

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07402

研究課題名(和文) コンパートメント境界において局所的にアクチン細胞骨格を制御する分子メカニズム

研究課題名(英文) The molecular mechanism that locally regulates actin cytoskeleton at compartment boundaries

研究代表者

梅津 大輝 (Umetsu, Daiki)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：60620474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの体内の組織は秩序正しく区画化されている。それらの区画間の境界は組織のパターン形成の起点となり、発生に重要な働きを持つ。その境界を維持する仕組みについてはこれまで長い論争が続いていた。本研究では、免疫細胞において病原体の認識に働くToll遺伝子群の一つであるToll-1がショウジョウバエ上皮組織の隣接する区画間で発現量が大きく異なることを発見した。培養細胞と生体組織を用いた解析からToll-1が接着分子として機能すること、また、Toll-1がアクチン細胞骨格とは独立に境界維持に働くことを示し、細胞同士の接着性の違いが上皮組織の境界を維持することを示す初めての報告となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で示した接着分子の発現量の違いによる組織境界の維持メカニズムは1964年にSteinberg博士が提唱した接着差仮説を支持するもので、この仮説が上皮組織で示された初めての例であるという点において学術的価値が高い。Toll遺伝子の哺乳類ホモログはTLR遺伝子群として知られ、免疫細胞による病原体の表面分子の認識に利用されている。それが細胞間の接着分子として生き物の形作りに使われていることを示したことは新規の発見である。今回の研究成果によって、免疫系分子研究の新たな道が切り拓かれた。ショウジョウバエに限らず多くの種や組織で似たような仕組みが働いている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The tissues in our body consist of spatially compartmentalized cells but not just a cell clump. The boundaries between compartments play a pivotal role in animal development by serving as a landmark that is used for tissue patterning. It has long been debated how these boundaries are physically maintained in tissues. In this study, we have found that a Toll receptor family gene Toll-1, whose mammalian homologues are well known for its important role in recognizing surface molecules on pathogens and transducing signals to protect from infections, shows a remarkable differential expression between neighboring compartments in a Drosophila epithelium. By using a cell culture system and cell biological approaches in the live tissue, we showed that Toll-1 acts as an adhesion molecule which maintains the boundaries independent of actin cytoskeleton. These data shows for the first time that the differential adhesion system works in maintaining compartment boundaries in epithelia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞接着 コンパートメント境界 自己組織化 細胞の選別 細胞間張力 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

異なる機能を持つ細胞を選り分け、組織を区画化することは形態形成で最も重要な過程の一つである。例えば、脊椎動物の脳の発生ではいくつもの区画が生じることが知られている。組織の区画化は脊椎動物からショウジョウバエの発生にまで見られ、多細胞生物のボディプランの確立に共通の戦略として用いられている。ショウジョウバエの翅において細胞系譜を追跡することにより、翅は前部と後部の二つの区画に分かれ、細胞はその境界を跨ぐことができないことが示された。この区画をコンパートメントと呼ぶ。研究代表者はこれまでに、細胞を選り分けるための物理的及び細胞生物学的なメカニズムの解明をめざし、ショウジョウバエの成虫原基及び腹部上皮に存在する前部/後部コンパートメント境界 (A/P 境界) をモデルに用いて研究を進めてきた。成虫翅は幼虫体内にある翅原基と呼ばれる上皮組織から発生する。翅原基は胚発生の初期に数十個の細胞から形成され、始めから A/P コンパートメントに区画化されている。A コンパートメント細胞 (A 細胞) と P コンパートメント細胞 (P 細胞) の選り分けは接着性の違いによって起こるという考えが広く受け入れられている。一方で、細胞間の接着面にかかる張力が細胞の選り分けに重要な働きをするという考えが提唱されている。

P コンパートメントではセクター遺伝子である *engrailed(en)* が、A コンパートメントでは Hedgehog シグナルの活性化が、それぞれ A/P 境界の維持に必要であることが示されている。これらの因子の役割は転写を介して細胞運命を決定することであり、力を生み出す実行因子の働きを上流で制御していると考えられる。細胞を選り分けるというメカニズムを本質的に理解するためには、実際に細胞に力を与える実行因子を同定し、それらの機能を解明することが必須である。アクチン繊維とミオシンを主要素とするアクチン細胞骨格の蓄積が、A 細胞と P 細胞の接触部位に限局していることから、異系譜細胞間の物理的な接触が重要であることが示唆される。本研究では、A/P 境界における細胞同士の認識メカニズムを分子レベルで理解することをめざす。ショウジョウバエの初期胚の上皮細胞においてもアクチン細胞骨格構成因子が平面内局在を示すことが知られている。この平面局在は細胞のつなぎ変えを駆動し、組織全体の収縮伸張を引き起こす原動力となっている。近年、ショウジョウバエ初期胚で見られるアクチン細胞骨格の細胞内平面極性が、脊椎動物からショウジョウバエまで広く保存されている Toll 遺伝子群によって制御されていることが明らかになった。そこで、本研究では A/P 境界で見られるアクチン細胞骨格の細胞内平面極性と Toll 遺伝子群の働きを解析し、境界維持の分子メカニズムの解明に迫る。細胞一つ一つの極性を制御するメカニズムを解明することによって、組織全体を構築する原理の根本的理解に迫れるものと考えている。

2. 研究の目的

組織の形成過程において細胞及び分子レベルでどのような仕組みが働いているかを理解することは重要な課題である。本研究ではこの仕組みの理解をめざす。組織を区画ごとに分けることは多細胞生物の発生の共通戦略である。発生過程で見られる区画はコンパートメントと呼ばれ、境界での細胞の混ざり合いを防ぐことによって維持される。細胞間のシグナル伝達、物理的特性、細胞動態などが明らかにされてきている一方で、細胞間の接触面における局所的な分子間の相互作用によって細胞の混ざり合いが抑制されるメカニズムについては未解明である。本研究では、コンパートメント境界の形成への関わりが示唆される Toll 遺伝子群の機能を解析し、分子から細胞、細胞から組織へとつながる一連の過程を理解することで、組織構築の原理の解明を目的とする。

3. 研究の方法

上述の目的を達成するために、以下の3点に注目して研究を遂行した。

(1) Venus ノックイン系統を作製して組織内の発現パターンを解析

研究代表者の先行プロジェクト (課題番号 15K18536) で発生中のショウジョウバエ腹部上皮組織で発現していることが明らかとなった4つの TLR ファミリー遺伝子の発現パターンの解析に取り組んだ。CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術により、これら4遺伝子の黄緑色蛍光タンパク質 (Venus) ノックイン系統を樹立し、組織内における発現パターンを解析した。

(2) 細胞内局在の解析

Toll-1 の Venus ノックイン系統を用いて *in vivo* で細胞内分子局在を解析した。細胞間相互作用の寄与を明らかにするために、ショウジョウバエの遺伝学的手法を活用したモザイク解析を行った。

(3) 遺伝学的操作による分子機能解析

変異体や過剰発現を用いて組織境界維持における Toll-1 の遺伝子機能を解析した。また、厳密に発生のステージングを行い、組織境界における細胞動態を 1 細胞レベルで定量的に解析した。さらに、アクチン細胞骨格系の分子動態に注目し、アクチン細胞骨格系と Toll-1 の機能の相互依存性について詳しく解析した。また、ショウジョウバエ由来の S2 培養細胞を用いて、細胞凝集を指標にして Toll-1 の細胞接着分子としての機能を検証した。

4. 研究成果

(1) Toll-1 遺伝子の発現境界がコンパートメント境界と一致する

Venus 蛍光タンパク質のノックイン系統を用いて、内在性の Toll 遺伝子の発現パターンを解析した。ライブイメージングによって細胞の動態を 1 細胞レベル解析することができるショウジョウバエ腹部上皮組織をモデルに用いた。その結果、腹部上皮に発現する 4 つの TLR ホモログのうち、Toll-1 がコンパートメント境界の維持へ関連することを示唆する結果が得られた。Toll-1 遺伝子が P コンパートメント全体に発現し、A/P コンパートメント境界において、シャープな発現境界を形成し、それはコンパートメント境界と一致していることが示された (図 1)。そこで、Toll-1 遺伝子がコンパートメント境界の維持に重要な役割を果たすと考え、この遺伝子についてさらに解析を進めることにした。

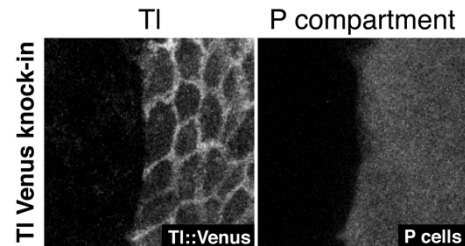


図 1. Toll-1 の発現境界はコンパートメント境界と一致する
コンパートメント境界付近では、Toll-1(TI)の発現は P 細胞に特異的である。

(2) Toll-1 同種親和性の細胞間接着分子として機能する

前述の Toll-1 の Venus ノックイン系統を用いたモザイク解析を行うことによって、Toll-1 タンパク質の細胞膜局在における細胞間相互作用の重要性を検証した。その結果、隣接細胞同士が発現している場合のみ Toll-1 が細胞間結合部に強く集積することが明らかとなった。以上から、Toll-1 の細胞表面への局在は、Toll-1 分子間のトランスの相互作用に依存していることが示された。このことから、Toll-1 が同種親和性の接着分子としての機能を有することが示唆される。そこで、培養細胞を用いてその機能を検証した。Toll-1 を発現する細胞は大きな凝集塊を作ることから、細胞間の接着分子としての機能を保持することが示された。以上から、Toll-1 分子が細胞間接着分子として働くことを示した。

(3) Toll-1 による接着性の制御にはアクチン細胞骨格系は関与しない

上皮組織にモザイク状に誘導した体細胞クローンで異所的に発現させると、体細胞クローンが滑らかな輪郭を持ち、周囲の細胞から分離されるような形態を示した。以上の結果は、Toll-1 が実際の組織において細胞間接着分子として機能していることを示している。また、異所的な発現によって体細胞クローンの輪郭が滑らかになる際に、その輪郭に沿ってアクチン細胞骨格が蓄積していることが示されている。そこで、Toll-1 の過剰発現クローンにおいても同様のメカニズムが働いているかどうかを検証するために、アクチン細胞骨格の蓄積を解析した。すると、予想に反し、Toll-1 の発現境界にはアクチン細胞骨格の蓄積は見られなかった。このことから、Toll-1 は細胞の接着をアクチン細胞骨格とは独立に制御することが示唆された。

(4) Toll-1 はコンパートメント境界の維持に必要である

以上の結果から、Toll-1 が細胞間接着分子として機能し、発現の違いで境界を維持する機構に寄与している可能性が考えられた。これは、1964 年に Steinberg によって提唱された Differential adhesion hypothesis (DAH) を支持するものである。そこで、RNAi と、変異アリのそれぞれを用いて Toll-1 変異体のコンパートメント境界の形状を解析したところ、通常は真っ直ぐなコンパートメント境界が乱れることが明らかになった (図 2)。このことから、Toll-1 が実際に接着分子として働き、組織境界の維持に働いていることが示された。これは、実際の上皮組織において DAH が働いていることを示した初めての報告である。

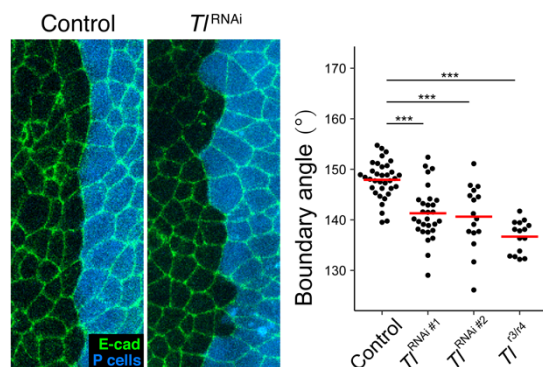


図 2. Toll-1 の変異体ではコンパートメント境界が乱れる
隣接する細胞結合同士のなす角度を測ることで境界の形状を定量した。

(5) Toll-1 の発現は en によって制御されている

P コンパートメントの Toll-1 の発現は、P 細胞を

運命づけるセレクター遺伝子である *en* によって制御されている可能性が考えられた。そこで、*en* の変異クローンを作成して Toll-1 の発現への影響を調べた。その結果、*en* の変異細胞では Toll-1 の発現が著しく低下したことから、Toll-1 の発現が *en* によって制御されていることが示された。先行研究において、*en* が境界の維持に必要であることが示されているが (Dahmann and Basler, *Cell*, 2000)、ミオシンの細胞内局在の制御を介する経路と、介さない経路があることが示されている (Rudolf, et al., *Development*, 2015)。本研究では、ミオシンの制御を介さない *en* の機能として、Toll-1 の発現制御を介した細胞間接着制御のメカニズムが働いていることを示したものであり、これまで不明であった *en* の機能の一端の解明した点において、組織境界の維持メカニズムの解明に大きく寄与することができた。

(6) ショウジョウバエ TLR ホモログは共通して細胞認識機能を保持する

Toll-1 以外の TLR ホモログを過剰発現したモザイククローンを作成した実験を行い、どの場合も Toll-1 と同様、もしくはそれ以上に滑らかな輪郭を持つことが明らかとなった。このことから、腹部上皮に発現する 4 つの TLR 分子が共通して、細胞同士の認識や適合性において重要な働きを持つ可能性が考えられる。これらの分子はお互いに少しずつオーバーラップしながらも、同一組織のそれぞれ異なる領域で発現していることから、領域特異的な細胞間認識機構に働いている可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iijima, N., Sato, K., Kuranaga, E., Umetsu, D.	4. 巻 11
2. 論文標題 Differential cell adhesion implemented by Drosophila Toll corrects local distortions of the anterior-posterior compartment boundary	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-20118-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hoshika, S., Sun, X., Kuranaga, E., and Umetsu, D	4. 巻 147
2. 論文標題 Reduction of endocytic activity accelerates cell elimination during tissue remodeling of the Drosophila epidermal epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.179648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuboi Alice, Ohsawa Shizue, Umetsu Daiki, Sando Yukari, Kuranaga Erina, Igaki Tatsushi, Fujimoto Koichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Competition for Space Is Controlled by Apoptosis-Induced Change of Local Epithelial Topology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2115 ~ 2128.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2018.05.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuboi Alice, Umetsu Daiki, Kuranaga Erina, Fujimoto Koichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Inference of Cell Mechanics in Heterogeneous Epithelial Tissue Based on Multivariate Clone Shape Quantification	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 Article 68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2017.00068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Umetsu Daiki, Kuranaga Erina	4. 巻 45
2. 論文標題 Planar polarized contractile actomyosin networks in dynamic tissue morphogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Opinion in Genetics & Development	6. 最初と最後の頁 90 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2017.03.012	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 梅津 大輝
2. 発表標題 Tissue Replacement during Drosophila Metamorphosis as a Model for Morphomeostatic Control of Cell Birth and Death
3. 学会等名 4th Morphomeostasis Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daiki Umetsu, Norihiro Iijima and Erina Kuranaga
2. 発表標題 Differential expression of Toll-1 maintains sharp compartment boundary in proliferating epithelium
3. 学会等名 26th European Drosophila Research Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daiki Umetsu
2. 発表標題 Mechanisms to maintain mechanical boundaries in the epithelium
3. 学会等名 NanoLSI Open Seminar, Kanazawa University (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daiki Umetsu, Norihiro Iijima, Erina Kuranaga
2. 発表標題 A Drosophila Toll-like receptor family protein prevents cell mixing through homophileic adhesion during epithelial morphogenesis
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSDCB 70th (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daiki Umetsu
2. 発表標題 Homeostatic control of cell dynamics during tissue morphogenesis and remodeling
3. 学会等名 Biologisches Kolloquium, Technische Universität Dresden (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daiki Umetsu
2. 発表標題 First aid of jagged boundaries in the absence of junction Myosin II
3. 学会等名 3rd Morphomeostasis Meeting (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅津大輝、飯島寛大、倉永英里奈
2. 発表標題 自然免疫センサーTLRは上皮組織パターン形成過程で細胞間接着分子として機能する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅津 大輝
2. 発表標題 ハ工から学ぶ「力が生き物の形をつくるしくみ」
3. 学会等名 小型魚類研究会 サテライトシンポジウム 第2回 帰ってきた ムシvs.サカナ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daiki Umetsu
2. 発表標題 Inference of cell mechanics in heterogeneous epithelial tissue based on multivariate clone shape quantification
3. 学会等名 2nd Morphomeostasis Meeting
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daiki Umetsu, Norihiro Iijima and Erina Kuranaga
2. 発表標題 Differential expression of an ancient cell surface recognition molecule guides cell sorting at the anteroposterior compartment boundary in Drosophila
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposium: Tissue Self-Organization: Challenging the Systems
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daiki Umetsu, Alice Tsuboi, Koichi Fujimoto and Erina Kuranaga
2. 発表標題 Inference of cell mechanics in heterogeneous epithelial tissue based on multivariate clone shape quantification
3. 学会等名 4th Asia Pacific Drosophila Research Conference
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Kuranaga Lab Web Page
http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/kuranaga_lab/blog-3/publication.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------