

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770264
 研究課題名（和文） 上皮陥入機構の解析：M期進入にともなう細胞形態変化の新たな役割
 研究課題名（英文） Novel Role of mitotic cell rounding in epithelial invagination
 研究代表者
 近藤 武史（KONDO TAKEFUMI）
 独立行政法人理化学研究所・形態形成シグナル研究グループ・基礎科学特別研究員
 研究者番号：60565084

研究成果の概要（和文）：

動物細胞は分裂期に進入するとその形態を球形へと変化させる。本研究では、ショウジョウバエ胚の気管原基陥入過程において密に配置された間期細胞が周辺から陥入中心に向かって圧力を高め、中心細胞の分裂期球形化がその圧を解放することで上皮シートの急激な落ち込みを誘導し、陥入を加速することを明らかにした。これらの結果から、分裂期球形化が細胞分裂とは独立に上皮形態形成運動も制御することが示された。

研究成果の概要（英文）：

Animal cells change their shape into sphere upon mitotic entry. In this study, we revealed a novel active role of mitotic cell rounding in epithelial invagination of the *Drosophila* tracheal placode. Mitotic rounding, but not cell division, of the central cells in the placode is required to accelerate invagination, in conjunction with centripetal pressure from the surrounding cells. These results indicate that mitotic rounding regulates the epithelial tissue morphogenesis independent of its role in cell division.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：上皮形態形成，細胞分裂，分裂期球形化，ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

動物の体は連続する上皮組織から成り立っており、二次元的な上皮シートが折りたたまれていくことで複雑な三次元構造が形成される。つまり、生理機能を発揮する複雑な器

官の形成機構を理解するためには、上皮形態形成の原理を明らかにすることが必須である。

折りたたみなどの上皮シート変形の駆動力は個々の細胞の形態変化や運動により生み出される物理的な力である。細胞形態は主

に細胞骨格および細胞間の接着力により制御されている。そのため、組織変形に関する多くの研究では細胞がどのような骨格や接着構造を“構築”するのかに焦点が当てられてきた。

上皮形態形成には上皮組織の成長も必須であり、分裂による細胞の倍加が重要な役割を担っている。細胞分裂が等方向的に組織成長を促すだけではなく、組織内で分裂方向を一定にすることで組織成長の方向を規定し、組織の最終形態を制御することが知られている。細胞分裂は染色体分配と細胞質分裂により進行するが、これらは紡錘体や収縮管の形成等を伴うため、間期の細胞骨格構造を“破壊”し、再構築する必要がある。そして、その過程ではほぼすべての動物細胞は球形となる（M期球形化）。一方で、前述のように、組織変形のために細胞は特殊な細胞骨格を構築し、自身の形態を変える必要がある。つまり、M期進入により間期細胞骨格が再編成されることは形態変化中の細胞にとっては妨げであり、細胞分裂は組織に影響がない時期にのみと起こると考えられている。そのため、組織成長や最終形態制御における細胞分裂の役割とは対照的に、形態形成におけるM期球形化の積極的な役割についてはほとんど着目されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ胚の気管原基をモデルとして上皮陥入機構の解析を行った。ショウジョウバエは先駆的な遺伝学的、分子生物学的および薬理学的手法が利用でき、胚の上皮組織を細胞レベルでライブ観察することができるため、個体内で引き起こされる上皮形態形成運動を詳細に解析するための非常に有用なモデル生物である。

気管原基は40個程度の表皮細胞集団として規定され、胚発生中期に上皮性を保ったまま内部へ陥入し、上皮の管を形成する。また、中胚葉細胞を持たない変異体においても気管陥入は正常であるため、気管陥入は上皮組織自律的な機構により制御されていると考えられる。先行研究でのライブ観察により、①はじめは頂端収縮によりゆっくりとシートが湾曲し（第一段階）、その後陥入速度が上昇することで（第二段階）、管構造が形成されること、②第二段階への遷移と同時に、陥入の底においてM期に進入し球形化

