

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0086

研究課題名(和文)上皮細胞の極性形成機構

研究課題名(英文)Mechanism of apical-basal polarity formation in epithelial cells

研究代表者

米村 重信 (YONEMURA, Shigenobu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：60192811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体の内側と外側を仕切るシートを作る上皮細胞には外側、内側の区別(極性)があることが重要だが、極性の形成、維持の機構は十分に理解されていなかった。この研究では外側、内側の形成に重要なタンパクの分布を正常時や実験下に定量的に測定し、モデル作成の基礎を作った。細胞間の接着、細胞外基質との接着の役割などを加味したモデルを作成中である。一方、上皮極性に関わる因子を網羅的に探索するために、効果的なゲノムワイドRNAiスクリーニングの方法を開発した。その結果、既知の因子を含め、新しい因子を見出すことができ、解析を進行している。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cell sheets form compartments that discriminate outer and inner environments and the apical-basal polarity of the epithelial cell is essential for the function. The mechanism of the formation and maintenance of the polarity, however, has not been fully understood. We made a basis for constructing a model that explains how the polarity is formed by quantitative measurements of protein amount along the cell cortex under normal or experimental conditions. Models containing the role of cell-cell and cell-substrate adhesions are under consideration. We also tried to identify important genes for polarity formation from genom-wide screening. After development of effective methods for measurement and analysis, we performed RNAi screening using more than 15,000 human genes. The results contained not only genes already reported but also new genes which involvement appears to be intriguing.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮細胞 上皮極性 細胞間接着 定量生物学 細胞外基質 網羅的スクリーニング RNAi

### 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞はシートを作り、生体の内側(生物的環境)と外側(外部環境)とを分ける区画を作る。そして、内側の生物的環境を守る、すなわち生体の恒常性の維持という必須の機能のために、上皮細胞は極性を持っている。外側に面している細胞膜はアピカル面、内側に面している細胞膜はバソラテラル面として、構成するタンパク質の種類、機能も異なる(図1)。

上皮シートの機能のためには細胞が細胞間接着装置

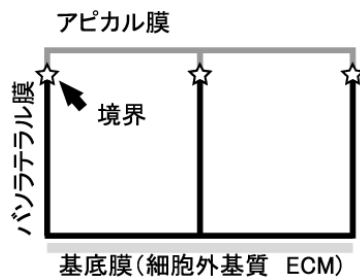


図1 ECM 上の上皮シートの極性

置に

よりシールされていないが、この装置が形成されるのは、ちょうどアピカル/バソラテラル境界である。また生体内では上皮シートは例外なく細胞外基質(ECM)シート上に乗っており、必ずECMの反対側がアピカル面である。このようなことから、細胞間接着装置の形成と偏在したECMからの位置情報が上皮極性形成に必須であると信じられてきたが、いくつかの報告と応募者らの実験により、細胞間接着装置の形成は上皮極性形成には必要ではないこと、ECMの偏在も上皮極性の形成には必須ではないということが明らかになってきた

(図2)。

これまで、上皮細胞極性は、線虫卵における極性のように、相対する極の性質を作る因子群が相互抑制をす

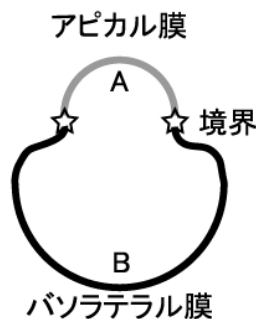


図2 単独上皮細胞の極性

るといふ実験事実から全体像が想像されていた。しかし、極性因子の濃度などの定量的なデータから数理的に上皮極性を理解したり、細胞間接着、細胞外基質との接着の役割などを説明できるモデルはなかった。その原因の一つは、上皮細胞は、例えば卵細胞の極性形成には重要とされる因子を抑制してもなかなか異常が現れないことである。これに対し、応募者は遺伝子の欠失により細胞間接着ができない上皮細胞はそのような因子の抑制に鋭敏に反応して極性の変化を示すことを見だし、そのような特徴的な細胞系を使用することで、上皮極性の本質を知る突破口とするというこれまでにない着想を得た。

