

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650074

研究課題名（和文）細胞数によって細胞集団の振る舞いが異なる現象を数理モデルと実験から理解する

研究課題名（英文）Understanding of a phenomenon where cells differently behave in a cell number-dependent manner

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） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：平面内細胞極性（PCP）は、組織平面において細胞集団の向きが特定の方向に揃う現象である。これまでに我々は、実験とシミュレーションにおいて、PCP分子Spleの過剰発現によるPCPの向きの逆転が細胞数に依存することを見出している。それはすなわち、ある細胞集団にSpleを過剰発現させた際、細胞数が多ければPCPの向きは逆転するが、少ない場合は逆転しないという現象である。本研究では、独自に構築したこれまでのPCP数理モデルを改良するとともに、上述の「Sple過剰発現によるPCP表現型の細胞数依存性」の分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The planar cell polarity (PCP) pathway coordinates cell polarization within an epithelial sheet in both vertebrates and invertebrates. Recently, using a combination of experiment and computer simulation, we found an intriguing feature of sple overexpression clones. In small clones, polarity inside the clones was never reversed, but the PCP was reversed inside larger clones. In this study, we modified the mathematical model of PCP that we made before, and performed experiments and computer simulations to understand a molecular mechanism underlying the above phenotype.

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

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ある特定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一般的な現象である。例えば、哺乳類では、PCP の働きにより内耳有毛細胞が一定方向に配向し、この極性の獲得が機能の発現と密接に関連する。また近年、PCP が細胞の分裂軸制御や嚢胞腎などの疾患に関与することが報告され、PCP が関与する生命現象が広がりを見せている。

PCP の分子機構を理解するにあたり、ショウジョウバエを用いた遺伝学的研究が大きな貢献を果たしてきた。ショウジョウバエ翅には数万個にもおよぶ細胞が存在し、個々の細胞は、辺縁部から翅先端側 (遠位側) に伸長する 1 本の翅毛を有する。PCP は、この一系乱れぬ個々の細胞の振る舞いを統制する。ショウジョウバエは遺伝学的解析に優れたモデル生物である上に、顕微鏡観察により翅毛の配向性を容易に観察できる利点を併せ持つ。ショウジョウバエは PCP 研究のための最適な実験系を提供する。

ショウジョウバエを用いた遺伝学的研究から、PCP の制御に関わる分子は機能の相違により 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 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。例えば、ショウジョウバエ翅の上皮細胞では、Fz は遠位側細胞端に、Stbm は近位側細胞端にそれぞれ非対称に局在する (Fmi は遠位側および近位側の両細胞端に局在する)。コアグループ分子群の非対称性が確立させた後、Fz が局在する細胞端から翅の遠位側方向に向かって 1 本の翅毛が形成される。二つ目は、非典型的カドヘリン分子である Dachshous (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。

ショウジョウバエ翅においては、方向情報である Ds の発現勾配が翅の根本 (近位側) から先端 (遠位側) に向かって低くなるように形成され、この情報に従って Fz が偏在化する。しかしながら、ショウジョウバエ複眼においては、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おり、PCP 形成時における「方向情報」と「個々の細胞の極性」を繋ぐ機構には不明な点が多い。

以前、我々はショウジョウバエを用いた組織特異的 RNAi スクリーニングを行い (Nature 458, 97-992, 2009) 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た。また、この結果をもとに、北海道大学電子科学研究所の秋山正和博士と共同で PCP の数理モデルを構築し、実験で得られる様々な PCP 表現型をシミュレーションにより再現することに成功している。

2. 研究の目的

我々は、上述の数理モデルを用いて様々な条件においてシミュレーションを施行したところ、Pk:Sple 発現比の改変による Fz 局在の向き (翅毛の向き) の変換は、“細胞数” に依存することを見出した。つまり、翅の PCP シミュレーションにおいて、ある細胞集団 (“クローン” と呼ぶ) に Sple を過剰発現させた際、クローンが大きければ (細胞数が多ければ) Fz 局在の向きは逆転するが、クローンが小さい場合は逆転しない。この現象が実際のショウジョウバエの翅においても観察されるかどうかを明らかにするために、ショウジョウバエの翅細胞の一部に Sple 過剰発現させたところ、シミュレーションで観察された現象と同様の結果を得ることができた。

