

「生命システムの動作原理と基盤技術」

平成 18 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 教授)

「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」

1. 研究実施の概要

多細胞体の構築において、それぞれの細胞は、所属する器官あるいはボディーの非対称な空間情報を解読し、平面内細胞極性 (planar cell polarity; PCP) を獲得する。この極性の獲得が細胞の生体内機能の発現に重要であり、平面内極性形成に欠陥が生じれば、様々な器官の障害につながる事が予想される。この極性獲得機構を解明する目的で、ショウジョウバエ翅(はね)の表皮細胞をモデル系として、細胞が翅全体の遠近軸を読み取る仕組みを明らかにし、さらにその系で明らかになった原理が、脊椎動物の平面内極性にもあてはまるかどうかを検証する。以前より、極性調節因子である、7回膜貫通型受容体 Frizzled (Fz) や Flamingo (Fmi) の特徴的な細胞内局在に着目していた。そしてそれらを含む小胞 (Fz-Fmi 小胞) の挙動を観察した結果、Fz-Fmi 小胞の細胞遠位側への選択的な輸送が極性獲得に重要であることを示していた。本研究では、その極性輸送を支える仕組みを、分子遺伝学および数理的アプローチにより解明することを目指す。Fz-Fmi 小胞の変位を定量的に解析する目的で、新しいイメージングシステムのハードウェアの構築をほぼ終了した。画像取得のための条件の最適化も間もなく完了する見通しである。得られる画像データから、小胞の変位を自動的に追跡するアルゴリズムの作成を目指す。

2. 研究実施内容

1) Fz-Fmi 小胞の変位の定量的解析とモデル化

Fz-Fmi 小胞の挙動は、動的な確率変化の問題としてモデル化できる可能性がある。このモデルに基づけば、何度も微小管を乗り換える非効率な輸送が、Fz などの偏りの著しい細胞内局在を生み出す可能性がある。一方で、上皮型クラシックカドヘリン (DE-cadherin) のように、いずれの細胞境界にも分布するタンパク質については、輸送の効率が良いことが予想される。そこで、Fz::GFP で標識される小胞と DE-cadherin::GFP 小胞の変位を定量的に解析し、モデルが正しいかどうかを検証する。

小胞の変位を定量的に解析できる画像データの取得を目指して、共焦点スキャナーユニットと

電子増幅デジタル CCD カメラを導入し、新しいイメージングシステムのハードウェアの構築をほぼ終了した。部品の改善など画像取得のための条件を最適化して、高いシグナル・ノイズ比と長時間の追跡を実現しようと試みている。特に、過剰量発現できない Fz::GFP を含む小胞の微弱なシグナルを追跡するためには、この目標の達成は重要である。ハードウェアの最適化に加えて、一分子あたりの蛍光強度を高めたトランスジェニックフライの作製にも取り組んでおり、系統の樹立を終了しつつある。すでに得た予備的な画像データから、小胞の変位を自動的に追跡するアルゴリズムの作成を試みている。

2) 翅表皮細胞内で、微小管の配向や極性を調節する仕組みの解明

Fz や Fmi が働く時期に先行して、非典型的カドヘリン Fat (Ft) と Dachshous (Ds) などが極性形成に働き、翅の遠近軸情報を Fz シグナル伝達経路に伝えることを示唆するデータが報告されている。そこで、これらの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、Fz-Fmi 小胞の極性輸送を調節しているのかどうかを検討する。

Ft や Ds の分子機能を調べる手法の一つとして、それぞれの細胞内領域および膜貫通領域に結合する分子を探索している。スクリーニングの一方で、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は、表皮細胞内の微小管の配向や極性を調節しているのかもしれない(翅表皮細胞内では、翅の遠近軸方向に沿って微小管が配向する傾向があることをすでに示している)。そこで、生細胞内で微小管のプラス端を標識できるマーカーを用いて、野生株や *dachshous* 変異体の中での微小管の配向や極性を検討している。すでに、野生株あるいは *dachshous* 変異体のバックグラウンドで、微小管の成長端マーカーを発現する系統を作製したので、1) で説明したイメージングシステムを用いてデータを取得し解析中である。

3) Fz-Fmi 小胞を輸送するモータータンパク質の同定とその解析

Fz-Fmi 小胞を輸送するモータータンパク質の候補について、遺伝学的な解析を試みてきた。観察された極性異常の表現型と、候補分子をコードする遺伝子に生じた突然変異との因果関係を証明しようと試みている。また、他の候補分子を探索する目的で、培養細胞を利用して Fz 小胞の輸送をアッセイできる系の構築を開始している。

4) マウス胚における平面内極性形成を可視化できる経時観察系の構築

ショウジョウバエの系で、特徴的な細胞内局在を示す分子群のホモログは、内耳などの脊椎動物の平面内極性系においても、器官のグローバルな空間情報に従った細胞内局在を示すことが報告されている。従って、それらの脊椎動物の系においても特定の軸に沿って配向する微小管などが存在し、それに沿った極性輸送が重要な役割を果たすことが推測される。そこで、細胞骨格や細胞内小器官をマウス生体内で可視化する目的で、種々のトランスジーンを *ROSA26* 遺伝子座に挿入させたノックインマウスを作製し、経時観察系を構築する。

核および細胞膜を GFP によって可視化できるマウスは実用段階にあり、これらの胚を培養して

経時観察できる系を立ち上げようとしている。また、微小管成長端マーカーを発現するノックインマウスの作製を開始した。さらに、微小管のダイナミクスを可視化する別のプローブを開発する目的で、中心体あるいは基底小体を蛍光タンパク質で標識するトランスジーンを作製を試みている。

3. 研究実施体制

(1)「上村」グループ

①研究分担グループ長: 上村 匡 (京都大学大学院 教授)

②研究項目

- ・ ショウジョウバエ翅における平面内極性形成の解析 (極性輸送の分子基盤の解明と変位の定量化、平面内極性を調節する分子群の機能解明)
- ・ 平面内極性形成を支える細胞ダイナミクスの数理的解析とモデル構築

(2)「藤森」グループ

①研究分担グループ長: 藤森 俊彦 (京都大学大学院 助手)

②研究項目

- ・ マウス胚における平面内極性形成の解析