

令和 4 年 4 月 4 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06650

研究課題名(和文) ショウジョウバエ腸管の恒常性における上皮バリアの役割の解明

研究課題名(英文) The role of epithelial barrier in *Drosophila* intestinal homeostasis

研究代表者

泉 裕士 (Yasushi, Izumi)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・准教授

研究者番号：10373268

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)：ショウジョウバエ腸管においてスムーズセプテートジャンクション(sSJ)は細胞間隙バリアとして機能する。我々はsSJ構成分子として新たにHokaを同定し、これがsSJ形成と腸管バリア機能に必須であることを示した。さらに、sSJ分子の欠失した成虫腸管では、幹細胞の増殖が亢進していることを見出した。sSJ分子欠失腸管では、atypical Protein Kinase C (aPKC)の発現が上昇しており、sSJ分子が欠失した腸管でaPKCを欠失させると、幹細胞の増殖が抑制された。従って、sSJ分子はaPKCの制御を介して腸管幹細胞の増殖を制御し、腸管恒常性の維持に寄与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショウジョウバエの腸管バリア機能に重要な役割を果たしているスムーズセプテートジャンクション(sSJ)の新規構成分子Hokaを同定し、sSJの分子構築と形成機構の理解が進んだ。sSJ構成分子欠失により、腸管幹細胞の増殖が亢進し腸管に腫瘍が形成されたことから、上皮バリアが腸管幹細胞の増殖制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

本研究より、ショウジョウバエ腸管の上皮バリアが、体内への異物の侵入あるいは体外への生体成分の流出を防ぐだけでなく、幹細胞の増殖のコントロールを介して腸管恒常性維持にも寄与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In the *Drosophila* intestine, smooth septate junctions s(SJs) act as paracellular diffusion barrier. We identified four sSJ-associated membrane proteins, Ssk, Mesh, Tsp2A and Hoka, all of which are essential for sSJ organization and intestinal barrier function. We investigated the effect of sSJ protein depletion on the adult intestine. The sSJ protein-deficient flies showed intestinal hypertrophy, which was associated with increased intestinal stem cell proliferation and activation of the MAPK and Jak-Stat pathways in the stem cells. In the sSJ protein-deficient intestine, atypical protein kinase C (aPKC) was upregulated in the cytoplasm and the apical membrane of epithelial cells. The reduced expression of aPKC in the sSJ protein-deficient enterocytes resulted in reduced stem cell overproliferation. These findings indicate that sSJ proteins play a crucial role in maintaining stem cell homeostasis through the regulation of aPKC activities in the *Drosophila* intestine.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：上皮バリア 組織恒常性 幹細胞 ショウジョウバエ 細胞増殖 セプテートジャンクション 細胞間
接着 腸管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の腸管上皮は食物、消化液、微生物を含む過酷な外界の環境に常に曝されており、疲弊した上皮細胞を脱落させるとともに、新たな上皮細胞を生み出しながらリニューアルを繰り返している。このような細胞の動的なターンオーバーの中で、切れ目ない一層の腸管上皮の構造と機能が維持されるためには、幹細胞の分裂と上皮細胞への分化、及び細胞死が厳密にコントロールされる必要がある。しかしながら、上皮の恒常性の背景にある上皮細胞の増殖制御のメカニズムはいまだ完全には理解されておらず、幹細胞生物学、細胞生物学、発生生物学、腫瘍生物学をまたぐ重要な研究課題となっている。

これまで私は、ショウジョウバエの腸管上皮において細胞間隙の透過バリアを形成する細胞間接着構造「スムーズセプテートジャンクション(sSJ)」を研究してきた。その過程で、腸管上皮のバリア機能が、腸管幹細胞の増殖制御にも重要な役割を果たしていることを示す知見を得た。しかし、『腸管の恒常性維持のためにどのようなしくみで腸管幹細胞の増殖が制御されているか』については不明瞭な状態だった。

2. 研究の目的

私は、ショウジョウバエ腸管上皮の細胞間隙の透過バリアとして機能する細胞間接着装置スムーズセプテートジャンクション(sSJ)の構成分子群 Ssk, Mesh, Tsp2A を先駆的に同定し、これらの分子が sSJ の形成に必須であること、これらを欠失させたショウジョウバエが腸管上皮のバリアの破綻を伴い孵化直後に致死となることを明らかにしてきた。この実験系を応用して成虫で腸管上皮のバリアの破綻を誘導したところ、上皮細胞の異常増殖と共に上皮の重層化による腸閉塞が観察された。さらに、このとき幹細胞が過剰に増殖していることが分かった。そこで本課題では上記の研究をさらに発展させ、ショウジョウバエ成虫の腸管上皮のバリア機能の破綻により起こる幹細胞と上皮細胞の増殖異常のメカニズム解明を目的とした。そして、上皮バリア機能がどのようなしくみによって腸管の恒常性維持に寄与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ腸管恒常性維持における sSJ の役割

Myo1A-GAL4, GAL80^{ts} システムにより sSJ 構成分子(Mesh, Ssk, Tsp2A)の RNAi をショウジョウバエ成虫腸管上皮細胞で発現誘導し、sSJ 構成分子の発現を抑制した。

のショウジョウバエの寿命と腸管バリア機能(青色色素を経口投与し、色素が腸外に漏れるかを観察、Smurf assay)を解析した。

の腸管を共焦点レーザー顕微鏡で観察。上皮細胞の状態(アクチン染色と上皮細胞の GFP ラベル) 幹細胞の増殖(抗 PH3 抗体染色) 幹細胞の分裂誘導シグナル経路(MAP キナーゼ経路、Jak-Stat 経路の活性化)を解析した。

の腸管を電子顕微鏡で観察した。

正常腸管上皮細胞の集団の中に一部だけ sSJ 構成分子(Tsp2A)を失った細胞クローンの集団を出現させるショウジョウバエを得た。そして、SJ 構成分子の発現抑制による上皮バリアの破綻が遠隔に及んで幹細胞の増殖を引き起こすのか、sSJ 構成分子欠損細胞そのものが異常増殖するのかを明らかにした。

(2) Hoka によるショウジョウバエ腸管の sSJ 形成と幹細胞恒常性の制御

Hoka の抗体を作製し、腸管上皮細胞での発現及び細胞内局在を解析した。さらに、mesh, ssk, Tsp2A 変異系統における細胞内局在の変化を検討した。

Hoka の sSJ 形成への関与を明確にするため、CRISPR/Cas9 法を利用した変異系統作製を試み、Mesh, Ssk, Tsp2A の局在に与える影響(共焦点レーザー顕微鏡観察)及び sSJ 形態(電子顕微鏡観察)を解析した。

hoka 変異系統に GAL4-UAS システムを利用して Hoka-GFP の発現を誘導し、sSJ の形成異常がレスキューされるか検討した。

Hoka と Mesh, Ssk, Tsp2A との相互作用の有無を検討するために、ショウジョウバエ胚及び幼虫を可溶化し、共免疫沈降実験を行った。

Myo1A-GAL4, GAL80^{ts} システムにより Hoka の RNAi をショウジョウバエ成虫腸管上皮細胞で発現誘導し、Hoka の発現を抑制した。そのショウジョウバエの寿命と腸管バリア機能を解析した。*hoka*RNAi 腸管を共焦点レーザー顕微鏡で観察。上皮細胞の状態、幹細胞の増殖、幹細胞の分裂関連シグナルを解析した。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ腸管恒常性維持におけるsSJの役割

ショウジョウバエ成虫の腸管は、幼虫の腸管とは異なり、幹細胞システムによりコンスタントに上皮細胞がリニューアルされると共に、上皮がダメージを受けると、幹細胞の増殖がアクティブになり、ダメージを受けた上皮細胞を新しい細胞に置き換える。この様な成虫腸管の恒常性維持におけるsSJ構成分子の役割を解析するために、Myo1A-GAL4, GAL80^{ts} システムを利用し、sSJ構成分子のRNAiを成虫腸管上皮特異的に発現誘導し、sSJ構成分子の発現を抑制した。

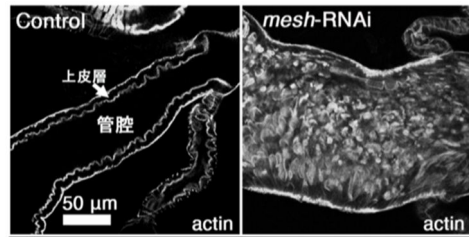


図1.ショウジョウバエ成虫腸管の断面像
コントロールにおける典型的な単層上皮に対し、sSJ構成分子MeshをRNAiにより発現抑制した腸管では、上皮細胞の形態異常を伴った異常増殖と共に、上皮の重層化が見られた。

腸管上皮でのsSJ構成分子の発現を抑制した成虫バエは著しく寿命が短縮した。また、Smurf assay (ハエに青色色素を含む餌を食べさせることにより、青色色素が腸内に留まるか、腸外に漏れ出たかで腸管バリア機能を評価するアッセイ)により、sSJ構成分子の発現を抑制した成虫バエは、腸管バリア機能が低下していることが分かった。

sSJ構成分子の発現を抑制した腸管を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、上皮細胞が腸管腔で過剰に蓄積し腸閉塞の状態になっていることが分かった(腸上皮腫瘍を形成、図1)。この過剰な上皮細胞の蓄積は、幹細胞の増殖亢進に由来すると考え、分裂細胞を観察したところ(抗PH3抗体染色) sSJ構成分子の発現を抑制した腸管では分裂中の幹細胞がコントロール腸管に比べ著しく増加していることが分かった(図2)。更に幹細胞自身(抗Delta抗体陽性細胞)も大きく増加していることを確認した。

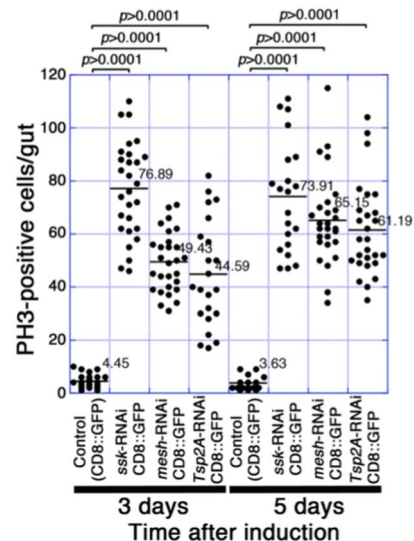


図2. コントロール及びsSJ構成分子のRNAiを発現誘導したショウジョウバエ成虫腸管の、1腸管当たりの分裂期の幹細胞の数。コントロールに比べ、sSJ構成分子RNAi腸管では分裂期の幹細胞が著しく増加していた。

幹細胞の増殖には、MAP キナーゼ, Jak-Stat経路が関与することが知られている。sSJ構成分子の発現を抑制した腸管では、コントロール腸管に比べMAPキナーゼ経路の活性化のマーカー、抗dpERK抗体の染色レベルと Jak-Stat 経路の活性化マーカー、STAT-DGFPのシグナルが大きく上昇していることを確認した。ダメージを受けた腸管では、上皮細胞からサイトカインであるUpd2,3が発現し、幹細胞のJak-Stat経路を活性化し、その増殖を亢進させることが知られている。sSJ構成分子の発現を抑制した腸管でもUpd2,3が幹細胞の増殖亢進に関与しているかを確認するために、Upd2,3変異体バックグラウンドでsSJ構成分子の発現を抑制した。その結果、sSJ構成分子の発現を抑制した腸管に比べ、Upd2,3バックグラウンドでsSJ構成分子を抑制した腸管は、幹細胞の増殖は依然高いレベルであったが、上皮細胞の管腔内

での蓄積は有意に抑制されていた。この結果より、sSJ構成分子の発現を抑制した腸管において Upd2,3は、幹細胞の増殖よりも主に上皮細胞の分化に関与していることが示唆された。

以上の結果は、腸管上皮全体でsSJ構成分子をRNAiにより抑制した解析に基づくが、次にsSJ構成分子の変異クローン（GFPでマーク）を腸管の一部で形成させ、このクローン周囲の幹細胞増殖状態を観察した。その結果、コントロールクローンに比べ、sSJ構成分子(Tsp2A)変異体のクローンでは、その周囲での幹細胞の増殖が亢進していた。従って、sSJ構成分子変異クローンは細胞非自律的に周囲の幹細胞の増殖を促進することが分かった。

以上の結果より、sSJはショウジョウバエ腸管において、幹細胞増殖と上皮細胞の挙動を制御することで、その恒常性維持に重要な役割を担っていることが明らかになった。

(2) Hokaによるショウジョウバエ腸管のsSJ形成と幹細胞恒常性の制御.

Hoka は非常に短い細胞外ドメインを持つ新規の一回膜貫通型タンパク質であり、遺伝学的スクリーニングで sSJ の形成不全を招く遺伝子欠失系統の原因遺伝子産物として同定した(図3)。Hoka の細胞内局在を明らかにするために抗体を作製し、ショウジョウバエ腸管上皮細胞を蛍光免疫染色した結果、Hoka も sSJ に局在するタンパク質であることが分かった。Hoka の機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 法により *hoka* 変異系統の作製を試み、*hoka* 遺伝子内での塩基欠失により Hoka タンパク質が正常に合成

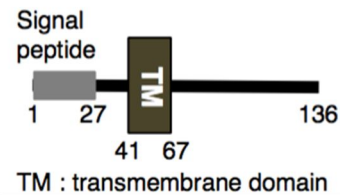


図3. Hoka構造模式図；一回膜貫通型タンパク質で極めて短い細胞外ドメインをもつ。

されない変異系統を得ることに成功した。この変異系統は幼虫期に致死であることから、Hoka は生存に必須な分子であることが分かった。電子顕微鏡観察の結果、*hoka* 変異系統では sSJ が正常に形成されていないことが分かった。Hoka の局在は、Ssk、Mesh、Tsp2A に依存していた。また、*hoka* 変異系統における Mesh、Ssk、Tsp2A の局在を観察したところ、これらの分子はラテラル膜全体に局在していることが分かった(図4)。従って、Hoka は sSJ 形成の際、一旦ラテラル膜に集まった Mesh、Ssk、Tsp2A を、sSJ 領域に集合させるのに必要であることが示唆された。

続いて、Myo1A-GAL4, GAL80^{ts}システムにより、ショウジョウバエ成虫の腸管上皮の Hoka の発現を RNAi により抑制した。その結果、上皮バリア機能の低下と幹細胞の著しい増殖亢進と上皮細胞の腫瘍化が観察された。また、そのような腸管の上皮細胞では、aPKC の発現が大きく上昇していることを見出した。最近、ショウジョウバエ成虫腸管において、sSJ の構成分子の欠失に伴う腸管ステムセルの増殖亢進に aPKC と Hippo 経路の転写共役因子である Yorkie が関与することが報告された(Xu et al., 2019)。そこで、Hoka の発現を抑制した腸管で aPKC または Yorkie の発現も抑制したところ、幹細胞の増殖が有意に低下した。これらの結果より、Hoka は腸管上皮の sSJ 形成とバリア機能に必須であり、成虫腸管においては aPKC と Yorkie の活性を制御し、幹細胞の増殖をコントロールしていることが明らかになった。



図4. コントロール及び Hoka変異系統の腸管上皮細胞におけるMeshの局在；Hoka変異系統では Meshのラテラル膜全体への局在が観察された。

(得られた成果の国内外における位置づけとインパクト)

ショウジョウバエの腸管は、幹細胞の増殖・分化による上皮細胞の修復機構を内包する恒常性維持のモデルシステムとして注目を浴びてきた。幹細胞に由来した上皮のリニューアルがコンスタントに起こるとともに、組織の損傷などが幹細胞の増殖を誘導することが報告されている(総説: Jiang et al. Cell.Mol.Life Sci. 2016)。sSJと腸管幹細胞の増殖との関連については、私たちを含む複数のグループによって報告され、(Izumi et al. JCS 2019, Salazar et

al. *iSci.* 2018; Xu et al. *Cell Rep.* 2019)、sSJの制御する上皮バリアが、体内への異物の侵入あるいは体外への生体成分の流出を防ぐだけでなく、幹細胞の増殖と分化のコントロールを介して腸管恒常性にも寄与するという新しいコンセプトを導いた (Izumi et al. *JCS* 2019)。今回の成果は、私たちが Hoka をはじめとする sSJ 構成分子群を先駆的に同定し、その欠失により sSJ を破綻させる実験系を確立したことにより得られた独創性の高いものである (Izumi et al. *JCS* 2012; Yanagihashi et al. *JCS* 2012; Izumi et al. *JCS* 2016)。

今回の報告は、*J. Cell Sci.* (2019) doi: 10.1242、*J. Cell Sci.* (2021) doi: 10.1242 に掲載されると共に、注目論文としてそれぞれの掲載号の 'Research Highlight' でも紹介され、注目度の高さが裏付けられた。

(今後の展望)

現在、私が最も注目しているのは、sSJ 構成分子の欠失がどのようなシグナル経路を介してして幹細胞の増殖亢進を引き起こしているかである。aPKC と Yorkie が関与していることは大きなヒントと考えられ、今後 aPKC 及び Yorkie の上流、下流に関わるシグナル伝達分子を明らかにしていきたい。

幹細胞の増殖を適切に制御することは、組織の恒常性を維持し、腫瘍などの疾患を防ぐために重要である。幹細胞の増殖に関わる因子は進化をこえてよく保存されており、今後の関連シグナル因子の同定は、ショウジョウバエだけでなく、哺乳類の幹細胞の増殖制御機構や組織恒常性維持機構の解明につながることを期待される。

(新たな知見)

sSJ 構成分子 Ssk, Mesh, Tsp2A をショウジョウバエ成虫マルピーギ管 (腎管) で発現抑制した結果、腎管幹細胞の増殖亢進が観察された。さらに、腎管の幹細胞の増殖制御機構は領域によって異なることが示唆された。今後、腎管における幹細胞の制御機構についても解析を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yasushi Izumi, Kyoko Furuse, Mikio Furuse	4. 巻 134
2. 論文標題 The novel membrane protein Hoka regulates septate junction organization and stem cell homeostasis in the Drosophila gut	5. 発行年 2021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.257022	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 Klaus W Beyenbach, Frederike Schone, Leonhard F Breitsprecher, Felix Tiburcy, Mikio Furuse, Yasushi Izumi, Heiko Meyer, Sima Jonusaite, Aylin R Rodan, Achim Paululat	4. 巻 318
2. 論文標題 The septate junction protein Tetraspanin 2A is critical to the structure and function of Malpighian tubules in Drosophila melanogaster.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American journal of physiology. Cell physiology	6. 最初と最後の頁 C1107-C1122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00061.2020	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 該当する
1. 著者名 Yasushi Izumi, Kyoko Furuse and Mikio Furuse	4. 巻 132
2. 論文標題 Septate junctions regulate gut homeostasis through regulation of stem cell proliferation and enterocyte behavior in Drosophila.	5. 発行年 2019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.232108.	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 Sima Jonusaite, Klaus W. Beyenbach, Heiko Meyer, Achim Paululat, Yasushi Izumi, Mikio Furuse, and Aylin R. Rodan	4. 巻 318
2. 論文標題 The septate junction protein Mesh is required for epithelial morphogenesis, ion transport, and paracellular permeability in the Drosophila Malpighian tubule.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C675-C694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00492.2019.	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 該当する

1. 著者名 Yukako Oda, Taichi Sugawara, Yuko Fukata, Yasushi Izumi, Tetsuhisa Otani, Tomohito Higashi, Masaki Fukata and Mikio Furuse	4. 巻 295
2. 論文標題 The extracellular domain of angulin-1 and palmitoylation of its cytoplasmic region are required for angulin-1 assembly at tricellular contacts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 4289-4302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yasushi Izumi, Mikio Furuse
2. 発表標題 The novel membrane protein Hoka regulates septate junction organization and stem cell homeostasis in the Drosophila intestine.
3. 学会等名 The 14th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉 裕士、古瀬幹夫
2. 発表標題 新規膜タンパク質Hokaによるショウジョウバエ腸管のセプテートジャンクション形成と幹細胞恒常性の制御
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉 裕士、古瀬幹夫
2. 発表標題 新規膜タンパク質Hokaによるショウジョウバエ腸管のセプテートジャンクション形成と幹細胞恒常性の制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泉 裕土、古瀬幹夫
2. 発表標題 ショウジョウバエ腸管の恒常性における上皮バリア機能の役割.
3. 学会等名 第9回生理研・名古屋大学医学部合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泉 裕土、古瀬幹夫
2. 発表標題 多様な膜貫通タンパク質により構成されるショウジョウバエのセプテートジャンクション
3. 学会等名 第19回日本蛋白質化学会年会、第71回 日本細胞生物学会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>消化管のバリア機能と恒常性の維持にかかわる新しい分子の発見 http://www.nips.ac.jp/nips_research/2021/03/--.html 腸管を正常に保つ上皮バリアのはたらき -ショウジョウバエをモデルとした研究から - http://www.nips.ac.jp/nips_research/2019/10/_-.html</p>

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			
ドイツ	University of Osnabruck			
米国	University of Utah			