本研究では、この現象の分子機構を理解することを目的とした。また、上述のシミュレーションを施行する際に用いた数理モデルは、現象論的視野から構築されており、細胞における PCP 分子群の挙動ではなく、細胞の向きを一つのパラメーターで表現している。本研究では、PCP 分子の挙動を反映させた改良型の数理モデルの構築も試みた。

3. 研究の方法

(1) Sple の細胞内局在の解析

Sple の細胞内局在を解析するために、flippase (Flp) recombinease 依存的に EGFP タグを付加した Sple をモザイク状に発現誘導可能な系統 (pAct-stop-EGFP::sple) を使用した。

(2) PCP の数理モデルの改良

上述したように、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既存の PCP 数理モデルでは、個々の細胞の極性の向きを一つのパラメーターで表現している。我々は、PCP の分子機構に関するこれまでの知見を基に、PCP 分子の挙動を反映させた改良型の数理モデルを構築した。

4. 研究成果

これまでの研究から、コアグループ分子の非対称局在の確立には、Fz を含む複合体 (以

下、Fz 複合体と略)と Stbm を含む複合体(以下、Stbm 複合体と略)間の細胞内および細胞間相互作用が重要であると考えられている。両複合体は、同一の細胞内では違いに忌避しあうのに対し、細胞間では親和性を示す。我々は、Fz 複合体と Stbm 複合体の挙動を異なるパラメーターで表現することで、PCP 分子の振る舞いを加味した改良型の数理モデルを構築した(図1)。

この改良型の数理モデルを用いたシミュレーションを行ったところ、旧型の数理モデルを用いた場合と同様に、実際の実験で観察される様々な現象を再現できることを確認できた。また、本研究で着目する、「Sple 過剰発現による PCP 表現型の細胞数依存性」の結果も再現できることを明らかにした。

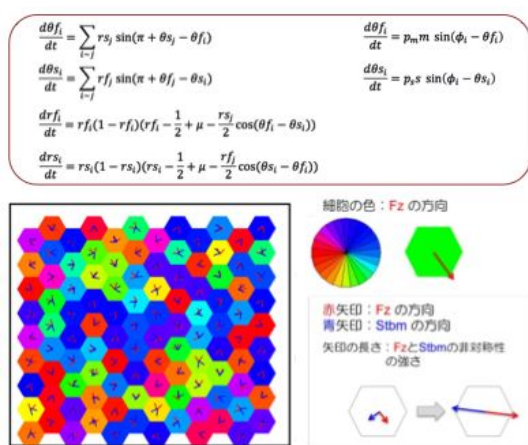


図1 PCPの数理モデル

次に我々は、「Sple 過剰発現による PCP 表現型の細胞数依存性」の分子機構を明らかにするために、幼虫の翅成虫原基において様々なサイズの Sple 過剰発現クローンを作り出し、Sple の細胞内局在を解析した。その結果、Sple 過剰発現クローンのサイズが大きい場合、クローン内の細胞において、Sple は強く非対称に局在するのに対し、クローンサイズが小さい場合(特に、1 クローンあたり数細胞の場合)、Sple の非対称局在が顕著ではない細胞が数多く認められた。さらに、Sple 過剰発現クローン内における接着分子の挙動を明らかにするために、Armadillo (ショウジョウバエ beta-catenin) の局在を解析したところ、Armadillo の膜局在が減弱している細胞が多数観察された。また、Sple を過剰発現させた細胞の数を一定にし、クローン数を変動(各クローンの細胞数が変動する)させたシミュレーションを様々な条件で実施したが、PCP 方向の逆転には大きな影響は認められなかった。今後、力学的観点から、詳細な解析を実施する予定である。

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. Dachshous-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 12 件)

Ⓢ 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)

Ⓢ 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)

Ⓢ 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)

Ⓢ 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)

Ⓢ Masakazu Yamazaki: A molecular mechanism underlying planar cell polarity orientation in *Drosophila*, MBI-Japan Joint Symposium 2014, Singapore, 2-4 December, 2014 (Invited Talk)

Ⓢ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Dachshous-

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)

○ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Dachshous-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)

○ 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)

○ 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)

○ 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)

○ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and Masakazu Yamazaki: Dachshous-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)

○ Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Jennifer L. Mummery-Widmer, Thomas Stoeger, Junko Sasaki, Juergen A. Knoblich, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki

and Masakazu Yamazaki: Dachshous-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)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計 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 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

秋山 正和 (AKIYAMA Masakazu)
北海道大学・電子科学研究所・助教
研究者番号: 10583908

(3) 連携研究者

()

研究者番号: