

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02505

研究課題名(和文) 発生ロバストネスを支える細胞集団挙動の解明

研究課題名(英文) Genetic dissection of cell behaviors that ensure morphogenetic robustness

研究代表者

井垣 達史 (Igaki, Tatsushi)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：00467648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物の個体発生は、種々の攪乱のもとでも正確な組織・器官を形づくるロバストなシステムである。発生中の生体が様々な攪乱に対処して正常発生を維持する際、発生の時間軸に一時的な異常(時間軸の歪み)が生じ、これが何らかの機構で補正されることで発生ロバストネスが実現されると考えられる。本研究では、ショウジョウバエの発生過程で時間軸に歪みが生じた際、これを補正する細胞集団挙動「細胞ターンオーバー」が誘発されることを発見し、モルフォゲンWgや発生遅延によって誘発されるその分子基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の個体発生は、時間軸に沿った三次元構築のプロセスである。したがって、発生時間軸の異常は、組織・器官の正確な構築過程に重大な影響を及ぼしうる。本研究では、ショウジョウバエ変異体をモデルとして用いた解析により、発生過程で時間軸の異常が生じた際に組織中で細胞死と細胞増殖が亢進する「細胞ターンオーバー」が起こり、これにより正常発生が維持されること、またこの細胞ターンオーバーの分子機構を明らかにした。本研究は、発生ロバストネスを支える細胞間コミュニケーションの新たな概念を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Highly reproducible animal development is achieved by robust, time-dependent morphogenesis. To study the mechanisms underlying morphogenetic robustness, we analyzed the developmental process of *Drosophila Minute/+* mutants heterozygous for a ribosomal protein gene. We found that both cell death and compensatory cell proliferation are dramatically increased in the wing imaginal epithelium of *Minute/+* animals. This massive 'cell-turnover' plays an essential role in normal wing morphogenesis. We elucidated the mechanism underlying cell-turnover, which is induced by the morphogen Wg and developmental delay.

研究分野：遺伝学、細胞生物学

キーワード：発生ロバストネス 細胞間コミュニケーション 細胞死 形態形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞の基本的な機能や挙動が分子レベルで説明できるようになったが、細胞レベルで明らかになった個々の知見を集約するだけでは多細胞生命システムの動作原理を理解することはできない。すなわち、個々の細胞機能や細胞挙動がいかに相互連絡して細胞集団としての機能・挙動を生み出しているのかを理解する必要があるが、これら「細胞-細胞集団」をつなぐ分子基盤の理解はいまだ大きく欠落している。研究代表者はこれまで、細胞間の「競合」現象に着目し、「細胞-細胞集団」をつなぐ分子機構の解析を進めてきた。その過程で、細胞集団となって初めて成立する機能・挙動の発現機構を理解するには、生体内の様々な攪乱に対して細胞集団がその機能・挙動を柔軟に維持する頑健性(ロバストネス)のメカニズムを明らかにすることが重要であるという考えに至った。

多細胞生物の発生は、様々な攪乱のもとでもどうにかしてそのプロセスを正常に維持しながら最終的には必ず決まった形・大きさ・機能をもつ組織・器官を形作る、きわめてロバストなシステムである。この正常発生プロセスを脅かす攪乱としては、ゲノム DNA の突然変異に代表される内的な攪乱(内乱)と、生体内外の環境変化が引き起こす外的な攪乱(外乱)が存在する。遺伝的な内乱に対してロバストネスを発揮する機構としては、遺伝子重複やシャペロン分子の存在が知られる。一方、外乱に対するロバストネス機構としては、遺伝的多様性(遺伝子機能の多様性)やホルモン等によるシステミックな生体制御が知られる。ここで、発生中の生体が強い内乱や外乱に対処して正常発生を維持しようとする際、発生の時間軸に異常(歪み)が生じると考えられる。例えば、ショウジョウバエの発生過程において、成虫原基の一部に損傷が起こると組織はそれを直ちに修復するが、その間個体発生は一時的に中断される(Cell Cycle, 2012)。個体発生は時間軸に沿った精密かつ計画的な形作りのプロセスであり、その時系列の異常は発生過程に重大な破綻を引き起こしうる。つまり、生体はそのような時間軸の歪みを何らかの機構で補正することで正常発生を実現していると考えられる。研究代表者らは、ショウジョウバエの発生過程において種々の強い攪乱が生じた際、発生時間軸の歪みを補正することで発生ロバストネスを支える未知の細胞集団挙動(「細胞ターンオーバー」)が上皮組織中に誘発されることを見いだした(図1)。本研究では、この未知の細胞集団挙動の分子機構とその役割を明らかにすることで、発生ロバストネスを支える細胞間コミュニケーションの新たな概念の発見を目指した。

