

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 10日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370102

研究課題名（和文）脊椎動物の細胞極性形成における膜・タンパク質輸送の意義

研究課題名（英文）Significance of membrane/protein trafficking for the establishment of cell polarity in the vertebrate.

研究代表者

上野 直人（UENO NAOTO）

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・教授

研究者番号：40221105

研究成果の概要（和文）：細胞極性の形成には微小管の安定化、束化が必要であり、上皮形態形成に関わり、Opitz 症候群の原因遺伝子がコードする MID1 やその関連タンパク質 MID2 といった分子が微小管安定化因子としての役割を担っていることを示した。そして、この微小管の再編成が起こることによって、分泌顆粒や細胞極性因子が輸送されるためのレールの上を移動し、適所に局在するとのモデルを提唱することができた。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that for the establishment of cell polarity, stabilization and bundling of microtubule are essential and that molecules implicated in epithelial morphogenesis such as MID1 encoded by a causative gene of Opitz syndrome and its related protein MID2 play important role in the stabilization/bundling of microtubules. Thus we have been able to propose that this remodeling of microtubules allows the trafficking of secreted vesicles and cell polarity factors on the rail of bundled microtubules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞極性・タンパク質輸送・細胞骨格・原腸形成・初期発生

1. 研究開始当初の背景

細胞はさまざまな形態的・機能的特性をもったユニットとして個体形成に寄与している。とくに動物細胞は、個体発生過程において、その形態をダイナミックに変化させ、また運動する。この細胞形態の変化、運動、機能の発現には細胞内に「極性」が正しく確立されることが必須であるということが改めて認識され、生物学の重要なテーマとなっている。

とくに近年、ショウジョウバエ、線虫など、モデル生物の遺伝学から、Wnt/PCP 経路や PAR タンパク質群などによる細胞極性形成の分子機構の詳細が解析されつつある。一方、細胞極性形成の引き金は何かといったメカニズムに関する基本的問題から、細胞の極性とはどのような事象をもって定義されるのかという本質的な課題が残されている。我々は科学研究費基盤（A）などにより、両生類

アフリカツメガエルをモデルとして、ショウジョウバエ *prickle* 相同遺伝子や *glypican4/6* (ゼブラフィッシュ変異体 *knypeck* 産物と相同) が原腸形成における「収斂と伸長 (convergent extension)」を制御する Wnt/PCP 経路のコンポーネントとして必須の働きを担っていることを明らかにした (Curr. Biol., 2003, Development 2003) ほか、新規原腸形成因子を複数同定し、機能解析を行ってきた。その結果、Wnt/PCP 経路や PAR タンパク質複合体の細胞両極への集積が、細胞の形態的極性を確立するのに必須であること (Dev. Cell, 2006)、微小管伸長の極性と細胞形態の極性に密接な関連があるという知見を得つつあった (Shindo, A. PLoS One, 2008)。

2. 研究の目的

脊椎動物の発生において、組織構築の基盤となる個々の細胞形態・機能の制御は極めて重要である。なかでも細胞極性は細胞の形態的・機能的トポロジーを決定する重要な要素であり、その制御は複雑な分子細胞機構によって支えられている。また、細胞極性は初期発生の原腸形成、神経管形成に必須であることも分かっている。この細胞極性形成に必須の多くの細胞極性因子は細胞に非対称に局在し、細胞形態・機能の非対称性を生み出す。本研究では細胞極性因子の偏在性の根源は膜・タンパク質輸送にあるとの仮説にもとづいて、その生物学的意義を明らかにすることを目的に研究を行った。本研究では、バイオイメージング技術などを駆使して細胞が極性を確立するプロセスを細胞学的、分子解剖学的に解析し、「分泌経路における膜輸送」の観点から細胞極性の形成機構について明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

アフリカツメガエルをモデル生物として、最も顕著な形態形成運動を示す神経管を研究対象に、細胞極性形成のしくみを明らかにする研究を行った。細胞骨格の再編成が膜・タンパク質の極性輸送に必須であるとの仮説のもとに、細胞骨格の再編成に関わる2つの分子群 (ネクチン、MID1/MID2) の機能解析を行った。どちらの分子についても試験管内で合成した mRNA の胚への微量注入による過剰発現系で機能亢進、およびアンチセンスモルフォリノを用いた翻訳阻害による機能阻害実験を行って主に胚の形態、マーカータンパク質の細胞内局在の顕微鏡観察による表現型を解析した。また、タンパク質間相互作用についてはエピトープ標識したタンパク質同士を免疫沈降法で共沈させ、ウェスタンブロットで検出した。

4. 研究成果

本研究では、とくにタンパク質・膜輸送が細胞極性、ひいては細胞形態形成に顕著な影響を及ぼす発生現象のひとつとして、神経管形成に着目して解析を行ったところ、神経上皮細胞の頂端極性形成におけるカドヘリンの細胞内輸送について成果が得られた。極性化していない細胞では細胞質に比較的均一に分布するカドヘリンが、細胞の伸長とともに頂底軸に沿って微小管アレイが発達すると、カドヘリンはネクチンによって頂端側の接着班周辺に動員されるという新たな発見があった (Morita, H. et al. Development, 2010)。

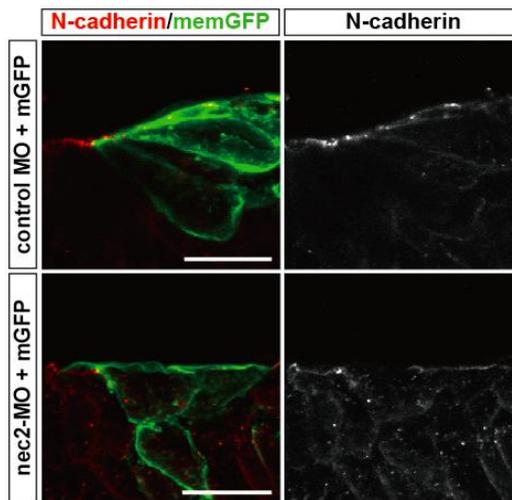


図1：ネクチンとカドヘリンの局在
ネクチンがなくなるとカドヘリンは頂端膜に局在することができなくなる。

この研究から細胞骨格の再編成が細胞極性形成、細胞形態形成に必須であることが明らかになった。

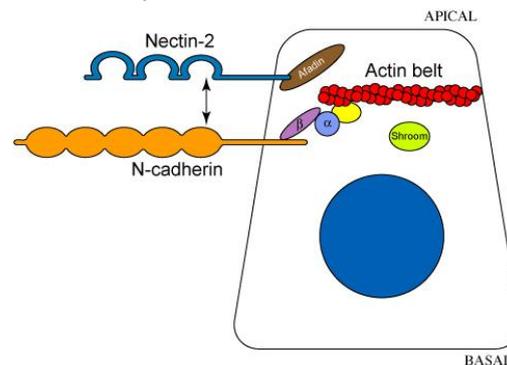


図2：ネクチンとカドヘリンの相互作用
ネクチンはカドヘリンと相互作用し頂端側にリクルートする。その際、頂底軸に沿って伸長した微小管ネットワークを用いているものと考えられる。このカドヘリンの局在変化によってアクチンも頂端側への集積が促進される可能性がある。

また、その知見をもとにして行ったメカニズ

ムに関する研究から、微小管の再編成、タンパク質輸送の解析を行った。微小管の重合阻害剤ノコダゾールを用いた結果から、神経管形成に寄与する細胞の頂底軸に沿った伸長には微小管の重合、微小管アレイの形成が必要であるという結果を得た。

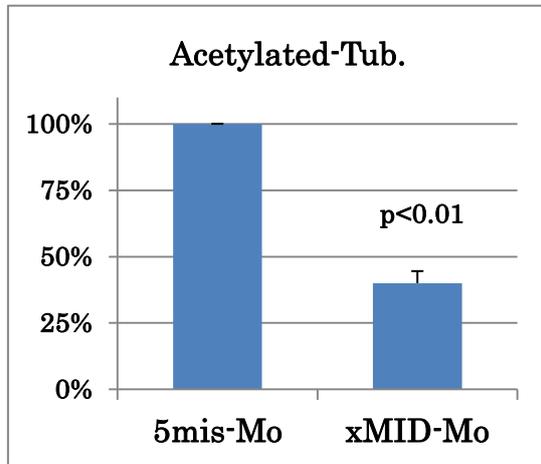


図3：MIDは微小管の安定化に必要であるモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてMIDの翻訳阻害を行うとアセチル化チューブリン（安定化したチューブリン）の量が大きく減少する。

上皮形態形成に関わり、Opitz症候群の原因遺伝子がコードするMID1やその関連タンパク質MID2といった分子が微小管安定化因子としての役割を担っていることを示した。我々はすでに、アフリカツメガエル胚における過剰発現系を用いた機能スクリーニングによって、原腸形成制御に関わると思われる複数の遺伝子を同定し、その多くがSecファミリー、ArfGAPなどをコードする膜・タンパク質輸送系（分泌系）に関わるものであることを明らかにしていたが、本研究で得られた細胞骨格系の再編成メカニズムに関する研究成果から、微小管の再編成が分泌顆粒や細胞極性因子の微小管レール上の輸送を可能にし、細胞極性因子を適所に局在させるとのモデルを提唱した。

