

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14718

研究課題名(和文) 平面内細胞極性の向きを逆転させる未知の機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel mechanism by which the orientation of planar cell polarity is reversed

研究代表者

山崎 正和 (YAMAZAKI, Masakazu)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40373378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：平面内細胞極性(PCP)は、組織平面において細胞集団の向きが特定の方向に揃う現象である。これまでPCPの制御分子は、コアグループとDachsousグループの二つに大別され、両者の協働作用によりPCPが形成されると考えられてきた。しかしながら、興味深いことに、最近我々が見出した第三のPCP制御グループとコアグループに属する分子を同時に欠損させると、毛の向きが逆転する。この現象をPCP分野の既存の概念で理解するのは困難である。本研究において我々は、実験と数理モデルを駆使することで、筋肉による背板上皮の牽引(外力)がPCP逆転現象に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Planar cell polarity (PCP) is the collective alignment of polarized cells within the plane of the epithelium. In the *Drosophila notum*, the sensory bristles consistently point from anterior to posterior, and a defect in the PCP pathway on the notum leads to misoriented bristles. We previously carried out a genome-wide RNAi screen using the *Drosophila notum* and identified novel genes involved in multiple developmental processes including PCP. One PCP gene we identified in the RNAi screen is jitterbug (jbug), which is the *Drosophila* filamin ortholog. While RNAi of jbug results in misaligned bristles on the notum like that of known PCP genes, double RNAi of jbug and a member of the PCP core genes displays a unique phenotype in which the orientation of bristles and trichomes is reversed. In this study, using a combination of experiment and theory, we found that external forces generated by the indirect flight muscles play a critical role in the reversed PCP phenotype.

研究分野：細胞生物学

キーワード：発生・分化 細胞・組織 平面内細胞極性 PCP 数理モデル

## 1. 研究開始当初の背景

平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) とは、組織平面において、細胞や毛などの付属器の向きが特定の方向に揃う現象であり、様々な器官の機能発現に重要な役割を果たす。PCP を示す典型例として、内耳の有毛細胞の向きが挙げられる。全ての内耳有毛細胞は、音の振動を効率よく受容できるように、特定の方向に向かって不動毛を形成する。しかしながら、その配向性に異常が生じると、聴覚機能が著しく低下する。同様の現象は気管や卵管に存在する絨毛上皮細胞においてもみられ、絨毛運動の方向性と機能が密接に関連する。また近年、ヒトにおいて PCP 遺伝子の変異により様々な疾患が惹起されることも明らかとなっている。組織構築の基本原則を解明するという学術的重要性のみならず、医療応用や創薬の観点からも、PCP 制御機構の全貌解明が必要とされている。

ショウジョウバエを用いた遺伝学的研究により PCP を司る分子が最初に同定されたのを嚆矢とし、以後様々な動物種において多くの PCP 分子が同定され、PCP 分子のタンパク質間相互作用や細胞内局在の解析から PCP 分子群の動態が次々と解明された。その中でも、コアグループに属する分子群は、その名が表すように、PCP の形成過程において必須の役割を果たすと考えられている。コアグループは、7 回膜貫通型タンパク質 Frizzled (Fz) や 4 回膜貫通型タンパク質 Strabismus (Stbm) (別名: Van Gogh)、7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo 等によって構成される。コアグループがその機能を発揮する上で重要なことは、これらの分子が個々の細胞において非対称に局在することにある。例えば、Fz と Stbm は様々な分子と複合体を形成して互いに相反する細胞端に非対称に局在する (ショウジョウバエ背板の場合、Fz は体の後方側、Stbm は前方側に局在する)。コアグループに属する分子群の機能は相互に関連しており、本グループに属する分子の機能が一つでも欠落すると、コアグループ全体の機能が破綻する。