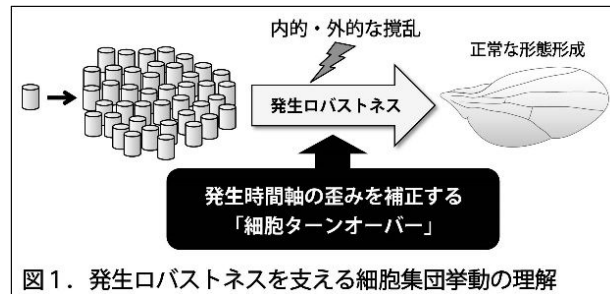


図1. 発生ロバストネスを支える細胞集団挙動の理解

2. 研究の目的

個体発生は、時間軸に沿った三次元構築のプロセスである。したがって、発生時間軸の異常は組織・器官の正確な構築過程に重大な影響を及ぼしうる。研究代表者らは、このような発生時間軸の異常と発生ロバストネスの関係を解析する目的で、ショウジョウバエ Minute 変異体に着目した。Minute 変異体とは、進化的に保存された一連のリボソームタンパク質遺伝子の機能欠失変異を「ヘテロ」にもつ変異体の総称である。興味深いことに、ショウジョウバエ Minute 変異体の発生過程では幼虫期において顕著な発生時間の遅延が起こるものの、最終的には正常な形・大きさ・機能をもった個体が形作られる(Dev Biol, 1975)。Minute 変異体の発生遅延が起こる幼虫期の各組織を詳細に解析したところ、翅原基の pouch 領域(将来翅のブレードを形成する領域)で大量の細胞死が起こっていることを見いだした。さらに、この細胞死をカスパーゼ阻害タンパク質 p35 により抑制すると、翅の形態形成異常が引き起こされることがわかった。すなわち、Minute 変異体の翅原基で誘導される大量の細胞死は、発生時間軸が歪んだ条件で正常発生を成し遂げるために必要なイベントであると考えられた。さらに興味深いことに、Minute 変異体の翅原基では大量の細胞死誘導に依存して細胞増殖が顕著に亢進していることを見いだした。このことは、翅原基中で「代償性増殖」が起こっていることを意味している。代償性増殖とは、細胞死を起こした細胞の周辺細胞が増殖を亢進して組織内の細胞数減少を代償する現象で、ショウジョウバエからマウスまで進化的に保存された現象であると考えられている。同様の細胞死/代償性増殖は、野生型ショウジョウバエ幼虫の複眼原基の一部に損傷や腫瘍形成を誘導して個体発生を一時的に中断させた場合にも引き起こされることがわかった。以上の予備的知見から、種々の原因により発生時間軸に歪みが生じたショウジョウバエ個体では、何らかの機構によって翅原基組織中に細胞死と代償性増殖による「細胞ターンオーバー」が誘導され、これが未知の機構を介して発生時間軸の歪みを補正し、正常な形態形成を実現していると考えられた。

以上の予備的知見に基づき、本研究ではショウジョウバエ幼虫期において種々の原因により発生時間軸に歪みが生じた際に「細胞ターンオーバー」が誘導される分子機構を明らかにするとともに、この細胞ターンオーバーが発生ロバストネスを実現させる分子基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Minute 翅原基の pouch 領域で引き起こされる細胞死の空間的パターンを詳細に解析したとこ

る、そのパターンが pouch 領域で発現するモルフォゲン Wingless (Wg ; Wnt ホモログ分子) の濃度勾配 (シグナル活性の勾配) に沿っていることが分かった。そこで、さらに翅原基中の Wg シグナル活性を解析したところ、Minute 変異体ではその活性が顕著に上昇している、つまり Wg シグナル活性の組織内分布が正常に比べてより急勾配になっていることが分かった。ここで、翅原基中で近接する細胞間で Wg シグナル活性に顕著な差が生じると、両者の間で「細胞競合」が起こり、Wg シグナル活性が相対的に低い細胞が競合の敗者となって細胞死を起こすことが知られている (Dev. Cell, 2011)。Wg シグナル活性がより急勾配になれば、近接する細胞間の Wg シグナル活性の差も増大することから、発生時間軸に歪みが生じた際に起こる細胞ターンオーバーは Wg シグナル活性の差が引き起こす細胞競合により駆動されている可能性が考えられた。そこで、Minute 変異体の翅原基において Wg シグナル活性の勾配を人為的に打ち消す実験を行った。具体的には、Wg は通常 pouch の D/V 境界に発現するが、Wg シグナル活性を D/V 境界で抑制する、あるいは pouch 領域全体で Wg を過剰発現させることで、Wg シグナル活性の勾配を消失させた。驚くべきことに、いずれの方法で Wg シグナル活性の勾配を消失させた場合にも、細胞ターンオーバーがほぼ完全に抑制された。以上の結果から、細胞ターンオーバーの誘導には、発生時間軸の歪みが引き起こす「Wg シグナル活性の急勾配化」が重要な役割を果たしていると考えられた。

以上の知見から、Minute 変異体の翅原基では D/V 境界上の Wg の発現量が高く、これに加えて個体発生速度の遅延 (細胞がシグナルを活性化している時間の延長) により Wg シグナル活性の絶対量の細胞間格差が増大し、これが細胞ターンオーバーを誘導している可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、細胞ターンオーバーを誘発する Wg 発現制御機構、およびそれによる細胞ターンオーバー誘発機構を遺伝学的に解析する。また、翅原基で起こる細胞ターンオーバーがどのような機構で発生時間軸の歪みの補正 (正常な形態形成の実現) に寄与するのかを解析するため、Minute 変異以外で細胞ターンオーバーを引き起こしうる内乱 (遺伝子の突然変異) を網羅的に探索し、細胞ターンオーバーを誘発する攪乱の共通メカニズムを遺伝学的に解析する。このような内乱の探索には、一連の P 因子挿入ショウジョウバエ系統ライブラリー (約 3,000 系統) を利用する。具体的には、一連の P 因子挿入変異をヘテロにもつ系統の翅原基 pouch 領域にカスパーゼ阻害タンパク質 p35 を発現させる。P 因子挿入変異による内乱が細胞ターンオーバーを介して補正されている場合、細胞死の抑制により形態形成異常が起こる。つまり、成虫翅の形態異常を指標にすることで、細胞ターンオーバーを引き起こす突然変異を網羅的に探索することが可能となる。

4. 研究成果

まず、ショウジョウバエ Minute 変異体の翅原基において Wg の発現が上昇するメカニズムを遺伝学的に解析した。その結果、翅原基の D/V 境界上での Wg 発現量はがん抑制経路 Hippo 経路の標的転写共役因子である Yorkie (Yki) の活性に強く依存していることがわかった。さらに、Minute 変異体の翅原基では Yki 活性が顕著に亢進していることがわかった。すなわち、この Yki 活性上昇により Minute 変異体の翅原基で Wg 発現量が上昇していることが明らかになった。続いて、Minute 変異体で Yki 活性が上昇するメカニズムの解析を進めたところ、翅原基でエクダイソンシグナルが上昇し、これが Yki 活性の上昇を引き起こしていることがわかった。さらに、このエクダイソンシグナルはストレスキナーゼである JNK シグナルを活性化し、その標的遺伝子の 1 つであるインスリンペプチド Dilp8 の発現誘導を引き起こすこともわかった。Dilp8 はエクダイソンの発現制御を介してショウジョウバエ幼虫の発生遅延を引き起こす分子であり、この経路によって Minute 変異の発生速度が遅延し Wg シグナル活性の絶対量の細胞間格差が増大すると考えられた。

