

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) を発達させる。例えば哺乳類では内耳有毛細胞など様々な組織で見られ、この極性の獲得が細胞の生体内機能の発現に重要である。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いる。各々の翅表皮細胞は、必ずその遠位端に翅毛と呼ばれる細胞突起を形成する仕組みを備えており、翅毛は翅の先端に向かって伸びる。表皮細胞が翅全体の遠近軸を読み取って翅毛形成の場所を決定する仕組みを明らかにし、さらにこ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。

翅毛形成の細胞内位置の決定には 2 グループの分子群が関与する。そのグループの一つは、細胞の遠位側あるいは近位側に局在するコアグループタンパク質であり、7 回膜貫通型受容体 Frizzled (Fz) や 7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo (Fmi) が含まれる。我々はそれらを含む小胞 (Fz 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り、その輸送に中心体非依存的な微小管が必要である仮説を提出していた。この仮説を検証するために Fz 小胞の挙動を定量的に解析したところ、当初の数値モデルでは説明できない結果が得られた。そこでデータからのフィードバックをかけてモデルの改訂に取り組んでいる。

第 2 のグループには非典型的カドヘリン Fat (Ft) と Dachshous (Ds) が含まれ、これらはコアグループタンパク質群より早期に機能すると考えられているが、それらの分子機能の詳細はほとんど明らかになっていなかった。我々は Ft と Ds が中心体非依存的な微小管の、配向と極性の両方の調節に重要な役割を果たすことを明らかにし、その分子機構を追究している (投稿準備中)。さらに、平面内極性を制御する新たな分子を探索する目的で、遺伝学的スクリーニングを行い、極性異常を含む多面的な異常を示す突然変異体を多数分離した。現在それらの変異体を絞り込み、原因遺伝子をクローニング中である。脊椎動物の平面内極性のモデル系としてはマウス卵管の繊毛上皮細胞に着目し、繊毛上皮細胞においてもコアグループタンパク質が働いているかどうかを調べた。

2. 研究実施内容

1) Frizzled (Fz) 小胞の定量的解析とモデルとの適合の検証

研究開始当初に、Fz 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予想を立てた。このモデルを検討するために小胞の挙動を定量的に解析できるシステムの構築を目指して、(1) Fz 1 分子あたりの蛍光輝度を高めたトランスジェニックフライの樹立、(2) 画像取得のためのハードウェアの設置と条件の最適化、さらに (3) 画像データから小胞の変位を半自動的に追跡するアルゴリズムの作成とフィッティングを終了した。データを解析した結果、Fz 小胞の挙動は単純な "Biased random walk" から予測されたものではなかった。解析の途中において、観測した Fz 小胞群は速度の異なる少なくとも 2 成分からなることに気づき、速度の大きな成分に注目して再度解析したが、やはり当初想定した数理モデルではその挙動を説明できなかった。一方、以上の解析から、細胞内の遠近のコンパートメントのいずれに小胞が属するかで、小胞の速度分布が異なることを見いだした。この速度分布の差が Fz の細胞遠位側への特異的な局在を生み出せるかどうか、モデルの改訂に取り組んでいる。

2) 非典型的カドヘリン Fat (Ft) と Dachshous (Ds) が微小管の配向や極性を調節する仕組みの解明

Fz などのコアグループタンパク質が働く時期に先行して、非典型的カドヘリン Fat (Ft) と Dachshous (Ds) などが働き、翅の遠近軸情報を個々の細胞に伝えるのではないかと推測されている。Ft と Ds はヘテロフィリックに結合することが報告されている。興味深いことに、Ds の発現パターンは翅の遠近軸に沿って、近位側で強く、遠位側に向うにつれ減弱する。一方で我々はこれまでに、コアグループタンパク質が細胞遠位側あるいは近位側に局在し始める段階において、微小管が翅の遠近軸に沿って配向していることを見出していた。さらに、Fz 小胞がこの微小管にそって極性輸送される仮説を提出していた。ここで述べる微小管とは、中心体に端を発しない（中心体非依存的な）微小管である。

そこで、Ft と Ds を介する細胞間相互作用が、この微小管の配向を調節しているのではないかと推測し、この仮説の検証を行った。生細胞内で微小管の成長端（プラス端）を標識できるマーカーを用いて、野生型の翅における微小管の時空間ダイナミクスを定量的に解析した。また、この時空間ダイナミクスを様々な遺伝学的バックグラウンド (*ds* あるいは *ft* の機能欠失または強制発現など) でも解析し、野生型での結果と比較検討した。さらに、微小管ダイナミクスと平面内極性（翅毛の伸長方向）との関連を追究した。その結果、Ds-Ft を介する細胞間相互作用が以下のように微小管ダイナミクスと極性形成を調節することを明らかにした。(1) 微小管が翅の遠近軸に沿って配向するのに Ds が必要である。この場合、Ds は遠近軸に沿って発現勾配を形成していなくてもよい。(2) Ds の発現パターンが勾配を形成している場合、各々の細胞内において、微小管は発現レベルの低い細胞に向って成長する傾向がある。(3) 翅毛は Ds 発現の低い方に伸長する。従って (2) で述べた微小管極性の非対称性と平面内細胞極性は密接に関連していることが示唆された。現在、Ft と Ds を介する細胞間相互作用の下流で微小管のダイナミクスを調節している候補分子の役

割を調べている（以上投稿準備中）。候補分子についてその挙動が Ft や Ds によってどのように調節されているか検討する一方で、Ft や Ds に生体内で結合する分子を探索する目的のもとに、EGFP タグをほどこした Ft あるいは Ds を発現するトランスジェニック系統を樹立した。これらの融合タンパク質が機能的であるかどうかを遺伝学的に調べている。

上記のように非典型的カドヘリンの側から微小管のダイナミクスを調べるアプローチと並行して、中心体非依存的な微小管生成そのものに関わる可能性のある分子にも着目して研究した。ショウジョウバエ培養細胞系における研究から、その仕組みに関わる候補分子群が報告され dim γ -tubulin (Dgt) と命名されている。Dgt 遺伝子群の中で、トランスポゾンが挿入された系統を利用して Dgt5 完全機能喪失変異体を分離し表現型を検討した。Dgt5 突然変異ホモ接合体は幼虫期で致死となったので、モザイク解析を利用して翅の中でクローンを作成しその平面内極性を調べたが、予想に反して異常は検出できなかった。Dgt5 変異を用いた解析は現在中断している。

3) 平面内極性を調節する新規遺伝子の探索

2) で述べた Dgt5 に限らず、極性形成に関わる候補分子を挙げ、個別に個体レベルで研究するアプローチも採用してきた。しかし既知の小胞輸送や微小管を調節する分子群の中から、平面内極性に関わることを遺伝学的に示すことには成功していない。そこで、より大きなスケールで平面内極性を調節する遺伝子を体系的に探索する手法を採用した。特に X 染色体（ハエにおける第一染色体；全ゲノムの 20% を占める）については、突然変異体の網羅的な探索はなされていないので、X 染色体を対象とした変異体のスクリーニングを行った。

致死性変異を X 染色体に持つ 3000 系統を樹立し、それぞれについてモザイク解析法を用いて観察し、その中から翅毛の向きが異常になる表現型を示す 60 系統を分離した。さらに各々の突然変異について、コアグループタンパク質の細胞内局在や細胞内翅毛形成場所を観察し、その局在異常の表現型の浸透度などから絞り込みを行っている。その結果以下の表現型を示す変異に注目している。(1) 平面内極性形成だけでなく canonical Wnt pathway の働きにも異常が見られる突然変異。平面内極性を調節するシグナル伝達経路と canonical Wnt pathway とは、Fz を共有しているので、このクラスの突然変異は Fz の動態に影響を与えている可能性が想像される (*fz* 遺伝子そのものは X 染色体上にはない)。(2) *ds* 変異体や *ft* 変異体とよく似た表現型を示す変異。*ds* 遺伝子も *ft* 遺伝子も X 染色体上にはないので、この原因遺伝子の産物は Ds-Ft を介する細胞間相互作用に属して働く可能性がある。(3) 平面内極性の異常に加えて表皮細胞のパッキングが異常になる突然変異。(4) 細胞全体の Fmi タンパク質のレベルが顕著に減少する変異。これらの突然変異について原因遺伝子のマッピングを行っている。

4) マウス卵管における平面内極性形成の解析

脊椎動物の平面内極性のモデル系としてマウスの卵管に着目した。卵管は卵巣から子宮へと未受精卵と着床前胚が輸送される管であり、この輸送において卵巣-子宮の軸に沿った繊毛運動の寄与が大きいと考えられている。卵巣-子宮の軸に沿ったグローバルな情報

がどこから与えられているのかを調べる目的で、卵巣を切除し一ヶ月後に卵管上皮を観察したが、予備的な観察では卵管中の水流や繊毛の運動に異常を検出することはできなかった。マウスの卵管上皮細胞の知見はヒトやブタなどに比べて乏しいので、性周期、繊毛細胞が入れ替わるタイミング、そして繊毛の極性発達との関連を調べている。ショウジョウバエにおいて平面内極性形成を調節する分子群のホモログについて、卵管での発現を体系的に調べた結果、Flamingo の3つのほ乳類ホモログのうち、*Celsr1* 遺伝子と *Celsr2* 遺伝子が発現していた。*Celsr2* ノックアウトマウスの卵管での繊毛運動を高速度カメラで撮影し、繊毛運動の向き、周期、そして協調性を検討したが、野生型とノックアウトマウスの間で顕著な違いを検出できなかった。現在、*Celsr1* タンパク質に対する抗体を用い、ショウジョウバエ翅表皮細胞のように器官の一方向の軸に沿った分布をするかどうかを調べている。また、卵管で発現していることがわかった極性調節遺伝子の候補について、蛍光タンパク質タグした分子や優性不能型改変分子を、卵管上皮細胞で発現させる系を構築している。

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、平面内極性を調節する新たな分子群の探索と機能解明)

平面内極性形成を支える細胞ダイナミクスの数理モデル構築の検証

(2) 「藤森」グループ

①研究分担グループ長：藤森 俊彦(基礎生物学研究所、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分子基盤の解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Daisuke Satoh, Daichi Sato, Taiichi Tsuyama, Motoki Saito, Hiroyuki Ohkura, Melissa M. Rolls, Fuyuki Ishikawa, and Tadashi Uemura. Spatial Control of Branching within Dendritic Arbors by Dynein-Dependent Transport of Rab5-Endosomes. *Nature Cell Biology*, 10: 1164-1171 (2008).
2. Kazuyoshi Kousaka, Hiroshi Kiyonari, Naoko Oshima, Akira Nagafuchi, Yasuyuki Shima, Osamu Chisaka, and Tadashi Uemura. Slingshot-3 dephosphorylates ADF/Cofilin but is dispensable for mouse development. *Genesis*, 46: 246-255 (2008).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：0 件）