

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770201

研究課題名(和文) 平面内細胞極性を制御する足場タンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a novel PCP regulator Jitterbug

研究代表者

鮎川 友紀 (Ayukawa, Tomonori)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：80586165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：上皮組織内には、細胞の頂部-基部軸と直交した、組織平面のある特定の軸に沿った極性が存在する。これは平面内細胞極性(planar cell polarity, PCP)と呼ばれ、多細胞生物の様々な組織・器官において観察される普遍的な現象である。

PCPの主要制御因子は機能的な違いから2つのグループに分類されている。申請者は新たなPCP制御グループであるJitterbug(Jbug)グループの存在を見出した。本研究では、Jbugグループの構成因子の網羅的な同定を試みた。その結果、申請者はJbugグループに属する9遺伝子の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Most tissues and organs acquire a polarity within the plane of the epithelium, which is orthogonal to the axis of apico-basal polarity. This is called planar cell polarity (PCP). PCP pathway is an evolutionarily conserved mechanism in multicellular organism.

PCP molecules are categorized into two groups by its function. We found that Jbug is categorized into a novel group of PCP regulators (Jbug group). In this study we succeed to identify 9 genes that co-operate with Jbug.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：平面内細胞極性 PCP 発生生物学 遺伝学 足場タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

上皮組織の細胞は、細胞の頂部-基部軸と直交する組織平面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、多くの多細胞生物において見られる進化的に保存された現象である。例えば、哺乳類では、PCP の働きにより内耳有毛細胞が組織内で一定方向に配向し、この極性の獲得が器官の機能発現と密接に関係していることが伺える。

ショウジョウバエの剛毛などの配向性異常を呈する変異体の解析から、初めて PCP 制御遺伝子が同定されたのを皮切りに、PCP の分子機構の理解が一気に進展した。その後、マウスなどの高等動物を用いた研究から、PCP 制御因子の多くは、種を超えて保存されており、その機能欠失は発生異常や囊胞腎などの種々の疾患を引き起こすことが明らかになった。

現在のところ、PCP の主要制御因子は機能的な違いから大きく 2 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 Fz/Fmi グループ分子群である。これらの分子は個々の細胞において偏在化し、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 Fat (Ft) や Dachous (Ds) 等によって構成される Ft/Ds グループ分子群であり、Fz/Fmi グループの上流で機能する位置情報としての役割が指摘されている。

最近、ショウジョウバエの腹部においては、Ft/Ds グループ分子が Fz/Fmi グループ分子を介さずに PCP を制御することが報告され (Development, 133, 4561-72, 2006) PCP の制御機構が予想されていたよりも複雑であることが示唆されている。このように PCP 経路の多様性が明らかになりつつ

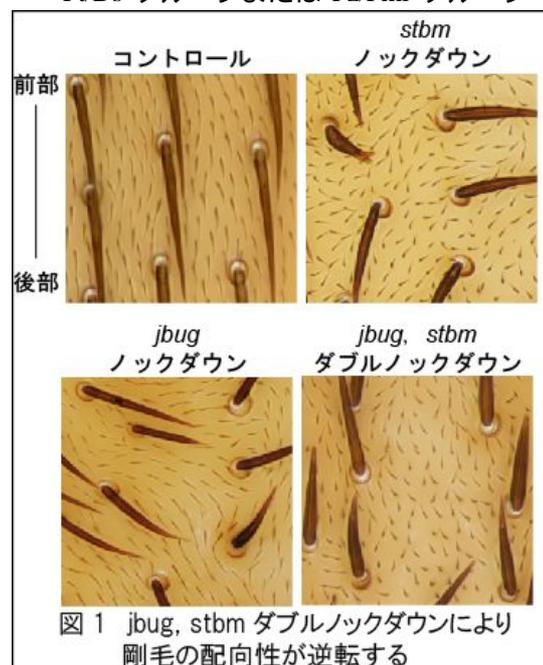
ある中で、PCP 制御に関わる主要な分子群が Ft/Ds グループ分子と Fz/Fmi コアグループ分子のみで説明がつくかどうかの検証は行われておらず、今後の解析が必要とされていた。

研究代表者が所属する研究室が参加した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、PCP 制御に関わる多くの新規分子が同定された (Nature 458, 987-992, 2009)。研究代表者はこのスクリーニングで得られた新規 PCP 分子 Jitterbug (Jbug) の機能を解析する過程で、Jbug が Ft/Ds グループまたは Fz/Fmi グループのいずれとも異なる新規の PCP 制御グループ (Jbug グループと命名) に属する可能性を示唆する結果を得た。本研究では、Jbug の機能解析を通して Jbug グループの全貌を明らかにし、この新規グループに属する分子群による新たな PCP 制御機構を解明する。

