

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16139

研究課題名(和文) 実験と数理から解き明かす、細胞配置換えに伴う細胞間接着再編成の分子メカニズム

研究課題名(英文) Elucidating molecular mechanism of junctional remodeling

研究代表者

井川 敬介 (Ikawa, Keisuke)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：10791402

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)：上皮細胞は、細胞接着を再編成し、隣接細胞の配置を変えながら組織を形作る。この細胞配置換えのプロセスは、細胞接着面の収縮、切り替わり、新たに生じた接着面の伸長という3つのステップで進行する。本研究では、ライブイメージングと物理モデリングを組み合わせることで、細胞頂点の周囲でアクチンケーブルがギャップ用の構造を形成することが、細胞接着面の切り替わりに重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞配置換えは組織形態形成の基幹プロセスである。それにもかかわらず、細胞間接着が切り替わる際のアクチンやAJの局所的な動態を詳細に観察した研究はほとんど報告されておらず、ブラックボックスのまま残されている。したがって、この未解明のメカニズムを明らかにする点で、本研究は発生生物学及び細胞生物学の分野において学術的に重要であると言える。また、形態形成の細胞動態の研究は、様々な生体組織の形作りに共通のメカニズムであることから、再生医療分野などへの波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells remodel cell adhesion and change their neighbors to shape a tissue. This cell rearrangement proceeds in three steps: the shrinkage of a junction, exchange of junctions, and elongation of the newly generated junction. Herein, by combining live imaging and physical modeling, we showed that the formation of multicellular myosin-II (myo-II) cables around the cell vertices underlies the exchange of junctions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アドヘレンスジャンクション トリセルラージャンクション 細胞配置換え

1. 研究開始当初の背景

組織が正しい形に成長するためには、細胞配置換えが精緻に制御される必要がある。この10年ほどで、細胞配置換えに伴うアドヘレンスジャンクション (AJ) の収縮と伸長の分子メカニズムの多くが明らかにされてきた (Pinheiro and Bellaïche, *Dev. Cell*, 2018)。特に、ミオシンによる力の生成が細胞接着面の収縮と新生細胞接着面の伸長の両方を担うことが分かっている (図 1b の左と右)。一方で、細胞配置換えが達成されるためには、接着する細胞が切り替わる細胞間接着の再編成が必須であるが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない (図 1b の中央)。

申請者は、ショウジョウバエ翅上皮において、cofilin とその補因子の AIP1 によるアクチン細胞骨格再編成が細胞配置換えを駆動することを報告した (Ikawa and Sugimura, *Nat. Commun.*, 2018)。この研究の過程で、正常細胞において、AJ 面が切り替わる直前にミオシンが AJ から乖離してギャップ状の構造を形成することがわかった (ミオシンギャップ; 図 2a 左の画像の矢頭)。加えて、AIP1 もしくは cofilin の機能欠損細胞では、ミオシンギャップが肥大化し、その中心部で Afadin や α -catenin などの AJ 構成因子の局在が減弱すること、ミオシンギャップが生成と消失を繰り返して新生細胞接着面が安定化されないことを見出し、その結果、細胞配置換えに異常が生じることも明らかになった (図 2a-c)。以上の結果は、ミオシンギャップが一過的に形成されることが AJ 面の切り替わりと再編成に必須の役割を果たしていることを示唆する。しかし、ミオシンや AJ 構成因子の局在や活性がどのように調節されて AJ の切り替わりと再編成が駆動されるのかは不明であった (図 2d)。

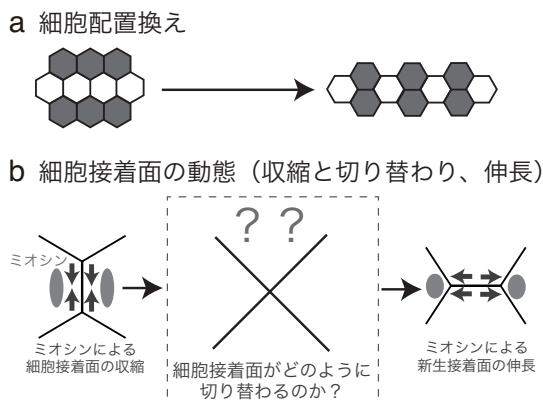


図 1. 細胞配置換えの模式図
 a. 灰色の細胞が白色の細胞の間に入り込んで細胞の配置が変化し、組織が変形する。
 b. 細胞配置換えに伴う細胞間接着の動態。ミオシン (楕円) が、細胞接着面を収縮させ、続いて、新生された細胞接着面を伸長させることが知られている。一方で、細胞接着面の切り替わりの分子メカニズムの多くが不明である。

