

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5月15日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21680030

研究課題名（和文） 大脳皮質の形態形成におけるアピカル領域の役割の解析

研究課題名（英文） Analysis of the role of apical membrane organization in the development of the cerebral cortex

研究代表者

田ノ上 拓自（Tanoue Takuji）

神戸大学・大学院医学研究科・特命講師

研究者番号：10360588

研究成果の概要（和文）：

主に、Dachsous1 のノックアウトマウスを用いて、我々が同定した細胞膜領域 subapical membrane apposition について解析を行った。ノックアウトマウスでも Fat4、Dachsous1 の RNAi 法を用いた形態異常（Ishiuchi et al., JCB, 2009）と、同様の形態異常が見られることを確認できた。また、Fat4、Dachsous1 の結合分子をいくつか同定した。さらに、関連分子、Lulu について解析を加え、Lulu が細胞のアピカル膜領域の面積を制御することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we mainly investigated the role of Dachsous1 cadherin in the development of the cerebral cortex by using Dachsous1 knockout mice. We focused our study on the morphogenesis of the apical membrane apposition in the neuroepithelial cells, which we previously identified. We found that Dachsous1 knockout mice displayed defects in the organization of the apical membrane apposition. We also identified several interacting molecules of Fat4 and Dachsous1. Furthermore, we analyzed Lulu molecule, which has a functional relationship with Fat4 and Dachsous1, and found that Lulu is also important for the normal organization of the apical membrane in epithelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2010 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総 計	20,200,000	6,060,000	26,260,000

研究分野：ライフサイエンス（共通基礎研究）

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：カドヘリン分子群、大脳皮質、形態形成、細胞膜

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は高等動物のみが持つ高度な情報処理の中核器官である。その形成過程を理解することは、高等動物の行動様式等を理解することにもつながる重要な研究課題である。

大脳皮質はその発生段階において、極性上皮細胞様の細胞（radial progenitors）が激しく分裂し、自己複製を行いつつ神経前駆細胞を生み出す。最終的には神経細胞の層からなるお椀型の形態をとる。しかしながら、細胞の

自己複製と神経分化がいかにして制御されるのか、また、全体としての構造をどのようにして作り出すのかなど、その形態形成の分子的な基盤に関して未だ解けていない謎が多い。近年、大脳皮質の形態形成過程において、アピカル（細胞頭頂部（脳室側））細胞膜領域が非常に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

大脳皮質の発生過程においては、radial progenitor 細胞が幹細胞として働く。radial progenitor 細胞は、apical-basal（頭頂—基底側）の極性を持つ細胞であり、アピカル面が脳室に面している。大脳皮質の脳室側にクラシックカドヘリン分子から成る細胞間接着構造（adherens junction）が形成され、アピカル領域と基底側領域を分離している。

近年、大脳皮質の形態形成過程において、アピカル領域が非常に重要な役割を果たしていることが示唆されている。例えば、adherens junction を破壊すると、大脳皮質の正常な形態形成は阻害される（Kadowaki et al., *Dev. Biol.*, 2007）。また、アピカル領域に局在する分子がいくつか同定されており、それらのノックアウトマウスにおいて、大脳皮質の構造、および細胞増殖・分化に異常が生じることが報告されている（Cappello et al., *Nat. Genet.*, 2006; Lien et al., *Science*, 2006; Rasin et al., *Nat. Neurosci.* 2007）。

私は、細胞間相互作用を担うカドヘリンスーパーファミリーの一員である Fat カドヘリン分子群に関して研究を進めているが、最近、その一つの Fat4 分子が発生途中の大脳皮質のアピカル細胞膜の構築に必須な分子であることを明らかにした。Fat4 は、ショウジョウバエにおいて細胞増殖と平面内極性の制御分子としてよく知られている Fat の哺乳類ホモログである。我々は、大脳皮質の発生過程において Fat4 が adherens junction よりもさらにアピカル側に位置することを見出した。電子顕微鏡を用いて大脳皮質のアピカル部位を詳細に観察すると、adherens junction よりもアピカル部位に細胞間の膜接合構造が観察された。我々はこの接合構造を sub-apical membrane apposition と名付けた。Fat4 を RNAi 法を用いてノックダウンすると、この領域が顕著に退縮する。また、Fat4 は別のカドヘリン分子である Dachsous1 と細胞外領域を介して結合する

が、Dachsous1 のノックダウンでもまた、sub-apical membrane apposition が退縮することを見出した。

さらに我々は、Fat4 の細胞内結合分子として Pals1 複合体を同定した。Pals1 複合体は、上皮様細胞の極性化の過程と細胞のアピカル領域の規定に必須な分子複合体としてよく知られている（Pellikka et al., *Nature*, 2002; Hong et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003）。我々は、Pals1 複合体もまた大脳皮質の sub-apical membrane apposition に局在することを見出し、Pals1 をノックダウンすると Fat4 と同様に sub-apical membrane apposition の退縮が観察された。

すなわち、我々は大脳皮質の発生過程において sub-apical membrane apposition という構造を同定すると同時に、Fat-Dachsous 系と Pals1 複合体がその構造を制御していることを明らかにした。しかしながら、sub-apical membrane apposition が大脳皮質の形態形成においてどのような役割を果たしているのかという大きな問題は未解決なままである。

2. 研究の目的

カドヘリン分子群の一員である Fat4 カドヘリンと Dachsous1 カドヘリンは神経上皮細胞の青いかる細胞膜近傍に局在することが我々の予備的な実験で明らかになっていた。本研究では、Fat4 と Dachsous1 の神経上皮細胞における役割の解明を中心に、その結合分子、および関連分子の解析も加えることを通して、神経上皮細胞の形態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

