

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命システムの動作原理と基盤技術」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成18年10月～平成24年3月

研究代表者: 上村 匡
(京都大学大学院生命科学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

多細胞体の構築において、様々な細胞は所属する器官あるいは体の空間軸に従って、一定の向きに非対称性(極性)を発達させる。この極性の一つが平面内細胞極性 (planar cell polarity; PCP) であり、細胞の生体内機能の発現に重要な役割を果たす。我々は PCP を生み出す動作原理を解明する目的で、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の翅(はね)表皮をモデル系として解析した。さらにこの系で解明された原理が脊椎動物の器官にもあてはまるかを検証した。

PCP の形成に必要な2つの分子群が発見されており、それらは種を越えて保存されている。一つはコアグループと呼ばれ、Frizzled (Fz) や7回膜貫通型非典型的カドヘリン Flamingo (Fmi) が含まれる。コアグループは器官の特定の空間軸(翅では遠近軸)に対して限局した形質膜ドメインに分布し、この局在様式が PCP 獲得に誘導的に働く(図 1)。しかし、その局在を支える仕組みは明らかにされていなかった。第2のグループには1回膜貫通型非典型的カドヘリン Fat (Ft) と Dachous (Ds) が含まれ、この Ft-Ds グループはコアグループより早期に機能すると考えられている。しかしコアグループとの関係には不明な点が多い。本研究では、微小管およびFzを含む小胞(Fz小胞)のダイナミクスを生体内定量的イメージングにより解析し(図 2)、以前に提唱した Fz 小胞の極性輸送モデルを検証しつつ、その動作原理に踏み込んだ。その結果、FtとDsによる遠近軸に沿った微小管の配向と、微小管極性の非対称性の調節、そしてこれらの微小管ダイナミクスに依存したFz小胞輸送の速さと向きに関する統計的性質を見いだした(図 4)。さらにこの性質を取り込んだシミュレーションにより、Fzの限局した形質膜ドメインへの分布を再現できた。以上の結果から、Ft-Ds グループとコアグループとの機能的な関係を示し、“器官の空間軸⇒微小管極性の差⇒小胞の極性輸送⇒細胞極性の獲得”へとつながるシステムの全体像を提唱した(図 7)。

また、生体内定量的イメージングを用いたアプローチとは別に、新しい極性制御遺伝子の同定も同時に行った。まず遺伝学的スクリーニングを行い、2つの遺伝子が PCP を制御することを新たに発見した。また、上述した3つの非典型的カドヘリンの下流シグナル伝達経路はほとんど明らかにされていない。そこでそれぞれの細胞内領域に結合する分子を探索した結果、Fmi のカルボキシル末端側細胞内領域に結合する LIMドメインタンパク質 Espinas (Esn) を単離し、その機能を明らかにした(図 8)。Esn は、コアグループのメンバーである Prickle (Pk) と同じ分子ファミリーに属するが、Pk とは異なり神経系で強く発現する遺伝子であった。esn ノックアウト個体などの神経系における表現型を単一細胞レベルで解析し、Fmi-Esn 複合体は同一神経細胞に由来する樹状突起同士間での反発(姉妹樹状突起の交差忌避)に働くこと、そして他のコアグループメンバーもこの複合体と共に交差忌避に機能することを示した。(以上、上村グループ)

脊椎動物の平面内極性のモデル系として、脳室内上衣細胞および卵管上皮(図 9)の繊毛運動に着目し、Fmi のマウスホモログ(Celsr1-Celsr3)の機能解析を行うと共に、コアグループや種々のオルガネラなどの動態をライブイメージングで追跡できるノックインマウスなどを作製した。野生型マウスの脳室では脳室上衣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形成自体と運動の異常により、脳室内で正常な還流が生み出されず水頭症を発症した。マウス卵管上皮での繊毛運動や繊毛形成過程についてはほとんど先行研究がなかったので、ハイスピードカメラの画像の輝度から繊毛運動の周波数を解析する方法などを独自に開発して解析した結果、成体マウスの卵管繊毛運動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ないことが明らかになった。また、卵管上皮では繊毛形成前からCelsr1が発現しており、卵管の長軸にほぼ直交する細胞膜ドメインに局在した。Celsr1ノックアウトマウスの卵管上皮では、繊毛は

形成されているものの、その運動方向は軸に沿わず、卵巣から子宮方向への一方向の流れが生み出されていないことを示した。興味深いことに、ノックアウトマウスの卵管上皮での表現型は、繊毛運動の極性化不全にとどまらず、一細胞から上皮シートの3次元構造までの複数の階層にまたがっていた。具体的には、野生型では個々の細胞は軸に沿って伸びる傾向があるのに対して、ノックアウトマウスの細胞は特定の方向に沿って伸びる傾向が見られず、その頂部面は円形に近い形態をとる。また、正常発生では管腔内にせり出してくるヒダは軸に並行に、そして直線状に形成されるのに対して、ノックアウトマウスではヒダが蛇行し異常な枝分かれをして、軸に対して平行に走らないヒダが形成された。このヒダの表現型を説明可能な数理モデルを構築中であり、Celsr1 の役割について作業仮説を提案しようとしている。以上の解析から、ショウジョウバエ翅の表現型では予想できなかった、器官の3次元構築における7回膜貫通型カドヘリンの役割を発見した。(以上、藤森グループ)

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)

特に断らない限り、生物種はショウジョウバエである。

Frizzled (Fz)	7回膜貫通型受容体(コアグループ), 65 kDa
Flamingo (Fmi)	7回膜貫通型の非典型的カドヘリン(コアグループ), 397 kDa
Celsr1, Celsr2, Celsr3	Flamingo のほ乳類ホモログ, 320-360 kDa
Fat (Ft)	1回膜貫通型の非典型的カドヘリン (Ft-Ds グループ), 565 kDa
Dachsous (Ds)	1回膜貫通型の非典型的カドヘリン (Ft-Ds グループ), 385 kDa
DE-cadherin	上皮型古典的カドヘリン(細胞間接着), 170 kDa
Espinas (Esn)	Flamingo のカルボキシル末端側細胞質領域に結合する LIM ドメインタンパク質ファミリーのメンバー(神経突起間反発), 87 kDa

(2) 顕著な成果

1. Harumoto et al., *Developmental Cell*, 19:389-401(原著論文 9)

Harumoto, Kobayashi, et al., in preparation(研究実施内容及び成果 4.1.2-2).

概要: 微小管および小胞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て、[器官のグローバルな軸]⇒[軸に沿った微小管極性の非対称性]⇒[小胞の輸送方向の偏り]⇒[一細胞の平面内極性の獲得]へとつながる、システムの全体像を提唱した。

2. Matsubara et al., *Genes & Development*, in press(原著論文 14).

概要: ショウジョウバエ7回膜貫通型カドヘリン **Flamingo** の結合分子として、LIMドメインタンパク質 **Espinas** を同定した。両者は他の PCP 制御分子群と共に、神経細胞において同一細胞の姉妹樹状突起間の絡み合いを防ぐ役割を果たす事を明らかにした。

3. Shi et al., *Genes to Cells*, 16: 282-290(原著論文 13)

Komatsu, Shi et al., in preparation(研究実施内容及び成果 4.2.2-3~2-5).

概要: 哺乳類7回膜貫通型カドヘリンの一つである **Celsr1** が、卵管形成において卵管軸に沿った上皮細胞の形状の歪み、繊毛の子宮方向への運動、そしてヒダの形成パターンまで、複数の階層にわたり重要な役割を果たす事を示した。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

1. Fz 小胞の細胞内の変位を定量的に解析できる観察系を構築し、得られたデータから数理モデルを検証する。
2. ショウジョウバエ翅表皮の系で、Fz 小胞の極性輸送などを調節する分子群を同定し、PCP を調節する分子装置のダイナミクスを解明する。
3. Fz-Fmi 小胞を輸送するモータータンパク質を同定し、その挙動を定量的に解析する。
4. 極性形成をイメージングできるマーカーマウス系統を作製し、胚などを用いた経時観察系を構築する。脊椎動物における平面極性の動作原理を明らかにする。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

1. 生体内の細胞に含まれる1粒子レベルの挙動を、定量的かつ統計的に調べた例はほとんど無かった。我々がこの課題に取り組むに際し、様々な *in vivo* 1粒子解析特有の、当初の予想以上に困難な問題や予想していなかった統計的性質に直面したが、一つ一つそれらの問題を解決してきた(詳細は、4.1.(1).2-2 と 4.1.(2))。
2. 1回膜貫通型非典型的カドヘリン Ft と Ds が、微小管の配向と極性を調節することを発見した。その分子メカニズムを追究する目的で結合因子を探索したが、当初採用した *yeast two-hybrid system* の変法は成功せず、生体試料からの免疫沈降そして質量分析法を用いて候補分子の絞り込みを進めている(詳細は、4.1.(1).2-3)。
3. 7回膜貫通型非典型的カドヘリン Fmi の結合分子 Esn を単離し、その複合体の生体内機能を明らかにした。その過程で、Fmi-Esn が他の PCP 調節因子と共に、神経細胞の姉妹樹状突起の交差忌避に働くことを明らかにした(詳細は 4.1.(1).2-3)。
4. Fz 小胞を輸送するモータータンパク質を同定する目的で、RNAi スクリーニングから浮上した候補分子を解析したが、突然変異体を用いた解析では RNAi 表現型を再現できず、解析を中断した。
5. マウス卵管をモデル系とした7回膜貫通型カドヘリンの機能解析から、従来の PCP 研究では予想できなかった器官の3次元構築における役割を発見した。

§ 3 研究実施体制

(1)「上村」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
上村匡	京都大学大学院 生命科学研究科	教授	H18.10～H24.3
碓井理夫	京都大学大学院 生命科学研究科	助教	H19.4～H24.3
春本敏之	京都大学大学院 生命科学研究科	非常勤職員時間 雇用研究員	H18.10～H24.3
毛利亘輔	京都大学大学院 生命科学研究科	D4(非常勤職員 教務補佐委員)	H18.10～H24.3
堀内伸也	京都大学大学院 生命科学研究科	D3	H18.10～H24.3
新田昌輝	京都大学大学院 生命科学研究科	D1(非常勤職員 教務補佐委員)	H20.10～H24.3
石東博	京都大学大学院 生命科学研究科	D1	H20.10～H24.3
上田泰己	理化学研究所発生・再生 科学総合研究センター、 システムバイオロジー 研究チーム	チームリーダー	H18.10～H24.3
小林徹也	東京大学生産技術 研究所	講師	H18.10～H24.3
水越絢子	京都大学大学院 生命科学研究科	非常勤職員時間 雇用教務補佐員	H22.4～H23.3
二股真由美	京都大学大学院 生命科学研究科	非常勤職員時間 雇用教務補佐員	H22.4～H23.3
堀内伸也	京都大学大学院 生命科学研究科	M2(謝金による雇 い上げ)	H18.10～H21.3
中河郁子	京都大学大学院 生命科学研究科	M2	H18.10～H21.3
佐藤太一	京都大学大学院 生命科学研究科	D1(非常勤職員 時間雇用教務補 佐員)	H19.10～H20.3
津山泰一	京都大学大学院 生命科学研究科	M2(謝金による雇 い上げ)	H19.10～H20.2
藤本梓	京都大学大学院 生命科学研究科	M2(謝金による雇 い上げ)	H19.10～H20.2
毛利亘輔	京都大学大学院 生命科学研究科	M2(謝金による雇 い上げ)	H19.10～H20.2
中河郁子	京都大学大学院 生命科学研究科	M1(謝金による雇 い上げ)	H19.10～ H19.11

② 研究項目

- ・ ショウジョウバエ翅での平面内極性形成：生体内定量的イメージング、数理モデルの

構築、その検証

- ・ 平面内極性を調節する非典型的カドヘリンに結合する分子群の探索と機能解明
- ・ 新たな平面内極性因子の探索

(2)「藤森」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
藤森 俊彦	基礎生物学研究所	教授	H18.10～H24.3
小山 宏史	基礎生物学研究所	助教	H23.4～H24.3
小松 紘司	基礎生物学研究所	研究員	H19.4～H24.3
石 東博	京都大学大学院 生命科学研究所	D1	H21.4～H24.3
平尾 真由美	基礎生物学研究所	技術支援員	H21.10～H23.9
樋口 陽子	基礎生物学研究所	技術支援員	H23.10～H24.3