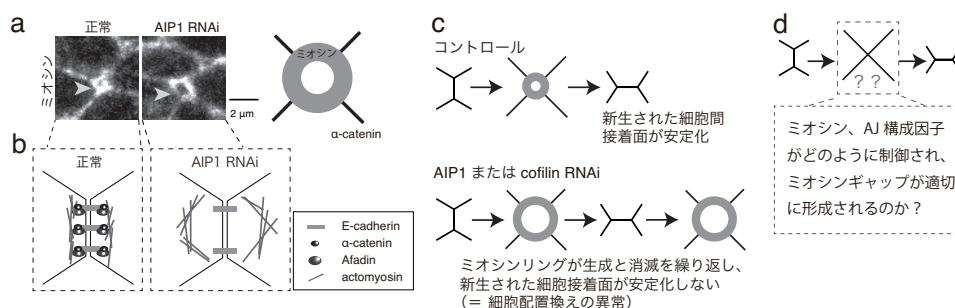


図 2. これまでの研究成果と本研究で解き明かす問
 a. 細胞接着面が収縮した際に構成される頂点でミオシンが剥がれたギャップ構造が形成される。また、このギャップ構造が AIP1 や cofilin の機能欠損で肥大化する。
 b. ミオシンギャップ構造の模式図。正常状態ではアクチンミオシンケーブルが細胞接着面に近い領域に局在するが、AIP1 機能欠損で AJ 構成因子の局在が薄くなり、アクチンミオシンケーブルも大きく乖離する。
 c. 細胞配置換えの過程でのミオシンギャップの役割の模式図。ミオシンギャップが広がると細胞配置換えが安定しない。
 d. 本研究で解き明かす問。

2. 研究の目的

本研究では、細胞配置換えに伴う細胞間接着再編成を制御する仕組みを解き明かすことを目指した。具体的には、第一に、ミオシンや Afadin/ α -catenin などの AJ 構成因子と複数細胞が接する細胞接着構造である Tricellular junction (TCJ) の構成因子の機能に注目

して、細胞接着面の切り替わりを実現する分子メカニズムを解析した。第二に、生体内で計測した細胞間接着の動態の定量データを取り込んだ数理モデルの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 分子遺伝学的手法を用いた分子機能解析

ショウジョウバエ分子遺伝学的手法、特にRNAi法を用いて機能欠損表現型を観察し、AJやTCJ構成因子の分子機能について解析を行なった。

(2) ショウジョウバエ上皮組織を対象とした高解像度のライブイメージングシステム

ショウジョウバエ翅上皮組織を対象として、微小構造であるミオシンギャップのダイナミクスを追跡するために、高解像度のライブイメージングシステムを確立した。この手法を用いて、AJやTCJ構成因子を蛍光タンパク質によって可視化し、細胞接着面切り替わりの際の動態を観察した。さらに、AJ及びTCJ構成因子の機能欠損条件下での分子動態についても解析した。

(3) 細胞接着面切り替わりの数理モデルの構築

ライブイメージング観察から抽出した、ミオシンギャップ動態の定量データを基にして、数理モデルの構築を行なった。数理モデルの構築は、東京大学の杉村薫准教授と石原秀至准教授との共同研究によって実施した。

4. 研究成果

(1) 野生型細胞におけるミオシンギャップの解析

ショウジョウバエ翅上皮組織において、ミオシンギャップのダイナミクスを追跡したところ、細胞接着面が収縮して4つの辺が交わった頂点構造の部分で一時的に形成され、その後、このギャップ構造が分裂して、新生細胞接着面の伸長が起こることが確認できた (図3a)。次に、ミオシンギャップ構造をより詳細に観察する目的で、Z スタックの断面画像を解析した。ショウジョウバエ胚発生期では細胞基底面でのアクチンプロトリエーションが細胞接着面の切り替わりを駆動することが報告されており (Sun et al., *Nat. Cell Biol.*, 2017)、ショウジョウバエ翅上皮においても同様の現象が起こってミオシンギャップの形成が促進される可能性が考えられた。しかしながら、ミオシンギャップの断面画像を解析したところ、翅上皮においては基底側でのアクチンプロトリエーションは観察されず、AJ近傍で特異的にアクチンやミオシンの局在が観察された (図3b,c)。以上の結果から、翅上皮の細胞配置換えにおいては、AJにおけるアクトミオシンケーブルの制御がミオシンギャップ形成に重要であることが示唆された。