## 2. 研究の目的

新規 PCP 分子 Jbug は、進化的に高度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。

Ft/Ds グループまたは Fz/Fmi グループ



に属する個々の遺伝子を個別に、または二重でノックダウンすると剛毛の向きはランダムになる。しかしながら、大変興味深いことに、*jbug* と Fz/Fmi グループに属する *strabismus* (*stbm*) との二重ノックダウンにより、剛毛の向きがコントロールと比較して 180 度逆転した(図 1)。 *jbug* がこのような新奇な表現型に関与することから、申請者は、この遺伝子が Ft/Ds グループまたは Fz/Fmi グループのいずれとも異なる新規 PCP 制御グループ (*Jbug* グループと命名) に属すると考えた。本研究では、この現象を利用した網羅的 RNAi スクリーニングにより、*Jbug* 以外の *Jbug* グループ分子の網羅的探索を行う。また *Jbug* の機能解析も並行して進め、*Jbug* グループを介した新たな PCP 制御機構を解明することを目指す。

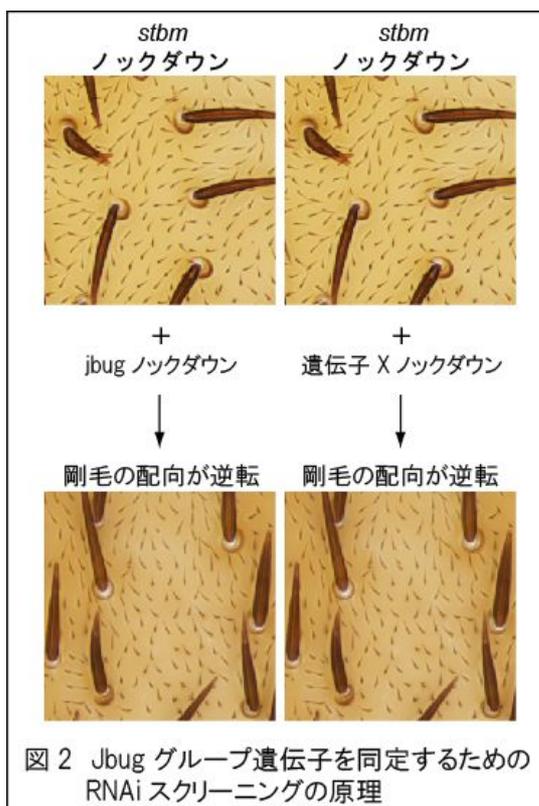


図 2 *Jbug* グループ遺伝子を同定するための RNAi スクリーニングの原理

### 3. 研究の方法

ショウジョウバエの遺伝学を駆使し、遺伝学的スクリーニングを行い *Jbug* グループ分子の網羅的同定を試みる。また、*Jbug* の機能

解析を進めることでその生理的役割を明らかにする。遺伝学的スクリーニングは、*jbug* と *stbm* の二重ノックダウンによって剛毛の向きが 180 度逆転する現象に着目して遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、*stbm* のノックダウンに加え遺伝子 X のノックダウンを行った際に剛毛の配向が逆転する遺伝子を探索する(図 2)。

### 4. 研究成果

これまでに、研究代表者が所属する研究室が参加した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、205 個の新規 PCP 制御遺伝子の同定に成功している (*Nature* 458, 987-992, 2009)。これらの新規 PCP 制御分子の中には *Jbug* グループ分子が含まれることが予想される。同定した新規 PCP 遺伝子と *stbm* 遺伝子との二重ノックダウンを行い、剛毛の配向が 180 度逆転する表現型に関与する遺伝子を探索する。RNAi 法によるスクリーニングでは、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 系統を併用する。スクリーニングを行った結果、*stbm* との二重ノックダウンで剛毛の配向が逆転する遺伝子を 28 個同定することに成功した。また、9 遺伝子について異なる RNAi 系統でも同様に剛毛の配向が逆転することを確認している。この内、進化的に保存された遺伝子は 6 遺伝子であった (*Jbug* を含む)。

*Jbug* の生理学的な機能を明らかにするため、これまでに研究代表者は imprecise excision 法により独自に *jbug* の機能喪失型突然変異体の作出している。まず、研究代表者は作成した *jbug* 変異体の正確な欠失領域を PCR 法と DNA シークエンスにより決定した。*jbug* 変異体では、RNAi 法による *jbug* のノックダウンと同様剛毛の配向が乱れる。