する細胞が現れること、三次元的な細胞形態変化を観察したところ、中心の頂端収縮細胞が分裂期に進入しその形態を柱状から球状へと変化させていく過程と同時に、その頂端面が内部へ入り込んでいくことが観察されていた。さらに、③DNA合成阻害剤（Aphidicolin）を用いてM期進入を抑制することにより、陥入第二段階への遷移も阻害されること、一方で④微小管重合阻害剤（コルヒチン）を用いて、M期球形化は阻害せずに球形化後の細胞分裂を抑制した場合には、球形化と同時に第二段階に遷移する様子が観察された。③と④によりM期球形化と細胞倍加の役割を区別することが可能となり、細胞倍加ではなく、「M期球形化による細胞のダイナミックな形態変化により、上皮組織の深い陥入が誘導される」という新たな仮説が考えられた。本研究では、この仮説を検証し、制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

（1）DNA合成阻害剤による陥入運動の遅延が本当にM期進入阻害によるものであることを検証するために他の方法によるM期進入阻害を試みた。ショウジョウバエ胚発生期において、ほとんどの細胞は16回の分裂を行うが、気管原基陥入期に見られる分裂は最後の16回目にあたる。*Cyclin A* (*CycA*)変異体はサイクル16のG2期で停止すること、*dup^{α3}*変異体はサイクル16のS期が延長することにより、M期への進入が遅延することが知られている。そこで、これら二種類の変異体を用いることにより、M期進入阻害による気管原基陥入への影響を解析した。

（2）以前の報告により気管原基陥入にはEGFRシグナル系が重要な働きをしていることが明らかになっていた。EGFRシグナルの制御化で、陥入中心を取り囲むようにして細胞境界に非筋ミオシンIIが強く濃縮し、ミオシンの収縮力を介して、極性を持った細胞の配置換えが誘導される。その結果、陥入の動力源として中心への圧力が生成されていると考えられる（図参照）。一方で、EGFRシグナル伝達系が異常になる変異体（*Egfr*変異体、*rho*変異体）では頂端収縮は阻害されるが、気管原基細胞が細胞分裂と同時に内部へ入り込む様子が予備的に観察されていた。そこで、EGFRシグナル変異体における陥入過程に細胞分裂が関与するかを検証するために、*Egfr*

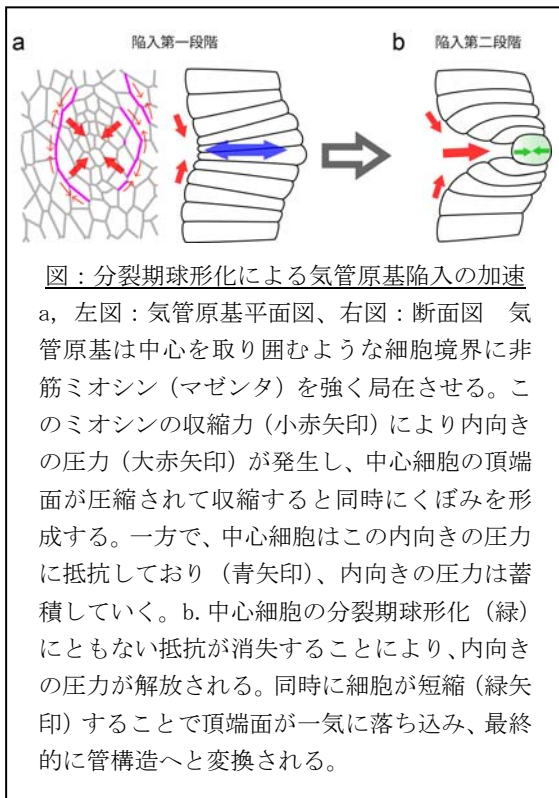
変異体および *rho* 変異体の陥入における個々の細胞動態を詳細に解析するとともに、*rho CycA* の二重変異体を作成し、その気管原基の振る舞いをライブ観察した。