(Suzuki, M., Development, 2010)

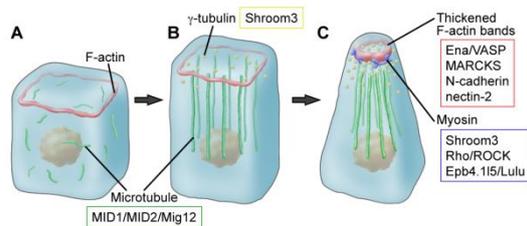


図4：細胞骨格の再編成と細胞形態形成
A: 変形前の上皮細胞（頂端側でアクチンの集積が見られる） B: 変形し始めた上皮細胞（微小管の束化が始まり細胞が伸長する） C: 変

形し終えた上皮細胞（アクチンの収縮によってくさび型となる）

これら一連の研究結果は細胞極性形成と細胞骨格リモデリングが密接に関わることを物語るものであり、今後は微小管の上を分泌顆粒やタンパク質が実際に輸送される姿をライブイメージングで捉えることが重要な課題となるであろう。

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5件）

- ① Morita, H., Kajiura-Kobayashi, H., Takagi, C., Yamamoto, TS., Nonaka, S. and Ueno, N.
Cell movements of the deep layer of non-neural ectoderm underlie complete neural tube closure in Xenopus. Development 査読有 139, 1417-1426 (2012)
- ② Tao, H., Inoue, K., Kiyonari, H., Bassuk, AG., Axelrod, JD., Sasaki, H., Aizawa, S. and Ueno, N.
Nuclear localization of Prickle2 is required to establish cell polarity during early mouse embryogenesis. Dev. Biol. 査読有 364, 138-148 (2012)
- ③ Suzuki, M., Hara, Y., Takagi, C., Yamamoto, TS. and Ueno, N.
MID1 and MID2 are required for Xenopus neural tube closure through the regulation of microtubule organization. Development 査読有 137:2329-2339 (2010)
- ④ Morita, H., Nandadasa, S., Yamamoto, TS., Terasaka-Iioka, C., Wylie, C., and Ueno, N.
Nectin-2 and N-cadherin interact through extracellular domains and induce apical accumulation of F-actin in apical constriction of Xenopus neural tube morphogenesis. Development 査読有 137:1315-1325 (2010)
- ⑤ Shindo, A., Hara, Y., Yamamoto, TS., Ohkura, M., Nakai, J. and Ueno, N.
Tissue-tissue interaction-triggered calcium elevation is required for cell polarization during Xenopus gastrulation. Plos One 査読有 24:e8897 (2010)

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① 鈴木誠
発表標題：ゼブラフィッシュ神経管形成における非筋型ミオシンの時空間分布
学会等名：発生物学会第 44 回大会
発表年月日：2011 年 5 月 20 日
発表場所：沖縄コンベンションセンター
- ② 森田仁
発表標題：Dissecting the contribution of non-neural ectoderm to the vertebrate neural tube closure
学会等名：Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists
発表年月日：2011 年 3 月 23 日
発表場所：ドイツ・ハイデルベルグ
- ③ 森田仁
発表標題：Dissecting the contribution of non-neural ectoderm to the vertebrate neural tube closure
学会等名：The 16th International Conference of the International Society of Differentiation
発表年月日：2010 年 11 月 16 日
発表場所：奈良県新公会堂
- ④ 森田仁
発表標題：Nectin-2 and N-cadherin Cooperatively Regulate Apical Constriction in Xenopus Neural Tube Formation
学会等名：11th International EMBL PhD Symposium
発表年月日：2009 年 10 月 31 日
発表場所：ドイツ・ハイデルベルグ
- ⑤ 森田仁
発表標題：Nectin-2 and N-cadherin Cooperatively Regulate Apical Constriction in Xenopus Neural Tube Formation
学会等名：The ASCB/JSCB/RIKEN CDB Meeting; Building the Body Plan: How Cell Adhesion, Signaling, and Cytoskeletal Regulation Shape Morphogenesis
発表年月日：2009 年 9 月 21 日
発表場所：国立京都国際会館（京都）
- ⑥ 森田仁
発表標題：Regulation for Xenopus neural tube morphogenesis by nectin-2, an Ig-like adhesion molecule in cooperation with N-cadherin
学会名：第 42 回日本発生物学会
発表年月日：2009 年 5 月 28 日
発表場所：新潟コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 直人 (UENO NAOTO)
基礎生物学研究所・形態形成研究部門
研究者番号：40221105

(2) 連携研究者

鈴木 誠 (SUZUKI MAKOTO)
研究者番号：10533193