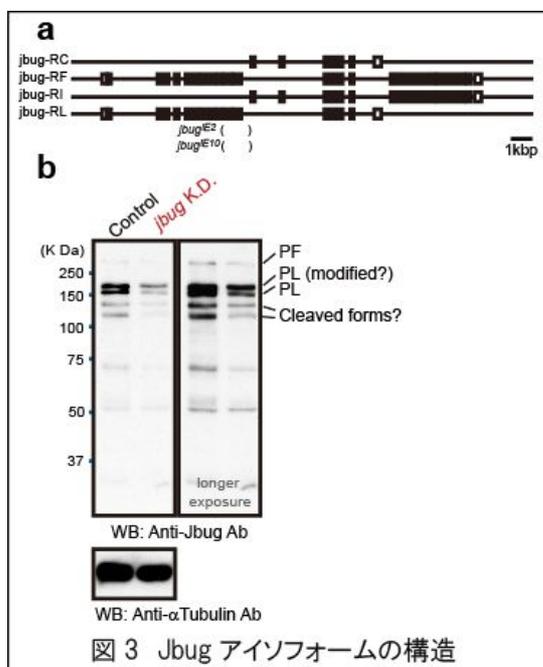


図 3 Jbug アイソフォームの構造

Gal4-UAS システムを用いて *jbug* 変異体において *jbug-RF* アイソフォーム (図 3: 後述) を発現させた。その結果、変異体における剛毛の配向の乱れは救済された。よって、*jbug* 変異体において剛毛の配向が乱れる表現型は、*jbug* の欠失によることが明らかになった。

図 3 に示したように、データベース上では *jbug* に複数のスプライシングバリエントが存在することが報告されている。しかしながら、これら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検討されていない。研究代表者は、Jbug 抗体を用い、翅成虫原基における Jbug アイソフォームの発現を検討した。データベースの情報から予想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 *jbug* の RNAi 法によるノックダウンによって減弱した。以上の結果から、複数の Jbug アイソフォームが実際に存在することが明らかになった。次に、研究代表者は Jbug アイソフォームの機能的差異の検討を行った。上述したように、最も分子量の大きい Jbug-RF を *jbug* 変異体に発現させると変異体の表現型は救済される。Jbug-RF の C 末端領域を欠いた Jbug-RL を同様に *jbug* 変異体に発現させたところ、変異体の表現型は救済さ

れた。よって、Jbug-RF の C 末端領域は PCP の制御に必要がないことが明らかになった。

## 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 3 件)

**Tomonori Ayukawa**, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki, Masakazu Yamazaki Dachsous-dependent asymmetric localization of Spiny-legs determines planar cell polarity orientation in *Drosophila*. Cell Reports 掲載決定 査読有

**Tomonori Ayukawa**, Kenjiro Matsumoto, Hiroyuki O. Ishikawa, Akira Ishio, Tomoko Yamakawa, Naoyuki Aoyama, Takuya Suzuki, Kenji Matsuno. Rescue of Notch signaling in cells incapable of GDP-L-fucose synthesis by gap junction transfer of GDP-L-fucose in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A.109(38), 15318-23 (2012) 査読有

Tomoko Yamakawa, **Tomonori Ayukawa** and Kenji Matsuno, Metabolism and transportation pathways of GDP-fucose that are required for the O-fucosylation of Notch. Adv Exp Med Biol. 727:37-46. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4\_3. (2012) 査読有

[学会発表](計 4 件)

**Tomonori Ayukawa**, Masakazu Akiyama, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki : Prickle and Spiny-legs Determine the Orientation of Cellular Asymmetry Relative to the

Dachsous Gradient, 第46回日本発生生物学会年会, 2013年5月, 松江 (ポスター)

Tomonori Ayukawa, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Functional analysis of a novel PCP regulator Jitterbug, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月, 福岡 (シヨートトーク・ポスター)

Tomonori Ayukawa, Juergen A. Knoblich, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Prickle and Spiny-legs ratio determines the orientation of cellular asymmetry relative to the Dachsous and Four-jointed gradients, Japanese Drosophila Research Conference 10 (JDRC10), 2012年10月 東京 (口頭発表・ポスター)

Tomonori Ayukawa, Juergen A. Knoblich, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Prickle and Spiny-legs ratio regulates global tissue coordination in planar cell polarity, Joint Meeting of The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology 2012年5月28-31日, Kobe International Conference Center & The Kobe Chamber of Commerce and Industry, 神戸 (一般講演・ポスター)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鮎川 友紀 (AYUKAWA TOMONORI)

秋田大学・医学研究科・教育系補佐員

研究者番号: 80586165