

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06255

研究課題名(和文)細胞キラリティが左右非対称な内臓捻転を誘導する力学的機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanical mechanism by which cell chirality induces left-right asymmetric gut tube twisting

研究代表者

稲木 美紀子(Inaki, Mikiko)

大阪大学・理学研究科・講師

研究者番号：10747679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生物は、外形、内臓や脳などに左右非対称な形態や機能を持ち、左右非対称性の形成は生物の正常発生に必須である。申請者は、ショウジョウバエ胚の後腸をモデル系として生体内で細胞キラリティ(細胞の左右非対称性)が内臓器官の左右非対称な形態を誘導する仕組みを研究してきた。これまで、細胞キラリティが、左右非対称な「細胞スライド」と名付けた細胞のキラルな変形により、左右非対称な内臓捻転を引き起こすことを示してきた。本研究では、RNA干渉スクリーニング、ex vivo組織培養、超解像度ライブイメージングにより、細胞キラリティおよび細胞スライドを誘発する力学的機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞キラリティは、近年、様々な脊椎動物由来の培養細胞でも発見され、キラルな動態へのアクチン細胞骨格系の関与が示唆されている。しかし、本研究で明らかにしようとしている、細胞キラリティの形成機構やそれにより誘導される組織変形の機構については、ほとんどわかっていない。本研究において、細胞キラリティが形成され、組織変形を誘導する機構を明らかにすることで、この分野の発展を世界的にリードできる。本研究により、新たな組織変形の機構が明らかになり、臓器の再生などへの応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Many organisms show left-right asymmetrical morphology and functions in their external and internal structures and the formation of left-right asymmetry is essential for the normal development. The applicant has been studying the mechanism by which cell chirality (cellular left-right asymmetry) induces the left-right asymmetric morphology of internal organs in vivo using the *Drosophila* embryonic hindgut as a model system. We have shown that cell chirality causes left-right asymmetrical gut tube twisting through a novel cellular behavior "chiral cell sliding". In this study, RNA interference screening, ex vivo tissue culture, and ultra-resolution live imaging showed the mechanisms that induce cell chirality and sliding.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞キラリティ 左右非対称性 器官形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの生物は、外形、内臓器官や脳などに左右非対称な形態や機能をもつ。その形成機構に関しては、ノード流による胚の左右軸形成など脊椎動物で研究が進んでいる。一方、近年、組織を構成する個々の細胞自身もつ内在的な左右性によって、左右非対称性が形成されることも示されている。細胞の左右性は、細胞キラリティと呼ばれる細胞の形状がその鏡像と重ならない性質として表すことができる。細胞キラリティはショウジョウバエ胚の後腸上皮細胞で初めて発見された後、様々な脊椎動物の組織由来の培養細胞でも見つかリ、細胞キラリティが細胞のもつ普遍的な属性であることが示されつつある。しかしながら、細胞キラリティが形成される機構や、細胞キラリティがどのように生体組織の左右性に変換されるのかについては分かっていない。本研究では、ショウジョウバエ胚の後腸をモデル系として、生体内で細胞キラリティが内臓器官の左右非対称性を形成する仕組みの解明を試みた。ショウジョウバエ胚の後腸は、初め左右対称な構造として形成された後、左ネジ回りに捻転し左右非対称な形態となる。捻転前に、後腸上皮細胞は、細胞の長軸が左に傾いた左右非対称な形態(細胞キラリティ)を示す(Utsunomiya et al., 2019)。それが捻転後には解消されることから、細胞キラリティの後腸捻転への関与が示唆されてきた。申請者は、これまでの研究で、コンピューターシミュレーションおよびライブイメージングを用いて、捻転前の細胞キラリティが細胞スライドと名付けた新規の細胞挙動により、左右非対称な内臓捻転へと変換されることを示した(Inaki et al., 2018)。捻転時に細胞は、相対的な位置を変え、下(胚の後方)に位置する細胞に対して捻転方向にスライドするように動く。しかしながら、細胞キラリティがどのように形成され、細胞スライドに変換されるのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RNA 干渉を用いたスクリーニング、*ex vivo* 組織培養と薬剤処理、超解像度ライブイメージングにより、細胞キラリティの形成機構とそれが細胞スライドを誘発する力学的機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) これまでの研究で、細胞が、捻転時に相対的な位置を変え、捻転方向にスライドするという挙動を示すことが分かった。ライブイメージングにより細胞境界を追跡すると、境界接合点を維持したまま、反時計回りに細胞境界が捻転していた。これらの結果は、細胞スライド時に、細胞が回転運動している可能性を示唆している。このような上皮細胞の動きはこれまで報告されておらず、それが細胞自律的に起こる場合、細胞質の回転により引き起こされている可能性が考えられる。そこで、細胞質に方向性のある回転運動が見られるかを、蛍光ビーズの注入および追跡により検証した。後腸上皮細胞は直径 5 μ m 程で胚の深部にあるためビーズを直接注入することは非常に難しい。そこで、ショウジョウバエにおいて上皮細胞が形成される前の初期胚に、蛍光ビーズを胚の予定後腸領域に注入して培養し、捻転前のステージに達した胚を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。その画像を用いて、細胞の重心に対するビーズの相対的な動きを測定した。

(2) ショウジョウバエ後腸の捻転は、一型ミオシンをコードする遺伝子 *Myosin31DF* の突然変異体で逆位となることから、アクチン細胞骨格系の関与が示唆されてきたが、直接的関与は不明であった。そこで、本研究では薬剤処理によりその寄与を確認した。まず、後腸の *ex vivo* 培養系を確立し、その後、アクチン細胞骨格系の阻害剤で処理して、その効果を調べた。

(3) アクチン細胞骨格系の関与が明らかになったため、RNA 干渉法を用いたスクリーニングにより後腸捻転に寄与する新たなアクチン関連分子を明らかにしようと試みた。ショウジョウバエ胚では RNA 干渉が効きにくいという問題点があるため、ショウジョウバエにおいて左右性を示し、*Myosin31DF* 突然変異体で逆位がみられる成虫精巣に着目し、スクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) 野生型および逆位の突然変異体 *Myosin31DF* に関して、それぞれ 8 個体に蛍光ビーズを注入し、それぞれ 12 および 14 のビーズを追跡した。その結果、野生型では反時計回りが 67% で優勢であったが、逆位の変異体では、時計回りと反時計回りが半数ずつであった。これらの結果から、細胞キラリティと細胞質の回転方向には相関はみられないことがわかった。

(2) 野生型のショウジョウバエ胚を解剖し、後腸と周りの表皮を培養し、後腸が正常に捻転することを確認した(n=10)。次に、アクチン重合阻害剤 Cytochalasin D (20 μ M) および MyosinII の活性阻害剤である Y-27632 (100 μ M) で処理したところ、100% (各 n=10) の試料で捻転が止まること分かった。また、*Myosin31DF* 突然変異体を用いた逆位の捻転に関しても、同様の結果が得られた。このことは、後腸の捻転にアクチンの重合と MyosinII の活性が必須であることを示

している。また、Y-27632 処理に関して細胞スライドおよび後腸の捻転度合いを定量化したところ、どちらも DMSO で処理した対照と比べて有意に減少していた (図 1)。これらの結果は、MyosinII の活性が、後腸捻転を担う細胞スライドに必須であることを示し、細胞スライドが細胞境界の収縮によって起こることを示唆した。

(3) 約 100 系統のアクチン関連分子の RNA 干渉系統に関して、精巣特異的な発現により、左右非対称性が異常となるかを指標にスクリーニングを行なった。その結果、独立な 2 系統に関して逆位が有意に認められた。また、その 2 遺伝子に関して複数の RNA 干渉系統で表現型を確認した。左右非対称性形成への関与が強く示唆された。

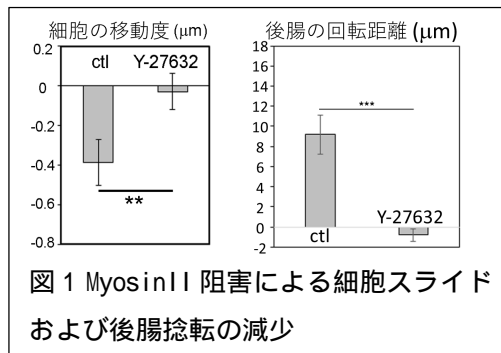


図 1 MyosinII 阻害による細胞スライドおよび後腸捻転の減少

<引用文献>

Utsunomiya S, Sakamura S, Sasamura T, Ishibashi T, Maeda C, Inaki M*, Matsuno K*. Symmetry 11: 505 (2019)
 Inaki M, Hatori R, Nakazawa N, Okumura R, Ishibashi T, Kikuta J, Ishii M, Matsuno K*, Honda H*. eLife 7: e32506 (2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 4件）

1. 著者名 Utsunomiya Sosuke, Sakamura So, Sasamura Takeshi, Ishibashi Tomoki, Maeda Chinami, Inaki Mikiko, Matsuno Kenji	4. 巻 11
2. 論文標題 Cells with Broken Left-Right Symmetry: Roles of Intrinsic Cell Chirality in Left-Right Asymmetric Epithelial Morphogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Symmetry	6. 最初と最後の頁 505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/sym11040505	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 Inaki M, Hatori R, Nakazawa N, Okumura R, Ishibashi T, Kikuta J, Ishii M, Matsuno K, Honda H	4. 巻 7
2. 論文標題 Chiral cell sliding drives left-right asymmetric organ twisting.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e32506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.32506	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 Inaki M, Sasamura T, Matsuno K	4. 巻 6
2. 論文標題 Cell chirality drives left-right asymmetric morphogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 Article 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2018.00034	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 Ishibashi T, Inaki M, Matsuno K	4. 巻 12
2. 論文標題 Statistical Validation Verifies That Enantiomorphic States of Chiral Cells Are Determinant Dictating the Left- or Right-Handed Direction of the Hindgut Rotation in Drosophila	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Symmetry	6. 最初と最後の頁 1991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/sym12121991	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mikiko Inaki, Taishi Takigawa, Akino Okubo, Takamichi Sushida, Masakazu Akiyama, Yasuhiro Inoue, Kenji Matsuno
2. 発表標題 Three-dimensional simulation of epithelial tube revealed distinctive chiral cellular behaviors that may account for the directional tissue rotation
3. 学会等名 第42回 分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inaki M, Honda H, Matsuno K
2. 発表標題 Chiral cell sliding drives left-right asymmetric organ rotation
3. 学会等名 EDBC Alicante 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲木美紀子、瀧川大志、大久保明野、須志田隆道、秋山正和、井上康博、松野健治
2. 発表標題 消化管の左右非対称な捻転を引き起こす上皮細胞の3次元形態変化
3. 学会等名 第19回日本タンパク質科学学会年会、第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inaki M, Takigawa T, Okubo A, Sushida T, Akiyama M, Inoue Y, Matsuno K
2. 発表標題 A novel 3D morphologic change, cell twisting, may drive left-right directional tissue rotation.
3. 学会等名 52nd Annual meeting of the JSDB (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inaki M, Honda H, Matsuno K
2. 発表標題 Chiral cell sliding drives left-right asymmetric organ twisting.
3. 学会等名 8th World Congress of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inaki M, Okubo A, Sushida T, Akiyama M, Inoue Y, Matsuno K
2. 発表標題 A novel 3D morphologic change of epithelial cells, cell twisting, may account for left-right directional tissue rotation.
3. 学会等名 第69回 日本細胞生物学会、第51回 日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲木美紀子、大久保明野、須志田隆道、秋山正和、井上康博、松野健治
2. 発表標題 キラルな細胞変形によって駆動される組織自律的な内臓捻転の機構
3. 学会等名 第41回 分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inaki M, Yukumatsu M, Takigawa T, Okubo A, Sushida T, Akiyama M, Inoue Y, Matsuno K
2. 発表標題 A novel 3D morphologic change of the cell, chiral cell twisting, may drive left-right directional tissue rotational tissue rotation
3. 学会等名 第43回 分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inaki M, Yukumatsu M, Takigawa T, Okubo A, Sushida T, Akiyama M, Inoue Y, Matsuno K
2. 発表標題 Three-dimensional simulation of epithelial tube revealed a chiral cellular behavior, cell twisting that may account for the directional gut rotation in Drosophila
3. 学会等名 第53回 発生生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲木 美紀子, 行松 美樹, 瀧川 大志, 須志田 隆道, 秋山 正和, 井上 康博, 松野 健治
2. 発表標題 3次元シミュレーションにより明らかとなった細胞のキラルなねじれによるショウジョウバエの消化管捻転の機構
3. 学会等名 第72回 細胞生物学会大会
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
---------	---------