

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17799

研究課題名(和文) アクトミオシンを駆動力とする組織形態制御

研究課題名(英文) Actomyosin-based control of tissue morphology

研究代表者

進藤 麻子(Shindo, Asako)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：60512118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では動物の発生過程で多様な組織形態を作る際に細胞の駆動力として活用される細胞骨格系アクトミオシンの制御機構を探索した。発生生物学分野でモデル動物として広く使用されるアフリカツメガエル胚を用いて、共焦点顕微鏡によるライブイメージングや新たな化合物スクリーニング法など、独自の手法を取り入れて研究を進めた。期間前半は形成中の表皮組織がもつ迅速な創傷修復力に関わるアクトミオシンとその他の細胞骨格の相互作用を明らかにし(Shindo et al., 2018)、期間後半は表皮組織の形態を維持するための新たなアクトミオシン制御機構の発見に至った。期間を通して今後の研究の発展につながる成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常な胚発生過程で細胞の形態変化や移動を駆動することが知られていたアクトミオシンの機能を、胚表皮の創傷修復過程といういわば「異常状態」を解析したことにより、アクトミオシンが多様な組織や現象に適応し利用されるメカニズムの一端を明らかにした。胚表皮の創傷修復を制御する分子を探索したことにより、なぜ胚は成体と異なり創傷を早く治すことができるのかという根源的な疑問に答えるためのヒントが得られ、胚の創傷修復研究を推進した。

研究成果の概要(英文)：Actomyosin is one of the conserved driving forces of tissue morphogenesis during animal development, and its regulatory molecules are significant to understand the processes of morphogenesis. In this study, we used *Xenopus laevis* embryo as a model system and found that the cytoskeletal interactions assist actomyosin contractility in facilitating wound closure in the developing epidermis (Shindo et al., 2018). To identify the regulatory molecules of actomyosin contractility, we established chemical screening using *Xenopus* embryos. By investigating one of the candidate molecules we detected from the screening, we found the molecular mechanism required for balancing the actomyosin contractility to maintain normal cell shape in the epidermis. Our findings illuminate molecular mechanisms for fine-tuning of actomyosin contractility both in dynamic and stable cell behaviors during morphogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：アクトミオシン 創傷修復 細胞運動 組織形態 アフリカツメガエル 胚

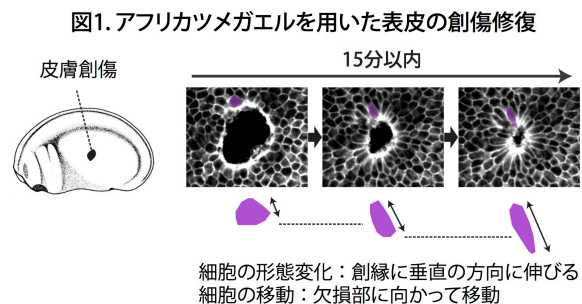
## 1. 研究開始当初の背景

組織や器官の形態は、それらを構成する細胞の形態変化や細胞集団の移動によって形成、維持される。発生過程における細胞集団の動態は各細胞内の細胞骨格の局在や活性に依存し、特に、細胞膜直下で収縮力を発生させる細胞骨格アクチオシン(アクチン線維とII型ミオシンの複合体)は、細胞の移動や形態変化の駆動力の一つであることが知られている。

本研究の開始当初、正常な組織の形態形成過程におけるアクチオシンの制御機構はよく研究されていた。しかし、創傷修復過程といった正常な発生過程では必ずしも必要としないが生命を守るためには必須の現象において、アクチオシンがどのようにふるまうのかについては不明な点が多かった。つまり、同じアクチオシン系が異なる現象や組織でどう制御されるのか、その仕組みについてはさらなる研究が必要であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、アフリカツメガエル胚をモデルとしてアクチオシンにより駆動される胚表皮の創傷修復過程に着目し、創傷修復過程特有の迅速な細胞動態に必要なアクチオシンの制御機序の解明を目指した(図1)。胚表皮の創傷修復では、傷口(創縁)に蓄積するアクチオシンが収縮力を発生し、創傷周囲の細胞を創傷方向に移動させることにより傷を閉鎖することが知られている(図2)。創傷を修復するアクチオシンの収縮活性は、正常な形態形成と比較して短時間で生じ、その活性は創傷が閉鎖されるまで強力に維持される。この迅速かつ持続的なアクチオシンの収縮活性を制御するメカニズムを探索するため、(1)創傷修復過程をライブイメージングで撮影し、関わる細胞骨格の動態を明らかにすること、(2)細胞骨格を制御する上位のシグナルの探索・同定を目的とし、研究を開始した。

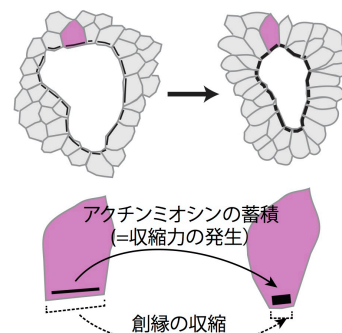


## 3. 研究の方法

アフリカツメガエルの胚表皮の創傷修復過程において、細胞骨格の動態とそれを制御する分子メカニズムを探索するため、アクチオシンを標的とする阻害剤の投与や表皮のみを標的とする遺伝子発現阻害を行った。アクチオシンの阻害を行なったのちに創傷を作成し、創傷の閉鎖過程にどのような違いがあるかを正常胚と比較した。正常胚とアクチオシン阻害胚の創傷閉鎖過程の比較には、実体顕微鏡による創傷の大きさの測定、共焦点顕微鏡による細胞形態の定量化により行なった。

また、胚の表皮でアクチオシンの収縮活性を制御する未知の分子群を検出するため、胚を用いた化合物スクリーニングの実験系を立ち上げた。標的が既にわかっている化合物のライブラリーを使用することにより、アクチオシンの収縮活性を変化させる分子群の同定を行った。

図2. 創傷閉鎖におけるアクチオシンの役割

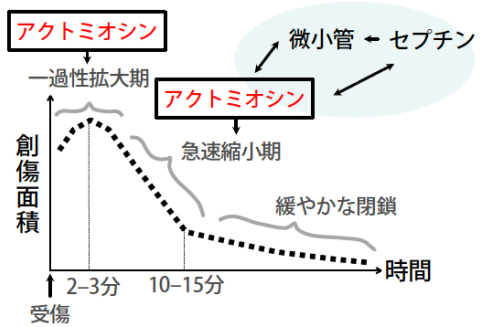


## 4. 研究成果

### 4-1. 胚表皮の創傷修復においてアクトミオシンの活性は、創傷閉鎖の開始のタイミング、収縮速度を決定する。

胚表皮の創傷は受傷後約2分間で一過性の拡大を示し、その後約10分から15分で急速な縮小を示す(図3)。アクトミオシンの収縮活性を強める化合物を投与したところ、拡大期が消失し、急速縮小期の開始時期が早まった(図3, 左のアクトミオシン)。アクトミオシンの収縮活性を弱める化合物を投与したところ、急速縮小期が延長し、創傷修復の遅延が見られた(図3, 中央のアクトミオシン)。これらの結果から、アクトミオシンの収縮活性は創傷の閉鎖を開始するタイミングと、創傷面積の縮小速度を決定することがわかった。また、急速縮小期でみられるアクトミオシンの収縮は持続的であり、正常組織の形態形成で通常見られる振動(オシレーション)を伴う活性とは異なることもわかった(Shindo et al., *Developmental Biology*, 2019)。

図3. 創傷面積の変化と細胞骨格の相互作用

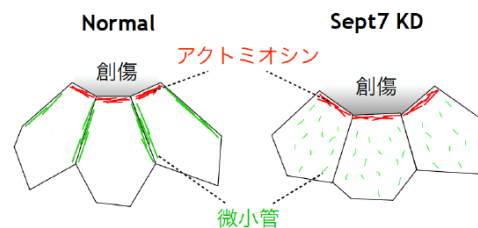


### 4-2. 迅速な創傷修復には複数の細胞骨格の機能的な相互作用が必要である。

アクトミオシンやその他の細胞骨格を標的とする複数の阻害剤を胚に投与し、創傷修復過程を実体顕微鏡と共焦点顕微鏡を用いて高時間分解能で撮影し、解析した。その結果、創傷閉鎖にはアクトミオシンによる創縁の収縮に加え、微小管の再配置による細胞伸長が必須であることがわかった。

受傷後3分より微小管動態を観察したところ、創傷の中心に向かって伸長する細胞の細胞膜直下に微小管束が形成されることを見出した。また、阻害剤による検証の結果、微小管は創縁に対し垂直方向に配置する細胞膜の伸長に必要であることがわかった。さらに、微小管の配向を制御するメカニズムとして、細胞骨格因子セプチンの機能を見出した(図4)。セプチンを表皮特異的にノックダウンすると、微小管束の形成と配向が乱れ、細胞の伸長が阻害されることがわかった。興味深いことに、セプチンはアクトミオシンの創縁への蓄積には必要なかったが、セプチンが正常に機能しないとアクトミオシンの収縮力が低下することも明らかになった。これらから、胚組織の創傷修復過程において、受傷をきっかけとして複数の細胞骨格因子が機能的に相互作用し、迅速な細胞動態を可能にしていることが示された(図3, 右上)。以上の成果は Shindo et al., *Journal of Cell Science* (2018)にまとめ、報告した。