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明
- ・ 卵管構築の数理モデルの作成と検証

§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 ショウジョウバエの翅における平面内細胞極性形成の動作原理の追究(京都大学 上村グループ)

(1)研究実施内容及び成果

①研究の背景

ショウジョウバエの翅においては、各々の表皮細胞は翅全体の遠近軸を読み取り、細胞遠位端に翅毛と呼ばれる突起を形成する(図 1A と B)。遠位端に生えた翅毛は翅の遠位側に向って伸長するので、PCP の異常は翅毛の向きの異常として容易に検出できる。我々を含む複数のグループの先行研究の結果、この PCP の形成には、少なくとも2つの分子群が関与すること、そしてそれらの分子群は種を越えて保存されていることが示された。

一つのグループはコアグループと呼ばれ、このグループに属する Frizzled (Fz) や7回膜貫通型カドヘリン Flamingo (Fmi) などは、細胞の遠位側境界あるいは近位側境界に局在する(図 1C)。この特徴的な局在が細胞遠位端での翅毛形成に誘導的に働くことは示されていたが、その局在化機構はほとんど解析されていなかった。第2のグループには、1回膜貫通型の非典型的カドヘリンである Fat (Ft) と Dachshous (Ds) が属しており、細胞間で両者はヘテロフィリックに結合することが知られている。このグループ(Ft-Ds グループ)はコアグループより早期に働き、翅の遠近軸情報を個々の細胞に伝えると推測されていたが、分子機能はほとんど明らかではなかった。

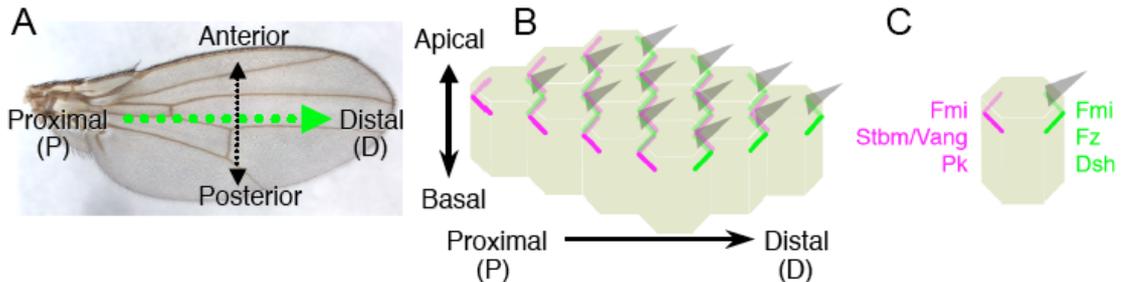


図 1 ショウジョウバエ翅表皮細胞が示す平面内極性とコアグループの細胞内局在

(A) 成虫の翅の全体像。遠近軸と前後軸を矢印で示した。(B と C) 各々の表皮細胞は細胞遠位端から翅毛を生やす。翅毛が生える直前 (30 h after puparium formation; 30 h APF) から形成開始直後 (33 h APF) に見られるコアグループメンバーの細胞内局在の模式図。Frizzled (Fz); Flamingo (Fmi); Strabismus (Stbm)/Van Gogh (Vang); Prickle (Pk); Dishevelled (Dsh)。Fz と Dsh は細胞遠位側境界(緑)に、Stbm/Vang と Pk は近位側境界(マゼンダ)に選択的に局在し、Fmi は遠近両側(遠近境界を挟んだ両側)に局在する。前後側細胞境界にはいずれのコアグループメンバーも濃縮しない。

我々は先行研究において、Fz や Fmi を含む小胞(Fz 小胞)が (1) 各々の表皮細胞内において翅の遠位側に向って選択的に輸送されること、そして (2) その輸送には遠近軸に沿って配向する中心体非依存的な微小管が必要であるモデルを提出していた(極性輸送モデル; Shimada et al., *Developmental Cell*, 2006)。この仮説を検証し、その動作原理を追究する目的で、次の2つの問題の解明を目指した。第一に、微小管を細胞内で翅の遠近軸におおむね沿って配向させる仕組みは何か? 第二に、遠近軸に沿って配向した微小管上を、Fz 小胞はなぜ細胞遠位側に輸送されるのか? この方向性は、遠近軸に沿った微小管極性の非対称性(例えば遠位側優位性)が原因なのか? もしそうならば、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のではないかと推測した。以上の問題の解明を目指す過程で得られた結果を総合して、2つのグループの分子がどのように協調して細胞を極性化するのかを追究した。

②実施方法・内容・成果

2-1. 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(原著論文 9)

微小管の成長端マーカー (EB1:GFP) を発現するトランスジェニック系統を作製して、野生型の生きた組織における微小管成長の時空間ダイナミクスを調べる系を立ち上げた(原著論文 3, 4)。特に翅の遠近軸に沿った微小管極性に非対称性があるかどうかに着目し、その非対称性を生み出す仕組みを解明するには、様々な遺伝学的バックグラウンドで、しかも時空間座標内の多点で微小管ダイナミクスがどのように影響を受けるかを調べる必要が予想された。そこで我々は、一つの観測点あたり、1,000~2,000 の微小管成長端について迅速にデータ取得し、統計処理する系を構築した(図 2)。実際には、合計 600 以上の観測点からデータを取得して解析した。なお、翅毛は蛹期に入って約 30 時間 (30 h after puparium formation; 30 h APF) で形成され始め、その時期にコアグループの遠位側あるいは近位側細胞境界への局在は最も顕著になる(図 3B の 30 h)。

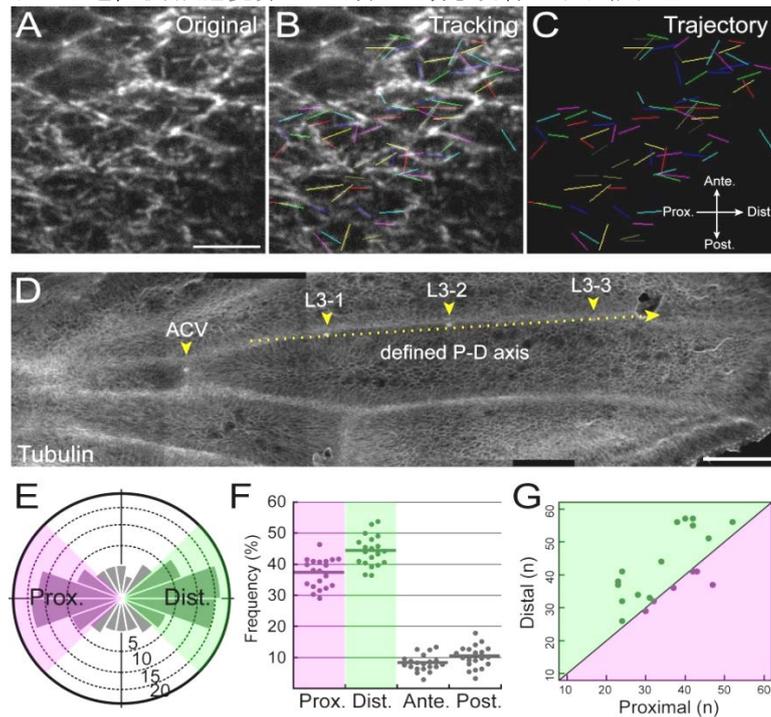


図 2 微小管成長端の追跡と定量的解析方法

(A-C) EB1:GFP コメットの追跡方法。(A) は EB1:GFP コメットの生体内観察像。(B) はコメットのトレース像との重ね合わせ。(C) はトレース像のみを示した。

(D) 24 h APF の蛹の翅のチューブリン染色像。矢印は遠近軸を表す。遠近軸は、L3 翅脈上にある 3 個の感覚器官 (L3-1, L3-2, L3-3; 矢頭) を結ぶ直線と定義している。

(E-G) コメット伸長方向の統計解析。(E) コメット伸長方向の分布をローズダイアグラムにプロットした (20° ごと 18 分割)。各分割の面積が、該当角度に伸長したコメットの頻度を表す (同心円は 5% 区切りの目盛)。(F) コメット伸長方向のドットプロット。角度を 90° ごとに 4 分割し (E 参照)、サンプルごとにドットプロットした。(G) 遠近軸に沿った微小管の伸長方向の偏りを表すために、観測点ごとに、遠位方向および近位方向に伸長したコメットの個数を 2 次元プロットしたもの。遠位方向に伸長した微小管数がより多いことがわかる。伸長方向の偏りの有意差検定の際は、遠位方向の四分円 (-45°~45°; “E,” “F,” and “G” の緑色セクターに相当) と近位方向の四分円 (135°~225°; “E,” “F,” and “G” のマゼンタ色セクターに相当) に含まれるコメット個数を Wilcoxon の符号順位検定により検定した。スケール: 5 μm (A, B, and C), 50 μm (D)。

野生型の微小管のダイナミクスを解析した結果、以下の発見があった(図 3)。まず 14 h APF では、微小管は遠近軸よりもむしろ前後軸に沿って配向していた。18 h APF になると配向は 90° 回転した。この時期にはまだ、コアメンバーが特定の細胞境界に局在しているかどうかを判断するのは困難である。その後 24 h APF になると微小管は遠近軸方向に最も顕著に配向し、この時期にコアメンバーの遠近側細胞境界への局在が検出され始める

(図 3B の黄色矢じり)。また微小管極性の非対称性を調べたところ、24 h APF において遠位方向に伸長した微小管の数が、近位方向に伸長した微小管よりも僅かながら有意に多かった(10%以下; 図 3B の緑色矢印; 以後、微小管極性の遠位側優位性と呼ぶ)。翅毛が形成される 30 h APF になると遠近軸方向の微小管配向は緩んだ。

これらの微小管極性のダイナミクス(配向、そして極性の遠位側優位性)が、PCP の発達に重要かどうかを調べる目的で、微小管伸長を調節するセリンスレオニンキナーゼ PAR-1 を過剰発現させた。この条件下では微小管の配向と極性の非対称性は検出されなくなり、野生型に比べて微小管成長は等方的になった。この PAR-1 過剰発現は PCP 異常を起こした事から、野生型で観察された微小管ダイナミクスが PCP の発達に必要であることが示唆された。さらにこの PAR-1 過剰発現による表現型が、Ds-Ft グループの突然変異体の表現型と似ていたことから、このグループが微小管ダイナミクスにどのように作用するのかが追究した。

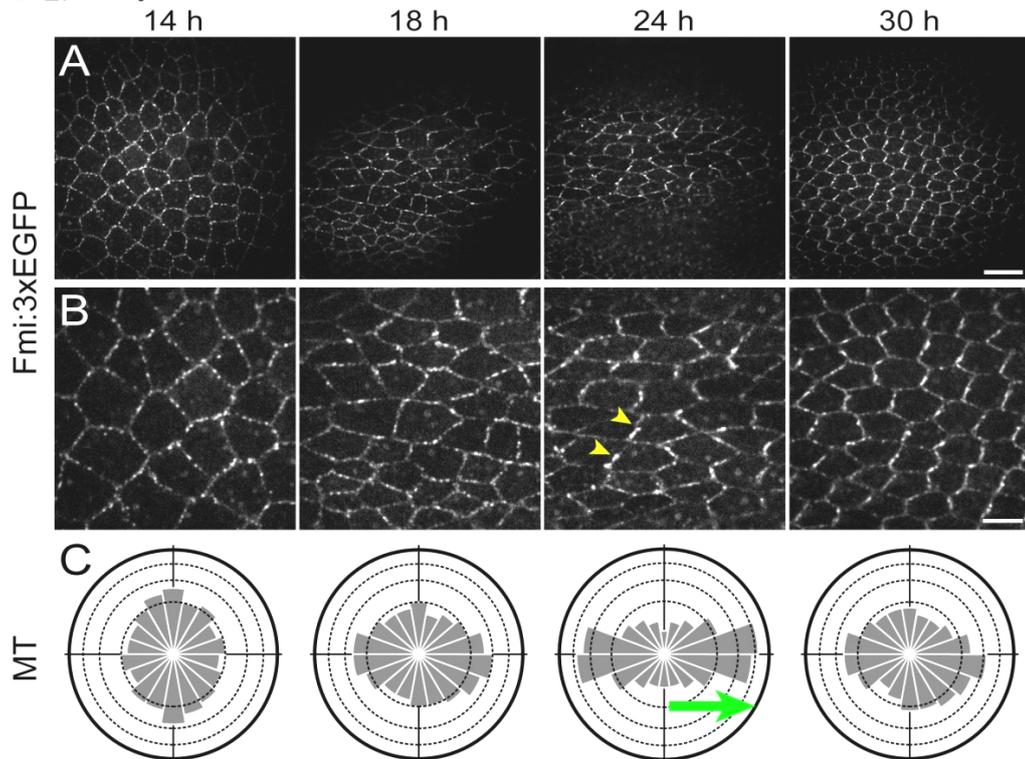


図 3 Fmi:3xEGFP の局在パターンと微小管伸長方向の時間変化

(A と B) Fmi と 3 コピーの GFP を融合した分子 (Fmi:3xEGFP) を発現する蛹の翅の生体内経時観察像。翅の近位側領域 (L3-1; 図 2D) において 14 h APF から 30 h APF にかけて異なる 4 つの時期にデータを取得した。(B) は (A) の一部分の拡大図である。24h において、遠位側あるいは近位側細胞境界への Fmi:3xEGFP の局在が検出され始める(黄色矢じり)。(B) と同等の領域及び時期における微小管の伸長方向を (C) に示す。24 h APF において遠位方向に伸長した微小管の数が、近位方向に伸長した微小管よりも有意に多くなった(緑色矢印; 微小管極性の遠位側優位性と呼ぶ)。スケール: 10 μ m (A), 5 μ m (B)。

その結果、Ft-Ds を介する細胞間相互作用は、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が示された(図 4 の *ds mutant*)。また、野生型では翅の近位側に Ds の発現レベルの高低の境界があることから(図 4 の青色急勾配)、組織内で Ds の発現レベルに差がある場合、微小管は発現の低い方向へ成長する可能性を検討した。翅の遠位側領域で Ds を異所的に発現させた人工的な Ds 逆勾配条件下(図 4 のマゼンダ色の急勾配)では、微小管極性が逆転し、翅毛の向きも逆転した(図 4 の 'Distal' Ds)。この結果は、Ds 発現レベルの差が、微小管極性に誘導的に働くことを示唆している。その他の実験結果も総合して、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、PCPの制御に寄与することを示した。

上述した微小管極性の遠位側優位性に依存して、Fz小胞は細胞遠位側に輸送され、遠位側細胞境界に選択的に局在するようになるのだろうか？我々は、“biased random walk”に基づく極性輸送モデルを構築し(図5)、Fz小胞の動きを定量的に検証することにより、このモデルの検証を試みた。

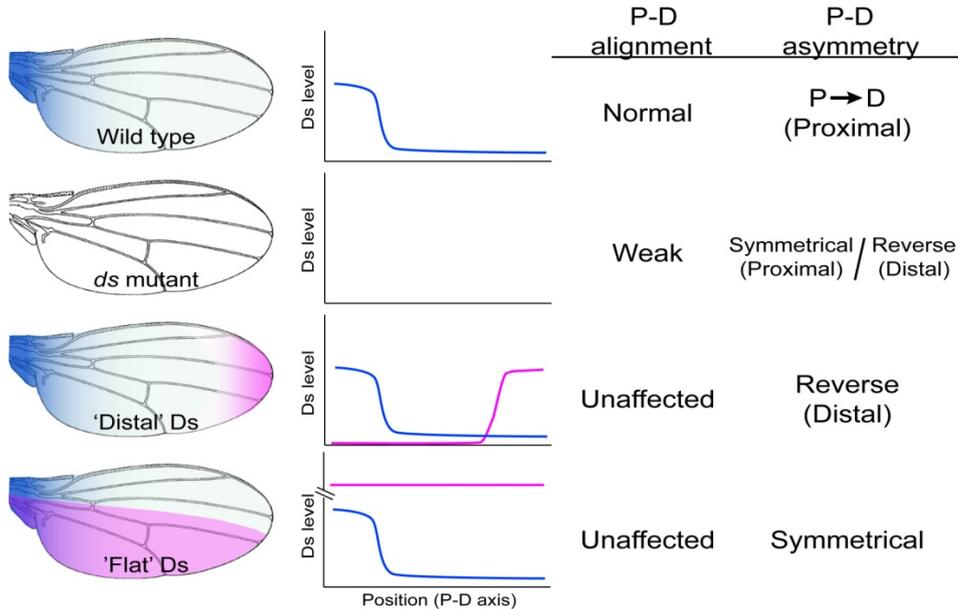


図4 Dsによる微小管ダイナミクスの調節

様々な遺伝子型の翅で、遠近軸に沿った微小管の配向 (P-D alignment) と極性の非対称性 (P-D asymmetry) を調べた結果の模式図。(Wild type) 野生型. Dsの発現は翅の近位側で高く遠位側で低い(青色の影付け). 微小管は遠近軸に沿って成長する傾向があり, Ds発現が低い遠位側に向って成長するものがより多い (P→D). (*ds* mutant) *ds*変異体の翅. 遠近軸方向の微小管配向は緩み, 翅の近位側領域では極性是对称性を示した. ('Distal' Ds) 翅の先端部に逆向きの Ds発現急勾配(マゼンタ)を作った実験. 発現ドメインに隣接した領域では近位側に向って成長する微小管が増える (Reverse). ('Flat' Ds) 翅の後部コンパートメント内で, 一様にそして強く Dsを発現させた場合(マゼンタ). 微小管極性の非対称性がなくなる.

2-2. 微小管極性依存的な小胞輸送による、特定の形質膜ドメインへの局在 (Harumoto, Kobayashi, et al., in preparation.)

“biased random walk”モデルの検証には、同一の Fz 小胞の挙動を短い時間間隔で、しかも多数のフレームにわたって追跡する必要があることが予想された。そこで退色を可能な限り抑えるために、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系統を新たに樹立し (*ubiquitin promoter-Fz:3xEGFP*)、画像取得のためのハードウェアの設置と条件の最適化を行った。さらに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を作成した。その概略は、各フレームでの画像から細胞境界と小胞とを別々に追跡した後、細胞境界の変化から細胞の重心の動きを求め、それをもとに小胞の動きを補正して、小胞の正味の変位を導くアプローチである(6E)。Fz小胞の追跡には、過剰発現が許されないこと(コアグロームを過剰発現すると gain-of-function phenotype が現れてしまう)、新たなトランスジェニック系統により改善されたとは言えなお低いシグナル/ノイズ比、そして細胞境界上のシグナルと小胞シグナルとの識別など、技術的に困難な点が多かった。コアグロームとは異なり、細胞境界にほぼ均一に分布する古典的カドヘリン *DE-cadherin:GFP* を含む小胞 (*DE-cad* 小胞) についても、同様のデータ取得と画像解析を行い、Fz小胞との挙動の違いを検討した。いずれの小胞についても、最も小胞が高頻度で観察された 20-21 h APF でデータを取得した。

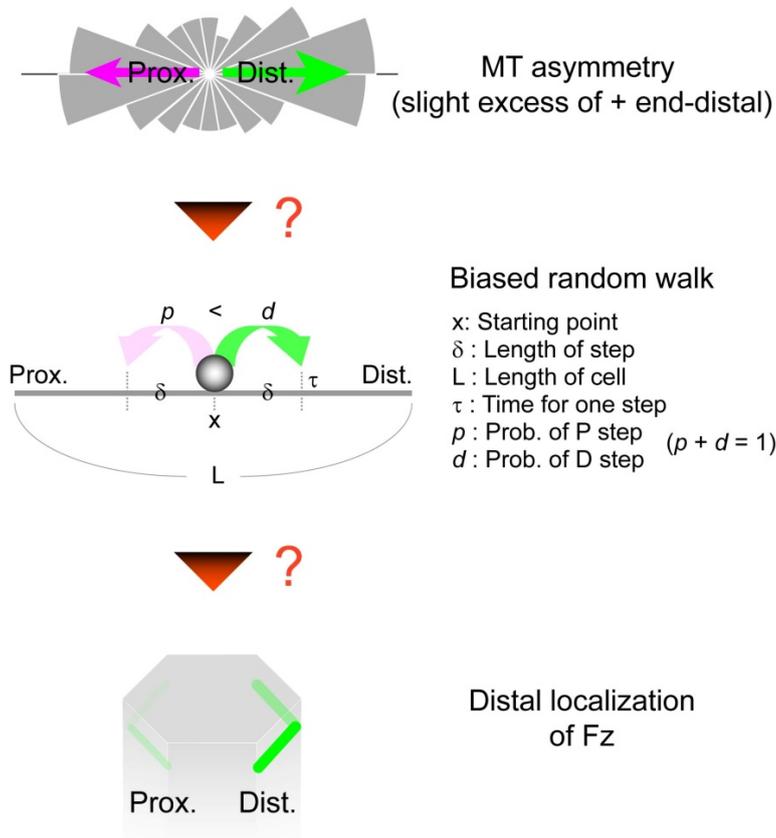


図5 Fz 小胞の“biased random walk”モデル

翅の近位側領域(L3-1)では微小管が遠近軸に沿って強く配向すると共に、伸長方向は僅かながら(10%以下)遠位側に偏っている(上段の緑色矢印)。我々が先行研究により極性輸送モデルを提出した際、Fz小胞は1分程度の長い観察インターバルでは遠位側に動く一方で、短い時間インターバル(1~10秒)では動きに顕著な方向性が見られなかった(Shimada et al., 2006)。Fz小胞が微小管上を(+)端指向性モーターにより輸送されると仮定すると、この特徴的な挙動は、以下に記す“biased random walk”モデルにより記述できるかもしれない(中段)。このモデルでは、観察から得られた僅かな微小管非対称性を反映して、遠位側への移動確率が近位側への移動確率よりも僅かに大きいとしている(中段の $p < d$)。この確率モデルに従えば、各小胞が細胞境界到達までに多くのステップを経る場合(例えば、小胞のステップサイズ δ が細胞の遠近軸方向の長さ L よりも十分に小さい場合)、僅かな遠位側への移動確率の偏りでも十分にFzの遠位側境界での非対称局在を生み出すことが予測された(下段)。

当初一般的な“biased random walk”を念頭において小胞の変位を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、小胞の瞬間速度(一つのフレームから次のフレームへの移動距離と方向)の分布に着目し、極座標を導入して再度解析したところ(図6F)、以下の2つの性質を見いだした。第一は速度の絶対値に関する発見であり、Fz小胞もDE-cad小胞も速度の絶対値は対数正規分布を示した。通常のrandom walkでは正規分布から導出される式に従うので、この発見はモデルを構築した当初は、予想していなかった結果である。第二の発見はFz小胞の移動方向に関するものであり、細胞内で移動方向は均一ではないことがわかり、この点も予想外の結果だった。具体的には、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っていた。また、これらのFz小胞の挙動の性質は微小管依存的事であることを確認した。

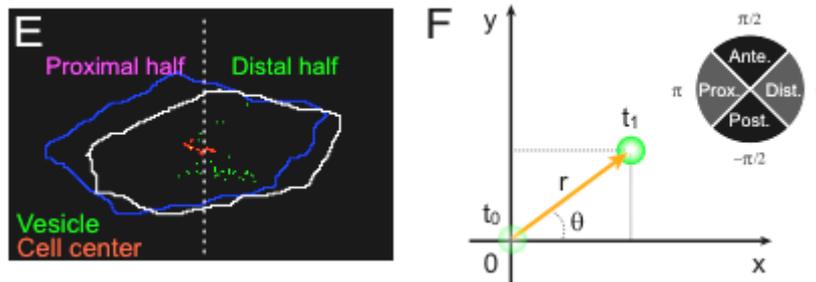


図 6 Fz 小胞挙動の定量化方法

(E) Fz 小胞 (緑色) と細胞重心 (赤色) の追跡結果を重ね合わせた例. この細胞は観察中に遠位側方向に移動している (青線から白線方向). 小胞の移動から細胞重心の移動を差し引くことで, 正味の小胞移動を見積もることができる. 以降の解析では, 重心により細胞を二つの領域に分割し解析を行った (Proximal half: 近位側半分及び Distal half: 遠位側半分).

(F) 極座標による小胞の挙動解析. 開始フレーム t_0 から次フレーム t_1 への変位は, 距離 r 及び角度 θ により表わされる. 右上に方向 (Prox.: 近位側, Dist.: 遠位側, Ante.: 前方, Post.: 後方) と角度 (ラジアン表示) を示した.

上記の解析で見いだした Fz 小胞輸送の方向に関する性質は, 微小管極性の遠位側優位性に依存しているのだろうか? 我々は微小管極性を逆転した場合 (図 4 の 'Distal' Ds) の小胞輸送を調べ, この可能性を示唆する結果を得た. さらに, 本研究により見いだされた Fz 小胞輸送の速度分布 (速度の絶対値の分布と方向分布) の特性によって, 細胞遠位側境界に Fz を局在させることはできるのだろうか? この問いに答えるために, それらの性質を取り込んだ random walk によるシミュレーションを行ったところ, 近位側境界に比べて遠位側境界に Fz 分子が 10% 程度より多く到達することが示された. このシミュレーションで再現された近位側と遠位側境界での分布の差は, 24 h APF あるいはそれ以前 (20 h APF ~ 24 h APF) での Fz の分布の弱い非対称性に相当するのかもしれない (図 3B の黄色矢印).

以上のように, 我々は微小管ダイナミクスと Fz 小胞輸送を定量的に解析したが, 一方で他のグループにより Fz の細胞境界上の偏りが定量解析の対象とされた (Aigouy et al., *Cell*, 2010). 両グループの結果を総合して, Fz に代表されるコアグループの局在化機構を議論する (図 8A). 14 h では微小管は翅の前後軸に沿って配向する傾向があり, この時 Fz は翅の前側の細胞境界に局在することが報告された (Aigouy et al., *Cell*, 2010; ただし我々が微小管と小胞のダイナミクスを主に観測した領域 L3-1 では, そのような Fz の細胞境界上の偏りがあるとしても, わずかである). その後, 微小管の配向は約 90° 回転し, 24 h APF に遠近軸方向の配向がもっとも顕著になる. 微小管極性の遠位側優位性は 20 h APF から 24 h APF にかけて検出される. Fz 小胞が顕著に観察できるのは 20 h APF であり, この時期には細胞境界上の Fz の偏りは一時的にほとんど検出されなくなる (Aigouy et al., *Cell*, 2010). 従って, 20 h APF には, エンドサイトーシスにより取り込まれた Fz 小胞が, 微小管極性の非対称性を利用して遠位側へ盛んに輸送されていると考えられる. 実際にはこの極性輸送により生み出された Fz の分布の差を, さらに増幅させる別の仕組み (例えば遠位側境界への選択的な小胞のリサイクリングなど) が働き, その結果, 30 h で見られるような顕著な局在パターンが誕生すると推測された.

本研究は, 極性輸送モデルの動作原理に踏み込むと共に, Ft-Ds グループとコアグループが微小管ダイナミクスを介して機能的に連関することを示し, 器官の空間軸に沿った Ds の発現差異 \Rightarrow 微小管極性の遠位側優位性 \Rightarrow Fz 小胞の極性輸送 \Rightarrow Fz の遠位側境界への局在による細胞極性の獲得へとつながる, システムの全体像を提唱するものである (図 7B).

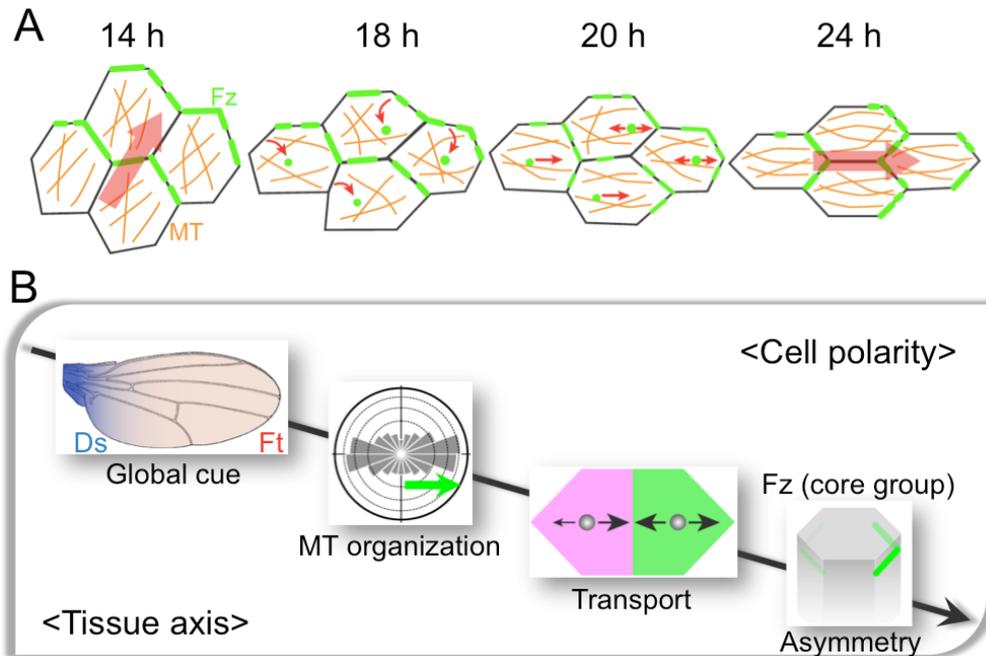


図 7 器官のグローバルな軸と一細胞の極性をつなぐ仕組み

(A) 14 h APF では Fz は翅の前側の細胞境界に局在する (Aigouy et al., *Cell*, 2010). その後の微小管の配向の回転, そしてエンドサイトーシス(18h の赤矢印)と極性輸送(20h の赤矢印)により遠位側境界への再配置される過程をまとめた模式図. 細胞境界上の Fz (緑色の線), Fz 小胞(緑点), 微小管(オレンジ色の線), そして Fz 非対称局在の方向(朱色太い矢印)を描いた. 詳細は本文参照.

(B) 遠近軸に沿った Ds の発現差異が, Fz の遠位側境界への局在に結びつくシステムの全体像の模式図. 詳細は本文参照. なお, 図示した経路以外の可能性を排除しない(「③成果の位置づけと類似研究との比較」にて後述).

2-3. 非典型的カドヘリン結合タンパク質の探索と機能解析

PCP においては上述した3つの非典型的カドヘリン (Fmi, Ft, そして Ds) が重要な働きをしているが, いずれもその下流のシグナル伝達経路はほとんど明らかになっていない. Fmi の哺乳類ホモログである *Celsr2* と *Celsr3* については, G-protein coupled receptor として働く可能性を間接的に示すことはできた(原著論文 2). 我々は並行して, それぞれの非典型的カドヘリンの細胞内領域に結合する分子を探索した.

yeast two-hybrid system (Y2H) を用いて Fmi のカルボキシル末端側細胞内領域に結合する LIM ドメインタンパク質 *Espinas* (*Esn*) を単離し, その機能を明らかにした(図 8A-B). *Esn* は, コアグループのメンバーである *Prickle* (*Pk*) と同じ分子ファミリーに属するが, *Pk* とは異なり神経系で強く発現する(図 8B). *fmi* 変異体と *esn* ノックアウトフライの神経系における表現型を単一細胞レベルで解析したところ, 同一神経細胞に由来する樹状突起同士間での反発(姉妹樹状突起間での交差忌避)が損なわれ, 突起同士が高頻度で交差する表現型が検出された(図 8C-F). しかもこの表現型の回復には, 神経細胞内で Fmi-Esn 複合体形成が必要なことが強く示唆された(図 8G-H). さらに, Fmi はコアグループに属し, *Esn* は *Pk* とパラログの関係にあることから, 他のコアグループメンバーの突然変異体の神経細胞も調べたところ, *fz* や *Stbm1 Vang* 変異体においても交差異常が検出された. その他の遺伝学的相互作用の解析結果などと考え合わせて, Fmi-Esn 複合体は, 他のコアグループメンバーや, すでに突起間反発に役割を果たす事が報告されているシグナル伝達経路とも共働して, 樹状突起同士が絡み合うのを防ぐ働きをしている仮説を提唱した(図 8I; 原著論文 14).

ここ数年間の他のグループの研究から, PCP コアグループ(あるいはそのメンバーの一部)は上皮組織に加えて, 動物発生における細胞再配列や細胞間接触を介する細胞運動方向制御など, 様々な局面での役割が報告されてきた. しかしながら依然として Fmi ファミ

リーからそれぞれの細胞の挙動につながる経路はほとんど明らかになっていない。**Esn** はタンパク質間相互作用に関わることが示唆される LIM ドメインを分子内に 3 コピー持つことから、**Fmi** 以外の他の分子とも結合する「足場」となっている可能性を考えた。そこで我々はさらに **Esn** に結合するタンパク質の探索を通じて、姉妹樹状突起の絡み合いを防ぐ機構の全体像の解明を目指している。

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に加えて、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。それらの調節機能を分子レベルで追究する目的で、それぞれの細胞内ドメインに結合する分子を探索している。本研究開始当初は、形質膜およびその近傍での分子間結合を検出できる Y2H の変法を用いてスクリーニングしたが、有力な候補分子は得られなかった。そこで、**Ft** と **Ds** それぞれにタグをほどこした分子を発現するトランスジェニック系統を樹立し、タグ抗体を用いて免疫沈降物を回収した後、質量分析法による結合分子の探索を開始した。**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、少なくとも **Ds:EGFP** は、*ds* ミュータントをレスキューできる機能分子であることを示した。蛹破砕液から GFP 抗体を用いて免疫沈降した後、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。また、**Ft:EGFP** および **Ds:EGFP** の生細胞内での局在を調べたところ、意外な事に細胞間境界に限局しておらず、細胞境界上のファジーなシグナルに加えて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 **Fmi** などのコアグループとは顕著に異なり、その生理的意義を検討している。

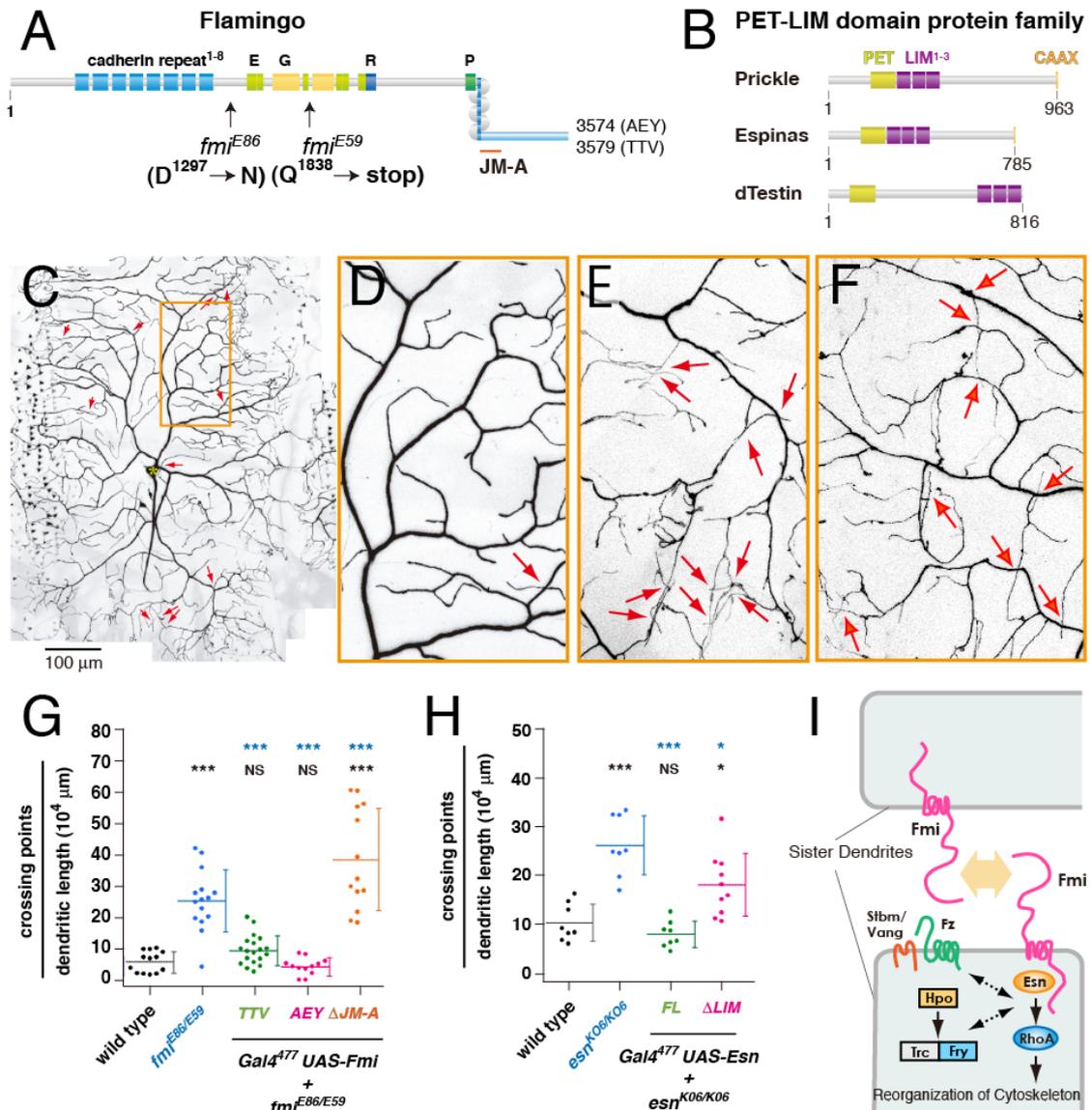


図 8 Flamingo とその結合タンパク質 Espinas, そして PCP 調節因子による姉妹樹状突起間での交差忌避

(A) Fmi の構造図とアミノ酸配列。今回新たに *fmi*^{E86} を同定した。カルボキシル末端側細胞内領域内の一部 (juxtamembrane region-A; JM-A) に LIM ドメインタンパク質 Espinas (Esn) が結合する。カルボキシル末端をコードするエクソンの alternative splicing により、3579 アミノ酸からなる TTV form と 3574 アミノ酸からなる AEY form ができる。Cadherin repeats, E, G, R, そして P は細胞外領域に存在するドメインである。

(B) Esn は Prickle (Pk) や dTestin と同じ LIM domain ファミリーに属する。見やすくするため (A) とはスケールは合わせていない。

(C-F) 3 齢幼虫での class IV dendritic arborization (da) neuron の樹状突起の、低倍 (C) と高倍 (D-F) の画像の例。野生型 (C と D)。 *fmi* 変異体 (E; *fmi*^{E86}/*fmi*^{E59})。 *esn* ノックアウト (F; *esn*^{K06}/*esn*^{K06})。赤矢印は、同一神経細胞に由来する樹状突起同士が交差している箇所を指す。野生型に比べて、 *fmi* 変異体や *esn* ノックアウトでは突起間交差がより高頻度で検出された。

(G と H) 表現型を定量して、 *fmi* 変異体 (G) あるいは *esn* ノックアウト (H) でのレスキュー実験の結果をまとめた。表現型は突起長 10 mm あたりの交差数で現す。個々のポイントが、定量した class IV da neuron 一つ一つを指す。(G) *fmi* 変異体の表現型は、TTV form と AEY form のいずれを神経細胞で発現させても回復したが、Esn が結合する JM-A を欠く form (Δ JM-A) では回復できなかった。(H) 同様に *esn* ノックアウトの表現型は、Esn 全長型 (FL) を神経細胞で発現させると回復したが、Fmi が結合する LIM domain を欠く form (Δ LIM) では回復できなかった。エラーバーは mean \pm s.d. を指す。(*) $P < 0.05$ と (***) $P < 0.001$ (one-way ANOVA and HSD post hoc test)。黒の星印は野生型との有意差

を示し、青の星印は*fmi* 変異体 (G) あるいは*esn*ノックアウト (H) との有意差を示す。なお、いずれの遺伝子型の神経細胞においても、細胞当たりの突起全長には顕著な差はなかった。

(I) 同一神経細胞に由来する樹状突起 (Sister Dendrites) の間で、Fmi のホモフィリックな相互作用が引き金となって生じる反発作用の想像図。Fmi-Esn 複合体は、PCP コアメンバーである Fz および Stbm/Vang, エフェクターである RhoA に加えて、すでに突起間反発に役割を果たす事が報告されている Hippo (Hpo), Tricornered (Trc), そして Furry (Fry) とも共働して、樹状突起同士が絡まり合うのを防ぐと考えられる。

2-4. 新たな極性制御分子群の発見

非典型的なカドヘリンを起点とするアプローチとは別に、Fz 小胞の細胞内輸送に着目し、モータータンパク質や微小管動態を調節する既知の分子に的を絞って、PCP を調節する分子を拾いだそうと試みたが、成功しなかった。そこで既知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、遺伝学的スクリーニングを行った。標的とした染色体は、PCP に異常を引き起こす突然変異の網羅的な探索がされていなかった 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) である。突然変異を誘発した 10,000 以上の X 染色体のそれぞれについて、モザイク解析法を用いて成虫の翅を観察し、翅毛の向きが異常になる表現型を示す 57 系統を分離した。さらに各々の突然変異について、コアグループに属する Fmi の細胞内局在や細胞内翅毛形成部位を観察して、それらの表現型や表現型の浸透度などから 18 系統に絞り込んだ。このうち以下の2つの原因遺伝子に着目して解析している。

一つの遺伝子は、Cohesin complex のサブユニットである SMC3 をコードしていた。この遺伝子の突然変異をホモに持つ細胞集団 (ミュータントクローン) は、周囲の野生型細胞と比べて Fmi タンパク質のレベルが上昇する傾向があった。ミュータントクローン内で *fmi* の発現をノックダウンすると PCP の異常は抑制されるので、Fmi レベルの亢進が PCP 表現型の原因の少なくとも一つになっていることが示された。このミュータントクローン内では、表皮頂部面での細胞のパッキング (充填) が異常になる点にも特徴がある。Cohesin complex は postmitotic cell において遺伝子発現を調節することが報告されているので、*fmi* 遺伝子の発現レベルの変動を調べている。

③ 成果の位置づけと類似研究との比較

PCP研究の新たな広がり

最近数年間の他のグループの研究から、コアグループ (あるいはそのメンバーの一部) や Ft-Ds グループは、上皮組織に限らず、動物発生における細胞間接触を介する様々な細胞再配列の局面での役割が報告されてきた。具体的には、神経堤細胞間の接触依存的な運動停止と、接触点からの忌避的運動 (Carmona-Fontaine et al., *Nature* 2008)、運動神経の移動経路の制限 (Wada and Okamoto, *Dev. Growth, Differ.*, 2009)、神経軸索束の形成 (Zhou et al., *Science*, 2008) などである。従って、PCP 調節因子の役割は上皮平面の文脈を越えて、各方面から注目を浴びている。しかしながら依然として、ノックアウトなどの表現型の記載にとどまり、扱っているコアグループメンバーから細胞の挙動までを結びつけた研究は少ない。また、一部のコアグループがなぜ限局した形質膜ドメインに局在して機能するようになるのか、さらにはコアグループと Ft-Ds グループは分子レベルでどのような関係にあるのか、遺伝学的手法を越えて踏み込んだ研究も少ない。本研究はそのいずれにもブレークスルーを開いた。

その一方で、我々はコアグループの局在化機構について、極性輸送以外のメカニズムを排除するものではないし、コアグループと Ft-Ds グループの関係についても図 7B にあげたのは重要な機能的連関の一つだと考えている。上述したように、様々な動物種の様々な細胞タイプにおいて、PCP 調節因子は少しずつ異なる使われ方をしたり、ショウジョウバエの上皮に限っても PCP のアウトプットとして何に着目するかによって、メカニズムが異なることが示されている (Goodrich and Strutt, *Development*, 2011)。実際に、本研究のイメージングシステムを立ち上げ、Fz:GFP の挙動を DE-cadherin:GFP と比較しつつ観察し

ていると、極性輸送では説明できないような Fz:GFP の奇妙な振る舞いに驚かされることがある。コアメンバーだけでなく、捉えつつある Ft や Ds の挙動のイメージング解析に加えて、巨大膜貫通タンパク質の生化学的取扱の工夫も重視して研究を進展する必要がある。

(2)研究成果の今後期待される効果

in vivo 1粒子定量的バイオイメージングへの展開と課題

1. in vivo での1粒子定量解析が直面する問題

これまで様々な研究から1分子・1粒子レベルでの生体高分子の挙動が調べられてきた。しかし、組織内の細胞に含まれる1粒子レベルの挙動を、定量的かつ統計的に調べた例はほとんど無い。我々がこの問題に取り組むに際し、イメージングにおける S/N の問題、画像解析における粒子以外のバックグラウンドシグナルの問題、そして褪色などの理由から1粒子あたりの観測フレーム数が限られることによる解析方法の問題など、in vivo 1粒子解析特有の問題を解決してきた。このノウハウは今後ますます重要になる in vivo での1分子定量解析の基礎となると思われる。

2. MSD (Mean-Square Displacement) 解析の限界？

Fz 小胞の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。独自の解析方法を模索したために、当初の研究計画より時間を要した(図 6F)。MSD 解析は、一般に広い空間内で、多数のステップを追跡できる系で用いられる。それに対して、我々の系は小さい細胞(長さ 5 μ m)の境界に小胞が達するまでしか、データが取れない。しかも追跡できる小胞の数が少ない上に、各々の小胞について褪色を最大限抑える努力をしたが、100-200 steps が限度だった。これらが原因となって、MSD 解析では統計的性質を発見できなかったのかもしれない。

3. 対数正規分布に従うランダムウォーク

我々の解析から、生体内の粒子の速度分布が対数正規的な分布に従うことが明らかになってきた。対数正規分布は通常のランダムウォークが従う正規分布と異なり長い裾を持つ。生物に限らない物理の研究ではこの長い裾を持つ分布の特性が注目され、現在様々な方面から解析されている。我々の発見は、今後 in vivo における分子動態を考える上での基礎的な知見となり得る。

4. 全自動化ではなく半自動化

バイオイメージの画像解析の中でも、比較的手法が進んでいるのは、細胞内小胞などの粒子状オブジェクトの位置同定である。しかしながら生体内での Fz 小胞の追跡のようにバックグラウンドノイズが大きい場合や、EB1:GFP のように複数のシグナルの軌跡が交差する場合には、正確な粒子の同定や追跡は今なお技術的な課題があり、全自動化にこだわらない選択がある。実際本研究では、半自動化することで乗り越えた。すなわち、観察者の目に頼るステップでの手間を軽減するツールを開発した(図 2B と図 6D)。

5. 細胞膜などの境界領域の同定

小胞のような粒子状のオブジェクトの同定に対し、細胞膜などの境界領域の同定はまた違った難しさがあった。特に上皮のように多数の細胞が密着している状態では、境界自体が均一に標識されていないければ、境界領域が分断されて同定されることも多く、また逆に、細胞内小胞のように形質膜とは異なる場所にシグナルが出てしまうと誤って膜として同定されてしまった。バンドパスフィルターやモルフォロジー演算など古典的な解析手法を組み合わせることにより、十分ではないが問題を解決する手法は作ることができる。ここでもやはり問題はシグナル/ノイズであり、褪色を避け得ない経時観察では精度が犠牲になる。我々は、連続する時間点での解析結果を統合することにより精度を上げる手法を開発してこの問題に対応した。

6. バイオイメージ解析の分野全体の体系化

バイオイメージの領域では、対象とするデータが個別現象ごとに質的に非常に多様である。バイオイメージ解析の分野全体を問題別に体系化して、その中に本研究で蓄積したノウハウを納めて、他の画像データと統一的に扱う枠組みを明確にすることによって新たな展望がひらけるのではないかと考えている。

4.2 マウス絨毛上皮における平面内極性形成の可視化と分子基盤の解明(基礎生物学研究所 藤森グループ)

(1)研究実施内容及び成果

①研究のねらい

ショウジョウバエをモデル系とした研究で明らかになった動作原理が、脊椎動物の絨毛上皮が示す PCP にもあてはまるかどうかを検証する。脊椎動物の絨毛上皮では、個々の細胞が絨毛を発達させ、それらは定まった軸に沿って往復運動してその機能を果たす。ショウジョウバエはこのような絨毛上皮を持たないが、ハエの研究で明らかになった原理が脊椎動物の絨毛運動の極性化にも働いているのだろうか。本研究では、主にマウスの卵管上皮を対象とし、Fmi ホモログ(Celsr1-Celsr3)の機能解析を行うと共に、ショウジョウバエ同様、PCP の発達過程におけるコアグループや種々のオルガネラなどの動態をライブイメージングで追跡できる系を構築して、PCP 発達の動作原理を追究している。

卵管の卵巣側入り口から、受精が行われる卵管膨大部 (ampulla) までは、卵管漏斗 (infundibulum) と呼ばれ、その上皮の約8割が絨毛細胞で占められている(図 9)。本研究では、この卵管漏斗を研究対象としている。絨毛は卵巣から子宮に向かって運動しており、これによって卵丘細胞に覆われた卵子(卵胞)を運搬していると考えられる。さらに卵管漏斗内には多数のヒダが形成されており、このヒダは卵管の軸に並行に走っている。従って、卵管では個々の細胞の絨毛運動の方向性に加えて、ヒダのような多細胞から成る3次元構造体も一種の planar polarity を獲得している。

Regional differences in the mouse oviduct

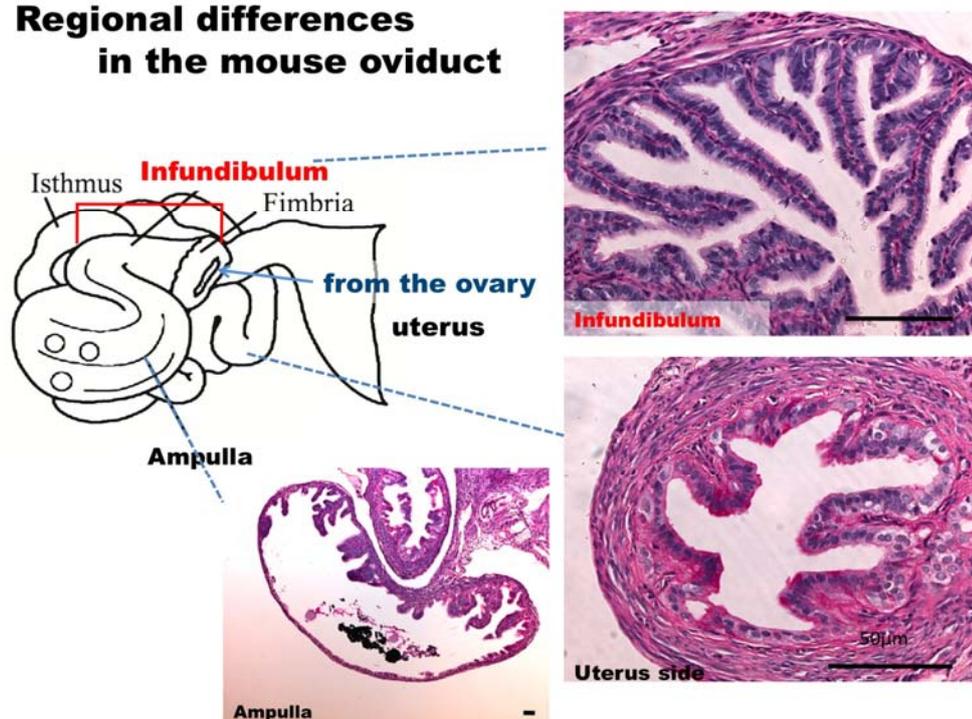


図 9 卵巣から子宮までの模式図と、マウス(15 週齢)の卵管の異なる部位での組織切片像 (左上段) 卵管の模式図。(右上段) 卵管の卵巣側の入り口である卵管漏斗 (infundibulum)。上皮の大半が絨毛細胞で占められている。また、多数のヒダが形成されている。(左下段)受精が行われる卵管膨大部

(ampula). (右下段)卵管膨大部から子宮側は (uterus side) 上皮細胞の大部分は分泌細胞で占められ、周囲に筋層が発達している。この領域では筋収縮によるぜん動運動で、卵子が輸送される。

②実施方法・内容・成果

2-1. ライブイメージングのためのマーカー系統作製とイメージングシステムの構築(原著論文 1, 7, 10, 11, 12, 15-17)

PCP の発達過程において可視化を目指したタンパク質には、ショウジョウバエコアグループのマウスホモログや、繊毛、微小管、そして種々のオルガネラのマーカーとなるものを選んだ。それぞれの蛍光タンパク質との融合タンパク質を、独自に開発した卵管上皮への電気穿孔法により発現させ、コンストラクトを絞込んだ後、**Rosa26** 遺伝子座に挿入させたノックインマウスあるいはトランスジェニックマウスを作製した。現在までに観察に耐えるレベルのシグナルを発する系統の作製に成功したのは、**Vangl2:EGFP**、**EB1:GFP**、**Venus-Moesin**、**Venus-actin** などである。**Vangl2:EGFP** は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あり、これは内在の **Vangl2** の局在と一致した。**Vangl2:EGFP** を電気穿孔法によって卵管上皮でモザイク状に発現させた観察結果から、**Vangl2:EGFP** は卵管軸に対して、卵巣側の細胞境界に局在することがわかった。この局在様式は、ショウジョウバエ翅表皮における近位側細胞境界での **Vang** の局在 (図 1C) とよく似ている。以上のノックインマウス、トランスジェニックマウス作製と並行して、卵管上皮における PCP の発達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分散した上皮細胞の培養系を開発した。器官培養系では二日間の経時観察が可能であり、その間上皮は成長する。また分散培養では、単離した上皮細胞から繊毛細胞のシートを形成できたので、今後の極性の再構成実験に用いる事ができる。これらの培養系を用い、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。

2-2. 野生型マウス成体の卵管の繊毛運動の解析(原著論文 13)

マウスの卵管漏斗(以後、卵管と表記する)の繊毛細胞に関する知見はヒトやブタなどに比べて乏しい。まずマウス成体(8-12週齢)の卵管上皮を管に沿って切り開き、高速度カメラを用いて観察したところ、いずれの繊毛も卵管軸(以後、単に軸と表記する)に沿って子宮に向かって速く、そして卵巣に向かって遅い非対称な運動をしていた。また、切り開いた卵管の卵巣側付近に卵丘細胞に包まれた卵(卵丘・卵母細胞複合体)を置いたところ、繊毛細胞の10倍以上の大きな複合体は卵管に吸い込まれ、子宮側へ輸送された。従って、一方向性の繊毛運動が卵の輸送において重要な役割を果たしていることが示唆された。その他、性周期を通じた繊毛運動や繊毛の発達段階などを明らかにした。ハイスピードカメラの画像の輝度から、繊毛運動の周波数の自己相関値を解析する方法を開発し、その方法を用いて排卵が行われている発情期と排卵後の間期において、繊毛運動の周波数はそれぞれ $8.5\text{Hz}\pm 2.5$ と $10.9\text{Hz}\pm 3.3$ (平均 \pm 標準偏差)だとわかった。また、成体マウスの卵繊毛運動は局所的に高い周期性が保たれているが、全体として周波数が統一されていなかった。

2-6. *Clesr2* と *Celsr3* が脳室上衣細胞の繊毛形成と運動に果たす役割(原著論文 8)

脳室上衣細胞の繊毛にも着目し解析を進めた。野生型マウスの脳室では脳室上衣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、*Clesr2* あるいは *Celsr3* ノックアウトマウスでは繊毛形成自体と運動の異常により、脳室内で正常な還流が生み出されず水頭症を発症した。この結果は、*Celsr2* および *Celsr3* が、繊毛形成自体と運動の極性化(一方向への運動)の両方に重要な役割を果たすことを示している。なお、*Celsr2* ノックアウトマウスについては卵管も調べたが、明らかな異常は検出できなかった。繊毛運動の向き、周期、そして協調性のいずれにおいても、野生型とノックアウトとの間で顕著な違いを検出できなかった。

③成果の位置づけと類似研究との比較

上述したように、*Celsr1* ノックアウトマウスの表現型は、軸に沿った細胞伸長、細胞内および細胞間での繊毛運動方向のコーディネーション、そして上皮シートが変形してできあがる3次元構造(ヒダ)まで、複数の階層にまたがっていた。我々はまだ予備的な解析段階ではあるが、*Celsr1* は直接的な役割は上皮細胞に力学的なインテグリティを付与することではないかと模索している。もしこの可能性が正しければ、繊毛運動方向の異常は、上皮細胞の力学的インテグリティが不足した(2次的な?)結果である可能性が出てくる。PCP 研究の発展型が、器官の3次元構築の仕組みに新しい切り口を与えることができるかもしれない。

(2)研究成果の今後期待される効果

多細胞生物が器官を作るにあたって、効率よく細胞を制御する一つのシステムが PCP であると考えられるのではないかと期待される。器官の3次元の形態形成はまだ未解明の謎が多く、そこに切り込むことができるのではないかと期待される。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表(国内(和文)誌 2件、国際(欧文)誌 16件)

1. Kurotaki Y, Hatta K, Nakao K, Nabeshima Y, and Fujimori T. Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science*, 316:719-723 (2007).
2. Shima Y, Kawaguchi SY, Kosaka K, Nakayama M, Hoshino M, Nabeshima Y, Hirano T, and Uemura T. Opposing roles in neurite growth control by two seven-pass transmembrane cadherins. *Nature Neuroscience*, 10:963-969 (2007).
3. Rolls MM, Satoh D, Clyne PJ, Henner AL, Uemura T, Doe CQ. Polarity and intracellular compartmentalization of Drosophila neurons. *Neural Development*, 2: e7(total 15 pages) (2008).
4. 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).
5. 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).
6. 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: e37(total 20 pages) (2009).
7. Toshihiko Fujimori, Yoko Kurotaki, Kouji Komatsu, and Yo-ichi Nabeshima. Morphological organization of the mouse preimplantation embryo. *Reproductive Science*, 16: 171-177 (2009).
8. 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: 700-707 (2010)
9. Toshiyuki Harumoto, Masayoshi Ito, Yuko Shimada, Tetsuya J. Kobayashi, Hiroki R. Ueda, Bingwei Lu, and Tadashi Uemura. Atypical cadherins Dachous and Fat control dynamics of noncentrosomal microtubules in planar cell polarity. *Developmental Cell*, 19:389-401 (2010).
10. Fujimori T, Preimplantation development of mouse: A view from cellular behavior. *Develop. Growth Differ.*, 52, 253-262, (2010).
11. Niwa H, Fujimori T, **Stem cell systems in development of mammals.** *Develop. Growth Differ.*, 52, 251-251, (2010).
12. 藤森俊彦、マウス初期胚における細胞分裂と発生。「細胞周期フロンティア」。共立出版。168-173、(2010)。
13. Dongbo Shi, Kouji Komatsu, Tadashi Uemura, and Toshihiko Fujimori, Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct. *Genes to Cells*, 16: 282-290 (2011).
14. Daisuke Matsubara, Shin-ya Horiuchi, Kohei Shimono, Tadao Usui, and Tadashi Uemura. The Seven-pass transmembrane cadherin Flamingo controls dendritic self-avoidance via its binding to a LIM domain protein Espinas in Drosophila sensory neurons. *Genes & Development*, 25: 1982-1996 (2011).
15. Shioi G, Kiyonari H, Abe T, Nakao K, Fujimori T, Jang C, Huang C, Akiyama H, Behringer R R, and Aizawa S, A mouse reporter line to conditionally mark nuclei and cell membranes for in vivo live-imaging. *Genesis*, 49: 570-578 (2011).

16. Abe T, Kiyonari H, Shioi G, Inoue K, Nakao K, Aizawa S, and Fujimori T, Establishment of conditional reporter mouse lines at ROSA26 locus for live cell imaging. *Genesis*, 49: 579-590 (2011).
17. Kousuke Mouri, Shin-ya Horiuchi, and Tadashi Uemura. Cohesin Controls Planar Cell Polarity by Regulating the Level of the Seven-Pass Transmembrane Cadherin Flamingo. *Genes to Cells*, in press.

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

1. Hiroshi Kimura, and Tadashi Uemura. Cadherins in “*Encyclopedic Reference of Neuroscience*”. EDT: Binder, Marc D.; Hirokawa, Nobutaka; Windhorst, Uwe; Hirsch, Martin Christian. Springer-Verlag (2008).
2. Toshihiko Fujimori. Preimplantation development of mouse: A view from cellular behavior. *Development, Growth & Differentiation* 52, 252-262 (2010).
3. Tadashi Uemura. Differential Hippo Signaling in Early Mouse Embryos. *Developmental Cell*, 20:e3. DOI 10.1016/j.devcel.2011.03.006.
4. 小松紘司、藤森俊彦、ライブセルイメージングによる着床前胚発生研究、*HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 18, No.1, 13-18, (2011).

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 14 件、国際会議 22 件)

1. Tadashi Uemura (Kyoto University). Logic of shaping cells in development: Roles of seven-pass transmembrane cadherin, Thursday Seminar at Max Planck Institute of Cell Biology and Genetics, Nov, 2006. Dresden.
2. Toshihiko Fujimori (Kyoto University). Environmental cue from the flattened zona pellucida plays a primary role in the blastocyst axis specification of mouse. The 112th Annual Meeting of the Japan Association of Anatomists, Japan-US Joint Symposium “Early mammalian development: From fertilization to implantation.” March 2007. Osaka.
3. Tadashi Uemura (Kyoto University), “Shaping cells in development”, 4th NIBB-EMBL MEETING "CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY", NIBB at Okazaki, May 24-27, 2007.
4. 藤森俊彦(京都大学)。細胞の振る舞いを観察してマウス着床前胚を考える。第 21 回モロシヌス研究会。2007 年 6 月。淡路。
5. Toshihiko Fujimori (Kyoto University). Morphological organization of mouse preimplantation embryo. 2nd SGI International Summit on Reproductive Medicine. Nov, 2007. Valencia.
6. Toshihiko Fujimori (Kyoto University/National Institute of Basic Biology). Analysis of cell behaviors in early mouse embryos. U.T.M.D. Anderson Cancer Center-RIKEN-CDB (Kobe, Japan) Joint Symposium: Vertebrate Development and Organogenesis. Nov.20-21, 2008. Houston.
7. Toshihiko Fujimori (Kyoto University/National Institute of Basic Biology). Analysis of cell behaviors in early mouse embryos. San Francisco-Japan Joint Meeting on Vertebrate Organogenesis. Nov.24-25, 2008. San Francisco.
8. 上村匡(京都大学)。How to connect global tissue asymmetry to cell polarity on the plane. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会。Dec. 12-19 2008. Kobe.
9. 藤森俊彦(京都大学/基礎生物学研究所)。胚の形作りと関連する局所的細胞周期。第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会シンポジウム「細胞周期制御と高次生命現象」。2008 年 12 月 9 日—12 日。神戸。
10. Toshihiko Fujimori (National Institute of Basic Biology). Analysis of cell behaviors during preimplantation mouse development. Keystone Symposia, “Frontiers in

- Reproductive Biology and Regulation of Fertility.” Feb, 2009. Santafe.
11. Tadashi Uemura (Kyoto University), Roles of organelle dynamics in shaping cell. The 50Annual Drosophila Research Conference, March 4–8, 2009. Chicago.
 12. Toshihiko Fujimori (National Institute of Genetics). Analysis of Cell Behaviors in Early Mouse Development. The 9th NIBB–EMBL Symposium. Apr. 20-22, 2009. Okazaki.
 13. Tadashi Uemura (Kyoto University). Roles of organelle dynamics in shaping cells in vivo. The 5nd National Taiwan University (NTU)-Kyoto University Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology. May 23, 2009. Kyoto.
 14. Tadashi Uemura (Kyoto University). Linking global organ asymmetry to cell polarity on the plane. The 42nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biology (JSDB). May 28-30, 2009. Niigata.
 15. Tadashi Uemura (Kyoto University). Linking Global Tissue Asymmetry to Cell Polarity on the Plane. The American Society for Cell Biology/Japan Society for Cell Biology/RIKEN Center for Developmental Biology 2009 Meeting “Building the Body Plan: How Cell Adhesion, Signaling and Cytoskeletal Regulation Shape Morphogenesis”, September 21-23, 2009. Kyoto.
 16. Fujimori T (National Institute of Basic Biology). Cell divisions relating to the morphogenesis of the early mouse embryo. 第 82 回日本生化学会大会、Oct 21-24, 2009. Kobe.
 17. 藤森俊彦(基礎生物学研究所)。マウス初期胚のライブイメージング、奈良先端科学技術大学院大学シンポジウム「見る生物学4」。Nov 24-25, 2009. 奈良。
 18. Toshihiko Fujimori (National Institute of Basic Biology). Analysis of Cell Behaviors in Early Mouse Development. The 9th NIBB–EMBL Symposium. Apr. 20-22, 2010. Okazaki.
 19. Toshihiko Fujimori (National Institute of Basic Biology). Behaviors of Cell and Gene Expression during the Preimplantation Mouse Embryo. The First SKLRB Symposia on Frontiers in Peri-implantation Biology. May 8-12, 2010. Beijing.
 20. 藤森俊彦(基礎生物学研究所)。新たに広がる哺乳類初期発生研究の可能性、第 62 回日本細胞生物学会大会。May 19-21, 2010. 大阪。
 21. Tadashi Uemura (Kyoto University). Linking global tissue asymmetry to cell polarity on the plane. The 7th iCeMS International Symposium“Emerging Approaches and Applications in Developmental Biology: Taking the Next Step”. June 24, 2010. Kyoto.
 22. Tadashi Uemura (Kyoto University). Linking global tissue asymmetry to cell polarity on the plane. SDB-JSDB Joint Meeting. Aug 5-9, 2010. Albuquerque.
 23. Tadashi Uemura (Kyoto University). The 20th Hot Spring Harbor Symposium and joint with the 6th Global COE International Symposium “New Horizons for Modern Science -Biology and Medicine at the Crossroads-“August 19-20, 2010. Fukuoka.
 24. 藤森俊彦(基礎生物学研究所)。マウス初期胚における細胞と遺伝子の挙動の解析。第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会。Sep. 4-5, 2010.Tokyo.
 25. Toshihiko Fujimori (National Institute of Basic Biology). Cellular behaviors in early mammalian embryonic development. 第 48 回日本生物物理学会年会。Sep. 20-22, 2010. Sendai.
 26. 上村匡(京都大学)。平面内細胞極性における非典型的カドヘリンの機能解析。神戸大学大学院医学研究科セミナー。4 月 15 日、2011 年。神戸。
 27. Toshihiko Fujimori (National Institute of Basic Biology). Roles of a seven-pass transmembrane cadherin Celsr1 in multi-ciliated epithelial cells of the mouse oviduct. 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. May 18-21 2011. Okinawa.
 28. Tadashi Uemura (Kyoto University). Linking global tissue asymmetry to cell polarity on the plane. The 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference

- (APDRC). May 22-25, 2011. Taipei.
29. Tadashi Uemura (Kyoto University). Linking global tissue asymmetry to cell polarity on the plane in “Cytoskeleton: Basic, Progress, and Future”. 第 63 回日本細胞生物学会年会. June 27-29, 2011. Sapporo.
 30. 小林徹也(東京大学)。定量的な生命科学と情報・数理技術。第 84 回日本生化学会大会シンポジウム「細胞内ロジスティクスの融合研究」。9 月 21 日、2011 年。京都。
 31. Tadashi Uemura (Kyoto University). Linking global tissue asymmetry to cell polarity. Exciting Biology Series: “Cellular development: Biology at the interface”. September 29-October 1, 2011. Kobe.
 32. 小林徹也(東京大学)。バイオイメージングと画像情報処理の技術: 定量的な解析にむけて。日本顕微鏡学会第 55 回シンポジウム「発生過程における細胞移動ライブイメージング」。9 月 21 日、2011 年。高松。
 33. Tadashi Uemura (Kyoto University). Linking global tissue asymmetry to cell polarity. Developmental Control of Sex, Growth and Cellular Fate. October 11-October 15, 2011. Cold Spring Harbor Asia at Suzhou.
 34. Tadashi Uemura (Kyoto University). The Seven-pass transmembrane cadherin: multiple missions in vivo in “Frontiers in Science – a symposium supported by HFSP”. 第 34 回日本分子生物学会年会. December 13-16, 2011. Yokohama.
 35. 藤森俊彦(基礎生物学研究所)、ほ乳類の初期発生。第 8 回宮崎サイエンスキャンプ。2 月 18 日、2012 年。宮崎。
 36. Tadashi Uemura (Kyoto University). Linking global tissue asymmetry to cell polarity. Quantitative Developmental Biology. March 26-28, 2012. Kobe.

② 口頭発表(国内会議 7 件、国際会議 4 件)

1. Tadashi Uemura (Kyoto University). Polarized transport of Frizzled-Flamingo vesicles and exploring the origin of its asymmetry in the Drosophila wing, The Cell Workshop, "The Biology of Shape", 2006.10.27-29, Barcelona.
2. Tadashi Uemura (Kyoto University). Shaping and reshaping diverse morphologies of cells in development. GCOE 生命数理セミナー。2 月 20 日、2009 年。京都。
3. Toshiyuki Harumoto (Kyoto University). Atypical Cadherins Dachsous and Fat Control Alignment and Polarity of Microtubules in Planar Cell Polarity. The 7th International Student Seminar. March 12, 2009. Kyoto. (優秀発表賞受賞)
4. 上村匡(京都大学)。Roles of organelle dynamics in shaping cells in vivo. 首都大学東京セミナー。4 月 21 日、2009 年。南大沢。
5. Tadashi Uemura (Kyoto University). Linking Global Tissue Asymmetry to Cell Polarity on the Plane. CDB Symposium 2009 “Shape and Polarity”, March 25-29, 2009 in Kobe.
6. Toshiyuki Harumoto (Kyoto University). Atypical Cadherins Dachsous and Fat Control Alignment and Polarity of Microtubules in Planar Cell Polarity. The 9th Japanese Drosophila Research Conference, July 6-8, 2009. Kakegawa.
7. Toshiyuki Harumoto (Kyoto University). Atypical Cadherins Dachsous and Fat Control Alignment and Polarity of Microtubules in Planar Cell Polarity. 第 82 回日本生化学会大会。10 月 21 日-24 日。神戸。2009 年。
8. 上村匡(京都大学)。動物体内での小胞輸送の定量的解析—平面内細胞極性を舞台として—。新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」班会議。11 月 9 日-12 日。沖縄。2009 年。
9. Tetsuya J. Kobayashi (Tokyo University). Image Analysis Reveals Statistical Properties of Randomly-Walking Intracellular Particle in vivo. MIRU 2010 サテライトワークショップ「細胞内画像処理」。2010 年 7 月 26 日(月)。
10. 石 東博(京都大学)。マウス卵管上皮の繊毛運動とその極性形成。日本発生生物学会 夏季シンポジウム 2010。8 月 25-27 日。八王子。
11. Tadashi Uemura (Kyoto University). Quantitative analysis of Fz-vesicle dynamics.

PCP MEETING. May 26-28, 2010. Elba.

③ ポスター発表 (国内会議 14 件、国際会議 21 件)

1. 毛利亘輔(京都大学)。Hunting for Novel Genes that Regulate Planar Cell Polarity. 日本発生物学会第 41 回年会。5 月 28 日—30 日、2008 年。徳島。
2. Toshiyuki Harumoto (Kyoto University). Control of alignment and polarity of apical non-centrosomal microtubules in planar cell polarity. Joint Meeting of French and Japan Societies of Developmental Biologists “Frontiers in Developmental Biology”, September 13-17, 2008. Giens.
3. Kouji Komatsu (Kyoto University, National Institute of Basic Biology). The analysis of cell movement and expression of Oct4, Nanog and Cdx2 during mouse blastocyst formation. Joint Meeting of French and Japan Societies of Developmental Biologists “Frontiers in Developmental Biology”, September 13-17, 2008. Giens.
4. 春本敏之(京都大学)。Control of alignment and polarity of apical non-centrosomal microtubules in planar cell polarity. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会。12 月 9 日—12 日、2008 年。神戸。
5. 碓井理夫(京都大学)。Control of Dendritic Self-Avoidance by the Seven-Pass Transmembrane Cadherin Flamingo in *Drosophila* Sensory Neurons. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会。12 月 9 日—12 日、2008 年。神戸。
6. 毛利亘輔(京都大学)。Hunting for novel genes that regulate planar cell polarity. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会。12 月 9 日—12 日、2008 年。神戸。
7. 上村匡(京都大学)。分子集合体—オルガネラ—1細胞—器官:マルチスケールでの経時観察と画像解析の実践に向けて。定量生物学の会第1回年会。1月10日—12日、2009年。東京。
8. 石東博。卵管上皮細胞における平面内細胞極性について。定量生物学の会第1回年会。1月10日—12日、2009年。東京。
9. Kousuke Mouri (Kyoto University). Hunting for Novel Genes that Regulate Planar Cell Polarity. The 7th International Student Seminar. March 12, 2009. Kyoto.
10. Shin-ya Horiuchi (Kyoto University). Hunting for Mutations that Affected Planar Cell Polarity (PCP): Multiple Phenotypes of Misoriented Hairs, Cell Packing Defect, and Mislocalization of a PCP Protein. The 7th International Student Seminar. March 12, 2009. Kyoto.
11. Toshiyuki Harumoto (Kyoto University). Linking Global Tissue Asymmetry to Cell Polarity on the Plane. CDB Symposium 2009 “Shape and Polarity”, March 25-29, 2009. Kobe.
12. Kousuke Mouri(Kyoto University). Hunting for Novel Genes that Regulate Planar Cell Polarity: Mutations that Affect both PCP and the Canonical Wnt Pathways. CDB Symposium 2009 “Shape and Polarity”, March 25-29, 2009. Kobe.
13. Tadao Usui (Kyoto University). Control of Dendritic Self-Avoidance by the Seven-Pass Transmembrane Cadherin Flamingo in *Drosophila* Sensory Neurons. CDB Symposium 2009 “Shape and Polarity”, March 25-29, 2009. Kobe.
14. Shin-ya Horiuchi(Kyoto University). Hunting for Mutations that Affected Planar Cell Polarity (PCP): Multiple Phenotypes of Misoriented Hairs, Cell Packing Defect, and Mislocalization of a PCP Protein. CDB Symposium 2009 “Shape and Polarity”, March 25-29, 2009. Kobe.
15. Daisuke Matsubara (Kyoto University). Espinas, a *Drosophila* PET-LIM Family member, Mediates Signalling of Flamingo, the Seven-pass Transmembrane Cadherin, and Regulates Inhibitory Interaction between Sister Dendrites in Sensory Neurons. The 5nd National Taiwan University (NTU)-Kyoto University Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology. May 23, 2009. Kyoto.

