

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440113

研究課題名(和文)新規PCP遺伝子の機能解析

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

研究代表者

鮎川 友紀 (Ayukawa, Tomonori)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80586165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：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。

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。研究代表者は、既存のPCP分子とは全く異なる機能を有するPCP制御分子群であるJitterbug(Jbug)グループを同定することに成功している。本研究では、Jbugグループ構成因子の機能解析を行い、Jbugグループを介した新たなPCP制御機構の一端を明らかにした。

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. In previous study we have already succeeded to find a novel group of PCP regulators (Jbug group). In this study we try to understand molecular mechanism by which Jbug group regulates the PCP pathway.

研究分野：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

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 (図 1a)。

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 (図 1c,d)。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 (図 1b) や嚢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、

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 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、今後の解析は必須である。

2. 研究の目的

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独自に同定した PCP 分子 Jitterbug (Jbug) の機能解析を行っている過程で、この分子が 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たな PCP 制御グループ (Jbug グループと命名、以下 Jbug グループと略記) の存在を見出した。さらに、Jbug グループを同定するための遺伝学的スクリーニング (RNAi 法を用いた) を実施し、これまでに複数の遺伝子 (Member of Jbug group, MJG) の同定に成功した。

このように、Jbug グループ分子の同定が進んだものの、そのグループを介して、どのように PCP が制御されているかは不明であった。本研究では、MJG1 (Jbug)、MJG2、MJG3 (VhaM8.9)、MJG5 (Dumpy, Dp)、MJG6 に着目して機能解析を行い、Jbug グループを介した新たな PCP 制御機構の解明を目指す。

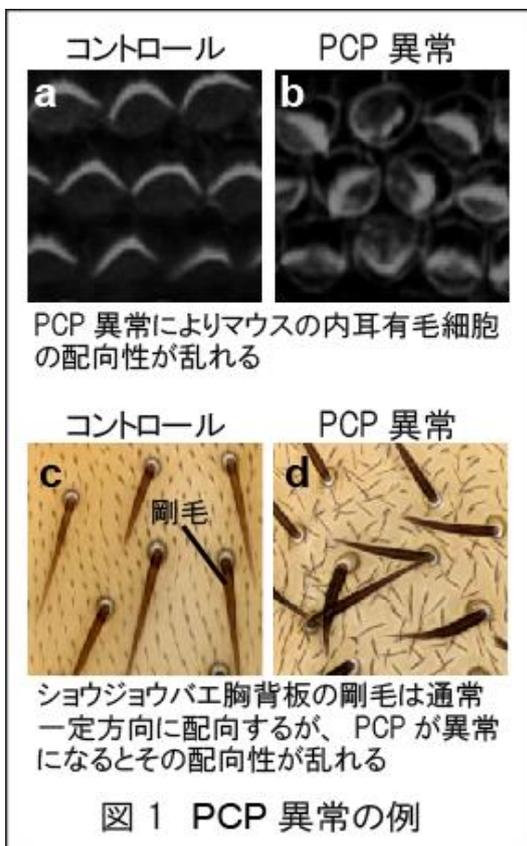
3. 研究の方法

(1) Jbug グループ分子の生理機能の解明

VhaM8.9 は、V 型 ATPase (V-ATPase) のアクセサリサブユニットのショウジョウバエオルソログである。V-ATPase は進化的に保存されたプロトン輸送体であり、ゴルジ体やリソソーム等、種々の膜系に局在化している。VhaM8.9 の変異体は PCP 異常を示し、コアグループ分子である Fz との物理的相互作用が報告されている。一方で、V-ATPase の機能の欠失では PCP の異常が観察されないことから、VhaM8.9 には、V-ATPase のアクセサリサブユニット以外の機能が存在すると考えられる。本研究では、Jbug グループ分子の細胞内局在を検討することで、Jbug グループ分子の生理学的機能を明らかにすることを目的とする。

(2) Jbug グループ分子による PCP 制御機構の解明

これまで、VhaM8.9 は Fz/Fmi グループに属すると考えられてきたが、前述したように、VhaM8.9 は第三のグループにも属するという



ショウジョウバエの腹部におい

知見を得た。このことから、Jbug グループは VhaM8.9 を介して Fz/Fmi グループを制御する可能性が予想される。本研究では、この知見を手掛かりに、Jbug グループで中心的な働きをはたしていると考えられる Jbug と Fz/Fmi グループとの関係を分子レベルで明らかにする。

4. 研究成果

(1) Jbug グループ分子の生理機能の解明

Jbug グループ分子の生理機能を明らかにするために、FLAG タグや Myc タグを付加したこれら分子の各種発現ベクターの構築を行った。哺乳動物細胞発現用のベクターとして、MJG2、MJG3、MJG6、ショウジョウバエ個体で発現させるベクターとして、MJG2、MJG6 に関してコンストラクトの作製を完了した。

また、研究代表者は、FLAG タグや Myc タグを付加した MJG1 (Jbug) をショウジョウバエ個体で発現するトランスジェニック系統の作製を研究開始時にすでに完了していた。ショウジョウバエ個体において Jbug はアドヘレンスジャンクションの近傍に局在することを明らかにしている。