もう一つの主要な PCP 制御グループとして非典型的カドヘリン Dachshous (Ds) 等によって構成される Ds グループが知られている。Ds グループ分子はコアグループ分子の上流で器官の方向情報として働き、器官の特定の方向に沿ってコアグループ分子の非対称局在の向きを揃えるのに重要な役割を果たす。これまでに我々は、実験と数理モデルを駆使することで、両グループを繋ぐ分子機構を明らかにしている (Ayukawa et al. *Cell Reports*, 8, 610-621, 2014)。

このように、コアグループと Ds グループの協働作用により PCP が形成されると考えられているが、最近我々はコアグループや Ds グループとは全く異なる機能を有する新たな PCP 制御グループ (Jitterbug (Jbug) グループ) に属する分子群を同定している (\*Mummery-Widmer, \*Yamazaki (\*co-first author) et al. *Nature*

458, 987-992, 2009 および未発表)。ショウジョウバエ背板において、Jbug グループの構成遺伝子をノックダウンすると、コアグループ遺伝子を欠損させた時と同様に、毛の配向性が乱れる。しかしながら、驚くべきことに、Jbug グループ遺伝子とコアグループ遺伝子を同時にノックダウン (または欠損) させると、野生型ショウジョウバエと比較して、毛の向きが逆転する。コアグループの働きが無いにも関わらず、毛の向き (PCP) が逆方向に揃うのは大変興味深い。PCP 分野の既存の概念ではこの現象を理解するのは困難である。

## 2. 研究の目的

近年、実験で観察される現象をコンピューターシミュレーションで再現することにより、仮説の妥当性を提示する試みが盛んに行われているが、このような理論的手法の真価は未知の現象に対するアプローチの過程において発揮される。すなわち、シミュレーションから得られた仮説を実験で検証し、理論と実験の間を循環させることで、未知の現象の解明に貢献する大きな可能性を秘めているのである。

これまでに我々は、研究分担者の秋山との共同研究により PCP の数理モデルを構築している。この数理モデルは、実験で得られる様々な現象をシミュレーションで再現するのみならず、実験結果の予測も可能であった (Ayukawa et al. *Cell Reports*, 8, 610-621, 2014)。本研究では、この数理モデルを基に構築した改良型の PCP の数理モデルを駆使することで、上述の PCP 逆転現象を理解することを試みた。

## 3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ背板における PCP の数理モデルの構築

以前報告した数理モデル (Ayukawa et al. *Cell Reports*, 8, 610-621, 2014) は、各細胞における PCP 分子群 (Fz を含むタンパク質複合体および Stbm を含むタンパク質複合体) の挙動を組み込んで構築されている。本研究で着目する PCP 逆転現象を司る分子機構は不明であるため、現象論的視野に立ち、特定の PCP 分子群の挙動ではなく細胞の向きを一つのパラメータで表現することで数理モデルを構築した。その際、実際のショウジョウバエ背板の細胞数および外力の作用部位を反映させた。

(2) ショウジョウバエ背板における PCP 遺伝子のノックダウン

GAL4/UAS システムを用いて、ショウジョウバエ背板における PCP 制御遺伝子のノックダウンを実施した。具体的には、背板特異的 *pannier* (*pnr*) -GAL4 系統と PCP 遺伝子に対する IR (逆向き反復配列) 系統とを交配させることで様々な PCP 遺伝子を背板特異的にノックダウンした。IR 系統は、国立遺伝学研究所の NIG 系統および Vienna Drosophila RNAi センターの VDRC 系統、Transgenic RNAi

Project の TRiP 系統を使用した。

#### 4. 研究成果

ショウジョウバエ背板は、上皮細胞と外部感覚器から構成される一層の細胞シートからなる。外部感覚器からは **Bristle** と呼ばれる大型の毛が、上皮細胞からは **Trichome** と呼ばれる小型の毛が形成され、これらの毛は体の後部方向に配向する (PCP 制御系が異常になると、これらの毛の配向性が乱れる)。また、一部の上皮細胞は腱細胞に分化し、腱細胞から伸張する腱突起が背板上皮の基底側にある間接飛翔筋 (以下、筋肉と略) に結合する。発生過程において、筋肉は収縮・伸張し、その力は腱突起を介して、背板上皮へと伝わる。