### 2. 研究の目的

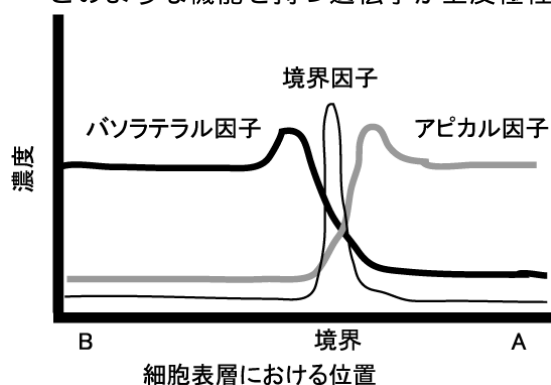
本研究課題では、一つの上皮細胞が自律的に極性を作りうるとみなすのが妥当という考えに立脚して、それがどのような機構で作られるのか、そして細胞間の接着や細胞外基質との接着の意義は何であるのかなどについて、実験計測、単一細胞から上皮シートに至る各段階を踏んだ数理モデルの積み上げ、さらに網羅的なRNAi実験による検証というアプローチにより明らかにしていくことを目的とする。

### 3. 研究の方法

上皮極性形成にそれぞれ重要であることが報告されているアピカル局在因子として aPKC、バソラテラル局在因子として Scrib、境界局在因子として Par3 について浮遊培養をした R2/7 細胞に蛍光抗体法を行い、共焦点顕微鏡により三次元情報を得て、それぞれ濃度分布を得る(図3)。極性に摂動を与えた場合も含んだ計測値を参照し、数理的に上皮極性を理解するために(1)始原的な極性機構の

反応拡散モデル、(2) アピカルとバソラテラルの境界面における膜上の構造を考慮した反応拡散-コンパートメントモデル、(3) 基底膜と細胞間接着を考慮した多細胞上皮極性モデルという段階を踏んで数理モデルを構築する。

また、ゲノムワイドの siRNA ライブラリーを用いた遺伝子抑制スクリーニングを行い、どのような機能を持つ遺伝子が上皮極性形



**図3 極性関連因子の濃度分布と境界（細胞間接着装置）因子との関係の概念図**

成、維持に関わるのかを明らかにするとともに、数理モデルの検証実験とする。

#### 4. 研究成果

(1) R2/7 細胞のアピカル、バソラテラル局在因子、並びに境界に局在する因子(それぞれ、aPKC, Scrib, Par3 など)の定量解析の結果は、それまでの観察から概念として持っていた濃度分布とほぼ一致しており、単純に、両極の濃度が高いのではなく、境界近くの濃度が高いという特徴を持っていた。これは境界部分に越え難いフェンスのようなものがある、また極性因子は表層上にトラップされていると考えさせる。

(2) この境界はアクチン細胞骨格に支えられており、アクチン重合阻害剤の投与でリング状の境界は壊れた。その際、それぞれの因子が独立して消失するのではなく、複合体を作

るように断片化していった。これはアピカル、境界、バソラテラルがごく近接して形成される可能性を考えさせる。また、ミオシンによる収縮力も境界の位置や幅に関係し、力が緩むと境界も幅広くなり、力が増すとリングは収縮し小さくなった。さらに、ミオシンのライブイメージングでは、この境界を可視化することができるが、この境界がダイナミックに動いていることがわかった。周期的に往復運動(数分で1往復)あるいは上から見て回転運動をしているものが数割以上の細胞に見られた。この周期的な動きそのものが上皮極性の形成に関わるのかという点については、動かないものでも極性はあるので、必須なものではないことは明らかだが、極性の可塑性のようなものと密接な関係がある可能性はある。この動きはミオシンの活性に依存していた。また、浸透圧の変化により膜に張力を与えるとこの動きは阻害された。

これらのデータを踏まえて、数理モデルの構築を始めている。

(3) 極性因子の網羅的スクリーニングについては、ゲノムワイドの RNAi スクリーニングを考えていた。細胞は R2/7 で、蛍光抗体法によって ZO-1 を可視化する。それが作るリングが小さくなればアピカルがバソラテラルに比べて相対的に弱くなったことを意味し、リングが大きくなれば相対的に強くなったことを意味すると解釈し、それを 384 プレートから得られる大量の画像から解析することを試みた。多量の細胞についてこのような染色された構造の形状情報を基に画像解析をすることは実際にほとんど行われてこなかったということがわかり、RNAi によるスクリーニングに関する共同研究者であ

