

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25711013

研究課題名(和文)位置情報に対する細胞集団の向きを変換する機構

研究課題名(英文)A molecular mechanism underlying cell orientation relative to global directional cues

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) 20,500,000円

研究成果の概要(和文)：平面内細胞極性の形成過程において、非典型的カドヘリンDachsous (Ds) の勾配は方向情報として機能し、個々の細胞の極性の担い手である7回膜貫通型受容体Frizzled (Fz) などの非対称局在の向きを制御する。しかしながら、ショウジョウバエの翅と複眼で、Ds勾配に対するFz局在の向きは反対になっており、Ds勾配とFz局在を繋ぐ機構には不明な点が多い。我々は、実験と数理モデルを融合した研究を実施し、Prickle (Pk) とそのアイソフォームであるSpiny-legs (Sple) の発現比の違いにより、Ds勾配に対するFz局在の向きが変換される分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In *Drosophila*, planar cell polarity (PCP) molecules such as Dachsous (Ds) are thought to function as global directional cues orienting cellular asymmetry, which is manifested as polarized localization of PCP core proteins such as Frizzled (Fz). However, the relationship between the Ds gradient and Fz asymmetry in the eye is opposite to that in the wing, thereby causing controversy about how these two systems are connected. Here, using a combination of experiment and computer simulation, we elucidated a mechanism by which the Pk:Sple ratio determines the orientation of the core proteins relative to the Ds gradient.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生・分化 細胞・組織 遺伝学 平面内細胞極性 PCP

1. 研究開始当初の背景

組織を構成する細胞は、組織全体におよぶ“方向情報”を読み取ることにより、ある特定の向きに沿って極性化することが知られている。この現象は平面内細胞極性(planar cell polarity, PCP)と呼ばれ、上皮細胞の頂底軸(apico-basal 軸)に直交する極性として定義される。PCP は様々な組織で観察される現象であり、組織・器官の機能発現に重要である。例えば、哺乳類の内耳では、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、PCP と内耳の機能が密接に関連していることが分かる。

ショウジョウバエの翅の表面に存在する翅毛の配向性に着目した遺伝学的研究により、進化的に保存された PCP 制御分子が同定され、機能の違いから 2 つのグループに分類される。一つ目は、7 回膜貫通型受容体 Frizzled (Fz) や 4 回膜貫通型分子 Strabismus / Van gogh (Stbm)、7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo / Starry night (Fmi) などから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う。二つ目は、非典型的カドヘリンである Dachsous (Ds) などによって構成される Ds グループであり、コアグループ分子の上流で機能する方向情報としての役割が指摘されている。

翅においては Ds 発現の勾配が翅の根本(近位側)から翅の先端(遠位側)に向かって低くなるように形成され、Fz は細胞の遠位側辺縁部、すなわち Ds 勾配の低い側に非対称に局在する。一方、ショウジョウバエの複眼においては、Ds 勾配の方向と Fz 局在の関係が反対であることが知られている。この結果から、組織毎に Ds 勾配に対する Fz 局在の向きを変換する未知の機構の存在が示唆されるが、その実体は全く不明である。

これまでに、我々は、細胞質に存在する既知の PCP 分子である Prickle (Pk) とそのアイソフォーム (Pk と同じ遺伝子座から産生) である Spiny-legs (Sple) の発現比がこの謎を解く鍵となることを見出している。すなわち、Pk と Sple の発現比は、ショウジョウバエの翅と複眼で大きく異なること(翅では $Pk : Sple \approx 17 : 1$ 、複眼では $Pk : Sple \approx 1 : 1$)、さらに両分子の発現比を改変するだけで Ds 勾配に対する Fz 局在の向きを変換できることを明らかにしている。

2. 研究の目的

これまでに我々は、Pk と Sple がホモまたはヘテロ複合体 (Pk-Pk、Sple-Pk または Sple-Sple) を形成することを明らかにしている。この実験系において、各複合体の分子間結合の強さに大きな違いが認められないことから、翅 ($Pk : Sple \approx 17 : 1$) と複眼 ($Pk : Sple \approx 1 : 1$) における Pk-Pk : Sple-Pk : Sple-Sple の量比は確率論的に、それぞれ約

「289 : 34 : 1」と「1 : 2 : 1」になると推測される。すなわち、翅においては Pk-Pk (Pk 複合体と略) 量が多く、複眼では Sple-Pk と Sple-Sple (両者をまとめて Sple 複合体と略) の合計量が Pk-Pk 量よりも数的に優位(約 3 倍)となる。また、Pk 複合体が Ds 勾配を上がる方向に非対称に局在するのに対し、Sple 複合体はその反対の Ds 勾配が下がる方向に局在することを、見出している。我々は、これらの結果と前項の学術的背景を踏まえ、PCP 形成過程における Ds 勾配(方向情報)と Fz 局在(細胞極性)を繋ぐ分子機構に関する研究を展開した。

また我々は、数理モデルの手法を駆使して、実験で得られる PCP 表現型を再現するとともに、実験と理論を融合した研究を実施することで、通常分子生物学的手法のみでは理解が困難な現象の解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) Sple と相互作用する分子の同定

