

「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ことを予想される。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を用いた画像取得のための条件を最適化した。画像データを取得し、小胞の変位を自動的に追跡するアルゴリズムの作成をほぼ終了した。また、また脊椎動物の平面内極性のモデル系として、マウス卵管の繊毛上皮細胞に焦点を合わせて、その極性形成の仕組みを研究できる系の立ち上げを開始した。

## 2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

### 1) Fz-Fmi 小胞の変位の定量的解析を可能にするイメージングの実現

Fz-Fmi 小胞の挙動は、” Biased random walk ” と呼ばれる、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、細胞全体の遠近軸方向の長

さに対して、Fz-Fmi 小胞が微小管に結合して一回に動く距離 ( $\delta$  値) が十分小さければ、微小管極性の偏りはわずかであっても、効率よく小胞を細胞の片側 (遠位側境界) に運び得ることが予想された。つまり、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 ( $\Delta E$ -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 ( $\delta$  値が大きい) ことが予想される。そこで、Fz::GFP で標識される小胞と  $\Delta E$ -cadherin::GFP 小胞の変位を定量的に解析し、それぞれの  $\delta$  値を求めることを目指した。

小胞の変位を定量的に解析するに足る画像データの取得を目指して、新しいイメージングシステム本体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する一方で、Fz は過剰量発現できないため一分子あたりの蛍光強度を高める試みも行った。具体的には、Fz のカルボキシル末端に EGFP を 3 コピータンデムに融合させた Fz::3xEGFP を発現するトランスジェニックフライを作製し、この融合タンパク質が、機能喪失突然変異体の表現型をレスキューできる機能分子であることを示した。最適化したハードウェアを用い、新しく作製したトランスジェニックフライを組み合わせることで、高いシグナル-ノイズ比 (S/N 比) と長時間の追跡が実現できた。得た画像データを使いながら、小胞の変位を自動的に追跡するアルゴリズムの作成をほぼ終了し、 $\delta$  値を求めようとしている。

また、Fz-Fmi 小胞と  $\Delta E$ -cadherin 小胞を同時追跡することが、両者の輸送の仕組みの違いを解明する上で理想的だと考えられた。そこで、Fz のカルボキシル末端に赤色蛍光タンパク質が融合した分子 Fz::tdTomato を発現するトランスジェニックフライを作製し、 $\Delta E$ -cadherin::GFP との 2 色イメージングを計画した。しかし残念なことに、作製した Fz::tdTomato は、ほとんど細胞境界に分布しなかったため本研究の目的には適さなかった。

## 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に向けて

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 Dachous (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した。

まず 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に結合する分子を探索した。その手法として、形質膜内およびその近傍での分子間結合を検出できる、Split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system を用い、複数の bait の適正を検討しつつスクリーニングを行った。その結果、機能未知の遺伝子産物と Ft との相互作用が検出できたが、この遺伝子の突然変異体は存在しない。この遺伝子を過剰発現させたところ、弱いながら平面内細胞極性が乱れる表現型が得られた。

Ft や Ds の結合分子を探索する一方で、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、翅表皮細胞内の微小管の配向や極性を調節する可能性も検討した。我々は本研究開始時点で、野生型の翅表皮細胞内では、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た。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、野生株と *dachsous* 変異体の中での微小管の配向や極性を検討した。その結果、遠近軸方向の微小管極性が *dachsous* 変異体の中では異常になっていた。

### 3) Fz-Fmi 小胞を輸送するモータータンパク質の探索

Fz-Fmi 小胞を輸送するモータータンパク質の候補を、トランスジェニック RNAi 法により探索した。具体的には、ショウジョウバエゲノム中に存在する Kinesin superfamily (KIF) genes の中で、12 個のそれぞれを標的としてノックダウンすることが期待される RNAi 系統コレクションを取り寄せた。どの KIF gene をノックダウンした場合に平面内極性が乱れるか検討したところ、1つの RNAi 系統で平面内極性が異常になる表現型が得られた。しかしその後候補遺伝子の突然変異体を取りよせてその表現型を解析したところ、RNAi 系統を用いて得られた結果は off-target effect による可能性を排除できなくなったので、解析を中断している。

### 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。特に、EB1 と蛍光タンパク質との融合タンパク質 (EB1-Venus) を発現するノックインマウスを昨年度に引き続き作製中である。マウス胚を体外で培養し、光毒性を可能な限りおさえて細胞系譜を追跡するイメージングシステムの確立については、論文発表に至った[1]。

マウスでの平面内極性のモデル系として、卵管を選択した。卵管の絨毛上皮細胞は、卵巣から卵管へと未受精卵を輸送する働きがあり、この運搬において卵巣-子宮の軸に沿った絨毛運動の寄与が大きいと考えられている。また上皮細胞の絨毛の発達は性周期によって変動する可能性があり、排卵期になると絨毛の運動は活発になり子宮への流れを生み出す。この平面内極性を獲得するメカニズムを明らかにする目的で、マウス卵管の組織学的な観察に加え、卵管由来の初代培養を試み始めた。

### 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、教授)

#### ②研究項目

- ・マウスにおける平面内極性形成の可視化と解析

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

[1] Kurotaki Y, Hatta K, Nakao K, Nabeshima Y, Fujimori T. Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. Science. 2007 May 4;316(5825):719-23.