究を進め、Flamingo (Fmi) やFrizzled (Fz)などの極性調節因子が細胞境界面において一過的に偏って分布し、この局在が極性形成において重要であることを提唱してきた。生細胞経時観察と電子顕微鏡を用いたアプローチを総合して解析した結果、個々の表皮細胞において微小管が遠近軸に沿って配向していること、そして微小管に依存した細胞内膜輸送が極性調節因子群の分布を調節することを明らかにした。また、この微小管の配向はFzには依存していなかった。従って、Fzの上位で働くと考えられている非典型的カドヘリンを介する細胞間コミュニケーションが、微小管の配向を調節する可能性が考えられた。

## ほ乳類7回膜貫通型カドヘリンファミリーの神経突起形成における役割

Flamingo (Fmi) は我々がショウジョウバエで同定し、進化的に高度に保存された7回膜貫通型カドヘリンである。これまでにFmiのマウスホモログ (Celsr1, Ceslr2, and Ceslr3)のうち、Celsr2が樹状突起の形成または維持に必須であることを示した。分化したニューロンはCelsr3も発現しているため、Celsr3の機能をRNAiなどを用いて解析した結果、Celsr2とは異なる機能を担っていること、そしてその機能の違いは細胞内セカンドメッセンジャー系との共役の仕組みが違っていることを示唆する結果を得た。細胞内セカンドメッセンジャーの動態を直接的に検討する目的で、それぞれの細胞外ドメインを含む組み換えタンパク質を精製した。また、ハエおよびほ乳類分子の構造—機能解析から、7回膜貫通型カドヘリンはホモフィリックな分子間結合に加えて、未同定のリガンドとヘテロフィリックに結合する可能性が示唆されていた。そこでCelsr2の細胞外ドメインと結合する候補分子の探索方法を改良して、リガンドのスクリーニングを再開した。また、Fmiの細胞内ドメインと結合する分子を探索し、dCed-12 (線虫CED-12のオルソログ)などを分離した。

### 樹状突起パターンの多様性を支える分子機構

ニューロンの入力受容装置である樹状突起のパターンは、ニューロンのクラスごとに極めて多岐にわたっており、この突起パターンの多様性はニューロンのクラスごとに特有の機能を支えている。我々がモデル系として採用しているショウジョウバエのdendritic arborization (da) neuronは、突起サイズと分岐の複雑度を基準として、より単純で小さな突起を形成するクラスIから、最も大きく複雑な突起を発達させるクラスIVに分類されている。我々はすでにクラスIに選択的に発現する転写調節因子Abruptを発見し、そのクラスに特徴的な突起パターンを制御することを明らかにしていた。我々はクラスIVに特異的に発現する転写調節因子Knotも発見し、クラスIVパターンの形成に重要な役割を果たすことを支持する予備的な結果を得た。さらにda neuronの突起パターン形成に異常を示す突然変異体の分離を進め、高次の分岐を形成できない変異体や、過剰な突起伸長を示す変異体、樹状突起が十分に伸長できない一方で複数本の軸索を形成する変異体などが得られ、原因遺伝子のクローニングを進めている。

### 極性形成においてアクチン細胞骨格のリモデリングが果たす役割の解析

アクチン細胞骨格のリモデリングを調節するフォスファターゼ (Slingshot, SSH)ファミリーの役割を、細胞レベルあるいは個体レベルで解析する準備を進めた。神経系で強く発現するSSH2については、発現をノックダウンできるプラスミドを構築し、海馬初代培養系や脳スライス培養系でのRNAiによる機能解析を開始した。一方、上皮で強く発現するSSH3については、ノックアウトマウスを作製し、ホモ接合体が致死となることを明らかにした。

## **見学美根子 (理化学研究所・脳科学総合研究センター)**

小脳顆粒細胞の二相性移動の分子基盤を探るため、幼若マウスの小脳顆粒細胞に電気穿孔法で安定に遺伝子を導入し、スライス作成後、組織内での二相性細胞移動のダイナミクスを数日間タイムラプス顕微鏡で追跡する手法を確立した。P35ノックアウト動物を用い

