

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「単一細胞レベルのパターン形成:細胞極性の制御機構」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

上村 匡 (京都大学大学院生命科学研究科 教授)

主たる共同研究者

見学 美根子 (理化学研究所脳科学総合研究センター チームリーダー)

田畑 秀典 (慶應義塾大学医学部 助手)

永渕 昭良 (熊本大学発生医学研究センター 教授)

3. 研究内容及び成果

発生において個々の細胞は外界からのシグナルなどを解読し、細胞骨格を何度も再編成させて様々なベクトルの極性を発達させる。この単一細胞レベルのパターンが正しく形成されてはじめて、誕生した器官に個体の行動や生存のために必要な巧妙な機能が賦与される。本研究では神経系と上皮を対象として単一細胞レベルのパターン形成機構を研究し、以下の成果を得た。

### (1) 神経系における細胞突起の伸長と分岐のパターン形成

[上村グループ]

我々は以前に、ショウジョウバエをモデル生物とした研究から7回膜貫通型カドヘリン Flamingo (Fmi) を発見していた。我々や他のグループは、Fmi が神経回路形成に重要な役割を果たすことを示していたが、その分子レベルでの作用機序は明らかではなかった。ほ乳類ホモログの機能アッセイ系を樹立し、ほ乳類においても7回膜貫通型カドヘリンが神経突起の伸長を制御することを示した。さらに、二つのほ乳類ホモログはGタンパク質と共役する受容体であり、分子間のホモフィリックな結合により活性化されること、そしてそれぞれ異なる様式で突起伸長を調節することを支持するデータを得た。これらの結果を総合して、生体内において神経突起が成長しつつ互いにコンタクトする際に、Fmi ファミリーメンバーの分子間結合を介するシグナル伝達経路が、突起伸長を調節するモデルを提案した。また、Fmi は未同定のリガンドとヘテロフィリックに結合して機能する局面があることが強く示唆された。

[上村グループ]

ニューロンはクラス毎に特徴的な樹状突起パターンを形作り、このパターンの多様性は、神経系が様々な情報を受容し処理するために不可欠であると考えられている。しかしクラス毎に特徴のあるパターンを規定する分子基盤は不明だった。本研究では、ショウジョウバエの dendritic arborization (da) neuron をモデル系として、生体内において単一細胞の解像度で樹

状突起を可視化できる系を樹立した。そして、転写調節因子群によるクラス選択的な突起パターンの調節機構が存在することや、da neuron とその周囲の非神経細胞との間で、接着分子を介する相互作用が特定のクラスの突起形成に重要であることを明らかにした。

[見学グループ]

神経突起だけでなく、グリア細胞の突起の発達も神経回路形成と機能に重要な役割を果たす。マウス小脳顆粒細胞で発現する遺伝子の探索から、新規EGF関連膜貫通分子DNER (Delta/Notch-like EGF-related Receptor) を発見し、プルキンエ細胞-バグマングリア-顆粒細胞が細胞間相互作用を通じて互いに分化を制御し合い、小脳皮質層形成を制御していることを明らかにした。この過程において、DNER は Notch のリガンドとして働く。

## (2)ニューロンの運動に伴う極性変換のダイナミクス

脊椎動物の中枢神経系発達過程で、ニューロンは誕生部位からダイナミックに移動し、機能的に相関する細胞と共に秩序正しく配列して、層構造や核を形成する。本研究では電気穿孔法を用いて、大脳皮質のニューロンあるいは小脳顆粒細胞を長時間追跡できる系を確立し、さらに移動を調節する候補分子の機能を追究する段階に至った。[仲嶋グループ]大脳皮質発生過程においては、ロコモーションと細胞体トランスロケーションという2つの異なる移動様式が知られていたが、さらに第三の移動様式として多極性移動を発見した。さらに、大脳皮質の主要構成要素である興奮性神経細胞が、多極性移動からロコモーションへと多段階的に移動様式を変化させることを明らかにした。[見学グループ]一方、小脳顆粒細胞はその誕生後に、90 度の方向転換を挟む二相性の移動様式をとることが知られていた。それぞれの移動ダイナミクスによりシグナル伝達経路が使い分けられており、Cdk5-p35 シグナルが差次的に機能することが示唆された。