以上の解析により得られたモデルを検証するため、細胞ターンオーバーを遺伝学的に再構成

することを試みた。具体的には、Wg の発現上昇と幼虫期の発生遅延を同時に誘導した野生型 (あるいは Minute 以外の変異体) ショウジョウバエの翅原基において、細胞ターンオーバーが誘導されるかどうかを解析した。Wg の発現上昇は、wg 遺伝子のプロモーターを用いた wg 強制発現により誘導した。また発生遅延は、エクダイソンを産生できない変異酵母 (erg2 変異) を用いて作成した餌で幼虫を飼育する、あるいは発生遅延を起こす ecdysoneless 変異体を用いて行った。その結果、いずれの方法で Wg の発現上昇と幼虫期の発生遅延を誘導した場合にも、翅原基において細胞ターンオーバーが誘発されることがわかった。以上の結果から、Minute 変異体の翅原基において引き起こされる Wg 発現上昇と発生遅延が協調することで細胞ターンオーバーが起こること、またこの細胞ターンオーバーが Minute 変異体において正常な翅の形態形成を実現するために必須であることがわかった (図 2)

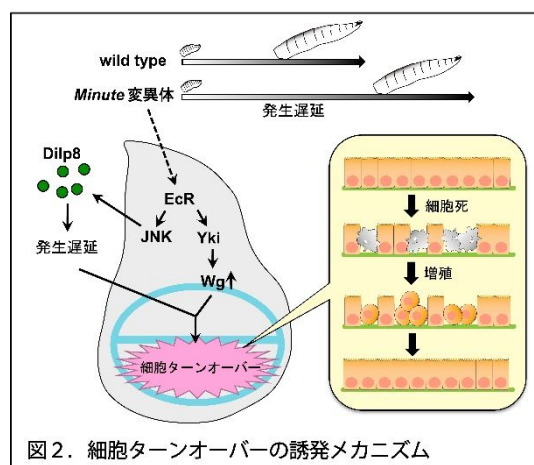


図 2. 細胞ターンオーバーの誘発メカニズム

(論文投稿中)

一方、細胞ターンオーバーがどのようなメカニズムで発生時間軸の歪みを補正するのかを理解するため、細胞ターンオーバーを引き起こしうる遺伝子変異の遺伝学的スクリーニングを行い、RhoGEF タンパク質をコードする pebble 遺伝子をヘテロに欠失したショウジョウバエの翅原基において、カスパーゼ阻害タンパク質 p35 を強制発現させると翅形成異常が引き起こされることを見いだした。そこで、pebble 遺伝子ヘテロ変異体の解析を進め、翅原基において実際に細胞ターンオーバーが起こっていること、またこの現象が JNK 依存的事であること、さらにこの現象に細胞分裂軸の異常が関与する可能性を見いだした。さらに、Minute 変異体において Yki 遺伝子をヘテロに欠失させると翅の形態形成に顕著な異常が起こることを見いだし、この現象も JNK 活性化によって起こる大量の細胞死が原因であることを見いだした。そこで、Minute 変異体において Yki 活性が発生ロバストネス向上に貢献するメカニズムを解析した。その結果、Yki により発現誘導される DIAP1 が Dronc 活性を抑制することで、Droc 依存的な JNK 活性化が抑制され、これにより細胞死が阻害されることで正常な形態形成が引き起こされることがわかった(投稿準備中)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Nagata R and Igaki T. | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Cell competition: Emerging mechanisms to eliminate neighbors | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Dev Growth Differ | 6. 最初と最後の頁 522-530 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12575 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Akai Nanami, Igaki Tatsushi, Ohsawa Shizue | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Wingless signaling regulates winner/loser status in Minute cell competition | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Genes to Cells | 6. 最初と最後の頁 234 ~ 240 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12568 | 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 Vaughen J and Igaki T | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Slit-Robo Repulsive Signaling Extrudes Tumorigenic Cells from Epithelia | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Developmental Cell | 6. 最初と最後の頁 683-695 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2016.11.015 | 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21件（うち招待講演 7件／うち国際学会 9件）