上述した我々の遺伝学的解析 (**Jbug** グループ構成分子の同定) と並行して、米国の **Mlodzik** 博士のグループから、新規 PCP 分子 **Chascon** (**Chas**) が報告された (**Olguin et al. Current Biology, 236-242, 2011**)。 **chas** 遺伝子を欠損させると、背板上皮の毛の配向性が乱れるが、この異常は筋肉を除去すると救済される。この際、筋肉の収縮性は野生型と同程度であることから、 **chas** 遺伝子欠損による PCP 異常の原因として、外力 (筋肉による牽引) に対する上皮組織の頑強性の低下が考えられる。興味深いことに、 **Chas** は我々の遺伝学的解析において **Jbug** グループの構成分子として同定されており、この事実は本研究で着目する PCP の逆転現象に外力が関与することを示唆する。

最初に、我々は、ショウジョウバエ背板における PCP の数理モデルの構築に必要な実験データの取得を試みた。以下、得られた結果を記載する。

##### (1) ショウジョウバエ背板の細胞数

実験データを基に、ショウジョウバエ背板の細胞数を算出した。背板はドーム上に湾曲しているため全細胞数を測定するのは困難であるが、 **pnr-GAL4** 系統の **GAL4** 発現部位を十分にカバーする領域 (一部、 **GAL4** 非発現部位を含む) の細胞数を測定したところ、約 6400 個であった。

##### (2) 筋肉による背板上皮の牽引部位

筋肉により牽引される背板領域を明らかにするために、 **Jbug** グループ遺伝子を二つ同時にノックダウンして背板形態と毛の配向性への影響を解析した。 **Jbug** グループ遺伝子を単独でノックダウンした場合よりも、二種類の **Jbug** グループ遺伝子を同時にノックダウンすると顕著な PCP 異常が観察された。特筆すべきことに、二種類の **Jbug** グループ遺伝子を同時にノックダウンした場合、背板に深い陥入構造が出現し、筋肉により牽引される領域がより顕著となった。シミュレーションでは、この陥入構造が認められた部位に外力の効果を与えた。

##### (3) 外力による PCP の摂動機構

外力による PCP 摂動の分子機構は不明であるが、(2) の解析において陥入構造と毛の配向性 (PCP) に特定の法則が存在することを見出した。すなわち、陥入構造から遠ざかるように毛の向きが変化していることが明らかとなった。

##### (4) コアグループ分子の代替分子

上述したように、コアグループ分子群は、文字通り PCP 形成の“中核 (コア)”をなすものであり、隣接する細胞同士の間を協調的に揃える機能を有する。コアグループの機能欠損時に、代わりに機能する分子の実体は不明であるため、数理モデルの構築に際し、同様の機能を有する分子の存在を仮定した。

次に、これらの実験データ等を基に、数理モデルを構築し、PCP 逆転現象を再現できるか否かを検証した。その結果、シミュレーションにおいても実験結果と同様の PCP 逆転パターンが出現した (図 1)。しかしながら、様々な条件でシミュレーションを実施したところ、外力の影響範囲を減少させた場合や初期条件を改変した場合に、PCP 逆転現象を必ずしも再現できるわけではないことが判明した。

この結果の解釈の一つとして、上述の数理モデルに導入した外力の作用部位が不足しており、想定していない新たな外力の作用部位が実際の背板に存在する可能性があげられる。 **DE-cadherin** の局在を指標に、PCP が逆転している背板上皮の個々の細胞の形態および挙動を解析したところ、外力が作用する新たな部位を見出した。背板上皮の複数箇所に作用する外力が協調的に働くことによって PCP の逆転が惹起されることが示唆された。今後、コアグループの代わりに機能する分子の実体を解明し、PCP 逆転現象の分子機構を詳細に解析する予定である。

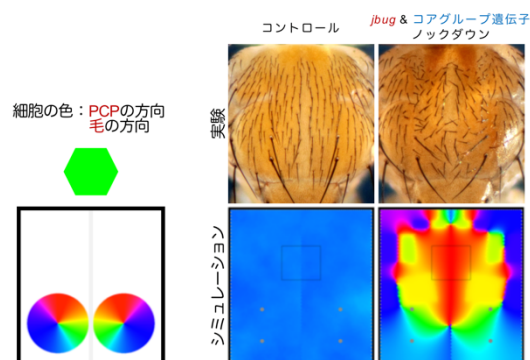


図1 シミュレーションによるPCPの逆転

#### <引用文献>

- ① **Ayukawa T, Akiyama M, Mummery-Widmer JL, Stoeger T, Sasaki J, Knoblich JA, Senoo H, Sasaki T and Yamazaki M: Dachshous-dependent asymmetric localization of Spiny-**

legs determines planar cell polarity orientation in *Drosophila*. *Cell Reports* 8, 610-621 (2014)

- ② \*Mummery-Widmer JL, \*Yamazaki M (\*co-first author), Stoeger T, Novatchkova M, Bhalerao S, Chen D, Dietzl G, Dickson BJ and Knoblich JA: Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature* (Article) 458, 987-992 (2009)
- ③ Olguin P, Glavic A and Mlodzik M. Intertissue mechanical stress affects Frizzled-mediated planar cell polarity in the *Drosophila* notum epidermis. *Current Biology*, 21, 236-242 (2011)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

(1) 鮎川友紀、八月朔日泰和、山崎正和 平面内細胞極性を司る新規調節機構の解析 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018 年 3 月 28 日~30 日、東京 (ポスター発表)

(2) 山崎正和 外力による PCP 制御機構の解析 第 3 回 生体調節研究所 内分泌代謝シンポジウム, 2017 年 11 月 13 日~14 日、群馬 (口頭発表)

(3) 鮎川友紀、八月朔日泰和、山崎正和 平面内細胞極性を司る新規調節機構の解析 日本解剖学会・第 63 回東北・北海道連合支部学術集会, 2018 年 9 月 9 日~10 日、東京 (口頭発表)

(4) 山崎正和 平面内細胞極性の向きが逆転する現象の解析 第 16 回生命科学研究会, 2017 年 6 月 30 日~7 月 1 日、金沢 (口頭発表)

(5) Tomonori Ayukawa, Yasukazu Hozumi and Masakazu Yamazaki: Functional analysis of a PCP regulator Jitterbug, The 4<sup>th</sup> Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, Osaka, May 8-11 2017 (Poster presentation)

(6) 鮎川友紀、山崎正和 平面内細胞極性を司る新規調節機構の解析 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017 年 3 月 28 日~30 日、長崎 (ポスター発表)

(7) 山崎正和、秋山正和 細胞集団が同じ方向を向く仕組み CREST「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」研究領域 第 7 回数理解デザイン道場, 2016 年 12 月 20 日、日本科学未来館 (東京) (招待講演)

(8) 鮎川友紀、佐々木雄彦、山崎正和 平面内細胞極性を司る新規調節機構の解析 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日、パシフィコ横浜 (横浜) (ポスター発表)

(9) 山崎正和 平面内細胞極性の分子機構 - 細胞集団が同じ方向を向く仕組み - 第 115 回「細胞シグナリング研究会」, 2016 年 6 月 27 日、横浜市立大学 (横浜) (招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
<http://www.med.akita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza.php?koza=kaibo2>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 正和 (YAMAZAKI Masakazu)  
秋田大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 40373378

(2) 研究分担者

秋山 正和 (AKIYAMA Masakazu)  
北海道大学・電子科学研究所・助教  
研究者番号: 10583908

鮎川 友紀 (AYUKAWA Tomonori)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 80586165

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )