

令和元年6月10日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14729

研究課題名(和文)ヒドラにおける上皮細胞接着シグナルの解析

研究課題名(英文)Elucidation of functions of cell adhesion molecules using hydra

研究代表者

池ノ内 順一 (Ikenouchi, Junichi)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：10500051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒドラは外胚葉性上皮細胞、内胚葉性上皮細胞とその中間に細胞外マトリックスをもつ動物で、間葉組織を持たない。一方で、ヒドラの上皮細胞は発達した細胞間接着装置を有し、ゲノム上にはヒトと相同な細胞接着分子群の遺伝子セットが存在する。本研究提案では、ヒドラが細胞接着分子の解析に有用な実験モデル生物になるか否かを検証するため、細胞接着分子に蛍光タンパク質を付加したキメラ遺伝子を発現するトランスジェニックヒドラの作出を試みた。また全身にGCaMPを発現するトランスジェニックヒドラを用いて、上皮細胞間のシグナル伝播の様子を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮細胞の細胞接着分子の機能解析はこれまで培養細胞を用いた研究により進められてきた。しかし培養細胞はその樹立過程で増殖や分化などの精緻な制御機構を失っており、機械的な細胞接着機能や形態の観察以外の解析には適さない。ヒドラは刺胞動物に属する原始的な多細胞動物である。ヒドラは外胚葉性上皮細胞、内胚葉性上皮細胞とその中間に細胞外マトリックスをもつ動物で、間葉組織を持たない。一方で、ヒドラの上皮細胞は発達した細胞間接着装置を有し、ゲノム上にはヒトと相同な細胞接着分子群の遺伝子セットが存在する。本研究提案では、飼育や維持が簡便なヒドラが上皮細胞の接着分子の機能解析に適したモデル生物か否かの検証を行った。

研究成果の概要(英文)：Hydra is a multi-cellular organisms with ectodermal epithelial cells, endodermal epithelial cells and an extracellular matrix between them. These epithelial cells have a well-developed intercellular adhesion apparatus. There is a gene set of cell adhesion molecule groups homologous to human on the hydra genome. In this research proposal, in order to test whether hydra is an experimental model organism useful for the analysis of functions of cell adhesion molecules, we generated transgenic hydras that express a chimeric gene in which a fluorescent protein is fused to cell adhesion molecules. We also observed signal propagation between epithelial cells using transgenic hydra expressing GCaMP throughout the body.

研究分野：細胞生物学

キーワード：多細胞生物 上皮細胞 細胞間接着装置 Hydra

## 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、多細胞生物の体表や器官の表面で細胞のシートを形成する。細胞同士は、細胞接着装置のタイトジャンクション(以下、TJ)を介して密に接着することにより、体外からの異物の侵入を防ぎ、体内からのイオンや水の漏出を防ぐ。一方で、上皮細胞は体外に存在する糖やアミノ酸などの有用な物質を能動的に取り込み、生命活動の維持に必須の役割を果たす。細胞が機械的に接着する上で重要な細胞接着装置として、カドヘリンを介した細胞接着構造(アドヘレンスジャンクション、デスモゾーム)が挙げられる。このような細胞接着構造の研究において、これまで多くの研究が培養細胞を用いて進められてきた。TJを構成する主要な膜タンパク質として4回膜貫通タンパク質のクローディン、AJを構成する主要な膜タンパク質として、1回膜貫通タンパク質のカドヘリンが同定され、それぞれが細胞接着活性を有することが示された。

申請者はこれまで培養細胞を用いて、細胞接着部位に集積する遺伝子の探索を行ってきた。具体的には、これまで私たちの研究グループでは、上皮間葉転換現象に着目して上皮細胞に特異的な発現する細胞接着分子の研究を進めてきた。上皮間葉転換のマスター転写因子であるSnailを培養上皮細胞に発現させると細胞接着を喪失した間葉細胞に転換する。上皮細胞が間葉細胞に転換する際に遺伝子発現量が顕著に低下する遺伝子群の中には、クローディンやカドヘリンなどの上皮細胞に必須の細胞接着分子が含まれていた。しかしながら、細胞接着部位に集積を示すものの、培養上皮細胞に於ける遺伝子の過剰発現やCRISPR法によるノックアウトによる解析によって、明確に表現型を示さない遺伝子が多数あり、遺伝子の機能の手がかりを得るようなアッセイの確立の必要性を感じていた。生体内において、上皮細胞は細胞接着装置を介して、隣り合った細胞の情報を受け取り、細胞の分化や増殖を調節している。このような細胞接着を介した情報伝達機構に関わる分子の同定には、*in vivo*における遺伝子破壊個体の表現型の解析が有用であるが、すべての遺伝子に対してノックアウトマウスを作出するのは困難であり、新たなモデル生物の必要性を感じていた。

## 2. 研究の目的

刺胞動物のヒドラにおいて進化的に保存されている上皮細胞の細胞接着分子をコードする遺伝子について、ヒドラのドラフトゲノムの情報をもとに、遺伝子を単離し、それらと蛍光タンパク質の融合タンパク質を安定的に発現するトランスジェニックヒドラの樹立を試みた。また、上皮細胞間のシグナル伝達の可視化が可能かどうかを検証するために、GCaMPを安定発現するトランスジェニックヒドラの作出を試みた。またこれらのトランスジェニックヒドラの樹立に際して、エレクトロポレーション法やリポフェクション法などの手法の検討を行うことで、ヒドラの遺伝子改変体の作出の容易さ、モデル生物としての扱いやすさを評価した。

## 3. 研究の方法

ヒドラのドラフトゲノムの情報をもとに、ヒトのタイトジャンクションおよびヒドラのセプテータジャンクションに局在する細胞接着タンパク質クローディンに相同性を示す遺伝子を14種類単離した。クローディン遺伝子は平均700bp程度と比較的小さな遺伝子であり、トランスジェニックヒドラの作出に適した細胞接着分子である。14種類のクローディンのアイソフォームの中で、ヒドラの外胚葉上皮細胞および内胚葉上皮細胞をそれぞれ単離し、どちらかの上皮細胞に偏って発現するクローディンの同定を行った。その結果、外胚葉上皮細胞にはHydraクローディン1が、内胚葉上皮細胞には、Hydraクローディン11が特異的に発現することを見出した。そこで、それぞれのクローディンに対してGFPを融合させたキメラ遺伝子を発現するベクターをpHyVec1ベクターを基に作成し、トランスジェニックヒドラの作出を試みた。

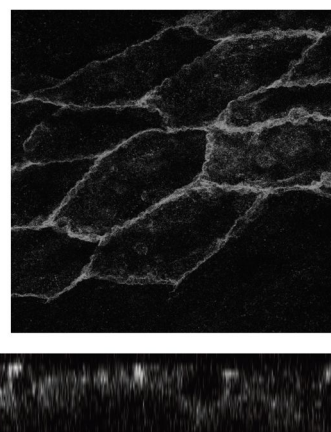
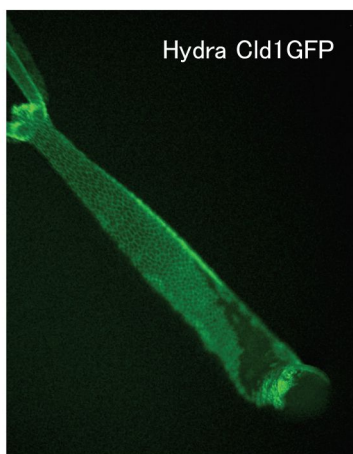
トランスジェニックヒドラの作出を目的として、培養細胞に於いてよく遺伝子導入に用いられるエレクトロポレーション法、リポフェクション法による遺伝子導入を試みた。しかしながら、ほとんど遺伝子導入された細胞は観察されなかった。ヒドラの体表を覆う粘液を除去し、遺伝子導入の効率が上昇するか試みたが、有意に遺伝子導入効率は上昇しなかった。

そこで、福岡女子大学の濱田俊教授に共同研究をお願いし、ヒドラ受精卵へのマイクロインジェクションによる遺伝子導入法をご指導いただき、トランスジェニックヒドラの作出を試みた。その結果、Hydraクローディン1-GFPの発現ベクターを200個の受精卵に対して遺伝子導入した結果、2個体のGFP陽性のトランスジェニックヒドラが得られた。しかしながら、これらの個体は非常に生存が弱く、ポリプによる無性生殖をおこなわなかったため、個体数を増やすことが困難であった。

次に、上皮細胞間のシグナル伝達の様子を観察するモデル生物としての有用性を検証するために、GCaMPを発現するヒドラ個体の作出を試みた。200個の受精卵に対してマイクロインジェクションを行った結果、5個体のトランスジェニック個体を得られて、その中で全身に一樣に発現する個体が1個体得られた。この個体を用いて機械刺激に応答して上皮細胞間を伝播する一過性細胞内カルシウムイオンの上昇を検討した。

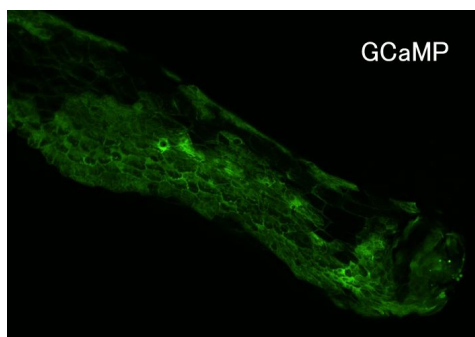
#### 4. 研究成果

Hydra クローディン-1-GFP を安定発現するトランスジェニックヒドラ個体の作出を試みた結果、右図に示すような個体を得ることができた。GFP に由来する蛍光は、外胚葉上皮細胞の細胞間接着部位に集積していた。また、X-Z 軸方向の観察からクローディン-1 は、細胞接着装置セプテートジャンクションに濃縮していることが確認できた。



しかしながら、トランスジェニックヒドラの作出効率は非常に低く、また原因は不明であるが、トランスジェニックヒドラのポリプによる増殖の頻度が著しく低かった。このためトランスジェニックヒドラを作出し、細胞接着分子の局在の解析などを行うことは可能であるが、その樹立の効率の低さやその後の個体増殖率の低下を考慮すると、遺伝子改変技術を駆使した実験や遺伝学の実験においてヒドラをモデル生物として使用するのには容易ではないと結論した。

また GCaMP を発現するトランスジェニックヒドラを得ることができた(右図)。先端が針状の棒でヒドラ個体に触れることにより局所的な機械的な刺激を与えると、Ca シグナルが上皮細胞シートを伝播し、やがてヒドラ個体が収縮する様子が観察された。このように、上皮細胞間のシグナル伝達を可視化することでモデル生物としてヒドラが有用であることが実証できた。



上述の通り、今後、トランスジェニックヒドラの効率的な作出法や遺伝子導入後にヒドラの増殖率の低下する原因が明らかになり、さらに CRISPR-Cas9 などの実験手法も適応可能になると、飼育が簡便でかつライブイメージングが容易である利点と組み合わせることによって、ヒドラのモデル生物としての有用性が一層高まると結論した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Roles of membrane lipids in the organization of epithelial cells: Old and new problems. Ikenouchi J.

Tissue Barriers. 2018;6(2):1-8.

doi: 10.1080/21688370.2018.1502531. 査読有

2. -Catenin Controls the Anisotropy of Force Distribution at Cell-Cell Junctions during Collective Cell Migration.

Matsuzawa K, Himoto T, Mochizuki Y, Ikenouchi J.

Cell Rep. 2018 Jun 19;23(12):3447-3456.

doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.070. 査読有

3. Adherens junctions influence tight junction formation via changes in membrane lipid composition.

Shigetomi K, Ono Y, Inai T, Ikenouchi J.

J Cell Biol. 2018 Jul 2;217(7):2373-2381.

doi: 10.1083/jcb.201711042. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

池ノ内順一

「上皮細胞に存在する細胞膜構造の形成メカニズム」  
2018年9月26日 第91回日本生化学会（京都）

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

九州大学理学部生物学科代謝生理学研究室ホームページ  
<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~taisha/ikelab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。