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 井垣達史 |
| 2. 発表標題 細胞競合による上皮の恒常性維持機構 |
| 3. 学会等名 第17回細胞幹シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Wada Y, Ohsawa S, Igaki T |
| 2. 発表標題 Yorkie ensures morphogenetic robustness during Drosophila wing development |
| 3. 学会等名 26th European Drosophila Reserch Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Igaki T |
| 2. 発表標題 Mechanism of tumor-suppressive cell competition |
| 3. 学会等名 Keystone Symposia Cell Competition in Development and Disease (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nakamura M, Igaki T |
| 2. 発表標題 Dissecting JNK-mediated cell elimination in Drosophila |
| 3. 学会等名 59th Annual drosophila research conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Igaki, T |
| 2. 発表標題 Tumor Suppression and Epithelial Maintenance by Polarity-Mediated Cell Competition |
| 3. 学会等名 Gordon Research Conference on Cell Polarity Signaling (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yayoi Wada, Shizue Ohsawa, Tatsushi Igaki |
| 2. 発表標題 Hippo-mediated morphogenetic robustness during <i>Drosophila</i> wing development |
| 3. 学会等名 第70回細胞生物学会・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 Yukiko Inui, Shizue Ohsawa, Tatsushi Igaki |
| 2. 発表標題 Genetic analysis of cell death-mediated robust coordination of tissue growth in <i>Drosophila</i> |
| 3. 学会等名 第70回細胞生物学会・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 Yayoi Wada, Shizue Ohsawa, Tatsushi Igaki |
| 2. 発表標題 Hippo-mediated morphogenetic robustness during <i>Drosophila</i> wing development |
| 3. 学会等名 The 13th Japanese <i>Drosophila</i> Research Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yukiko Inui, Shizue Ohsawa, Tatsushi Igaki |
| 2. 発表標題 Genetic analysis of cell death-mediated robust coordination of tissue growth in <i>Drosophila</i> |
| 3. 学会等名 The 13th Japanese <i>Drosophila</i> Research Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nanami Akai, Shizue Ohsawa, Tatsushi Igaki |
| 2. 発表標題 Epithelial cell-turnover ensures robust tissue growth in Drosophila ribosomal protein mutants |
| 3. 学会等名 The 13th Japanese Drosophila Research Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 井垣達史 |
| 2. 発表標題 細胞ターンオーバーによる組織成長制御の遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第50回日本発生物学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 乾由希子、大澤志津江、井垣達史 |
| 2. 発表標題 細胞ターンオーバーを介した発生ロバストネス機構の遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大澤 志津江、赤井 菜々美、井垣 達史 |
| 2. 発表標題 細胞ターンオーバーを介した発生ロバストネスの遺伝的基盤 |
| 3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 乾由希子、大澤志津江、井垣達史 |
| 2. 発表標題 細胞ターンオーバーを介した発生ロバストネス機構の遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第26回日本Cell Death学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 乾由希子、大澤志津江、井垣達史 |
| 2. 発表標題 細胞ターンオーバーを介した発生ロバストネス機構の遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第29回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 乾由希子、大澤志津江、井垣達史 |
| 2. 発表標題 細胞死を起点とした発生ロバストネス機構の遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ohsawa S Akai N, Igaki T |
| 2. 発表標題 Epithelial cell-turnover ensures morphogenetic robustness in Drosophila |
| 3. 学会等名 Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologist (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Igaki T |
| 2. 発表標題 Epithelial cell-turnover in Minute animals: a possible role of cell competition in morphogenetic robustness |
| 3. 学会等名 Cell competition meeting 2016 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Wada Y, Ohsawa S, Igaki T |
| 2. 発表標題 The Hippo-mediated morphogenetic robustness during Drosophila wing development |
| 3. 学会等名 第12回 日本ショウジョウバエ研究会 (JDRC12) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井垣達史、中村麻衣、大澤志津江 |
| 2. 発表標題 Epithelial cell-turnover ensures morphogenetic robustness in Drosophila |
| 3. 学会等名 第68回日本細胞生物学会・第11回日本ケミカルバイオロジ ー学会 合同大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 乾 由希子、大澤 志津江、井垣 達史 |
| 2. 発表標題 ロバストな形態形成を支える「細胞ターンオーバー」の遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第68回日本細胞生物学会・第11回日本ケミカルバイオロジ ー学会 合同大会 |
| 4. 発表年 2016年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院生命科学研究科システム機能学分野井垣研究室HP
<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/genetics/>

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