Sple と相互作用する分子群を同定するために、生化学的手法およびショウジョウバエを用いた遺伝学的手法を用いた。

(2) PCP の数理モデルを用いた解析

北海道大学電子科学研究所の秋山正和博士との共同研究により構築した、PCP の数理モデルを使用した。本数理モデルは現象論的視点から、構築されており、細胞における PCP 関連分子群の挙動ではなく、個々の細胞における極性の向きを一つのパラメーターで表現した。

4. 研究成果

(1) Sple と相互作用する分子群の探索

我々は、Pk と Sple の機能と細胞内局在の違いを明らかにすることを目的とし、Pk または Sple に結合する分子の探索を行った。その結果、Sple アイソフォーム特異的な N 末端領域 (Sple-N) が非典型的カドヘリン Ds の細胞内領域 (Ds-ICD) と相互作用することを見出した。また、Sple-N と Ds-ICD の様々な欠失変異体を作製し、それぞれの結合領域を決定した。

さらに我々は、Pk および Sple と相互作用する分子として非典型的ミオシン Dachsous を見出している。Dachsous の Sple 結合領域を探索したところ、Dachsous の中央に位置する Myosin domain が Sple との相互作用に重要であることが明らかとなった。

Sple の N 末端領域のアミノ酸配列解析から、Sple と物理的に相互作用することが予想される分子群をピックアップし、これらの分子と Sple との遺伝学的相互作用を解析した (Sple の過剰発現による翅毛の配向性の逆転を抑制する RNAi 系統をスクリーニングした)。現在までのところ、上述の Ds と Dachsous を除いて、Sple と遺伝学的に相互作用する分子は同定されていない。

(2) Pk と Sple の細胞内局在に関する研究

研究目的の項で述べたように、これまでに我々は、ショウジョウバエの蛹期の翅細胞において、Pk 複合体が Ds 勾配を上げる方向(翅の近位側)に非対称に局在するのに対し、Sple 複合体はその反対の Ds 勾配が下がる方向(翅の遠位側)に局在することを見出している。他のグループの報告から、幼虫期の翅成虫原基においても、Pk が非対称に局在することが報告された。Sple の局在に関しても検討したところ、蛹期の翅と同様に、幼虫期の翅成虫原基においても、Pk が局在する細胞端とは反対側の領域において非対称に局在することを見出した。

上述の解析で Sple と相互作用する分子として同定した Ds と Dachs が Sple の細胞内局在の制御に関わるかどうか検討を行った。Ds をノックダウンした蛹期の翅および Ds 機能欠損型変異体の翅成虫原基において、Sple は正常とは反対側の細胞端 (Pk が局在する細胞端) に非対称に局在した。Pk の非対称局在は、Ds 欠損による影響を受けなかった。また、Dachs を欠損した翅成虫原基においても、Sple の非対称局在は異常となることが明らかとなった (Ds を欠損させた翅成虫原基における Sple の局在と同様であった)。以上の結果から、Sple の非対称局在は Ds および Dachs に依存することが明らかとなった。

Sple の N 末端領域 (Ds 結合領域) に EGFP を融合させた分子 (EGFP-Sple-N) の細胞内局在を解析した。EGFP-Sple-N は、幼虫期の翅成虫原基では細胞膜に局在するのに対し、蛹期の翅では主に細胞質における局在が観察された。幼虫期と蛹期において、Sple の局在制御機構が異なる可能性が示唆された。

Sple 非対称局在の分子機構に関してさらなる検討を行ったところ、翅成虫原基における Sple の非対称局在は、コアグループ遺伝子の欠失またはノックダウンによる影響を受けなかった。翅成虫原基における Sple の非対称局在は、コアグループに依存しないことが明らかとなった。

(3) 他のショウジョウバエ組織における Ds 勾配の解析

我々は、中胸背板における Sple 過剰発現により、中胸背板の後部領域においてのみ PCP (背毛の向き) の逆転が起きることを見出している。翅成虫原基の将来中胸背板となる領域における Ds 発現パターンを解析したところ、前部と後部の境界において最も高い発現が観察された。これは、上述の実験結果から導き出された我々の仮説を支持するものであった。

(4) 数理モデルと実験の融合研究による PCP の分子機構の解析

北海道大学 秋山正和博士との共同研究により数理モデルを用いた解析を行った。シヨ

ウジョウバエ翅の様々な発生段階において Sple の過剰発現を行うと、異なる PCP 表現型 (翅毛の配向性の異常) が観察される。我々は、実験とシミュレーションの相互検証により、幼虫期または蛹期の初期 (蛹化後 20 時間以前) におけるコアグループの僅かな偏りの違いが上述の PCP 表現型の違いの原因であることを明らかにした。また、実験で得られる様々な PCP 表現型をシミュレーションにおいて再現できることを確認した。

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 2 件)

