

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にもあてはまるかどうかを検証した。

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。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 と Fmi を含む小胞が微小管の配向と極性に依存して細胞の遠位側に輸送され、この輸送が極性形成に重要であることを明らかにした。また、PCP 形成に重要なこの微小管動態は、第2のグループに属する1回膜貫通型カドヘリン Fat (Ft) と Dachshous (Ds) により調節されることも示した。さらに、マウス卵管上皮および脳室内上皮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繊毛運動を卵巣—子宮軸にそろわせる役割を果たすことを見いだした。

§ 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 (京都大学大学院生命科学研究科、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

・マウス卵管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. Frizzled (Fz) 小胞の移動の偏りは微小管極性に依存する

生体内ライブイメージングから得られた画像データの定量解析から、Fz 小胞が細胞内コンパートメント依存的に遠位側へ偏って移動する性質を見いだしていた。この小胞の移動方向の偏りが、翅の遠近軸に沿った微小管極性の非対称性を逆転させると、キャンセルされることを見いだした。

3-2. 非典型的カドヘリン Ft (Ft) と Dachsous (Ds) は微小管のダイナミクスを制御する

互いに結合する非典型的カドヘリン 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 の制御下で微小管ダイナミクスの調節に関与することを示した²。Ft と Ds の役割は、本研究で明らかにした微小管ダイナミクスの制御、個々の細胞形態の調節から、翅全体の遠近軸方向のパターン形成まで多岐にわたるが、分子レベルで不明な点が多い。Ft::EGFP あるいは Ds::EGFP を発現するトランスジェニック系統を樹立し、GFP 抗体を用いた免疫沈降の後、沈降物を質量分析にかけて結合分子を探索した。その結果、両者あるいはどちらか一方に結合する分子の候補を見だし、結合の確認と生体内機能の解析を進めている。Ft::EGFP および Ds::EGFP の生細胞内での局在を調べたところ、細胞境界に局限しておらず、細胞内に繊維状のシグナルが観察された。この局在様式はクラシックカドヘリンや Flamingo などのコアグループとは異なる。

3-3. 新たな極性制御分子群の作用機序の追究

PCP に異常を起こす新たな突然変異を探索した結果、以下の2つの原因遺伝子を特定した。(1) ubiquitin. ubiquitin associated domain を持ち酵母からヒトまで保存されている。ユビキチン化されたタンパク質のプロテオソームによる分解を促進すると考えられている。PCP においてもユビキチン-プロテオソーム系の一員として機能しているのかどうかを明らかにする目的で、構造・機能解析と基質の特定を進めている。(2) cohesin complex のサブユニットである SMC3。cohesin complex 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ので、PCP 制御遺伝子の発現レベルの変動を追究している。

3-4. マウス卵管および脳室内上皮細胞における平面内極性の解析

昨年度 PCP コアグループメンバーに属する分子群の中で、マウス卵管での内在性 Celsr1 タンパク質の細胞内局在を明らかにした。Celsr1 は卵巣から子宮へ向う軸とほぼ直交する上皮細胞境界(以下、「特定の細胞境界」あるいは「特定の細胞膜ドメイン」と表現する)に局在する。この局在パターンはショウジョウバエ翅表皮での Flamingo (Fmi) の局在とよく似ていた。今年度は Celsr1 の局在パターンをマウス卵管発生途上において詳細に観察した。先行研究では、卵管上

皮における繊毛形成は生後5日目から始まると言われていたが、高速度カメラを用いて繊毛形成過程を調べたところ、生後2日目の段階で既に繊毛形成が始まっていることが確認できた。この段階では、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。*Celsr1* の細胞内局在を定量化したところ、生後2日目の段階で既に *Celsr1* は特定の細胞膜ドメインに局在する傾向が検出できた。従って、*Celsr1* の局在は機能的な繊毛運動に先行することが明らかになった。また、ハイスピードカメラの画像の輝度をもとに、繊毛運動の周波数の自己相関値を解析する手法を開発した³。それによって、成体マウスの卵管上皮における繊毛運動特性を解析したところ、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なかった。また、性周期間での繊毛運動の比較を行った。

