

細胞集団移動を介した新奇 PCP 制御機構の解明

A novel mechanism underlying planar cell polarity

(日本発生生物学会推薦)

代表研究者	秋田大学	山崎 正和	Akita University	Masakazu YAMAZAKI
協同研究者	秋田大学	鮎川 友紀	Akita University	Tomonori AYUKAWA
	明治大学	秋山 正和	Meiji University	Masakazu AKIYAMA
	秋田大学	高須賀 俊輔	Akita University	Shunsuke TAKASUGA

Planar cell polarity (PCP) is the coordinated polarity of cells within the plane of the epithelium. PCP plays crucial roles in the development and function of various organs, and defects in the PCP pathway cause many human diseases. Genetic and molecular studies using *Drosophila* have identified many PCP genes and greatly contributed to uncovering the regulatory mechanisms governing PCP. One group of the PCP molecules, a “core” group, includes several transmembrane proteins such as Frizzled and Flamingo, which exhibit polarized localization at the cell cortex. Although there is a consensus that the core group system plays a central role in the PCP pathway in *Drosophila* and vertebrates, recent studies suggest an existence of the core group-independent PCP pathway. However, the molecular mechanism governing this novel PCP pathway remains unclear. In this study, using live imaging and mathematical modeling, we tried to understand a mechanism underlying the core group-independent PCP.

研究目的

体表面や管腔の内面を覆う上皮組織には、体毛や繊毛が無数に存在する。これらの構造物は無秩序に配置されているのではなく、組織や器官の特定方向に配向し、精巧なパターンを形成する。この現象は、平面内細胞極性 (planar cell polarity : PCP) と呼ばれ、組織機能の発現においても重要な役割を果たす。例えば、内耳の有毛細胞は、特定の方向に向かって感覚毛 (不動毛) を形成し、その配向性異常は聴覚機能の低下を招く。

体毛の配向性異常を呈するショウジョウバエ変異体の解析から PCP を司る分子が同定されたのを契機とし、ヒトを含む様々な動物においても多くの PCP 制御分子が見出されている。その中でも、7 回膜貫通型タンパク質 Frizzled や 4 回膜貫通型タンパク質 Strabismus (別名 Van Gogh)、7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo 等から構成されるコアグループ分子群は、

PCP の中核をなすと考えられており、コアグループ分子の機能欠損は様々な動物において PCP の異常を引き起こす。しかしながら、組織によっては、コアグループに依存しない PCP 制御機構の存在が示唆されており、例えば、ショウジョウバエ腹部においては、ある遺伝学的背景においてコアグループに依存せずに体毛の配向性が揃う現象が報告されている (Casal et al. *Development*, 2006)。最近、マウスの組織においても類似の現象が報告され (Copley et al. *J Neurosci*, 2013; Cetera et al. *Dev Biol*, 2017)、コアグループに依存しない PCP 調節機構が種を超えて存在する可能性も提示されている。このように、近年、コアグループ非依存的 PCP の重要性が高まりつつある一方で、その制御機構は未だ不明であり、PCP 分野における謎として残されている。

これまでに代表研究者らは、ショウジョウバエを用いた組織特異的ゲノムワイド RNAi スクリーニン

グを世界に先駆けて実施し、PCP を含む様々な生命現象に関わる新規遺伝子を多数同定するとともに、この成果と数理モデルの手法を融合することで、組織の方向情報とコアグループを繋ぐ機構を明らかにしてきた (*Mummery-Widmer, *Yamazaki (*共筆頭著者) et al. Nature, 2009; Mauri et al. Curr. Biol, 2014; Ayukawa et al. Cell Reports, 2014)。その後、本スクリーニングで同定した新規 PCP 遺伝子群を対象とした精緻な遺伝学的解析から、既存の PCP 制御遺伝子とは全く異なる機能を有する PCP 制御遺伝子群を同定している (未発表)。この分子群は、Jitterbug (Jbug) (アクチン結合タンパク質 Filamin のショウジョウバエホモログ) とその結合因子 Chascon (Chas) を含む 7 つの分子から構成されており、代表研究者はこの新規 PCP 制御グループを Jbug/Chas グループと命名した (未発表)。

PCP 制御系が異常になると、ショウジョウバエの体の様々な部位において、毛の配向性が乱れることが知られている。例えば、背板において、コアグループ遺伝子または Jbug/Chas グループ遺伝子をそれぞれ単独で欠損させると (またはノックダウンすると) 背毛の配向性が乱れる。しかしながら、大変興味深いことに、両グループの遺伝子を同時に欠損させると、背毛の向きが野生型と比較して逆転する (Olguin et al. Curr Biol, 2011) (未発表)。コアグループ分子の機能は相互に関連しており、ショウジョウバエにおいてはコアグループ分子が 1 つでも欠損すると、コアグループ全体の機能が破綻する (残り全てのコアグループ分子の膜局在や非対称局在が失われる)。この事実は、上述の背毛の向きの逆転現象がコアグループとは異なる未知の機構により制御されていることを意味する。代表研究者は、この PCP 逆転現象を司る機序を理解することで、コアグループ非依存的 PCP の謎を解明できると考え、本研究を着想するに至った。

研究経過

ショウジョウバエ背板は、上皮細胞と一定の間隔で散在する外部感覚器から構成される単層の上皮組織である。外部感覚器は 4 種類の細胞から構成され、それらの内、毛細胞 (背毛) とソケット細胞が外部に露出する。蛹期にコアグループの非対称性が確立

された後、背毛の形成が始まる。背毛が形成される前後のステージにおいて、背板上皮を構成する大半の細胞が体の前方に流れるように移動する (Tissue flow)。Tissue flow が生じている過程で、体の後方側に向かって背毛が形成され、そのまま後方側へと伸長する。

上述したように、コアグループ遺伝子と Jbug/Chas グループ遺伝子の機能を同時に欠損させると (以下、二重変異体または二重ノックダウン系統と略)、野生型と比較して背毛の配向性が逆転する。この現象を司る機構を明らかにするために、共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブイメージングにより二重変異体における背板上皮の動態を解析したところ、Tissue flow の向きが野生型と比較して逆転していることが明らかとなった (未発表)。この結果から、二つの可能性 (1) 「逆向きの Tissue flow が背毛の配向性の逆転の原因である」、(2) 「逆向きの Tissue flow 自身ではなく 2 種類の遺伝子が同時に欠損したことが原因である」が提示された。この点を明らかにするため、二重変異体における逆向きの Tissue flow を正常方向に戻すことを試みた。逆向きの Tissue flow が外力 (間接飛翔筋による上皮の牽引) により駆動されることが示唆されたため、遺伝学的手法を用いて筋肉を除去し、背板上皮に作用する外力を抑制したところ、二重変異体における逆向きの Tissue flow が正常な方向に戻った (未発表)。さらに、成虫背毛の配向性も正常な方向 (後方側) へと救済された (未発表)。以上の結果から、「Tissue flow はコアグループに依存せず自身の流れの向きとは反対になるように背毛を配向させる」ことが強く示唆された。

Tissue flow を介した背毛の配向性制御のメカニズムを明らかにするため、緑色蛍光タンパク質 (GFP) とアクチン結合タンパク質との融合タンパク質を用いて背毛を蛍光標識し、二重変異体における Tissue flow と背毛の動態を同時に観察したところ、物理的な現象が Tissue flow を介した背毛の配向性制御に関与することが示唆された (未発表)。すなわち、「上皮頂端部の細胞外領域にある何らかの物質が抵抗となることで、背毛が Tissue flow とは反対方向に配向される」のではないかと考えられた。物理的抵抗の候補として、「上皮組織外の液体成分」と「細胞外マトリックス (extracellular matrix : ECM)」が想定され

たため、両者について検討を行った。

「上皮組織外の液体成分」の関与に関しては、実験的に検証することが困難であったため、数理モデルを用いて検証した（明治大学の秋山正和博士および京都大学の石本健太博士、大阪大学の中澤嵩博士との共同研究）。前述のライブイメージングの結果から算出された「Tissue flow の速度」や「背毛の長さ」等を含む様々なパラメーターを用いて、レイノルズ数を概算したところ、約 1.0×10^{-8} と非常に小さな値であった（未発表）。流体の運動を記述する場合、通常 Navier-Stokes 方程式が頻繁に用いられるが、このようにレイノルズ数が非常に小さい場合、Navier-Stokes 方程式を近似した Stokes 方程式を解いても計算結果はほとんど同じとなる。FreeFEM++および架空領域計算法（Fictitious domain method）を用いて、Stokes 方程式の数値計算を実施したところ、背毛の角度が最大 23.2 度変化した（Fig. 1）（未発表）。しかしながら、実際の背毛の角度は、同じ時間内に、最大 90 度以上変化することから（未発表）、「液体成分」以外の物質が主たる物理的抵抗として機能することが示唆された。

