

188. 組織の引張力に対抗して細胞極性を維持する仕組み

山崎 正和

秋田大学 大学院医学系研究科 細胞生物学講座

Key words : 平面内細胞極性, planar cell polarity, PCP, ショウジョウバエ, 数理モデル

緒言

上皮組織には、細胞の頂端-基底軸と直交する、特定の軸に沿った極性が存在する。これは、平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) と呼ばれ、様々な組織・器官において観察される現象である [1, 2]。PCP を示す典型例として、内耳の有毛細胞の向きが挙げられる。全ての内耳有毛細胞は、音の振動を効率よく受容できるように、特定の方向に向かって不動毛を形成する。しかしながら、その配向性に異常が生じると、聴覚機能が著しく低下する。同様の現象は気管や卵管に存在する繊毛上皮細胞においてもみられ、繊毛運動の方向性と機能が密接に関連する。また近年、ヒトにおいて PCP 遺伝子の変異により二分脊椎や僧帽弁逸脱が惹起されることも明らかとなっている。組織構築の基本原理を解明するという学術的重要性のみならず、医療応用や創薬の観点からも、PCP 制御機構の全貌解明が急務となっている。

これまで PCP 研究は、内耳有毛細胞の不動毛やショウジョウバエの体毛 (図 1a) などの細胞突起の配向性、またはこの配向性の獲得に必須な分子の細胞内における偏り (図 1b) に着眼することにより、組織平面において細胞集団が協調して非対称性を獲得する仕組み (PCP 形成機構) の解明を主たる目的として進展してきた [1, 2]。また、我々のグループを含む複数の研究室により数理モデルを用いて PCP 形成機構を理解する試みも成されている [3~5]。その一方で、一度形成された PCP が、発生・成長過程を通じて維持される機構は不明である。例えば、哺乳動物の気管などは発生過程のみならず生後においても成長を続け、これらの過程で生じる組織の引張力や細胞の分裂・再配列は、PCP (繊毛運動の方向性) を崩壊させる危険性を内包するが、PCP は生涯に渡り維持される。力に抗い PCP を維持するための、未知の機構が存在すると考えられる。

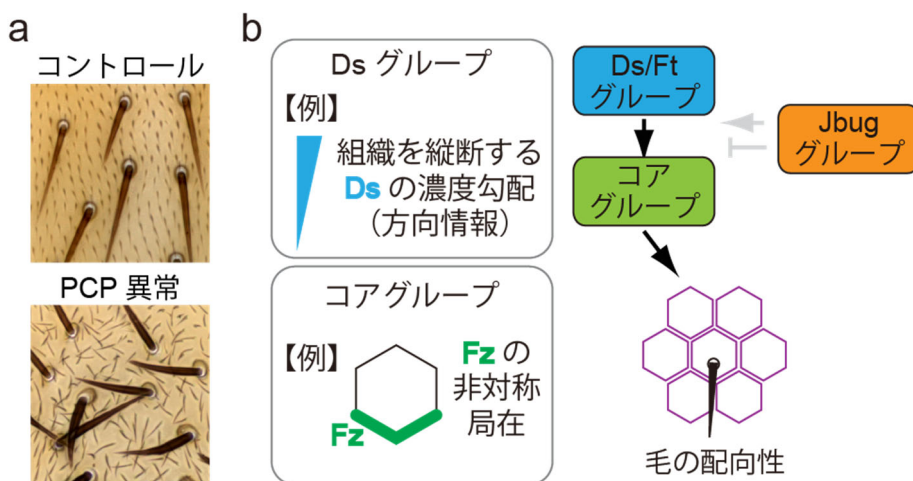


図 1. PCP 制御経路

a) ショウジョウバエ背板。b) 個々の PCP 制御グループの機能と PCP 制御経路。

ショウジョウバエを用いた研究から、PCP の主要制御分子は機能的な相違により二つのグループに分類されている [2]。一つ目は、7 回膜貫通型受容体 *Frizzled* (*Fz*) や 4 回膜貫通型タンパク質 *Strabismus* (*Stbm*; 別名 *Van Gogh*)、7 回膜貫通型タンパク質 *Flamingo* 等によって構成されるコアグループである (図 1b)。これらの分子は個々の細胞において偏在化し、この偏在化が細胞の極性形成 (特定の方向に配向する毛などの形成) に中心的な役割を担っている。二つ目は、非典型的カドヘリン *Dachsous* (*Ds*) および *Fat* (*Ft*) やゴルジ体キナーゼ *Four-Jointed* (*Fj*) 等によって構成される *Ds/Ft* グループであり、組織の方向情報の形成に寄与する。すなわち、*Ds* や *Fj* は組織平面において発現勾配を形成し、自身の勾配の向きに沿うようにコアグループ分子の非対称局在の方向を揃える (図 1b)。これら二つの制御グループの働きにより、PCP が形成されると考えられている。

これまでに我々は、ショウジョウバエを用いた組織特異的ゲノムワイド RNAi スクリーニングを行い、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である *Jitterbug* (*Jbug*) を含む新規 PCP 遺伝子を多数同定している [6]。一般的に、PCP 制御系が異常になると、背板における毛 (*bristle* および *trichome*) の配向性が乱れる。*jbug* 遺伝子とコアグループ遺伝子のそれぞれの単独のノックダウンでは毛の配向性は乱れるが、大変興味深いことに、*jbug* 遺伝子とコアグループ遺伝子との二重ノックダウンにより、毛の向きがコントロールと比較して逆転する。このような表現型は既知の PCP 遺伝子の単独または二重ノックダウンでは観察されない。この結果から我々は、PCP 制御系には、上述の二つのグループの他に“第 3 の PCP 制御グループ”が存在しており、*Jbug* がその新たなグループの構成分子だと考えるに至った (図 1b)。その後、我々はこの第 3 の PCP 制御グループ (*Jbug* グループ) の構成分子を同定するための遺伝学的解析を行い、*Jbug* グループの構成分子として進化的に保存された合計 7 つの分子を同定することに成功している (投稿準備中)。本研究では、*Jbug* グループの構成分子に着目して、PCP の維持機構を解析した。

方法および結果

1. 数理モデルを用いた仮説の検証

ショウジョウバエ背板は上皮細胞と外部感覚器 (*bristle* (毛) を含む) からなる。一部の上皮細胞は腱細胞に分化し、腱細胞から伸張する腱突起が背板上皮の基底側にある間接飛翔筋 (筋肉と略) に結合する。発生過程において、筋肉は収縮・伸張し、その力は腱突起を介して、背板上皮へと伝播する。我々の研究と並行して、米国の *Mlodzik* 博士のグループから、新規 PCP 分子 *Chascon* (*Chas*) が報告された [7]。*Chas* を欠損させると、背板上皮の毛の配向性が乱れるが、この異常は筋肉を除去すると緩和される。この際、筋肉の収縮性は野生型と同程度であることから、*Jbug* グループ遺伝子欠損による PCP 異常の原因として、外力 (筋肉による牽引) に対する上皮組織の頑強性の低下が考えられる。興味深いことに、*Chas* は我々の遺伝学的解析において *Jbug* グループの構成分子として同定されており、この事実は *Jbug* グループ分子群が上皮の頑強性の調節に関与することを示唆する。

最初に、「筋肉により牽引される背板領域」および「牽引と毛の配向性との関係」を明らかにするために、*Jbug* グループ遺伝子を二つ同時にノックダウンして背板形態と毛の配向性への影響を解析した。*Jbug* グループ遺伝子を単独でノックダウンした場合よりも、二種類の *Jbug* グループ遺伝子を同時にノックダウンすると顕著な PCP 異常が観察された (図 2a)。特筆すべきことに、二種類の *Jbug* グループ遺伝子を同時にノックダウンした場合、背板に非常に顕著な陥入構造が出現し、筋肉により牽引される領域が顕著となる。また陥入構造の周囲の毛の配向パターンを詳細に観察したところ、陥入構造から遠ざかるように毛の向きが変化していることが明らかとなった (図 2b)。

次に、この PCP 異常における筋肉による牽引 (陥入構造) の効果を検証するために、数理モデルを用いた解析を実施した。これまでに我々は、ショウジョウバエ翅における PCP の数理モデルを構築している [5]。この数理モデルを改良して、実際のショウジョウバエ背板の細胞数および陥入部位、さらに陥入による毛の配向性への効果を加味した、背板の数理モデルを構築した (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)。その結果、シミュレーションにおいて実験結果と同様の PCP パターンが出現した (図 2c)。以上の結果から、筋肉による牽引が *Jbug* グループの機能低下による PCP 異常の主たる原因であることが示唆された。

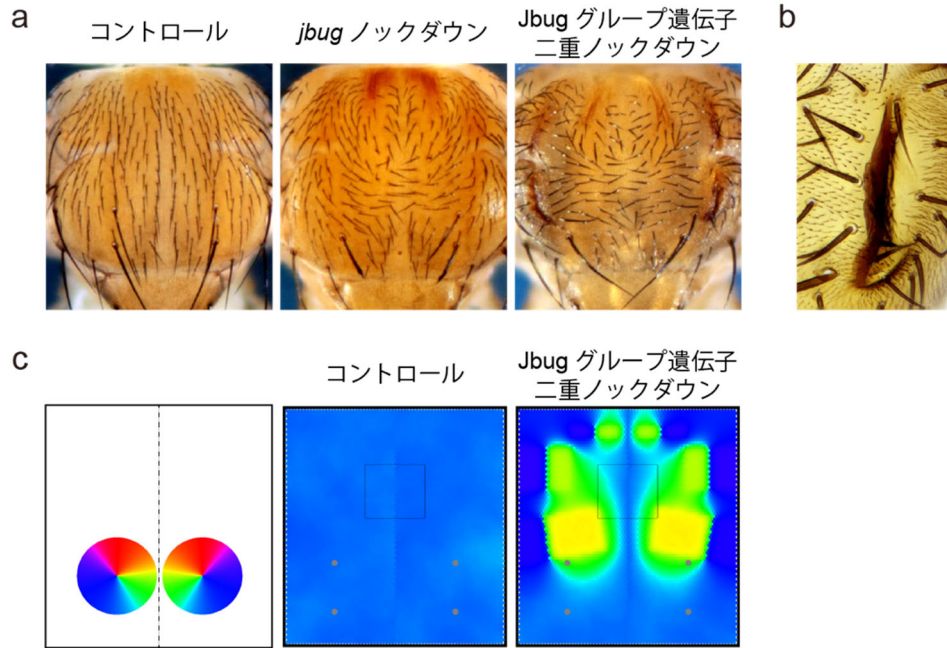


図 2. ショウジョウバエ背板における陥入構造による PCP の摂動

a) ショウジョウバエ背板における PCP 表現型。b) *Jbug* グループ遺伝子二重ノックダウンにおいて観察される背板陥入構造の拡大図。c) ショウジョウバエ背板の PCP に関するシミュレーション結果。色相環図は各細胞の毛の向きを表す。また色相環図はシミュレーション領域の左右で鏡像関係になっている。

2. *Jbug* グループ遺伝子と遺伝学的相互作用する遺伝子の探索

上述したように、*Jbug* グループ遺伝子をノックダウンすると、背毛の配向性が乱れる (図 2a)。この遺伝学的背景において任意の遺伝子をノックダウンまたは過剰発現し、背毛の配向性異常の救済に関わる遺伝子を同定することで、筋肉による牽引に起因する PCP 摂動機構の理解を試みた。ショウジョウバエ個体における任意の遺伝子のノックダウンおよび過剰発現には、*GAL4-UAS* 系を利用した。ショウジョウバエ背板特異的 *pannier-GAL4* 系統と *jbug* 遺伝子に対するトランスジェニック RNAi 系統 (*UAS-IR* 系統) を交配し、背板特異的に *jbug* 遺伝子が恒常的にノックダウンされたショウジョウバエ系統を得た。次に、この系統を様々な遺伝子に対する *UAS-IR* 系統 (国立遺伝学研究所の NIG 系統、Vienna Drosophila RNAi センターの VDRC 系統、Transgenic RNAi Project の TRiP 系統を併用) または様々な遺伝子の過剰発現用系統 (*UAS* 系統) と交配し、*jbug* 遺伝子のノックダウンによる PCP 異常に対する様々な遺伝子のノックダウンと過剰発現の影響を解析した。その結果、非典型的カドヘリン *ds* ノックダウンにより、*jbug* ノックダウンによる PCP 異常が救済された。

3. *Ds/Ft* グループ分子の組織発現分布の解析

上述の遺伝学的解析で同定された *Ds* の背板における組織発現分布を解析した。本解析には *ds-lacZ* 系統 (*ds* 遺伝子のプロモーターの下流で *lacZ* 遺伝子を発現するレポーター系統) を用いた。レポータ活性の検出には抗β-galactosidase 抗体を用いた蛍光免疫染色法を用い、全ての蛍光画像は Zeiss LSM780 共焦点レーザー顕微鏡により撮影した。また、他の *Ds/Ft* グループ遺伝子である *ff* ならびに、*Ds/Ft* グループの下流で機能する Hippo シグナル経路の転写標的遺伝子 *expanded (ex)* の組織発現分布の解析には、*ff-lacZ* 系統と *ex-lacZ* 系統を用いた。その結果、コントロールの背板と比較して、*jbug* 遺伝子をノックダウンした背板において *ds* 遺伝子発現の局所の上昇が認められた (図 3)。 *ff* 遺伝子および *ex* 遺伝子の発現レベルの顕著な上昇は認められなかった (図 3)。

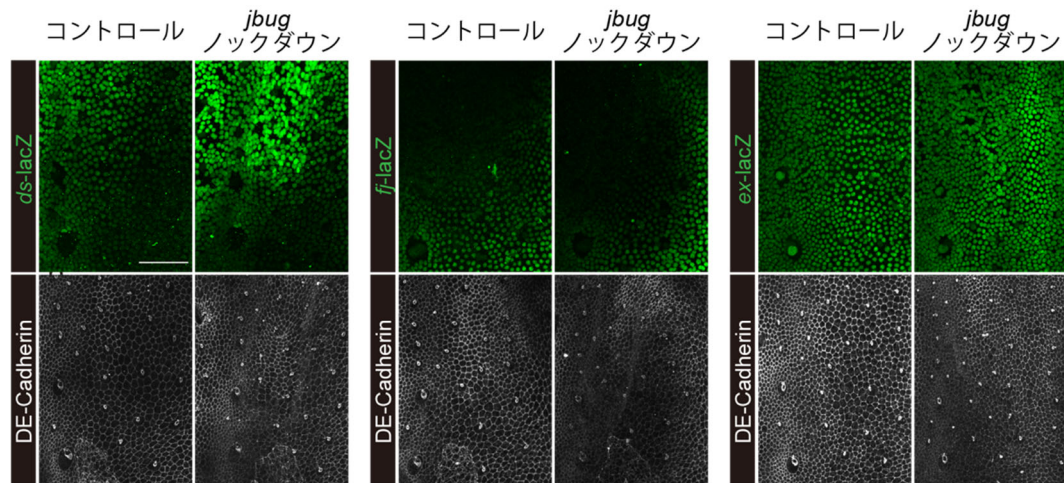


図3. *jbug* ノックダウンによる *ds* 発現レベルの上昇

緑：レポーター遺伝子の発現を抗 β -galactosidase 抗体で検出した。白：抗 DE-cadherin 抗体による免疫染色。

全てのサンプルで背板の同一領域を撮影した。上：ショウジョウバエ蛹前方、下：蛹後方。

スケールバー：50 μ m。

考 察

これまでの研究から、PCP を司る主要構成分子はコアグループと Ds/Ft グループの二つに大別されているが、最近我々はこれらの二つのグループとは異なる機能を有する“第3の PCP 制御グループ (Jbug グループ)”を見出している。本研究において、実際のショウジョウバエ背板の表現型データに基づく、数理モデルを用いた解析から、筋肉による牽引 (外力) が Jbug グループの機能低下による PCP 異常の主たる原因であることが示唆された。外力が毛の向きを摂動する機構は不明であるが、本研究の結果から、この謎を鍵として Ds の発現レベルの変化が示唆された。Ds は力学的作用を介した様々な生命現象に関与することが報告されており、外力を介した PCP 摂動機構を考える上で大変興味深い。今後、本研究で得られた成果を基に、さらなる解析を進めることで、組織の頑強性を司る分子機構やその低下によって引き起こされる PCP 関連疾患の発症機序の理解が深化すると考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、秋田大学大学院医学系研究科の鮎川友紀博士および北海道大学電子科学研究所の秋山正和博士である。本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Uemura T, Shimada Y. Breaking cellular symmetry along planar axes in Drosophila and vertebrates. *J Biochem.* 2003 Nov;134(5):625-30. Review. PubMed PMID: 14688226.
- 2) Butler MT, Wallingford JB. Planar cell polarity in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Jun;18(6):375-388. doi: 10.1038/nrm.2017.11. Epub 2017 Mar 15. Review. PubMed PMID: 28293032; PubMed Central PMCID: PMC5826606.

- 3) Amonlirdviman K, Khare NA, Tree DR, Chen WS, Axelrod JD, Tomlin CJ. Mathematical modeling of planar cell polarity to understand domineering nonautonomy. *Science*. 2005 Jan 21;307(5708):423-6. PubMed PMID: 15662015.
- 4) Aigouy B, Farhadifar R, Staple DB, Sagner A, Röper JC, Jülicher F, Eaton S. Cell flow reorients the axis of planar polarity in the wing epithelium of *Drosophila*. *Cell*. 2010 Sep 3;142(5):773-86. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.042. PubMed PMID: 20813263.
- 5) 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 Rep*. 2014 Jul 24;8(2):610-21. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.009. Epub 2014 Jul 3. PubMed PMID: 24998533.
- 6) Mummery-Widmer JL, Yamazaki M, Stoeger T, Novatchkova M, Bhalerao S, Chen D, Dietzl G, Dickson BJ, Knoblich JA. Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature*. 2009 Apr 23;458(7241):987-92. doi:10.1038/nature07936. Epub 2009 Apr 12. PubMed PMID: 19363474; PubMed Central PMCID: PMC2988197.
- 7) Olguín P, Glavic A, Mlodzik M. Intertissue mechanical stress affects Frizzled-mediated planar cell polarity in the *Drosophila notum* epidermis. *Curr Biol*. 2011 Feb 8;21(3):236-42. doi: 10.1016/j.cub.2011.01.001. Epub 2011 Jan 27. PubMed PMID: 21276726; PubMed Central PMCID: PMC3057393.