てCdk5/p35シグナルの機能を解析し、Cdk5/p35シグナル経路が後期相の放射移動に特異的に関与する事を示唆する結果を得た。また顆粒細胞の極性転換期に発現する分子DNERがNotchシグナルのリガンドとして機能し、バーグマングリア細胞の放射状突起形成を制御する事を明らかにした。

#### 田畑秀典（慶應義塾大学・医学部解剖学教室）

タイムラプス解析により、皮質神経細胞の大多数は移動途中で多極性細胞の時期を経て、移動の方向と直行する接線方向に軸索様突起を伸ばすことを観察した。この結果は、多極性細胞が微小環境を感受して軸索伸展の方向を決定するための時期であることを強く示唆したので、その分子基盤を明らかにするため、この細胞に発現する膜タンパク質のスクリーニングを開始し、候補となる約300分子を得た。また、多極性細胞の形態維持に内在性因子として働くことが示唆されるMUKに関して、short interference RNAによるノックダウン等による解析を行い、この分子の軸索伸展への役割を明らかにした。抑制性のGABA作動性介在神経は皮質の腹側にある基底核から接線方向に移動して皮質に入る。この際に多極性細胞との相互作用が想定されたので、GABA作動性神経と、多極性細胞を経る非GABA作動性神経の誕生日依存的な配置を比較した。その結果、両者には相違があり、GABA作動性神経の種類ごとに、非GABA作動性神経と同じ場所に配置するものとそうでないものが存在することを見いだした(Yozuら, 2004)。

#### 永瀧昭良（熊本大学・発生医学研究センター）

上皮分化誘導可能なF9細胞において、 $\beta$ カテニン・プラコグロビン遺伝性を破壊し、カドヘリン接着、Wntシグナルが上皮構築、極性形成に果たす役割を解析した。これらの細胞は誘導により使用した全ての上皮マーカー遺伝子を発現するようになり、Wntシグナルは上皮分化には必ずしも必要でないことが示された。分化マーカーの発現を基準に分化細胞を観察したところ、細胞体の上に風船状の構造を持つ特徴的な細胞が観察された。この細胞ではアピカルマーカーが風船構造の表面に、バソラテラルマーカーが細胞体表面に局在した。さらに、風船構造と細胞体間のくびれの部分にはPAR3複合体やJAMなど極性関連因子がネックレス状に局在し、アクチン線維の環状の束も見られた。これらの観察から細胞間接着の欠如により単層の上皮構造は構築できないが、単細胞の状態で完全な頂端部—基部極性を樹立出来ることが示唆された。

### 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：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  
樹状突起パターン形成に関わる遺伝子の探索  
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

#### 永渕グループ

- ① 研究分担グループ長：永渕昭良（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

- Kaoru Sugimura, Daisuke Satoh, Patricia Estes, Stephen Crews, and Tadashi Uemura. Development of morphological diversity of dendrites in *Drosophila* by the BTB-zinc finger protein Abrupt. *Neuron*, 43: 809-822 (2004).
- Yasuyuki Shima, Mineko Kengaku, Tomoo Hirano, Masatoshi Takeichi, and Tadashi Uemura. Control of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin, *Celsr2*. *Developmental Cell*, 7:205-216 (2004).
- Birth-date dependent alignment of GABAergic neurons occurs in a different pattern from that of non-GABAergic neurons in the developing mouse visual cortex, Masato Yozu, Hidenori Tabata, Kazunori Nakajima, *Neurosci. Res.* 49(4), 395-403(2004)
- The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells, Yusuke Hirabayashi, Yasuhiro Itoh, Hidenori Tabata, Kazunori Nakajima, Tetsu Akiyama, Norihisa Masuyama and Yukiko Gotoh, *Development* 131(12), 2791-2801(2004)

##### (2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：4件）