Ayukawa T, Akiyama M, Mummery- Widmer JL, Stoeger T, Sasaki J, Knoblich JA, Senoo H, Sasaki T, Yamazaki M, Dachsous-dependent asymmetric localization of spiny-legs determines planar cell polarity orientation in *Drosophila*. *Cell Reports* 8, 610-621 (2014) (査読有)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.009>

Mauri F, Reichardt I, Mummery- Widmer JL, Yamazaki M, Knoblich JA. The conserved discs-large binding partner Banderuola regulates asymmetric cell division in *Drosophila*. *Current Biology* 24, 1811-1825 (2014) (査読有)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.059>

[学会発表] (計 18 件)

1 山崎正和, 鮎川友紀, 秋山正和, 妹尾春樹 平面内細胞極性の分子機構 -細胞集団が同じ方向に向く仕組み- 日本遺伝学会第 87 回大会, 2015 年 9 月 24-26 日, 仙台 (ワークショップ)

2 鮎川友紀, 佐々木雄彦, 妹尾春樹, 山崎正和 平面内細胞極性を司る新規調節機構の解析, 第 14 回生命科学研究会, 2015 年 6 月 26-27 日, 三浦 (口頭発表)

3 山崎正和, 鮎川友紀, 秋山正和, 佐々木雄彦, 妹尾春樹: 平面内細胞極性の向きを決定する分子機構, 第 120 回日本解剖学会 総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会 合同大会, 神戸 (神戸国際会議場) 2015 年 3 月 21 日-23 日 (ポスター発表)

4 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に向く仕組み-, 秋田県泌尿器科集談会, 2014 年 12 月 13 日, 秋田 (教育講演)

5 Masakazu Yamazaki: A molecular mechanism underlying planar cell polarity orientation in *Drosophila*, MBI-Japan

Joint Symposium 2014, Singapore, 2-4 December, 2014 (Invited Talk)

⁶ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Dachsaus-dependent asymmetric localization of Spiny-legs is critical for determining planar cell polarity orientation in *Drosophila*, 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日-27 日 (ポスター発表)

⁷ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Dachsaus-dependent polarization of Spiny-legs is critical for determining planar cell polarity orientation in *Drosophila*, The 62nd NIBB Conference FORCE IN DEVELOPMENT, Okazaki, 17-19 November, Japan 2014 (Poster presentation)

⁸ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: A molecular mechanism underlying planar cell polarity orientation in *Drosophila*, International symposium on "Homeostasis through development, life, and diseases.", Maebashi, 7 November, Japan 2014 (Poster presentation)

⁹ 山崎正和, 鮎川友紀, 秋山正和, 佐々木雄彦, 妹尾春樹: 平面内細胞極性の分子機構に関する研究, 日本解剖学会第 60 回東北・北海道連合支部学術集会, 福島, 2014 年 9 月 6 日-7 日 (口頭発表)

¹⁰ 鮎川友紀, 秋山正和, 妹尾春樹, 佐々木雄彦, 山崎正和 位置情報が細胞の向きを決定する機構, 群馬大学・秋田大学連携 第 3 回生体情報研究シンポジウム, 2014 年 8 月 7 日, 秋田キャッスルホテル (秋田) (口頭発表)

¹¹ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Dachsaus-dependent polarization of Spiny-legs is critical for determining planar cell polarity orientation in *Drosophila*, Japanese

Drosophila Research Conference 11 (JDRC11), Kanazawa, 4-6 June 2014 (Oral presentation)

¹² Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Dachsaus-dependent polarization of Spiny-legs is critical for determining planar cell polarity orientation in *Drosophila*, 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Nagoya (Aichi), May 27-30 2014 (Flash talk & Poster presentation)

¹³ 秋山正和, 鮎川友紀, 山崎正和 平面内細胞極性の数理モデル, 日本数学会年会, 2014 年 3 月 15-18 日, 学習院大学 (口頭発表)

¹⁴ 山崎正和 位置情報が細胞の向きを決定する機構 Advans 研究会 2013, 2013 年 12 月 14-15 日, 東京 (招聘講演)

¹⁵ 鮎川友紀, 秋山正和, Juergen Knoblich, 妹尾春樹, 佐々木雄彦, 山崎正和 Prickle と Spiny-legs は Dachsaus 勾配に対する細胞極性の向きを決定する, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸 (ポスター)

¹⁶ Masakazu Yamazaki: A molecular mechanism underlying planar cell polarity orientation in *Drosophila*, 50th Birthday Symposium for Juergen Knoblich, IMBA (Vienna), 24th-25th October 2013 (Invited)

¹⁷ 鮎川友紀, 秋山正和, 妹尾春樹, 佐々木雄彦, 山崎正和 位置情報が細胞の向きを決定する機構, 第 12 回生命科学研究会, 2013 年 6 月 28-29 日, 青森 (口頭発表)

¹⁸ Tomonori Ayukawa, Masakazu Yamazaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Prickle and Spiny-legs determine the orientation of cellular asymmetry relative to the Dachsaus gradient, 第 46 回日本発生生物学会, 2013 年 5 月 28-31 日, 松江 (ポスター)

〔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/g/s/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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：