

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16145

研究課題名（和文）Focal Adherence Junctionsに着目した形態制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the function of Focal adherens junction in morphogenesis

研究代表者

山田 壮平（Yamada, Sohei）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・特任助教

研究者番号：40815528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：組織や器官の形態は、一つ一つの細胞が生み出す接着力や張力、圧力などの細胞自身が生み出す機械的な力により制御されている。しかし、機械的な力の制御機構については、未だ不明な点が多く、これは生体組織を対象に、細胞が生み出す力を定量評価する手法がほとんどないため、その分子制御機構を同時に解析することが困難であったことに由来する。本研究では、Focal Adherens Junctions (FAJs)が、胚発生過程における力生成のメカニズムに関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、形態形成過程において、新たな細胞間の力学的相互作用の制御メカニズムが存在する可能性を示しているため、その制御メカニズム多くの研究分野に大きなインパクトを与えることができると考えている。また、本研究の成果は、「細胞の生み出す力に着目した細胞集団の形態制御」技術開発への展開が期待される。

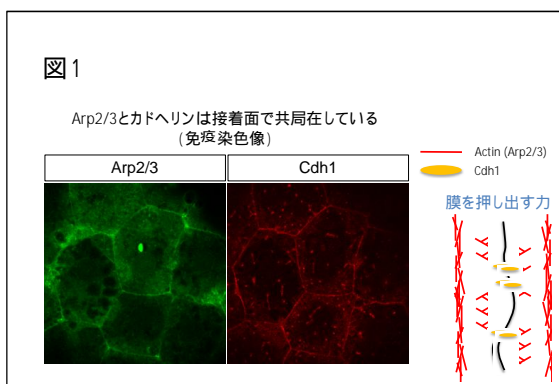
研究成果の概要（英文）：The shape of tissues and organs is regulated by mechanical forces generated by the cell, including tension and pressure. However, the cellular force generation mechanism is not fully understood because of the lack of a system for force evaluation. In this study, we analyzed this question by focusing Focal Adherens Junctions (FAJs) in zebrafish development, and showed the possibility that FAJs are involved in force generation in the development.

研究分野：発生生物学

キーワード：ライブイメージング フェムト秒レーザー 力学測定

1. 研究開始当初の背景

多細胞動物のからだ作りは、個々の細胞のもつ遺伝情報によって規定されると考えられており、実際に生物のかたち作りに関与する遺伝子群が数多く同定されている。一方で、組織や器官の形態が変化するのは、そこに機械的な力が働いているからであるが、どの程度の力が細胞で生み出されることで、かたちが変わり、細胞や組織の形態が決定されるのだろうか？ このような問いに答えるためには、細胞形態の分子制御機構だけでなく、細胞や組織の形態変化を生み出す力そのものを理解する必要がある。



申請者はこれまでに、高出力の近赤外フェムト秒レーザーを利用した操作技術と、原子間力顕微鏡 (AFM) を組み合わせることで、胚発生過程を対象に細胞間に働く力の定量評価手法や細胞操作技術を確立し、その力の分子制御機構を明らかにしてきた実績を持つ (Yamada et al., 2017, Yasukuni et al., 2018)。この手法を応用し、胚発生過程における細胞の形態変化を制御する機械的な力の定量評価を行えば、細胞の形態変化を生み出す力を理解できると考えた。

ゼブラフィッシュ胚発生初期に起こる Epiboly 運動では、球形である胚上皮組織 (EVL) の leading edge 側で、赤道面を囲うように形成されるアクトミオシンリングの収縮が EVL の形態変化の駆動力として働くことで、EVL が動物極側から植物極側へ引っ張られ、胚全体を覆う (Martin et al., 2009)。一方で、アクトミオシンの収縮力が作用しない動物極頂点付近の EVL 細胞では、形態変化を生み出す力は作用しないはずだが、leading edge 側細胞と同様に、細胞表面積を2倍程度まで拡大させることで、EVL が胚を覆うことに寄与している (Campinho et al., 2013)。このことは、Epiboly 運動過程には、アクトミオシンの収縮力に依存しない、EVL の形態変化を制御する未知のメカニズムが内包されていることを示唆している。

2. 研究の目的

Epiboly 運動過程における EVL 細胞の面積拡大を制御する分子メカニズムの探索を行うため、薬剤スクリーニングを行なった結果、アクチン繊維の分岐構造形成を制御する Arp2/3 阻害剤を処理すると、EVL の面積拡大が阻害されることを発見した。分岐構造を持つアクチン繊維は、細胞膜を押し出す力を発生することで細胞形態を制御することが知られており (Bieling et al., 2016)、実際に EVL における Arp2/3 の局在を観察すると、EVL 境界面で、細胞間接着分子 E-カドヘリン (Cdh1) と共局在していることが観察された (図1)。これらの結果から、申請者は、動物極側 EVL 細胞では、カドヘリンを介した細胞間接着を足場に分岐構造を持つアクチン繊維が、細胞の形態変化の駆動力を発生しているのではないかと考え、その制御機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

Focal Adherens Junctions (FAJs) とも呼ばれるこの接着構造は、細胞接着面における力学的相互作用の制御に関与する可能性が示唆されている (Efimova and Svitkina, 2018)。そこで、FAJs が、形態形成過程における力形成に関与するのが明らかにするため、Epiboly 運動過程における

EVL 形態変化の制御分子の解析と、フェムト秒レーザー照射時に発生する誘起衝撃力を利用し、細胞間に働く機械的な力の定量を行った。

4 . 研究成果

(1) まず、FAJs の制御に關与する Cdh1, Arp2/3 が EVL 形態制御、Epiboly 運動の制御に關与するか検証した。Epiboly 過程における EVL の形状を評価するため、EVL 特異的に Lifeact-GFP を発現するゼブラフィッシュ (Tg[Krt4-Lifeact-GFP]) を用いて、阻害剤処理及び、dominant negative form の過剰発現を行い、観察を行った。その結果、Cdh1, Arp2/3 の阻害条件ともに EVL の変形や、Epiboly 運動の阻害などが観察された。しかし阻害条件下では、胚全体大きく変形してしまい、EVL の変形が細胞間の力学的な相互作用による影響か判断することができなかった。組織全体で阻害を行うと、EVL 組織全体に与える影響が大きく、胚そのもの形態が変化する可能性が考えられる。そこで、方法を変更し、Cdh1、Arp2/3 阻害の影響を観察した。

(2) Cdh1、Arp2/3 阻害の影響を抑えるため、Krt4 のプロモーター下流に、蛍光タンパク質 mK02 と、Arp2/3、Cdh1 の dominant negative form を P2A 配列で繋いだプラスミドを導入し、EVL 特異的に、モザイク状に機能阻害を行った。mK02 を発現する機能阻害細胞と正常細胞との細胞の接着面を観察すると、阻害細胞側に細胞境界面がへこむことが観察された。タイムラプス画像を取得し機能阻害細胞を経時的に観察すると、正常細胞に囲まれる機能阻害細胞が基底面側に排除されることを発見した。mK02 のみをモザイク状に発現させたコントロール胚では、基底面側への排除は観察されないことから、機能阻害細胞が選択的に排除されることが明らかになった。これらの結果は細胞間力学相互作用の破綻が、細胞の排除を誘導することが示唆された。

(3) 工学分野では、対象の材料に対して穴を開け、この時生じた周囲の歪みから材料の持つ力学特性を評価することができる (Rendler et al., 1966)。この手法を生体組織の力学特性の測定に応用した生体組織は、バネで表現される弾性性質とダッシュポットで表現される粘性性質を併せ持つ粘弾性体としての性質を持つ。粘弾性は、細胞組織に穴あけを行った時に生じるひずみの時間変化を示す関数 $v = D(1 - e^{-t/\tau})$ の D (細胞間に働く荷重の大きさ)、 τ ($\tau = \text{粘性} / \text{弾性}$) を求めることで評価することができる。上皮シートに対してフェムト秒レーザーを用いたレーザーアブレーションにより、穴あけを行い、その変形の時間から D 値および τ 値を算出した。コントロール条件では、 D 値が -18.1 ± 7.4 であるのに対し、Arp2/3 阻害条件では、 14.7 ± 7.7 、Cdh1 機能阻害では 9.8 ± 1.9 と優位に増加していた。 τ 値に関しては、コントロール条件と機能阻害条件で優位な差は観察されなかった。これらの結果から、FAJs が細胞間の力学特性を制御する可能性が示唆された。

(4) D や τ は、粘弾性体における弾性と粘性の比を表した値であり、実際に上皮シートにかかる機械的な力 (応力) を測定したのではない。FAJs が細胞間に働く力の制御に關与する可能性が示唆された。フェムト秒レーザー誘起衝撃力を用い、細胞間にかかる応力を実測し、力が変化している変異体のスクリーニングを行う。高強度のフェムト秒レーザーを水溶液中に照射すると、集光点で微小な爆発現象が誘起され、周囲に圧力が作用する。このことを利用し、上皮シートを破壊後、破壊領域中心から細胞との境界面に衝撃力を発生させ、上皮シートの伸長と衝撃力を釣り合わせる。この時必要な衝撃力を測定し、発生する応力「 σ 」を実測した。野生型では、 0.98kPa の応力が発生していた。一方で、Arp2/3 阻害条件では 0.58kPa に減少していた。これら

の結果から、FAJs が実際に細胞間に働く力を生み出していることが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeuchi Y, Narumi R, Akiyama R, Vitiello E, Shirai T, Tanimura N, Kuromiya K, Ishikawa S, Kajita M, Tada M, Haraoka Y, Akiyama Y, Ishitani T, Fujioka Y, Ohba Y, Yamada S, Hosokawa Y, Toyama Y, Matsui T, Fujita Y	4. 巻 30
2. 論文標題 Calcium Wave Promotes Cell Extrusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 670 ~ 681.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2019.11.089	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 S.Yamada, Y.Bessho, Y. Hosokawa, T. Matsui
2. 発表標題 residual stress-mediated wound healing in zebrafish epithelia
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 壮平、別所 康全、細川 陽一郎、松井 貴輝
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ上皮組織の持つ粘弾性特性を利用した創傷治癒機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S.Yamada, Y.Bessho, Y. Hosokawa, T. Matsui
2. 発表標題 Tissue force-mediated wound healing in zebrafish epithelia
3. 学会等名 日本発生物学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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