

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。この極性は様々な組織で見られ、細胞の生体内機能の発現に重要である。PCP を生み出す原理を解明する目的で、ショウジョウバエの翅（はね）をモデル系として解析し、さらにこの系で明らかになった原理が脊椎動物の PCP にもあてはまるかどうかを検証している。

翅の表皮細胞は遠近軸に沿った極性を発達させ、この極性の誕生には種を越えて保存された少なくとも2つの分子群が重要な役割を果たすことが、我々の成果を含む先行研究により示されていた。一つのグループはコアグループと呼ばれ、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 **Fz** を含む小胞が、表皮細胞内において翅の遠位側に向かって選択的に輸送されること、そしてその輸送に中心体非依存的な微小管が必要であることを見だし、極性輸送仮説を提出していた。この仮説を検証するために、小胞および微小管のダイナミクスを生体内で追跡し、定量的に解析できる系を構築した。測定結果を解析した結果、小胞の挙動に関する統計的性質を明らかにした。第2のグループには非典型的カドヘリン **Fat (Ft)** と **Dachsous (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。我々はこれらの非典型的カドヘリンが、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示した。また、新たな極性制御遺伝子を同定する目的で網羅的な遺伝学的スクリーニングを行い、多数の突然変異体を分離し、2つの遺伝子座について責任遺伝子の候補を特定した。さらに、脊椎動物の平面内極性のモデル系として、マウス卵管上皮および脳室内上衣細胞の繊毛に着目し、コアグループタンパク質群の細胞内局在を明らかにすると共に、7回膜貫通型カドヘリンファミリーが、上衣細胞の繊毛形成自体と、繊毛運動の極性化に重要な役割を果たすことを示した。

§ 2. 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計測、数理モデル構築、そしてその検証

(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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

3-1. Fz 小胞の挙動が示す統計則の発見

極性輸送仮説の検証には、退色を可能な限り抑えて同一の Fz 小胞の挙動を長く追跡する必要があった。この目標を達成するために技術的に困難な点を克服した。測定結果を解析した当初、一般的な "biased random walk" を念頭において Fz 小胞の変位を MSD (Mean-Square Displacement) 解析したが、顕著な統計的性質を発見できなかった。その後、Fz 小胞の速度分布に着目し、さらに極座標を導入して再度解析したところ、Fz 小胞の挙動に以下の2つの性質を見いだした。(1) 細胞内の遠近コンパートメントのいずれに小胞が属するかで、移動方向の傾向が異なる。(2) どちらのコンパートメントに属する小胞も、速度の絶対値は対数正規分布を示す。この二つの統計的性質を取り込んだシミュレーションを行ったところ、Fz の細胞遠位側への局在を再現できた。

3-2. 非典型的カドヘリン Ft と Ds による微小管ダイナミクスの調節

昨年度までの解析に引き続き、非典型的カドヘリン Ft と Ds が微小管のダイナミクスを調節する可能性を検証した。極性形成期を含む長時間の観察系を立ち上げた後¹⁾、まず生細胞内で微小管の成長端を可視化できるマーカー (EB1::GFP) を用いて、野生型の翅における微小管成長の時空間ダイナミクスを調べた。また、このダイナミクスが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) でどのように影響を受けるかを調べ、平面内極性(翅

毛の伸長方向)の異常との関連を追究した。その結果、Ft-Ds を介する細胞間相互作用は、(1) 微小管が翅の遠近軸に沿って配向するのに必要であること、そして (2) 細胞間で Ds の発現レベルに差がある場合、微小管は発現の低い細胞の側に向って成長する傾向があることを示した(微小管極性の非対称性)。以上のように、Ft と Ds は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し、極性形成の制御に寄与していることを示した。さらにセリンスレオニンキナーゼである PAR-1 が、Ft-Ds を介する細胞間相互作用の下流で微小管ダイナミクスの調節に関与することが示唆された(投稿中:[Harumoto T., Shimada Y., Bingwei Lu, and Uemura, T. Atypical Cadherins Dachsous and Fat Control Alignment and Polarity of Microtubules in Planar Cell Polarity](#))。

Ft-Ds シグナリングと PAR-1 との関係を調べる一方で、Ft と Ds の機能を別のアプローチから追究する実験を開始した。具体的には、それぞれの細胞内ドメインには特徴的なモチーフがないため、結合する分子を探索している。Ft と Ds それぞれに GFP タグをほどした分子を発現するトランスジェニック系統を樹立し、タグ抗体を用いた免疫沈降物中に含まれるタンパク質を質量分析法により解析している。少なくとも Ds::GFP 融合タンパク質については、その発現により *ds mutant* の表現型はレスキューできたので、機能的な分子であることが示された。

3-3. 新たな極性制御分子群を発見する試み

既存の分子にとらわれずに、PCP を調節する遺伝子をより大きなスケールで探索する必要から、突然変異のスクリーニングを行った。標的とする染色体として、PCP に異常を引き起こす突然変異が網羅的に探索されていなかった X 染色体(全ゲノムの 20% を占める)を選択した。突然変異を誘発した 10,000 以上の X 染色体から、一次スクリーニングで 57 系統を分離し、さらにより詳細な表現型観察から 18 系統に絞り込んだ。その中で、以下の表現型を示す突然変異のクラスに注目し、原因遺伝子のクローニングを進めている。(1) 突然変異細胞と野生型細胞とが接する境界付近の細胞だけが、極性異常を示すクラス。責任遺伝子候補の産物は、ubiquitin associated domain を持ち酵母からヒトまで保存された ubiquitin である。ユビキチン化されたタンパク質のプロテアソームによる分解を促進すると考えられているが、その特異性についてはよくわかっていない。(2) PCP の異常に加えて、表皮細胞層の細胞のパッキング(充填)に顕著な異常を示す突然変異のクラス。責任遺伝子の産物は cohesin complex のサブユニットであった。cohesin complex は分裂期細胞において、姉妹染色体間の接着に必要なタンパク質複合体として発見されたが、近年では post mitotic cell において遺伝子発現調節を行うことが報告されている。(3) 細胞全体の Fmi タンパク質のレベルが顕著に減少する一方で、DE-cadherin(上皮型古典的カドヘリン)のレベルには影響を与えない突然変異のクラス。*fmi* 遺伝子の転写あるいは Fmi タンパク質の安定性に選択的に関与する遺伝子に突然変異が起きた可能性が考えられる。

3-4. マウス卵管および脳室内上衣細胞に置ける平面内極性の解析

コアグループメンバーに属する 23 個のマウス遺伝子について卵管での発現を調べた結果、7回

膜貫通型カドヘリンファミリー (*Celsr1*-*Celsr3*) の中では、*Celsr1* 遺伝子と *Celsr2* 遺伝子が発現していた。内在の *Celsr1* タンパク質の分布を調べたところ、生後 16 日目から卵巣から子宮へ向う軸とほぼ直交する細胞境界に局在する傾向がわかった。この局在パターンはショウジョウバエ翅表皮での *Fmi* の局在とよく似ていた。コアメンバーを過剰発現させたり、タグを付加した分子を発現させて細胞内局在を調べる目的で、電気穿孔法により卵管上皮に遺伝子導入するプロトコルを樹立した。この手法により、*Vangl2::EGFP* は卵巣に近い側の細胞境界に局在することがわかった。また、*Celsr1*、*Celsr2*、そして *Celsr3* 遺伝子各々のノックアウトマウスを共同研究者から入手し、SPF 化を進めている。

野生型マウスの卵管上皮細胞における繊毛形成過程を調べたところ、組織学的解析では生後 1 日目から繊毛形成が始まっていることが確認できた。ただし、高速度カメラを用いて繊毛の動きを観察したところ生後 2 日目の段階では、卵巣—子宮の軸に沿った機能的な繊毛運動は確認できなかった。その後、生後 5 日目以降の卵管では繊毛細胞の割合が上昇するとともに、卵巣—子宮の軸に沿った滑らかな繊毛運動が確立されてくることが確認された。現在、極性をもった繊毛運動の確立と平面内極性の関係性を検討するために卵管形成過程における *Celsr1* 以外の分子の発現変化を解析している。また、卵管内の機能的な流れがどの段階で確立されるかを調べている。

卵管形成過程における上皮組織の形成、繊毛の発達、極性形成の関連性を理解するために、卵管器官培養系を樹立し、細胞動態や分子の挙動を組織レベルでの経時観察により解析しようとしている。また、極性の再構成などを試みる目的で、単離した上皮細胞の培養系の確立も行っている。これらの培養系を用いて、極性形成に関与する可能性のある細胞骨格や小器官を可視化する目的で、マーカー遺伝子を *Rosa26* 遺伝子座に挿入させたノックインマウスを作製している。その一つとして微小管成長端マーカーを発現するマウス系統を樹立した。これらの系統を用いた今後の解析に備えて、マウス胚や器官を体外で培養し、光毒性をおさえつつ長時間経時観察できるイメージングシステムを確立した²⁾。また、ハイスピードカメラの画像の輝度をもとに、繊毛運動の周波数を解析したところ、成体の上皮においては、局所的に高い周期性が保たれていたものの、全体として周波数が統一されているわけではないことがわかった。

脳室内上衣細胞の繊毛にも着目し解析した。上衣細胞の繊毛の運動により、脈絡叢 (choroid plexus) から放出された脳脊髄液がクモ膜下腔 (subarachnoid space) へと還流される。ノックアウトマウスでの解析から、*Celsr2* と *Celsr3* が繊毛形成自体と運動の極性化の両方に重要な役割を果たすことを示した。

本報告書に登場する主なタンパク質名(省略名)と構造(機能)

Frizzled (Fz)	7回膜貫通型受容体(PCP コアグループ)
Flamingo (Fmi)	7回膜貫通型の非典型的カドヘリン(PCP コアグループ)
Celsr1, Celsr2, Celsr3	Flamingo のほ乳類ホモログ
Fat (Ft)	1回膜貫通型の非典型的カドヘリン (PCP)
Dachsous (Ds)	1回膜貫通型の非典型的カドヘリン (PCP)

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Kohei Shimono, Azusa Fujimoto, Taiichi Tsuyama, Misato Yamamoto-Kochi, Motohiko Sato, Yukako Hattori, Kaoru Sugimura, Tadao Usui, Ken-ichi Kimura, and Tadashi Uemura. Multidendritic sensory neurons in the adult *Drosophila* abdomen: origins, dendritic morphology, and segment- and age-dependent programmed cell death. *Neural Development*, 4: 37 (2009). DOI: 10.1186/1749-8104-4-37.
2. Toshihiko Fujimori, Yoko Kurotaki, Kouji Komatsu, and Yo-ichi Nabeshima. Morphological organization of the mouse preimplantation embryo. *Reproductive Science*, 16: 171-177 (2009). DOI: 10.1177/1933719108331120.
3. Fadel TISSIR, Yibo QU, Mireille MONTCOUQUIOL, Libing ZHOU, Kouji KOMATSU, Dongbo SHI, Toshihiko FUJIMORI, Jason LABEAU, Donatienne TYTECA, Pierre COURTOY, Yves POUMAY, Tadashi UEMURA, Andre M. GOFFINET. Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nature Neuroscience*, in press.