(3) 以前の研究により転写因子 *Tracheless* (*Trh*) および *Ventral veinless* (*Vvl*) が発現することで気管原基細胞の運命が決まること、*trh* 変異体では気管形成が開始しないことが報告されている。また、*Trh*, *Vvl* の下流で *rho* の発現が誘導され、EGFR シグナル伝達系が活性化される。前述のように EGFR シグナルを欠失しても気管原基は陥入構造へと変換され、細胞分裂と同調して陥入している。一方で、気管原基以外の表皮細胞も分裂を行うが分裂後も平らな組織を維持しており、陥入することはない。つまり、陥入運動には *trh*, *vvl* に依存し、EGFR シグナルには非依存の未知の機構も関与していること、それが細胞分裂と同調した陥入を制御していることが考えられた。つまり、*trh vvl* 変異体で発現が変化し *rho* 変異体では変化しない遺伝子は細胞分裂による陥入に関与することが強く期待される。そこで、マイクロアレイにより正常個体、*trh vvl* 変異体、*rho* 変異体の気管原基陥入期におけるトランスクリプトームを比較し、*trh vvl* 変異体のみで発現変化を示す遺伝子のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) 気管原基陥入における細胞分裂の貢献を検証するために、*CycA* 変異体、*dup³* 変異体のライブ観察を行った。すると、第一段階は正常に開始するが、後の陥入が正常胚と比較して遅れることが明らかとなり、分裂期進入が陥入に積極的に寄与することが明らかとなった。一方で、これらの変異体では遅延するものの、遅れて陥入速度が上昇し、一見正常な管を作り出すことから、陥入を制御する未知の機構の存在が示唆された。

陥入を完了し一本の管となった気管原基は、周辺細胞から分泌される FGF に向かって走化性を示し、分岐する。FGF シグナルは陥入には寄与しないと考えられており、実際に FGF シグナル変異体のライブ観察を行っても陥入速度に異常は認められなかった。しかしながら、*CycA* と FGF の二重変異体を解析したところ、*CycA* 変異体と比較してさらに陥入が遅延し、管構造への変換にも異常をきたすこ



とが明らかになった。気管原基特異的に *CycA* を発現させ、分裂期進入を誘導することにより二重変異体の表現型が回復することから、気管原基細胞の分裂期進入が陥入加速および管構造への変換に必須であり、FGF シグナルは細胞分裂不全により遅延した陥入を補助するバックアップ機構として働くと結論した。また、気管原基の陥入は頂端収縮による第一段階のみでは不十分であると考えられた。

(2) EGFR シグナルによる内向きの圧力と球形化の関係を探るために EGF シグナル変異体において、分裂期に進入した細胞がどの位置で球形となるのかを観察したところ、変異体の気管原基は分裂期進入直前まで平面を維持し、さらに分裂期に進入したはじめの数細胞は頂端側で球形化した。この結果は球形化にともなう陥入の加速には EGF シグナルが必要であることを示しており、ミオシンを介した圧により球形化細胞が内部へ押し込まれていることを示唆している。また、UV パルスレーザーを用いた微小破壊実験により第一段階の中心細胞に物理的な摂動を与えると人為的な陥入加速が誘発されたことから、中心細胞は内部へ入り込もうとする力に拮抗していると考えられた。これらの事実から、以下のモデルが考えられた。①第一段階では円周状に局在するミオシンにより内向きの圧が生成されるが、柱状の中心細胞がそれに

抵抗するため、原基中心部に内向きの圧が蓄積して行く。②中心細胞が分裂期に進入し細胞骨格系の再編成が起こることにより抵抗が消失し、蓄積していた圧が解放される。③同時に球形化により細胞の背丈（頂端-基底軸の長さ）が短縮することで、上皮シートの急激な変形を引き起こされ、頂端面が一気に内部に入り込んでいく。この過程は工学分野で扱われる弾性体の座屈として理解する事ができる。このようにEGFシグナルによる平面圧力と分裂期球形化による耐力の低下が時空間的に協調して作用することで、スムーズな陥入が達成されていると考えられた(図参照)。

以前の報告で、EGFとFGFの両方を欠失した場合においても、気管原基は部分的に陥入できることが示されていた。この陥入に細胞分裂が関与するかを調べるために、EGF, FGFシグナルに加えて*CycA*変異も導入した三重変異体を作製し解析したところ、陥入構造は形成されず平らな頂端面を維持した。つまり、気管原基はEGF, FGFシグナルが活性化しない状況では、細胞分裂に依存して陥入していることが明らかとなった。前述したように、EGFシグナル変異体でははじめの分裂細胞は頂端側で球形となり、内部へ入り込まない。その後の気管原基の観察を続けたところ、引き続いて分裂期に入る細胞の一部が内部で球形化することで頂端面が落ち込んで行く様子が観察された。この内部で球形化する細胞は直前に頂端面が減少する傾向があり、これは先立って頂端側で球形化した細胞によって押されたためと考えられた。これらの結果から、周りから圧迫された細胞が内側で球形化するという正常胚と共通の機構により、頂端面の落ち込みが引き起こされていることが明らかになった。