## (3)上皮細胞分化と平面内極性の獲得

上皮細胞は頂部側に微絨毛や接着結合を発達させ、また基側部側には接着斑を形成するなど、構造上そして機能上顕著な極性を示す。[永渕グループ]F9細胞を用いて、単層培養条件下でも、遺伝子発現、接着装置複合体の形成、そして頂端面形成など様々な点において上皮分化誘導が可能な実験系を立ち上げた。そして、上皮細胞が形成されるときに細胞間接着機構が果たす役割を、 $\beta$  カテニン・プラコグロビン二重欠損細胞を分離し解析した。

[上村グループ]

多くの上皮細胞は、頂端部-基底部軸に沿った極性の他に、平面内の軸に従った極性(平面内細胞極性: planar cell polarity, PCP) を発達させる。我々はショウジョウバエの翅を用いた研究から、7回膜貫通型カドヘリン Flamingo (Fmi) が、Frizzled (Fz) シグナル伝達経路の一つである non-canonical pathway の一員として働くことを、本研究の開始時点で明らかにしていた。さらに Fmi や Fz などの極性制御分子群の時空間的な局在様式が、PCP の獲得に重要であることを以前から提唱した。しかしながら、どのような仕組みで Fmi などの局在が調節さ

れているのかは不明だった。生体内経時観察や電子顕微鏡などを用いて、これらの分子の局在が、Fmi や Fz を含む小胞の極性輸送により調節されることを示した。PCP は様々な生物で見られる一般的な現象であり、脊椎動物内耳の有毛細胞や呼吸器系および輸卵管の上皮も PCP を獲得する。本研究をさらに推進すれば、極性制御の中核的な分子作動機構を明らかにできることが期待される。

[上村グループ]

上皮細胞はアクチン線維を基本骨格とする微絨毛を頂端面に発達させる。ショウジョウバエの表皮細胞も類似の突起を形成する。我々はこの突起構造が異常になる突然変異体を分離し、原因遺伝子のクローニングを出発点として、アクチン細胞骨格系の再編成を調節する新規フォスファターゼ Slingshot (SSH) ファミリーを発見した。そして生体内から試験管内反応系までの全てのレベルにおいて、SSH は Actin depolymerizing factor (ADF)/コフィリンを基質とすることを明らかにした。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本プロジェクトの成果は Cell, Neuron, Develop. Cell などのトップジャーナルに発表されており、研究成果は十分に高いと評価される。この種の厳密さを要求される基礎的な研究でインパクトファクターの高い国際誌への発表を持続的に行ってきた実績はCRESTの期待に十分に応えるものである。生体内での単一細胞の複雑な形態を可視化する技術の開発、および一個の細胞の細胞極性の決定や制御の分子機構の解明は、将来の再生医療や移植技術の基礎として重要な知見を生む研究であるが、まだ知財権を生む段階に達するにはしばらく研究を継続しなければならない。特許申請の努力を行っているが、まだ成立したりライセンスアウトすることを要求するには早すぎると考えられる。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

細胞の極性制御を正しく行うことは、この種の技術を再生医療等に発展させていく過程で重要であり、本研究は本領域の戦略目標によく合致している。また、本プロジェクト以前に研究代表者がショウジョウバエで発見した新規の7回膜貫通型カドヘリン分子の哺乳類ホモログを発見してその機能解析に成功した事は、発生生物学への貢献も大きい。共同研究者のグループもそれぞれ関連するテーマで高い成果をあげているが、研究代表者の研究との相乗作用はまだ始まりつつある段階と思われる。今後は単一細胞レベルでの細胞極性決定機構に関する細胞表面接着分子を介する外界情報の入力機構から、細胞内の情報の伝達、細胞骨格系など具体的な極性を実現する装置までの一連の分子機構をシームレスにつなげて理解するために、本プロジェクトで生み出された共同研究成果を発展させていくことが期待される。

##### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

(受賞)

上村 匡： 第一回日本学術振興会賞 (2005年3月)