る東京大学薬学部の名黒准教授と様々な方法を試みて、リングが小さくなる場合、リングが大きくなる場合について、それぞれ既知の遺伝子を用いた場合、それが十分に検出されることを基準にして、画像解析アルゴリズムを検討し、スクリーニング系の妥当性を評価し、効果的なものを得た。さらに自動分注装置、自動洗浄装置を使った場合の画像の質の妥当性も確認した。

このように通常のスクリーニングが可能と判断できる、安定した検出力があることを確認した上で、ゲノムワイドの網羅的スクリーニングを行った。384プレート70枚(18,152遺伝子)の解析を行った結果、アピカル関連(ZO-1リング縮小型)候補遺伝子が2090個、バソラテラル関連(ZO-1リング拡大型)候補遺伝子が608個見出された。その全ても個別に解析するのは困難なので、バイオインフォマティクス解析から、関係あるグループなどを検討し、興味が強く持たれるものから、異なる2種類のsiRNAを用いた二次スクリーニングを行いつつある。既知の因子も見出されており、また、ミオシンの活性制御につながるもの、小胞輸送に関係するもの、RNAの安定化に関わるものなど全く新しいカテゴリーの遺伝子も見出されてきている。それらについて検討することで、極性形成、維持の機構の全体像がわかってくることを期待している。

#### 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 26 件)

1) Wen FL, Wang YC, Shibata T. Epithelial Folding Driven by Apical or Basal-Lateral Modulation: Geometric Features, Mechanical Inference, and Boundary Effects. *Biophys J*. 2017 Jun 20;112(12):2683-2695. doi:

10.1016/j.bpj.2017.05.012. 査読有

2) Liu L, Suzuki K, Chun E, Murashima A, Sato Y, Nakagata N, Fujimori T, Yonemura S, He W, Yamada G. Androgen Regulates Dimorphic F-Actin Assemblies in the Genital Organogenesis. *Sex Dev*. 2017;11(4):190-202. doi: 10.1159/000477452. 査読有

3) Takeuchi M, Inoue C, Goshima A, Nagao Y, Shimizu K, Miyamoto H, Shimizu T, Hashimoto H, Yonemura S, Kawahara A, Hirata Y, Yoshida M, Hibi M. Medaka and zebrafish contactin1 mutants as a model for understanding neural circuits for motor coordination. *Genes Cells*. 2017 Aug;22(8):723-741. doi: 10.1111/gtc.12509. 査読有

4) Akiyama T, Inoko A, Kaji Y, Yonemura S, Kakiguchi K, Segawa H, Ishitsuka K, Yoshida M, Numata O, Leproux P, Couderc V, Oshika T, Kano H. SHG-specificity of cellular Rootletin filaments enables naïve imaging with universal conservation. *Sci Rep*. 2017 Jan 6;7:39967. doi: 10.1038/srep39967. 査読有

5) Arata Y, Hiroshima M, Pack CG, Ramanujam R, Motegi F, Nakazato K, Shindo Y, Wiseman PW, Sawa H, Kobayashi TJ, Brandão HB, Shibata T, Sako Y. Cortical Polarity of the RING Protein PAR-2 Is Maintained by Exchange Rate Kinetics at the Cortical-Cytoplasmic Boundary. *Cell Rep*. 2016 Aug 23;16(8):2156-2168. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.047. 査読有

6) Yoshida M, Kajikawa E, Yamamoto D, Kurokawa D, Yonemura S, Kobayashi K, Kiyonari H, Aizawa S. Conserved and Divergent Expression Patterns of Markers of Axial Development in the laboratory opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Dyn*. 2016 Jan; 245:67-86. doi: 10.1002/dvdy.24459. 査読有

7) Otani T, Ogura Y, Misaki K, Maeda T, Kimpara A, Yonemura S, Hayashi S. IKK $\epsilon$  inhibits PKC to promote Fascin-dependent actin bundling. *Development*. 2016 Oct 15;143(20):3806-3816pii: dev.138495. doi 10.1242/dev.138495 査読有

8) Yayama K, Tanaka A, Morosawa H, Furuta T, Takeda N, Kakiguchi K, Yonemura S, Yanagihara I, Tsutsumi Y, Kawai Y. Amorphous nanosilica particles

evoke vascular relaxation through PI3K/Akt/eNOS signaling. *Onodera A, Fundam Clin Pharmacol.* 2016 May 23. 2016 Oct;30(5):419-428. doi: 10.1111/fcp.12206. doi: 10.1111/fcp.12206. 査読有

9) Iwasaki Y, Sugita S, Mandai M, Yonemura S, Onishi A, Ito S, Mochizuki M, Ohno-Matsui K, Takahashi M. Differentiation/Purification Protocol for Retinal Pigment Epithelium from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells as a Research Tool. *PLoS One.* 2016 Jul 6;11(7):e0158282. doi: 10.1371/journal.pone.0158282. 査読有

10) Otowa Y, Moriwaki K, Sano K, Shirakabe M, Yonemura S, Shibuya M, Rossant J, Suda T, Kakeji Y, Hirashima M. *Flt1/VEGFR1* heterozygosity causes transient embryonic edema. *Sci Rep.* 2016 Jun 2;6:27186. doi: 10.1038/srep27186. 査読有

11) Takeuchi M, Karahara I, Kajimura N, Takaoka A, Murata K, Misaki K, Yonemura S, Staehelin LA, Mineyuki Y. *Mol Biol Cell.* 2016 Single microfilaments mediate the early steps of microtubule bundling during preprophase band formation in onion cotyledon epidermal cells 27(11):1809-1820. doi: 10.1091/mbc.E15-12-0820. 査読有

12) Maki K, Han SW, Hirano Y, Yonemura S, Hakoshima T, Adachi T. Mechano-adaptive sensory mechanism of  $\beta$ -catenin under tension. *Sci Rep.* 2016 Apr 25;6:24878. doi: 10.1038/srep24878. 査読有

13) Shibata N, Kashima M, Ishiko T, Nishimura O, Rouhana L, Misaki K, Yonemura S, Saito K, Siomi H, Siomi MC, Agata K. Inheritance of a Nuclear PIWI from Pluripotent Stem Cells by Somatic Descendants Ensures Differentiation by Silencing Transposons in Planarian. *Dev Cell.* 2016 May 9;37(3):226-237. doi: 10.1016/j.devcel.2016.04.009. 査読有

14) Yoshida M, Kajikawa E, Kurokawa D, Noro M, Iwai T, Yonemura S, Kobayashi K, Kiyonari H, Aizawa S. Conserved and divergent expression patterns of markers of axial development in reptilian embryos: Chinese soft-shell turtle and Madagascar ground gecko. *Dev Biol.* 2016 Jul 1;415(1):122-142. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.05.005. 査読有

15) Higashiguchi Y, Katsuta K, Minegishi T,

Yonemura S, Urasaki A, Inagaki N. *Cell Tissue Res.* 2016 Identification of a shootin1 isoform expressed in peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* Oct;366(1):75-87. doi: 10.1007/s00441-016-2415-9. 査読有

16) Ozone C, Suga H, Eiraku M, Kadoshima T, Yonemura S, Takata N, Oiso Y, Tsuji T, Sasai Y. *Nat Commun.* 2016 Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells. *Jan 14;7:10351.* doi: 10.1038/ncomms10351. 査読有

17) Shirai H, Mandai M, Matsushita K, Kuwahara A, Yonemura S, Nakano T, Assawachananont J, Kimura T, Saito K, Terasaki H, Eiraku M, Sasai Y, Takahashi M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. *Jan 5;113(1):E81-90.* doi: 10.1073/pnas.1512590113. 査読有

18) Sato K, Hiraiwa T, Maekawa E, Isomura A, Shibata T, Kuranaga E. Left-right asymmetric cell intercalation drives directional collective cell movement in epithelial morphogenesis. *Nat Commun.* 2015 Dec 10;6:10074. doi: 10.1038/ncomms10074. 査読有

19) Okubo Y, Suzuki J, Kanemaru K, Nakamura N, Shibata T, Iino M. Visualization of Ca<sup>2+</sup>-Filling Mechanisms upon Synaptic Inputs in the Endoplasmic Reticulum of Cerebellar Purkinje Cells. *J Neurosci.* 2015 Dec 2;35(48):15837-46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3487-15. 査読有

20) Sato K, Hiraiwa T, Shibata T. Cell Chirality Induces Collective Cell Migration in Epithelial Sheets. *Phys Rev Lett.* 2015 Oct 30;115(18):188102. doi: 10.1103/PhysRevLett.115.188102. 査読有

21) Shankar P, Nishikawa M, Shibata T. Adaptive Responses Limited by Intrinsic Noise. *PLoS One.* 2015 Aug 25;10(8):e0136095. doi: 10.1371/journal.pone.0136095. 査読有

22) Seirin Lee S, Shibata T. Self-organization and advective transport in the cell polarity formation for asymmetric cell division. *J Theor Biol.* 2015 Oct 7;382:1-14. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.06.032. 査読有

23) Shinohara K, Chen D, Nishida T, Misaki K, Yonemura S, Hamada H. *Dev Cell.* 2015 Absence of Radial Spokes in Mouse Node Cilia Is Required for Rotational Movement but Confers Ultrastructural Instability as a Trade-Off. *Oct 26;35(2):236-246.* doi:

10.1016/j.devcel.2015.10.001. 査読有

24) Takeuchi M, Yamaguchi S, Yonemura S, Kakiguchi K, Sato Y, Higashiyama T, Shimizu T, Hibi M. PLoS Genet. 2015 Type IV Collagen Controls the Axogenesis of Cerebellar Granule Cells by Regulating Basement Membrane Integrity in Zebrafish. Oct 9;11(10):e1005587. doi: 10.1371/journal.pgen.1005587. 査読有

25) Nagai H, Sezaki M, Kakiguchi K, Nakaya Y, Lee HC, Ladher R, Sasanami T, Han JY, Yonemura S, Sheng G. Development. 2015 Cellular analysis of cleavage-stage chick embryos reveals hidden conservation in vertebrate early development. 142: 1279-1286. Doi: 10.1242/dev.118604. 査読有

26) Nakanishi K, Kakiguchi K, Yonemura S, Nakano A, Morishima N. FASEB J. 2015 Transient Ca<sup>2+</sup> depletion from the endoplasmic reticulum is critical for skeletal myoblast differentiation. 29: 2137-49. doi: 10.1096/fj.14-261529. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1) 米村重信 細胞間接着装置と上皮形態形成 第 69 回日本細胞生物学会大会 仙台国際センター 仙台 2017 年 6 月 14 日

2) 米村重信、林華子、上田太郎 カテニンのアクチン結合能の制御 第 2 回 日本メカノバイオロジー学会 京都大学農学部 京都 2017 年 3 月 15 日

3) 米村重信 上皮細胞が丸くなれる仕組み-細胞間接着装置におけるメカノトランスダクション- 平成 28 年度公益社団法人日本顕微鏡学会 北海道支部学術講演会 北海道大学工学部 札幌 2017 年 12 月 10 日

4) Yoshihide Enomoto, Yasuhiro Inoue, Shigenobu Yonemura, Taiji Adachi, Three-dimensional vertex simulation on smooth surface maintenance of growing epithelial tissue based on intercellular mechano-feedback, Biophysical Society 60th Annual Meeting, Los Angeles, California, USA, 2016 年 2 月 27 日-3 月 2 日

5) Shigenobu Yonemura, Force-sensing device in alpha-catenin, "Mechanobiology, from molecules to tissue" ICISE, Quy Nhon, Viet Nam, June 27<sup>th</sup>, 2016.

6) 米村重信、本田尚三 (徳島大) お互い接着

しない上皮細胞を使って極性形成機構を探求する 第 68 回日本細胞生物学会大会 京都テルサ 京都 (2016 年 6 月 17 日)

7) 米村重信 上皮形態形成における ECM に対する感受性の細胞種による違い 第 67 回日本細胞生物学会大会 タワーホール船堀 東京 (2015 年 7 月 1 日)

8) 榎本祥英, 井上康博, 米村重信, 安達泰治, 成長する上皮組織に平滑形状をもたらす細胞間相互作用の数理モデリング、日本機械学会関西支部第 90 期定時総会講演会、京都、2015 年 3 月 16 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
米村 重信 (YONEMURA, Shigenobu) 徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号 : 60192811

(2) 研究分担者  
柴田 達夫 (SHIBATA, Tatsuo) 国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー

研究者番号 : 10359888