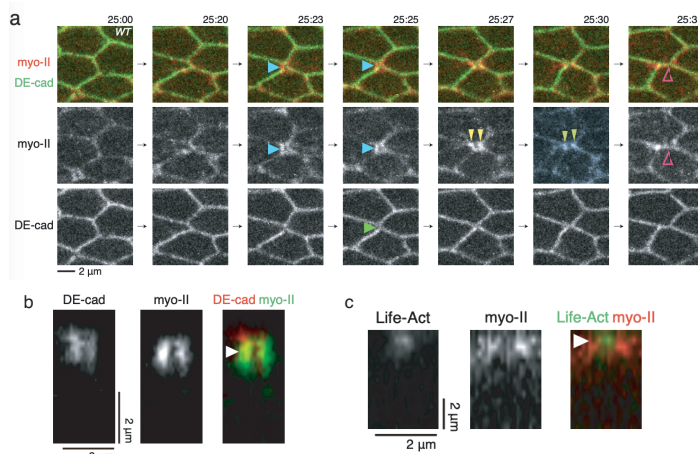


図 3. 野生型でのミオシンギャップの解析

a. ミオシンギャップのタイムラプス観察の結果。ミオシンギャップは頂点の切り替わりのタイミングで一時的に形成される。
b. ミオシンギャップ構造の断面画像。ミオシンギャップがAJに局在している。
c. ミオシンギャップ内のF-アクチンの局在。ショウジョウバエ翅上皮においては、F-アクチンはAJ面に主に局在し、ミオシンギャップ内に局在することがわかった。

(2) AJ構成因子の局在観察と機能欠損表現型の解析

アクトミオシンケーブルとAJを繋ぐアクチン-AJリンカーの分子群に注目し、機能欠損表現型を解析した。その結果、 α -cateninやAfadin/canoe、Ajubaといった因子のノックダウンによってミオシンギャップが肥大化すること、肥大化したミオシンギャップが長時間に渡り維持されること、さらに、肥大化したミオシンギャップでは細胞接着面の伸長が不安定化することがわかった (図4a,b)。また、同時に野生型細胞での分子局在観察を行なったところ、Ajubaの局在が、ミオシンギャップが形成されたタイミングでわずかに減弱することもわかった (図5a)。以上の結果から、Ajubaの局在が適切なタイミングでわずかに減弱することがミオシンギャップの正常な形成に重要であることが示唆された。

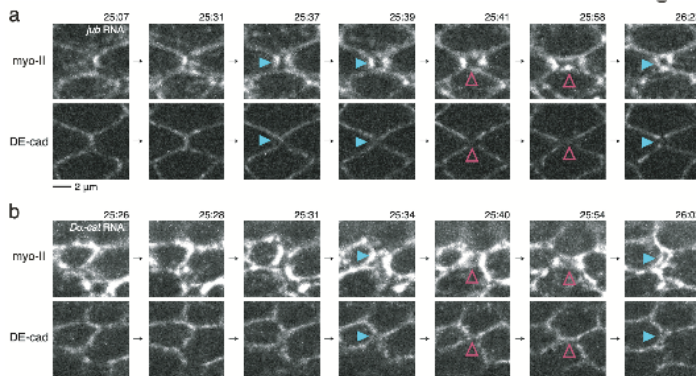


図 4. AJ 構成因子の機能欠損表現型

a. Ajuba の機能欠損条件下でのミオシンギャップのダイナミクス。ミオシンギャップが肥大化し、また細胞接着面伸長の不安定化やミオシンギャップ持続時間の延長といった表現型が認められた。
d. α -catenin の機能欠損条件下での観察結果。ミオシンギャップについての表現型は Ajuba の機能欠損と同様であった。

(3) TCJ構成因子の機能欠損条件化でのAJ構成因子の局在解析

次に、Ajubaが局所的に減弱する分子メカニズムの解析を行なった。野生型の翅において、一部のTCJ領域においてミオシンケーブルがわずかに剥がれる現象が観察されていたので、TCJ構成因子がAjubaの減弱とミオシンギャップの形成に関わる可能性を検証した。具体的には、TCJ構成因子の機能欠損細胞におけるミオシンギャップの形態やダイナミクス、Ajubaの局在について解析を行なった。その結果、M6と呼ばれるTCJ構成因子の機能欠損において、Ajubaがミオシンギャップ領域内で長時間局在し続けること、また、ミオシンギャップの構造が野生型に比べて長時間維持されることがわかった (図5a,b)。このことから、M6がAjubaの適切な減弱に必要であることが示唆された。次に、AjubaがM6に与える影響を解析する目的で、Ajubaノックダウン細胞におけるM6の局在を観察した。野生型の細胞においては、M6はAJより少し基底側のセプテートジャンクション (SJ) の面のTCJやミオシンギャップ領域に局在するのに対して、Ajubaをノックダウンした場合には、この局在がAJ面に上昇し、特に肥大化したミオシンギャップ内に入り込む様子が観察された (図5c-f)。以上から、AjubaとM6は相互に抑制する制御関係にあり、この制御関係がミオシンギャップの適切な形成を促進することが示唆された (図5g)。