16. Kousuke Mouri(Kyoto University). Hunting for Novel Genes that Regulate Planar Cell Polarity: Mutations that Affect both PCP and Cell Packing. The 42nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biology (JSDB). May 28-30, 2009. Niigata.
17. Shin-ya Horiuchi(Kyoto University). Hunting for Mutations that Affected Planar Cell Polarity (PCP): Mislocalization or Reduced Level of a PCP Protein. The 42nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biology (JSDB). May 28-30, 2009. Niigata.
18. Kousuke Mouri(Kyoto University). Hunting for Novel Genes that Regulate Planar Cell Polarity: Mutations that Affect Both PCP and Cell Packing. The 9th Japanese Drosophila Research Conference, July 6-8, 2009. Kakegawa.
19. Shin-ya Horiuchi(Kyoto University). Hunting for Mutations that Affected Planar Cell Polarity (PCP): Mislocalization or Reduced Level of the PCP Core Member Flamingo. The 9th Japanese Drosophila Research Conference, July 6-8, 2009. Kakegawa.
20. Toshiyuki Harumoto(Kyoto University). Linking Global Tissue Asymmetry to Cell Polarity on the Plane. The American Society for Cell Biology/Japan Society for Cell Biology/RIKEN Center for Developmental Biology 2009 Meeting “Building the Body Plan: How Cell Adhesion, Signaling and Cytoskeletal Regulation Shape Morphogenesis”, September 21-23, 2009. Kyoto.
21. 石東博(京都大学)。マウス卵管上皮における膜タンパク質の局在の極性定量化。定量生物学の会 第二回年会。11月27-28日。東京。2009年。
22. 上村匡(京都大学)。動物体内での小胞輸送の定量的解析—平面内細胞極性を舞台として—。定量生物学の会 第二回年会。11月27-28日。東京。2009年。
23. Dongbo Shi(Kyoto University). Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport activity in mouse oviduct. The First SKLRB Symposia on Frontiers in Periimplantation Biology, May 8-12, 2010. Beijing.
24. Dongbo Shi(Kyoto University). Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in mouse oviduct. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network. Jun 20-23, 2010. Kyoto.
25. Toshiyuki Harumoto(Kyoto University). Planar Cell Polarity: Mechanisms Underlying Polarized Transport of Frizzled-containing Vesicles. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network. Jun 20-23, 2010. Kyoto.
26. Kousuke Mouri(Kyoto University). Planar Cell Polarity: A Mutation of a Cohesin-subunit Gene Affected both PCP and Cell Packing. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network. Jun 20-23, 2010. Kyoto. (優秀発表賞受賞)
27. Shin-ya Horiuchi(Kyoto University). An Ubiquitin Receptor Regulates Planar Cell Polarity in *Drosophila*. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network. Jun 20-23, 2010. Kyoto.
28. Tadashi Uemura(Kyoto University). Linking global tissue asymmetry to cell polarity. 1st HFSP Alumni Meeting – Japan. Oct 9, 2010. Tokyo.
29. Shin-ya Horiuchi(Kyoto University). An Ubiquitin Receptor Regulates Planar Cell Polarity in *Drosophila*. APRU Research Symposium. Nov 24-26, 2010. Kyoto.
30. Toshiyuki Harumoto(Kyoto University). Planar Cell Polarity: Mechanisms Underlying Polarized Transport of Frizzled-containing Vesicles. APRU Research Symposium. Nov 24-26, 2010. Kyoto.
31. 藤森俊彦(基礎生物学研究所)。ほ乳類初期発生の理解に向けて求めるもの。定量生物学

- の会 第三回年会。11月26-28日。東京。2010年。
32. 石東博(京都大学)。マウス卵管上皮における膜タンパク質の局在の極性定量化。定量生物学の会 第三回年会。11月26-28日。東京。2010年。
 33. Kousuke Mouri(Kyoto University). The Cohesin-subunit SMC3 Is Required for both Planar Cell Polarity and Cell Packing. The 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference (APDRC). May 22-25, 2011. Taipei.
 34. Daisuke Matsubara (Kyoto University). The Seven-pass transmembrane Cadherin Flamingo Controls Dendritic Self-avoidance via its Binding to a LIM Domain Protein Espinas in Drosophila Sensory Neurons. The 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference (APDRC). May 22-25, 2011. Taipei.
 35. Masaki Arata (Kyoto University). Exploring Molecular Functions of Atypical Cadherins Dachsous and Fat that Affect Morphogenesis at Multiple Levels from Cell to Organ. The 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference (APDRC). May 22-25, 2011. Taipei.

(4)受賞・報道等

①受賞

第26回 井上學術賞「多細胞システムの機能発現を支える細胞極性化の調節機構」

②報道

「神経の「樹状突起」絡まぬ仕組み解明 タンパク質介して警告信号」京都新聞 2011年9月28日。

「神経のもつれ たんぱく質で制御」読売新聞 2011年10月24日。

「繊毛の乱れ 病気の元」読売新聞 2012年4月2日。

(5)成果展開事例

①実用化に向けての展開

②社会還元的な展開活動

上村匡(京都大学)

- 得られた成果(原著論文 9)は、*Cell*誌 (142, 674-675) "A new spin on planar cell polarity." で紹介された。また、本年発表された以下の細胞極性における4つの総説のいずれにおいても引用された。
Developmental Cell 誌 (21: 120-133. "Planar Cell Polarity: Coordinating Morphogenetic Cell Behaviors with Embryonic Polarity" by Gray et al.)
Nature Reviews Genetics 誌 (12: 385-91. "Pointing in the right direction: new developments in the field of planar cell polarity" by Bayly and Axelrod)
Development 誌 (138:1877-92, "Principles of planar polarity in animal development" by Goodrich and Strutt)
Development 誌 (138:799-809, "Elaborating polarity: PAR proteins and the cytoskeleton" by Nance and Zallen; Figure 4 で発表論文の画像データを引用)された。)。
- Associate editor を務める *Developmental Cell* 誌創刊 10周年企画の一つとして、創刊から今日までの(他研究者による)同誌発表論文の中から印象的な一報を選び紹介することを依頼された(その他の著作物 3)。
- 本研究成果をインターネット(URL; <http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/cellpattern>)で公開し、一般に情報提供している。

藤森俊彦(基礎生物学研究所)

- 本研究成果をインターネット(URL; <http://www.nibb.ac.jp/embryo/>)で公開し、一般に情報提供している。

§ 6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

上村 匡(京都大学)				
年月日	名称	場所	参加人数	概要
2010年6月20日(日)	第43回日本発生生物学会年会・若手ワークショップ	京都大学芝蘭会館および京大会館	200名以上	第43回日本発生生物学会年会の大会長として、48演題の口頭発表の選考と企画を担当した。
2010年6月20日(日)	第43回日本発生生物学会年会・市民公開講座「生物の再生・形・時計」	京都市国際交流会館	280名	第43回日本発生生物学会年会の大会長として、企画立案と関係各方面への協力要請を担当した。実施は阿形清和教授(京都大学理学研究科)が担当した。京都府教育委員会、京都市教育委員会、京都新聞社に後援頂き、講演の司会は、堀川高校、ノートルダム女学院、洛西高校の学生が担当した。司会担当の高校生には講演者と事前に顔合わせをしてもらい、研究内容を理解する機会を設けた。238座席のホールから聴衆があふれるほどの盛況で好評を博した。
2010年6月21日(月)～23日(水)	日本発生生物学会・アジア太平洋発生生物学会ネットワーク国際合同大会 (The 43 rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Jointly sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network)	国立京都国際会館	877名(うち海外からの参加者は169名で19%を占めた。)	大会長として、学会員である14名の京都大学教員からなる実行委員会を組織し、企画立案から実施までを担当した。特別講演者として、Eric Wieschaus 博士 (Princeton University 教授、1995年ノーベル医学・生理学賞受賞)および Roel Nusse 博士 (Stanford University, School of Medicine 教授)を招聘した。優秀発表賞として表彰された30演題の中に、CREST研究の成果が含まれている(ポスター発表26)。877名の参加者は今までの日本発生生物学会単独の年会としては最大規模であった。
2010年6月24日(木)	The 7th iCeMS International Symposium “Emerging Approaches and Applications in Developmental Biology: Taking	京都大学百年時計台記念館国際交流ホール	146名(うち海外からの参加者19名)	京都大学物質－細胞統合システム拠点 (Institute for Integrated Cell-Material Sciences; iCeMS) の見学美根子准教授と共同で、Eric Wieschaus 博士 (Princeton University 教授、1995年ノーベル医学・生理学賞受賞)および

	the Next Step”			Roel Nusse 博士 (Stanford University, School of Medicine 教授)を招聘し、開催した。招待講演者の一人として、CREST 研究の成果を発表した(招待講演 17)。
藤森 俊彦(基礎生物学研究所)				
2009年12月8日(火)	出張講義「哺乳類の体の形作りの始まり」	愛知県立岡崎高等学校スーパーサイエンスハイスクール	40名(高校2年生理系クラス)	
2009年12月25日(金)	生物学オリンピック選手合宿講義(発生学)「脊椎動物の発生」	基礎生物学研究所	6名	生物学オリンピックの国内強化合宿として選抜された生徒を対象とした。
2010年3月21日(日)	第9回自然科学研究機構シンポジウム:ビックリ4Dで見るサイエンスの革新	東京国際フォーラム	350名(一般市民)	講演「哺乳類初期発生の理解の為にライブイメージング」を行った。
2010年10月2日(土)	基礎生物学研究所一般公開	基礎生物学研究所	3200名(一般市民)	講演「体作りの始まりー卵から体ができるまでー」を行った。
2011年6月7日(火)	国研セミナー「ほ乳類の初期発生を考える」	基礎生物学研究所	30名(岡崎市小・中学校理科教諭)	セミナー後のアンケート調査では全員から「満足した」あるいは「大変満足した。」との回答を得た。「学校教育に生かせる内容であった。」と好評を博した。

なお、平成 19 年度から平成 20 年度まで、チーム内ミーティングは2週間に1回の頻度で行った。藤森グループが平成 20 年 8 月～10 月に基礎生物研究所に異動した後は、年 4 回～6 回の頻度でメンバーが直接会合してミーティングを行っている。

§7 結び

謝辞

若手研究者育成の観点から、CREST 専任 RA 制度を設けて下さいました。また、共同研究者である藤森俊彦(採択時:京都大学大学院医学研究科助教)が、2008 年秋、基礎生物学研究所初期発生研究部門に教授として転出し、研究室を立ち上げることになった際、備品の追加申請をお願い申しあげましたところ、お聞き届け下さいました。合わせて心から御礼申し上げます。



2009年3月藤森研究室での研究打ち合わせ後のスナップ。研究室を立ち上げて約半年後でした。