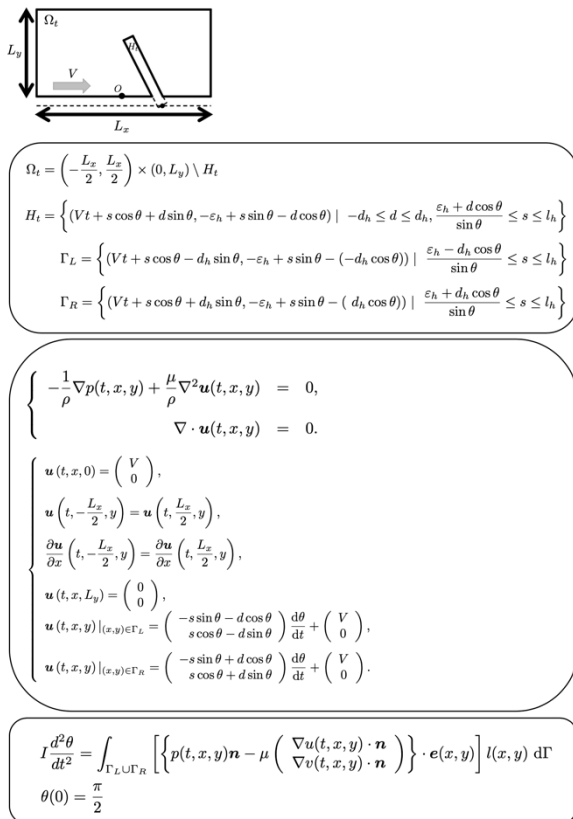


Fig. 1 Mathematical model

次に、ECM の関与について検討を行った。ショウジョウバエ背板上皮の頂端側細胞外領域には apical ECM (aECM) が存在する。もし aECM が上述の物理的抵抗の実体であれば、aECM の発現レベルを低下させた場合、Tissue flow に依存した背毛の配向性制御が抑制されるはずである。aECM の構成因子をノックダウンしたところ、二重ノックダウン系統における背毛の配向性の逆転が抑制された（未発表）。以上の結果から、aECM が物理的抵抗の実体であることが示唆された。

考察

コアグループは文字通り PCP 形成の”中核(コア)”をなすと考えられており、コアグループ分子の機能が損なわれると、ショウジョウバエやマウスを含む様々な動物の多様な組織において PCP が異常となることが知られている。しかしながら、組織によっては、分子実体は不明ながらコアグループ非依存的 PCP 制御機構の存在が示唆されており、PCP 分野における謎として残されている。本研究において、代表研究者らは、ショウジョウバエ背板における PCP の逆転現象をモデル系として用い、Tissue flow がコアグループ非依存的 PCP 制御機構の実体であることを見出した。また、驚くべきことに、Tissue flow を介した PCP 制御には、aECM との協調作用を介した単純な物理現象が寄与することが示唆された。

今回見出した、Tissue flow を介したコアグループ非依存的 PCP 制御機構は、生理的な条件においても機能しているのだろうか？最近、代表研究者らは、正常な方向の PCP 形成においても本機構が関わることを見出している（未発表）。今後、本研究で見出した新たな PCP 制御機構の進化的保存性についても検討していきたい。

参考文献

1. Casal, J., Lawrence, P.A., and Struhl, G. (2006). Two separate molecular systems, Dachshous/Fat and Starry night/Frizzled, act independently to confer planar cell polarity. *Development* 133, 4561-4572
2. Copley, C.O., Duncan, J.S., Liu, C., Cheng, H., and Deans, M.R. (2013). Postnatal refinement of auditory hair cell planar polarity deficits occurs in

the absence of Vangl2. *J Neurosci* 33, 14001-14016.

3. Cetera, M., Leybova, L., Woo, F.W., Deans, M., and Devenport, D. (2017). Planar cell polarity-dependent and independent functions in the emergence of tissue-scale hair follicle patterns. *Dev Biol* 428, 188-203.
4. Mummery-Widmer, J.L., Yamazaki, M., Stoeger, T., Novatchkova, M., Bhalerao, S., Chen, D., Dietzl, G., Dickson, B.J., and Knoblich, J.A. (2009). Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature* 458, 987-992.
5. Mauri, F., Reichardt, I., Mummery-Widmer, J.L., Yamazaki, M., and Knoblich, J.A. (2014). The conserved discs-large binding partner Banderuola regulates asymmetric cell division in *Drosophila*. *Current biology* 24, 1811-1825.
6. Ayukawa, T., Akiyama, M., Mummery-Widmer, J.L., Stoeger, T., Sasaki, J., Knoblich, J.A., Senoo, H., Sasaki, T., and Yamazaki, M. (2014). Dachshous-dependent asymmetric localization of spiny-legs

determines planar cell polarity orientation in *Drosophila*. *Cell Reports* 8, 610-621.

7. Olguin, P., Glavic, A., and Mlodzik, M. (2011). Intertissue mechanical stress affects Frizzled-mediated planar cell polarity in the *Drosophila* notum epidermis. *Current biology* 21, 236-242.

研究の発表

口頭発表 (* : 発表者)

1. *Masakazu Yamazaki: Molecular mechanisms underlying global PCP patterns in *Drosophila*, Wnt 研究会 2021, 14-15 January, 2021, Web 開催
2. 鮎川友紀, 秋山正和, 八月朔日泰和, *山崎正和 体毛の配向パターンを司る新奇制御機構の解析, 第 42 回日本分子生物学会年会, 2019 年 12 月 3 日-6 日, 福岡 (ワークショップ)
3. 鮎川友紀, 秋山正和, 八月朔日泰和, *山崎正和 平面内細胞極性を司る新奇制御機構の解析, 第 92 回日本生化学会大会, 2019 年 9 月 18 日-20 日, パシフィコ横浜