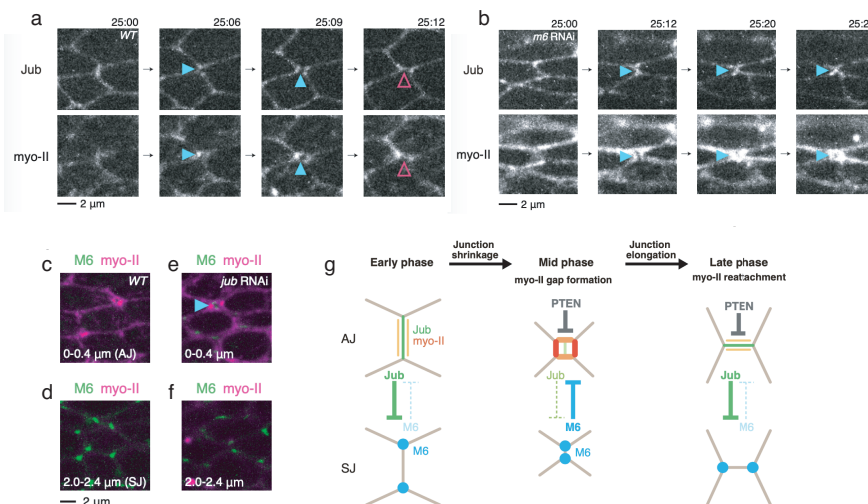


図 5. TCJ 構成因子の機能解析と本研究の作業仮説

a,b. TCJ 構成因子 M6 の機能欠損下での Ajuba の局在。Ajuba が長時間にわたってミオシンギャップ内に局在している。
c-f. Ajuba 機能欠損下での M6 の局在。M6 の局在が AJ の面上上がってくる。
g. 本研究の作業仮説。M6 と Ajuba による相互抑制がミオシンギャップの形成を制御する。PTEN の機能については以下の数理モデルパートを参照。

(4) 細胞接着面切り替わりの数理モデルの構築

ミオシンギャップの形態及びダイナミクスのデータを基に、数理モデルの構築を行なった。濡れの理論を応用して、細胞接着面が収縮した際の微小な領域におけるアクトミオシンケーブルと細胞膜との接着状態を自由エネルギーとして算出し解析を行なった (図6a)。アクトミオシンケーブルが細胞膜と接着している場合には、自由エネルギーは一定であることがわかった。一方で、アクトミオシンケーブルが乖離していた場合、自由エネルギーはケーブルが剥がれた距離 l に依存して右肩下りに減少することがわかった (図6b)。また、接着状態から乖離状態の間に、エネルギーバリア ΔF が存在すること、このエネルギーバリアを超えた場合に、アクトミオシンケーブルが接着から乖離へと状態変化を起こすことがわかった (図6b)。さらに、このエネルギーバリアがアクトミオシンケーブルの接着力 σ と垂直方向の細胞接着面の長さ L_0 に依存することや、アクトミオシンケーブルに生じる張力 γ が大きくなることで、よりアクトミオシンケーブルの乖離状態が生じやすくなることもわかった (図6b,c)。以上のことから、野生型の状態では細胞接着面が収縮して L_0 が小さくなり γ が大きくなることでミオシンギャップが生じること、一方で、AJ構成因子の機能欠損では、 σ が小さくなるためミオシンケーブルが長い細胞接着面から剥がれてしまいミオシンギャップが肥大化することが示唆された。

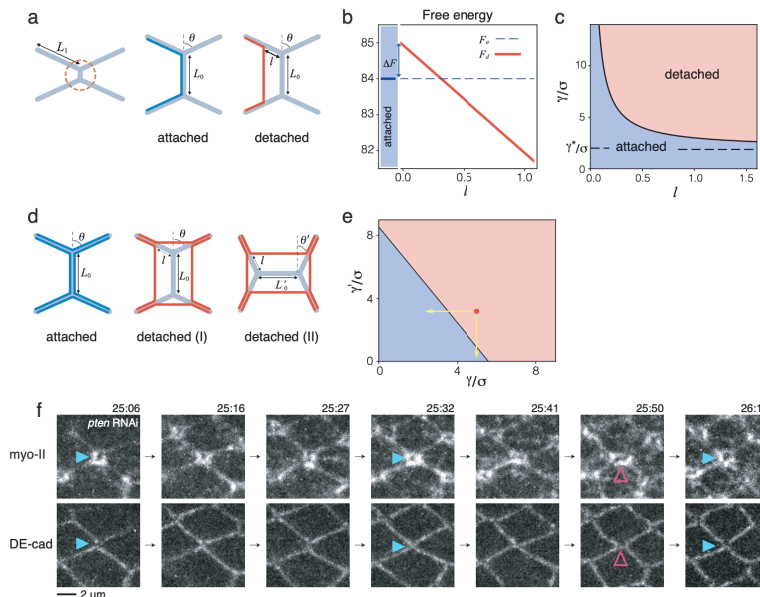


図 6. TCJ 構成因子の機能解析と本研究の作業仮説

a-c. 1 細胞でのアクトミオシンケーブルの状態変化について、自由エネルギーを用いて解析を行った結果。F_a (b 内、青線) が接着状態、F_d (b 内、赤線) が乖離状態のエネルギーを表している。エネルギーバリアは $\Delta F = \sigma L_0$ で表される。

d,e. 4 細胞に拡張したモデルとその解析結果。e 内、赤点が実際の乖離状態を示しており、これが γ か γ' の減少によって接着状態へと戻ること示している。

f. PTEN の機能欠損条件下でのミオシンギャップのダイナミクス。ミオシンギャップが長時間にわたって維持される。

次に、このモデルを4細胞に拡張して解析を行なった。左右の細胞の張力を γ 、上下の細胞の張力を γ' として相図を作成したところ、乖離状態にあるアクトミオシンケーブルが γ または γ' が小さくなることで再び接着状態へと戻ることがわかった (図6d,e)。過去の研究から、ショウジョウバエの翅上皮の細胞配置換えにおいて、上下の細胞における張力 γ' の減弱がPTENによって起こることが報告されており (Bardet et al., *Dev. Cell*, 2013)、また、PTENの機能を阻害した場合にミオシンギャップが長時間に渡って維持されることから、 γ' の減少によって上下のアクトミオシンケーブルが再接着しやすく、細胞接着面の切り替わりが起りやすい状態になっていることが示唆された (図6d-f, 図5g)。

以上の研究成果をまとめて学術論文として投稿し、現在、改訂の段階にある。

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 1件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Takagi Takeru, Ueno Tasuku, Ikawa Keisuke, Asanuma Daisuke, Nomura Yusuke, Uno Shin-nosuke, Komatsu Toru, Kamiya Mako, Hanaoka Kenjiro, Okimura Chika, Iwadate Yoshiaki, Hirose Kenzo, Nagano Tetsuo, Sugimura Kaoru, Urano Yasuteru | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Discovery of an F-actin binding small molecule serving as a fluorescent probe and a scaffold for functional probes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Science Advances | 6. 最初と最後の頁 Issue 47 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abg8585 | 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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Keisuke Ikawa, Shuji Ishihara, Kaoru Sugimura |
| 2. 発表標題 De-wetting of cortical myosin-II facilitates the reconnection of junctions during cell rearrangement |
| 3. 学会等名 The 51st NIPS International Symposium, Frontiers in Epithelial Cell Biology（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Keisuke Ikawa, Shuji Ishihara, Kaoru Sugimura |
| 2. 発表標題 Molecular basis of vertex resolution during cell rearrangement. |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ikawa Keisuke, Sugimura Kaoru |
| 2. 発表標題 AIP1 and cofilin ensure a resistance to tissue tension and promote directional cell rearrangement. |
| 3. 学会等名 From Molecules to Organs: The Mechanobiology of Morphogenesis（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井川 敬介 |
| 2. 発表標題 アクチン細胞骨格系を中心とした細胞配置換え制御メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|-------|---|-------------------------------------|----|
| 研究協力者 | 杉村 薫 (Sugimura Kaoru) (50466033) | 東京大学・理学系研究科・准教授 (12601) | |
| 研究協力者 | 石原 秀至 (Ishihara Shuji) (10401217) | 東京大学・総合文化研究科・准教授 (12601) | |
| 研究協力者 | 田守 洋一郎 (Tamori Yoichiro) (10717325) | 京都大学・医学研究科・准教授 (14301) | |

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 |
|---------|---------|