卵管で発現している *Celsr1* および *Celsr2* のノックアウトマウスを解析した。特にタンパク質局在が明らかになった *Celsr1* のノックアウトマウスの卵管に着目した。その結果、野生型マウスの卵管上皮細胞の繊毛は卵巣から子宮方向に沿った往復運動をするが、ノックアウトマウスではその方向がそろわず、多方向に運動していることが明らかになった。ただし個々の細胞内での繊毛運動の向きはそろっていた。この結果は *Celsr1* が繊毛運動の方向を器官全体の軸にそろえ、そして維持する上で重要な役割を果たす可能性を示唆している。

卵管上皮形成における PCP 形成をリアルタイムで解析するために、卵管の器官培養系および単離した上皮細胞の培養系の開発を進めている。細胞膜および核を可視化できるトランスジェニックマウスの卵管を用いて、卵管上皮形成過程における細胞動態を観察できる器官培養の経時観察系を確立した。この実験系を用いて、野生型マウスと *Celsr1* ノックアウトマウスの卵管上皮形成過程を比較し、ノックアウトマウスでの上皮形成の異常を観察している。また、これらの培養系を用いて極性形成を制御する候補分子の挙動を可視化する目的で、トランスジェニックマウスを作製した。昨年度卵巣上皮細胞への遺伝子導入実験から、*Vangl2*-EGFP が極性を持った局在を示すことを見出していたので、この蛍光標識タンパク質をユビキタスに発現するトランスジェニックマウスを作製し、今後の実験に用いるラインを選択した。*Vangl2*-EGFP を観察可能なレベルで発現し、卵巣—子宮の軸に直交する細胞境界への局在を示すラインを得た。さらに微小管ダイナミクスを観察する目的で、微小管成長端を可視化できる *EB1*-EGFP をユビキタスに発現するマウス系統を用いた観察を開始した。

以上の解析方法を応用して、脳室内上皮細胞の繊毛運動に関する解析を共同研究として行い、脳室において発現する *Celsr2* および *Celsr3* の役割を明らかにした¹。*Celsr2* と *Celsr3* は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。野生型マウスの脳室では脳室上皮細胞の繊毛運動により、脈絡叢 (choroid plexus) から放出された脳脊髄液がクモ膜下腔 (subarachnoid space) へと還流されるが、*Celsr2* あるいは *Celsr3* ノックアウトマウスでは繊毛運動の異常により、脳室内で正常な還流が生み出されず水頭症を発症する。

本報告書に登場する PCP 制御タンパク質名(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)
Vangl2	4 回膜貫通型タンパク質。PCP コアグループに属するショウジョウバエ Vang gogh (Vang) の哺乳類ホモログ。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Tissir F, Qu Y, Montcouquiol M, Zhou L, Komatsu K, Shi D, Fujimori T, Labeau J, Tyteca D, Courtoy P, Poumay Y, Uemura T, Goffinet AM. Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nature Neuroscience*, 13(6):700-7. 2010 (DOI: 10.1038/nn.2555)
2. Toshiyuki Harumoto, Masayoshi Ito, Yuko Shimada, Tetsuya J. Kobayashi, Hiroki R. Ueda, Bingwei Lu, and Tadashi Uemura. Atypical Cadherins Dachsous and Fat Control Dynamics of Noncentrosomal Microtubules in Planar Cell Polarity. *Developmental Cell*, 19(3):389-401. 2010. (DOI: 10.1016/j.devcel.2010.08.004)
3. Dongbo Shi, Kouji Komatsu, Tadashi Uemura, Toshihiko Fujimori. Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct. *Genes to Cells*, 16(3):282-90. 2011. (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01484.x.).