Fat4、Dachsous1 のノックアウトマウスの神経上皮細胞における表現型の解析と並行して、その結合分子の同定、関連分子の機能解析を分子・細胞レベルで行う。さらに、それら分子群の神経上皮細胞における機能をマウス胎仔エレクトロポレーション法を用いて解析する。

アピカル細胞膜領域、特に sub-apical membrane apposition が大脳皮質の形態形成において果たす役割の解明を目的として、以下の3つの方法をとる。

1) Fat-Dachsous 系の果たす役割とその下流の分子メカニズム・制御機構をさらに

詳細に明らかにする。

- 2) sub-apical membrane apposition の分子的な構成を明らかにする。
- 3) sub-apical membrane apposition に局在する分子群の機能を明らかにする。

手法としては、大脳皮質特異的なコンディショナルノックアウトマウスの解析、免疫沈降法等と質量分析法を用いた分子複合体の同定、マウス胎児子宮内エレクトロポレーション法を用いた *in vivo* での解析、および培養細胞系を用いた解析、の4つを柱として進めていく。

4. 研究成果

主に *Dachsous1* のノックアウトマウスの解析を進め、我々が同定した細胞膜領域 subapical membrane apposition について解析を行った。ノックアウトマウスでも *Fat4*、*Dachsous1* の RNAi 法を用いた形態異常 (Ishiuchi et al., JCB, 2009) と、同様の形態異常が見られることを確認できた。また、*Fat4*、*Dachsous1* の結合分子をいくつか同定した。さらに、発展研究として *Fat4* と *Dachsous1* 関連分子である、アピカル細胞膜領域の制御分子 *Lulu* について解析を加えた。

生化学的手法を用いて、*Fat* と *Dachsous* 結合分子候補をいくつか同定した。その後、本研究助成金で購入した機器を使用して、細胞分化や増殖、細胞移動に異常が観察できるか、*Fat4* と *Dachsous1*、およびその結合分子群について、GFP などを使用した *in utero* エレクトロポレーション法を併用してライブイメージングでの解析を加えたが残念ながら有意な差が観察されず、現在、他の可能性を検討中である。

Fat4 や *Dachsous1* と同様にアピカル細胞膜領域を制御する分子、*Lulu* に関する研究であり、*Fat4*、*Dachsous1* の研究から派生した発展研究である。分子としては、FERM ドメインを持っており、細胞膜と相互作用する性質を持つ。同様に大脳皮質のアピカル細胞膜領域の制御について研究を進めていく。*Lulu* は、もともとはショウジョウバエで *Yurt* という類縁分子の研究が先行しており、*Yurt* はショウジョウバエの *Pals1* 分子複合体と相互作用し、アピカル細胞膜領域を負に制御する活性を持つことが報告されていた。すなわち、*Fat4* や *Dachsous1* と逆の活性を持つ分子であると考えられる。*Pals1* 複合体は、我々

が *Fat4* と相互作用する分子複合体であることを見出したものであり (Ishiuchi et al., J. Cell Biol., 2009)、その関連で *Lulu* の解析も進めた。本研究期間中に、分子・細胞レベルでの基礎的な機能に関して解析を加えた。その成果として、*Lulu* が、哺乳類でもアピカル細胞膜領域を負に制御する分子であることを明らかにし、さらに、その活性は周縁帯 (circumferential actomyosin belt) と呼ばれる、上皮細胞のアピカル部位の細胞境界に沿って存在するアクチン - ミオシンのベルト状の構造物の活性を制御することによるものであることを明らかにした (Nakajima and Tanoue, J. Cell Biol., 2011)。また、分子レベルでは、*Lulu* が p114RhoGEF という Rho 特異的な活性化因子と結合して活性化することによって周縁帯を収縮させることを見出した。本 *Lulu* の研究は、当初計画から発展した研究であり、今後の新たな展開が期待できる。*Lulu* は、発生途中のマウス大脳皮質でも発現が観察された。

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)

1. Nakajima H. and Tanoue T.
The circumferential actomyosin belt is regulated by the *Lulu2*-p114RhoGEF system. (review)
Small GTPases. 3: 2, 1-6. (2012). (査読有)
2. Nakajima H. and Tanoue T.
Lulu2 regulates the circumferential actomyosin tensile system in epithelial cells through p114RhoGEF.
J. Cell Biol. 195: 245-261. (2011). (査読有)
3. Nakajima H. and *Tanoue T.
Epithelial cell shape is regulated by *Lulu* proteins via myosin-II.
J. Cell Sci. 123: 555-566. (2010). (査読有)

[学会発表] (計4件)

1. 田ノ上拓自
「Hippo の経路の上流について」
日本生化学会大会 シンポジウム講演
(2011) 京都

2. 田ノ上拓自
「極性上皮細胞の張力の制御機構について」 G-COE ワークショップ 講演 (2011)
淡路島
3. 中嶋洋行、石内崇士、竹市雅俊、田ノ上拓自
「極性上皮細胞の頭頂部と基底側部の規定に関して」
日本生化学会大会 シンポジウム講演
(座長) (2009) 神戸
4. 田ノ上拓自
「極性上皮細胞の頭頂部と基底側部の規定に関して」
G-COE ワークショップ 講演 (2009)
淡路島

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.research.kobe-u.ac.jp/fmed-gcoe/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田ノ上 拓自 (Tanoue Takuji)

神戸大学・大学院医学研究科・特命講師

研究者番号：10360588