また、EGFシグナルと*CycA*の二重変異体においては、通常FGFシグナルが働き分岐が始まる時期に気管原基が陥入を開始することも明らかになった。これらのことはEGFシグナル、細胞分裂、FGFシグナルはそれぞれ単独で、質の異なる機構を介して気管原基陥入の引き金を引きうることを示していた。

(3)細胞分裂により誘導される陥入運動に関与する未知の制御機構を明らかにするために、マイクロアレイを用いて野生型、*trh vv1*二重変異体、*rho bt1*(FGF receptor)二重変異体のトランスクリプトームを比較した。

それぞれから、気管原基陥入時期に対応するステージ10-11の胚約100匹よりRNAを抽出しマイクロアレイ解析を行ったところ、*trh vv1*変異体のみで発現が1.4倍以上減少する遺伝子を60個同定した。これらの中には既に*trh*によって発現が制御されていることが知られている遺伝子も含まれていた。また、陥入前の気管原基で発現することが知られている遺伝子の変異体をライブ観察により解析したところ、野生型と比較して陥入運動に異常がみられるものを一つ同定することができた。今後これら候補遺伝子の解析を進めることにより、なぜ気管原基は細胞分裂過程を経ることで陥入構造へと変換されるのか、さらには他の上皮組織はどのようにして平らな組織を保っているのかという問題を解決していくための重要なきっかけになることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination. Nature 査読有巻494, 2013, pp.125-129

[学会発表] (計12件)

① Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic cell rounding accelerates invagination of the Drosophila tracheal placode, CDB meeting, 2013年01月22-23日, RIKEN CDB, 兵庫県神戸市)

② Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination, The 10th Japanese Drosophila Research Conference, 2012年10月13-15日, The Jikei University School of Medicine 東京都

③ Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination, Exciting Biologies Forces in biology, 2012年10月04-06日, the Herbert Park Hotel, Dublin, Ireland

④ Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination, EMBO Conference

Series Morphogenesis and Dynamics of Multicellular systems, 2012年09月07-09日, EMBL Heidelberg, Germany

⑤ 近藤武史, 形態形成の現場を捉える - ショウシヨウハニエ気管原基陥入を例にして -, 第五回 evo-devo 青年の会, 2012年06月16日, 基礎生物学研究所 愛知県 岡崎市

⑥ Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic cell rounding accelerates invagination of the Drosophila tracheal placode, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, 2012年05月28-31日, Kobe International Conference Center The Kobe Chamber of Commerce and Industry 兵庫県 神戸市

⑦ Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic Cell Rounding Accelerates Invagination of the Drosophila Tracheal Placode, CDB Symposium2012, 2012年3月26-28日, RIKEN CDB (兵庫県)

⑧ Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic Cell Rounding Accelerates Invagination of the Drosophila Tracheal Placode, 53rd Annual Drosophila Research Conference 2012年3月7-12日, Sheraton Chicago Hotel & Towers, Chicago, UAS

⑨ Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic Cell Rounding Accelerates Invagination of the Drosophila Tracheal Placode, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月18-21日, ハニシフィコ横浜(神奈川県)

⑩ Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic Cell Rounding Accelerates Invagination of the Drosophila Tracheal Placode, Exciting Biology Series Cellular Development: Biology at the interface, 2011年9月29日-10月1日, RIKEN CDB(兵庫県)

⑪ Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic Cell Rounding Accelerates Invagination of the Drosophila Tracheal Placode, 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference, 2011年5月22-25日, Chientan Youth Activity Center, Taipei, Taiwan

⑫ Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mitotic Cell Rounding Accelerates Invagination of the Drosophila Tracheal Placode, 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2011年5月18-21日, Okinawa Convention Center(沖縄県)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

細胞分裂が組織陥入の引き金をひく
http://www.cdb.riken.jp/jp/04_news/articles/13/130125_invagination.html

組織形成における細胞分裂の新しい役割の発見
http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130114_1/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 武史 (KONDO TAKEFUMI)

独立行政法人理化学研究所・形態形成シグナル研究グループ・基礎科学特別研究員

研究者番号: 60565084

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし