

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14691

研究課題名(和文) 光で細胞内ミオシンIIをダイレクトに操作する新規力学的制御ツールの開発

研究課題名(英文) Constructing optogenetic tools for spatiotemporal regulation of contractile forces in cells

研究代表者

上地 浩之 (Uechi, Hiroyuki)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：50755452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アクトミオシン(アクチン・ミオシンII複合体)は細胞内で力を生成し、適時適所で機能することで様々な細胞動態を惹起し細胞応答や発生現象に寄与する。よって、アクトミオシン活性を自在にコントロールできれば、多彩な細胞動態が混在する生命現象を紐解く有用な手段となる。そこで本研究では、光で生体内ミオシンII分子を望みの時間、場所で不活化できる光遺伝学的ツールを開発した。また本ツールを利用して、集団細胞移動を生み出すミオシンIIの時空間的な分布や新規分子実体の関与を見出し、発生現象に必要な集団細胞の流動性を生み出す仕組みの一端を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内で力を生み出すミオシンII分子を、光を用いて生体内で時空間的に操作できるツールを開発した。ミオシンIIの生成する力は基礎的な生命現象からガン細胞の転移のような集団細胞移動にまで関与することから、本ツールは生命科学研究に有用な手段として広く貢献できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The actin-myosin II complex (actomyosin) is central to generate contractile forces inside cells essential for a diverse array of cellular dynamics. Thus manipulation of actomyosin in living organisms in a spatiotemporal manner could help us understand complex biological systems such as development, cellular responses, and cancer metastasis. Here we developed a genetic tool allowing spatiotemporal inactivation of endogenous myosin II with laser irradiation on a confocal microscopy in fruit flies. Applying this tool in the context of morphogenesis, we found a mechanism underpinning collective cell movement in epithelia. This study provides the novel tool for controlling intracellular forces as well as shows molecular distributions and functions that could underlie various morphological events.

研究分野：細胞生物学

キーワード：光遺伝学 アクトミオシン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物で観察される発生や細胞応答では、集団細胞による多様なふるまいが複雑に混在している。これら細胞動態を惹起する力のうち、収縮力を生み出す実行因子がアクトミオシン(アクチン・ミオシン II 複合体)であり、細胞移動時の後方細胞膜取り込み、細胞分裂における収縮環形成、細胞層からのアポトーシス細胞の排除、頂端収縮や細胞伸長などの細胞形態変形、細胞インターカレーション(細胞同士の配置換え)などの様々な細胞動態を制御する。よって、生体内アクトミオシンの収縮力を望みの場所・時間で操作できれば、生命現象を構築する個々動態の寄与と仕組みを紐解く一助になると期待された。近年の光遺伝学による研究では、アクトミオシンの上流因子を光操作することで細胞内の力を制御する方法が提案されてきたが、アクトミオシン分子そのものを直接操作する手法は存在していなかった。そこで本研究では、光遺伝学的手法を用いて生体内ミオシン II 分子活性を直接調節するツールの開発を試みた。

2. 研究の目的

アクトミオシンが生成する収縮力の生体内細胞動態への寄与を時空間的に理解することを目指し、ミオシン II 分子活性を直接操作する光遺伝学ツールを開発することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

まず光遺伝学的手法によりミオシンII分子活性を阻害するコンストラクトをデザインした。発色団補助光不活性化法(CALI)は、強度のレーザー照射により蛍光タンパク質から活性酸素種を生成させ、近傍のタンパク質を特異的に不活化する手法である¹。またこのCALIを志向して開発された蛍光タンパク質SuperNovaは、効率的に活性酸素種を産生する一方で光未照射時の標的タンパク質動態に影響を与えないことが報告されている²。そこでハエミオシンII調節軽鎖(MRLC)のゲノムコーディング領域下流、停止コドン直前にSuperNova配列を挿入し、MRLC-SuperNova融合タンパク質(MRLC::SuperNova)を発現するノックインショウジョウバエ系統を作製した。

次に本系統が期待した通りに機能するか評価した。不活化を誘導しない程度の弱いレーザー照射によりショウジョウバエを生きたままイメージングし、MRLCが先行研究で報告されているような細胞内動態を示すかを確認した。収縮力の阻害効果は、細胞インターカレーションと呼ばれる集団細胞の協奏的な配置換えを観察することで評価した。本現象においてアクトミオシンは細胞接着辺の収縮を駆動することから、細胞インターカレーションを起こしているハエ上皮細胞にレーザー照射することで、接着辺収縮と細胞インターカレーションの阻害が誘導できるかを検討した。