図4. Sept7KDによる微小管配向の異常



### 4-3. アクトミオシンの制御分子群を同定するための化合物スクリーニング実験系の確立

胚表皮においてアクトミオシンを制御する未知の分子群を網羅的に検出するため、アフリカツメガエル胚を用いた化合物スクリーニングが可能か条件検討を行なった。まず、多くの実験系で用いられているアクトミオシンの収縮を過剰に活性化する効果を持つ化合物が、アフリカツメガエル表皮に裂傷を起こすことを見出した。この現象を指標として、化合物ライブラリーより約150種の化合物が同様の、または逆の効果を示すかスクリーニングを行なった。表皮の裂傷は実体顕微鏡下での簡便な観察により検出が可能であり、化合物のアクトミオシンに対する効果は裂傷の大きさで定量が可能であった。これにより、化合物の影響を評価する方法を確立し、標的既知の約150種

の化合物のアクチオシンの収縮活性への影響を決定した。評価した化合物の中からアクチオシンの収縮活性を操作する約20種の化合物を同定し、それらのうち複数の化合物が標的としていた受容体をアクチオシンの制御分子の候補とした。

#### 4-4. 胚表皮のアクチオシン収縮活性を制御する新たな分子の発見と機能探索

化合物スクリーニングによりアクチオシンの収縮活性の制御分子候補として見出された受容体に着目し、アフリカツメガエルの胚表皮においてどのような機能を持つか探索した。当受容体の機能を化合物やノックダウンにより阻害し、胚表皮の細胞形態やアクチンとミオシンの細胞内局在、アクチオシンの収縮活性を共焦点顕微鏡により撮影し、解析した。その結果、当受容体は胚表皮においてアクチオシンの収縮活性を弱める機能を持ち、表皮細胞の形態維持に必須であることがわかった。本成果は現在論文としてまとめ、投稿中である。

興味深いことに、上述の検証により得られた当受容体の機能は、これまで報告されている人や成体の動物とは異なり、発生過程特有のものである可能性が高い。今後、当受容体の機能と創傷修復の速度の関係を検証することにより、胚表皮特有の活発な細胞運動や、迅速な創傷閉鎖を可能にする分子機構が解明されることが期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Asako Shindo, Anastasia Audrey, Maki Takagishi, Masahide Takahashi, John Wallingford, and Makoto Kinoshita	4. 巻 131
2. 論文標題 Septin-dependent remodeling of cortical microtubule drives cell reshaping during epithelial wound healing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.212647	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 該当する

1. 著者名 Asako Shindo, Yasuhiro Inoue, Makoto Kinoshita, and John Wallingford	4. 巻 446
2. 論文標題 PCP-dependent transcellular regulation of actomyosin oscillation facilitates convergent extension of vertebrate tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental biology	6. 最初と最後の頁 159-167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 11件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 Spatial and temporal regulations of membrane cytoskeleton during tissue formation in vertebrate embryos
3. 学会等名 16th Membrane Research Forum, Meso-scale membrane compartments, domains, and interaction with the cytoskeleton（招待講演） （国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 Collective cell movements driven by actomyosin contractility
3. 学会等名 17th International Xenopus conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 Frequency and asynchrony of actomyosin oscillation promote PCP-dependent convergent extension
3. 学会等名 77th Annual meeting of Society of Developmental Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 組織形態制御の基盤となる細胞骨格ダイナミクス
3. 学会等名 91回 日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 Collective cell movements driven by actomyosin contractility in vertebrate embryos
3. 学会等名 56th Annual meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 Spatiotemporal control of actomyosin contractility by planar cell polarity pathway during vertebrate convergent extension
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of Japan Society for Developmental Biology 51th and Japan Society of Cell Biology 70th (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 Collective cell movements driven by actomyosin contractility in vertebrate embryos
3. 学会等名 Japan-China Young Women Scientists symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 Collective cell movements driven by actomyosin contractility in vertebrate embryos
3. 学会等名 International Symposium on “Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 Collaborative function of cytoskeletons for rapid cell behaviors during embryonic wound closure
3. 学会等名 The Company of Biologists, Workshop, “Intercellular interactions in context: towards a mechanistic understanding of cells in organs” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 胚表皮形態を維持する細胞骨格動態と制御分子ネットワーク
3. 学会等名 72回 日本細胞生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 Cellular machinery for controlling actomyosin contractility in vivo.
3. 学会等名 58回 日本生物物理学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 進藤 麻子
2. 発表標題 -Adrenergic receptor adjusts actomyosin contractility ensuring homeostasis of the developing epithelium
3. 学会等名 73回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------