MJG5 (Dp) の細胞内局在解析には、Dp の GFP 融合蛋白質を内在的プロモーターのもと発現する系統をストックセンターから入手し、その発現パターンと細胞内局在を検討した。種々の発生ステージで発現パターンの検討を行ったところ、蛹期の中胸背板において発現の高い領域を見出した。発生が進むとその発現パターンが顕著になることを明らかにした。

(2) Jbug グループ分子による PCP 制御機構の解明

Jbug グループ分子と Fz との関係を明らかにするために、Jbug グループの中で中心的な働きをしていると考えられる jbug のノックダウンを行い、様々な発生段階において Fz の細胞内局在に影響を与えるか検討を行った。まず、蛹期の中胸背板における Fz の細胞内局在を解析した。細胞内局在の解析にはアクチンプロモーターのもと Fz の GFP 融合蛋白質を発現する系統を用いて、その細胞内局在への影響を検討した。蛹が形成され始めてから 25 時間後 (25hr after puparium formation : 25hr APF) (30°C 飼育)において、Fz が非対称に局在した。また、Jbug と Fz との機能的な関連を検討するために、jbug をノックダウンした蛹期の中胸背板において Fz の細胞内局在を検討した (25hr APF 30°C 飼育)。その結果、25hr APF 30°C 飼育条件下では、jbug のノックダウンによって Fz の細胞内局在に顕著な違いは観察されなかった。次に、Jbug グループ分子と Fz 以外の Fz/Fmi グループ分子との関係を明らかにするために、Fz/Fmi グループ分子である *strabismus* (*stbm*)

に着目し、細胞内局在の解析を行った。*Stbm* の細胞内局在解析には、Fz と同様にアクチンプロモーターのもと *Stbm* の GFP 融合蛋白質を発現する系統を用いた。Fz の局在解析と同様に、25hr APF 30°C 飼育の中胸背板における Fz の細胞内局在を解析したところ、*Stbm* も Fz と同様に非対称に局在することを見出した。また、Jbug と *Stbm* との機能的な関連を検討するために、jbug をノックダウンした蛹期の中胸背板において *Stbm* の細胞内局在を検討した (25hr APF 30°C 飼育)。その結果、25hr APF 30°C 飼育条件下において、jbug のノックダウンを行っても *Stbm* の細胞内局在は野生型と比べて顕著に変化しなかった。

また、Jbug と Dp との機能的な関連を検討するために、jbug をノックダウンした蛹期の中胸背板において Dp の発現パターンを検討した。その結果、jbug のノックダウンによって Dp の発現パターンに顕著な違いは見出されなかった。

さらに、Jbug グループの機能を明らかにするために、細胞接着因子への影響を検討した。Jbug グループの中で中心的な働きをしていると考えられる jbug のノックダウンを行い E-カドヘリンへの影響を検討した。その結果、E-カドヘリンの細胞内局在に顕著な異常は観察されなかった。

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 4 件)

- ① Matsumoto K, Ayukawa T, Ishio A, Sasamura T, Yamakawa T, Matsuno K. Dual Roles of O-Glucose Glycans Redundant with Monosaccharide O-Fucose on Notch in Notch Trafficking. *J Biol Chem.* 291 (2016) 13743-52
DOI: 10.1074/jbc.M115.710483
- ② 鮎川友紀、Dachsous 依存的な Spiny-legs の非対称局在はショウジョウバエにおける平面内細胞極性の方向を決定する *Akita J Med* 42 (2015) 9- 17
- ③ Ishio A, Sasamura T, Ayukawa T, Kuroda J, Ishikawa HO., Aoyama N, Matsumoto K, Gushiken T, Okajima T, Yamakawa T, Matsuno K. O-fucose monosaccharide of Drosophila Notch has a temperature sensitive function and cooperates with O-glucose glycan in Notch transport and Notch signaling activation. *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 505-519
DOI: 10.1074/jbc.M114.616847.
- ④ 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 (2014) 610-621
DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.009.

[学会発表] (計7件)

- ① 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)
- ② 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年会、2016年11月30日—12月2日、横浜 (ポスター)
- ③ 鮎川友紀、秋山正和、Mummery-Widmer Jennifer、Stoeger Thomas、佐々木純子、Knoblich Juergen、佐々木雄彦、妹尾春樹1、山崎正和、Dachsous 依存的な Spiny-legs の非対称局在はショウジョウバエにおける平面内細胞極性の方向を決定する、日本解剖学会第61回東北・北海道連合支部学術集会、2015年8月29日、盛岡 (口頭発表)
- ④ 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 is critical for determining planar cell polarity orientation in *Drosophila*、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日-27日、横浜 (ポスター)
- ⑤ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki, Masakazu Yamazaki. A molecular mechanism underlying planar cell polarity orientation in *Drosophila*、International symposium on“Homeostasis through development, life, and diseases.”、2014年11月7日、高崎 (ポスター)
- ⑥ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki, Masakazu Yamazaki. Dachsous-dependent polarization of Spiny-legs is critical for determining planar cell polarity orientation in *Drosophila* Japanese *Drosophila* Research Conference 11 (JDRC11)、2014年6月4日-6日金沢 (口

頭発表)

- ⑦ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki, Masakazu Yamazaki. Dachsous-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 2014年5月27日-30日名古屋 (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・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80586165

(2)研究分担者

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