最後に本遺伝学的手法による光操作と細胞インターカレーションのライブイメージングにより、アクトミオシンの時空間的寄与が十分に理解されていない細胞動態を解析した。

4. 研究成果

(1) 研究成果

通常の遺伝子操作とCRISPR法により、MRLC::SuperNovaノックインショウジョウバエを作製した。ウェスタンブロットにより内在MRLCの全てにSuperNovaが付加されていることを確認した。不活性化を誘導しない程度の弱いレーザー照射で本系統の上皮をライブイメージングしたところ、MRLC::SuperNovaは細胞接着辺に沿って集積するとともに、細胞頂端層にて流動的なメッシュ構造として観察された。これらは先行研究で汎用されているGFP融合MRLCの細胞内動態と一致するものであった。また形態異常などは観察されなかったことから、SuperNovaの付加が不活性化非誘導時のミオシンII機能を阻害していないことを確認した。

強度のレーザー照射でMRLC活性が阻害できるかを検討するために、先述の細胞インターカレーションが介在する発生現象をモデルとした。ショウジョウバエ雄性外生殖器は変態時に前後軸に対して時計回りに360°回転する^{3,4}。当研究室の研究から、この回転運動が外生殖器を取り囲む上皮組織の時計回りの集団細胞移動であること、この集団細胞移動が細胞インターカレーションで駆動されることが明らかとなっている⁵。細胞インターカレーションは細胞接着辺のつなぎ替え、すなわち細胞接着辺の収縮・消失とそれに引き続く新規細胞接着辺の生成・伸長で進行し、収縮はその接着辺に集積するアクトミオシンにより引き起こされる⁶。そこでまず集団細胞移動中の当該上皮組織の観察領域全体に強度のレーザーを照射し、細胞接着辺つなぎ替えが阻害されるかを検討した。なお細胞接着辺の可視化には細胞接着の主要因子であるE-カドヘリンにGFPを融合したものを扱い、このイメージングに使用するレーザーはMRLC不活化に使用するものとは異なる波長である。

細胞接着辺動態のライブイメージングと並行して不活化用のレーザー照射を断続的に行ったところ、レーザー照射なしやSuperNovaなしの対照群と比較して、レーザー照射されたMRLC::SuperNova個体でつなぎ替えの頻度が有意に低下した。この表現型は遺伝学的に

MRLC を機能低下させた個体のものと類似していた。またレーザーアブレーション法で細胞接着辺にかかる張力を推定したところ、レーザー照射された MRLC::SuperNova 発現細胞接着辺で張力の低下が観察された。

次に局所的なレーザー照射で MRLC 分子の不活化を標的細胞接着辺に誘導できるかを検討した。ライブイメージングで集団細胞移動中の上皮組織から収縮中の細胞接着辺を同定し、本接着辺特異的に短時間レーザー照射したところ、収縮の進行が妨げられた。これらの結果から MRLC::SuperNova 系統を、MRLC 活性を時空間的に直接阻害できる光遺伝学的ツールとして報告した⁷。

本研究では MRLC::SuperNova 系統を利用し、上皮細胞インターカレーションのメカニズムを更に解析した。新規細胞接着辺の伸長は集団細胞動態を達成・継続する上で重要な段階であるにもかかわらず、そのメカニズムは細胞接着辺収縮と比較して十分に解析されていなかった。ここで、ショウジョウバエ胚体伸長で観察される細胞インターカレーションでは、新規接着辺伸長時にその両端に向かうミオシン II メッシュ構造の流れが報告されていること、申請者の観察から、雄性外生殖器回転運動時に新規細胞接着辺両端のミオシン II シグナル強度が増加することから、この両端すなわち三細胞結合点に局在するミオシン II が伸長に寄与していると予測された^{7,8}。そこでライブイメージングで集団細胞移動中の上皮組織から伸長中の新規生成細胞辺を同定し、その両端特異的にレーザー照射したところ、伸長が阻害された。一方で新規接着辺自体や、周辺の細胞接着辺を特異的に照射しても同様の阻害効果が観察されなかったことから、新規細胞点両端の三細胞結合点に局在するミオシン II 活性が新規辺の伸長に必要であることが明らかとなった。従来の遺伝学的操作では組織ないし細胞全体の MRLC 機能低下を誘導してしまうため、本知見は MRLC::SuperNova 系統の確立によって初めて得られたものである。

細胞接着辺伸長にはその両端に局在するミオシン II が必要であるという本知見に基づき、本研究では細胞接着辺伸長における三細胞結合点の寄与をさらに解析した。三細胞結合点には二細胞間接着とは異なる接着因子が局在することが知られているが、そのなかで Sidekick (Sdk) と呼ばれる膜貫通型接着分子の上皮細胞における機能はほとんど知られていなかった。sdk 欠損変異体の上皮細胞インターカレーションをライブイメージングにて解析したところ、細胞接着辺収縮は対照群と比較して同等であった一方で、新規細胞接着辺が生成されるまでに要する時間が増加し、その伸長速度も有意に低下していた。さらに本変異体では新規細胞接着辺両端へのミオシン II の蓄積も抑制されており、Sdk が MRLC::SuperNova で見出された細胞接着辺伸長機構を介していることが示唆された。

GFP 融合 Sdk を発現するショウジョウバエ系統を用いて Sdk 自体の動態をライブイメージング解析したところ、定常時は三細胞結合点に局在する Sdk が、新規に生成された細胞接着辺にも一過的に分布することが分かった。さらにその分布は E-カドヘリンと相補的であり、この Sdk の分布により E-カドヘリンの新規細胞接着辺への局在が抑制されることで、伸長が促進されることを見出した。これは Sdk と E-カドヘリンという 2 つの細胞間接着因子の量的バランスで集団細胞の流動性が調節されていることを示唆するものである⁷。

(2) 位置付け・展望

本研究課題ではショウジョウバエ雄性外生殖器回転運動という、当該研究室でよく確立した実験系において MRLC::SuperNova の有用性とその応用を検討した。本コンストラクトはショウジョウバエ全身で発現しているため、その他の組織・発生現象でアクトミオシンや細胞動態の解析に寄与するツールとなることが期待される。本ツールはミオシン II 分子を直接活性阻害する初めての例である。

また MRLC::SuperNova 系統の解析から発展して、細胞インターカレーションにおけるミオシン II 分子の時空間的寄与や Sdk 分子の役割を解明した。集団細胞のダイナミクスに関与する新規分子実体を提示したことで、多細胞生物の発生現象やひいてはガン細胞移動のメカニズムのさらなる理解に寄与できるものと考えられる。

(引用文献)

1. Rajfur, Z., Roy, P., Otey, C., Romer, L. & Jacobson, K. Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins. *Nat. Cell Biol.* **4**, 286–293 (2002).
2. Takemoto, K. *et al.* SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation. *Sci. Rep.* **3**, 2629 (2013).
3. Kuranaga, E. *et al.* Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia. *Development* **138**, 1493–1499 (2011).
4. Suzanne, M. *et al.* Coupling of apoptosis and L/R patterning controls stepwise organ looping. *Curr. Biol.* **20**, 1773–1778 (2010).
5. Sato, K. *et al.* Left–right asymmetric cell intercalation drives directional collective cell

- movement in epithelial morphogenesis. *Nat. Commun.* **6**, 10074 (2015).
6. Bertet, C., Sulak, L. & Lecuit, T. Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* **429**, 667–71 (2004).
 7. Uechi, H. & Kuranaga, E. The Tricellular Junction Protein Sidekick Regulates Vertex Dynamics to Promote Bicellular Junction Extension. *Dev. Cell* **50**, 327–338.e5 (2019).
 8. Collinet, C., Rauzi, M., Lenne, P. & Lecuit, T. Local and tissue-scale forces drive oriented junction growth during tissue extension. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1247–1258 (2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uechi Hiroyuki, Kuranaga Erina	4. 巻 50
2. 論文標題 The Tricellular Junction Protein Sidekick Regulates Vertex Dynamics to Promote Bicellular Junction Extension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 327 ~ 338.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2019.06.017	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上地浩之、梅津大輝、倉永英里奈
2. 発表標題 Regulation of intercellular junction growth by apical tricellular junctions
3. 学会等名 第70 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 上地浩之、倉永英里奈
2. 発表標題 集団細胞の配置換えにおける細胞接着因子Sidekick の機能解析
3. 学会等名 第30 回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----