

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657122

研究課題名（和文）平面内細胞極性を司る新規制御系の探索

研究課題名（英文）Searching for a novel regulatory system governing planar cell polarity

研究代表者

山崎 正和（YAMAZAKI MASAKAZU）

秋田大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：40373378

研究成果の概要（和文）：多くの組織や器官は、上皮細胞の頂底軸と直行する組織平面内のある特定の軸に沿った極性を獲得する。これは、平面内細胞極性（planar cell polarity, PCP）と呼ばれ、組織・器官の構築や機能の発現に重要である。最近我々は、ショウジョウバエを用いた組織特異的 RNAi スクリーニングにより新規 PCP 遺伝子 *jitterbug* (*jbug*) を同定している。興味深いことに、遺伝学的解析から *jbug* は既知の PCP 制御グループに分類されないことが分かった。この事は、新たな PCP 制御グループの存在を示唆している。本研究において我々は、*Jbug* の機能解析を行うとともに、この新たな制御グループに属する PCP 遺伝子群を同定した。

研究成果の概要（英文）：Most tissues and organs acquire a polarity within the plane of epithelium, which is orthogonal to the axis of apico-basal polarity. This is referred to as planar cell polarity (PCP). PCP plays essential roles in morphological development of multicellular organisms. We recently identified *jitterbug* (*jbug*) as a novel regulator of PCP by a tissue-specific RNAi screen using *Drosophila* as a model. Interestingly, our genetic analysis suggested that *jbug* is not categorized into known groups of PCP genes, indicating the existence of a novel regulatory system in the PCP pathway. In this study, we identified participants that belong to the novel PCP group and analyzed the function of a member of this group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞間情報伝達

1. 研究開始当初の背景

上皮組織内の細胞の多くは、細胞の頂底軸と直交する組織平面の特定の軸に沿った極性を獲得する。これは、平面内細胞極性（planar cell polarity, PCP）と呼ばれ、ほとんどの多細胞生物において見られる一般的な現象である。例えば、哺乳類の内耳では、非対称な形態を有した個々の有毛細胞の向き

が組織平面の特定の軸に沿って揃っており、「器官の機能」と「PCP による組織レベルの極性制御」が密接に関連することが伺える。これまでにショウジョウバエ中胸背板の背毛などの配向性異常を呈するショウジョウバエ変異体の解析から PCP の制御に関わる遺伝子群が同定され、PCP の制御分子は進化的に高度に保存されていることが分かった。

また近年、カエルやマウスなどの脊椎動物を用いた解析により、PCP 制御系が組織構築・維持の様々な局面に利用され、その破綻は嚢胞腎やがんなどの種々の疾患の発症に繋がることが明らかになりつつある。

PCP 制御分子は機能の違いから二つのグループに分類されている。一つ目は、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) / Starry night (Stan) 等によって構成される「コアグループ」である。これらの分子は個々の細胞内において組織平面に沿って偏在化し、この偏在化が細胞の極性形成に中心的な役割を担っている。二つ目は、非典型的カドヘリン分子である Dachshous (Ds) や Fat (Ft) 等によって構成される「Ds グループ」である。Ds グループ分子はコアグループ分子の上流で位置情報として働き、組織・器官の特定の軸に沿って個々の細胞の極性の向きを揃えるのに重要である。最近、ショウジョウバエの腹部においては、Ds グループ分子がコアグループ分子を介さずに PCP を制御することが報告され、PCP 制御システムが予想されていたよりも複雑である可能性が提示されている。このように PCP 制御システムの多様性・複雑性が明らかになりつつある中で、主要な PCP 分子群がこれら二つのグループのみかどうかは未検証であり、今後の解析が必要とされていた。

2. 研究の目的

これまでに申請者はショウジョウバエを用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングを行い、PCP 制御に関わる多くの新規分子を同定している (*Nature* 458, 987-992, 2009)。その内の一つである Jitterbug (Jbug) は、進化的に保存されたアクチン結合タンパク質 Filamin のショウジョウバエオルソログである。

一般的に、PCP 制御システムが異常になると、背毛の配向性が乱れることが知られている。しかしながら、大変興味深いことに、*jbug* とコアグループに属する *strabismus* (*stbm*) / Vang Gogh (Vang) との二重ノックダウンにより、背毛の向きがコントロールと比較して整然と逆転することを見出した。このような表現型は Ds グループとコアグループに属する遺伝子の単独または二重ノックダウンでは観察されない。この結果から申請者は、PCP 制御システムには、上述の二つのグループの他に「第 3 の PCP 制御グループ」が存在しており Jbug がその新たなグループの構成因子だと考えるに至った。

本研究では、これらの知見に基づき、「第 3 の PCP 制御グループ」の全貌を明らかにし、この新規 PCP グループを介した新たな PCP 制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ショウジョウバエを用いた組織特異的 RNAi スクリーニング

jbug と *stbm* の二重ノックダウンによりショウジョウバエ中胸背板の背毛の配向性が逆転する現象に着目し、「第 3 の PCP 制御グループ」遺伝子を同定する RNAi スクリーニングを実施した。スクリーニングの概略を以下に記す。

ショウジョウバエの中胸背板特異的 *pnr-GAL4* 系統と *stbm* 遺伝子に対するトランスジェニック RNAi 系統を交配し、中胸背板特異的に *stbm* 遺伝子が恒常的にノックダウンされたショウジョウバエ系統を得た。この系統における背毛の配向性はランダムになる。次に、この系統を RNAi fly ライブラリーのショウジョウバエ系統 (国立遺伝学研究所の NIG 系統、Vienna Drosophila RNAi センターの VDRC 系統、Transgenic RNAi Project の

TRiP 系統を併用) と交配し、任意のショウジョウバエ遺伝子と *stbm* が二重にノックダウンされたショウジョウバエ成虫を作出した。その後、実体顕微鏡下で背板の剛毛の配向性を観察し、剛毛の配向性の逆転に關与する遺伝子を同定した。

UAS-*jbug* 系統の作製

w 系統のショウジョウバエ蛹から調整した cDNA を鋳型として、常法に従い二種類の *jbug* スプライシングバリエント (*jbug*-RF と *jbug*-RL) の全長 cDNA をクローニングした。次に、Invitroge 社の GATEWAY システムを用いて、*jbug*-PF と *jbug*-PL cDNA を発現ベクター (pWALIU10-roe-GW : タグ無しタンパク質発現用、pTFW : N 末端に 3 x FLAG タグ融合) に組み込んだ。トランスジェニック系統の作製は外部委託 (BestGene) した。

4. 研究成果

第 3 の PCP 制御グループ構成因子の同定

jbug と *stbm* の二重ノックダウンによりショウジョウバエ中胸背板の背毛の配向性が逆転する現象に着目し、「第 3 の PCP 制御グループ」遺伝子を同定する RNAi スクリーニングを実施した。これまでに、申請者はショウジョウバエを用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングにより、212 個の PCP 関連遺伝子 (これらの遺伝子をノックダウンした個体において、背毛の配向性は乱れる) を同定することに成功している。これらの遺伝子のほとんどは、これまでに PCP の關与が報告されていない遺伝子である。これらの新規 PCP 関連遺伝子の中に、第 3 の PCP 制御グループ遺伝子が含まれている可能性が高いため、これら 212 遺伝子を対象として RNAi スクリーニングを実施した。その結果、*stbm* との二重ノックダウンにより、背毛の配向性を逆転させ

る遺伝子を 28 個同定した。我々は、これらの遺伝子群を“Member of *Jbug* Group (MJG) 1-28”と命名した。

Jbug の機能解析

MJG 分子の一つである *Jbug* は、進化的に保存されたアクチン結合タンパク質 Filamin のショウジョウバエオロソログである。*Jbug* の哺乳類ホモログは、30 個以上の結合パートナーを有していることからアクチン細胞骨格制御のみならず様々なシグナル分子の足場としての機能が注目されている。従って、*Jbug* が「第 3 の PCP 制御グループ」において中心的な役割を担うと考えられる。これまでに我々は、imprecise excision 法により独自に *jbug* 機能喪失型変異体 (*jbug* 遺伝子のエクソン 8 と 9 を欠失) を作出している。この *jbug* 変異体は、RNAi 法にてノックダウンした場合と同様に、背板における背毛の配向性異常を呈する。GAL4-UAS システムを用いて *jbug* 変異体に *jbug* (後述) を発現させたところ、変異体において観察される背毛の配向性の異常は救済された。以上の結果から、*jbug* 変異体で観察される PCP 異常は、*Jbug* の欠失によるものであることが明らかとなった。

データベース上 *Jbug* には複数のスプライシングバリエント (塩基配列の長い順に、*jbug*-RF, *jbug*-RL, *jbug*-RI, *jbug*-RC) が存在することが報告されているが、これらのスプライシングバリエントのタンパク質レベルでの発現は確認されていない。我々は抗 *Jbug* 抗体を用いて、翅成虫原基における *Jbug* タンパク質の発現を調べたところ、データベースから想定される分子量に複数のバンドが検出された。また、これらのバンドは、RNAi 法を用いた *jbug* のノックダウンにより減弱した。以上の結果から、タンパク質レベルにおいて複数の *Jbug* アイソフォームが存在す

ることが明らかとなった。次に、我々は Jbug アイソフォーム間の機能相違について解析を行った。上述したように、最も分子量の大きい Jbug アイソフォームである Jbug-RF は *jbug* 変異体の表現型を救済するが、Jbug-RF の C 末端領域を欠失したアイソフォームである Jbug-RL も同様の救済効果が認められた。以上の結果から、Jbug-RF の C 末端領域は PCP の制御に必要無いことが明らかとなった。

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 6 件)

(1) Tomonori Ayukawa ほか, Identification and characterization of novel planar cell polarity genes in *Drosophila melanogaster*, 1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (APDRC), 2011 年 5 月 23 日, Taipei (Taiwan)

(2) 山崎正和ほか, Functional analysis of actin binding protein Jitterbug in planar cell polarity pathway, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜

(3) 鮎川友紀ほか, Prickle and Spiny-legs ration regulates global tissue coordination in planar cell polarity, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜

(4) 山崎正和ほか, 平面内細胞極性の分子機構に関する研究, 第 8 回宮崎サイエンスキャンプ, 2012 年 2 月 17 日, 宮崎

(5) 鮎川友紀ほか, Functional analysis of a novel PCP regulator, Jitterbug, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 14 日, 福岡

(6) Masakazu Yamazaki ほか, Functional analysis of a novel PCP regulator, Jitterbug, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, 2012 年 5 月 31 日, 神戸

[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.gipc.akita-u.ac.jp/~arcbs/research/>
<http://www.med.akita-u.ac.jp/dat/cgi/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

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :