

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K07349

研究課題名(和文) ショウジョウバエ初代培養血球細胞で観察される細胞キラリティの形成機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of cell chirality formation mechanisms in Drosophila primary cultured macrophage

研究代表者

笹村 剛司 (Sasamura, Takeshi)

大阪大学・理学研究科・講師

研究者番号：70647487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々の体と同様に、ひとつの細胞にも左右性があることが近年の研究より明らかになってきており、細胞キラリティと呼ばれる。細胞キラリティは、内臓の左右非対称な形を作る際に、重要であることが示唆されているが、どのようにして細胞キラリティが形成されるのかはほとんど明らかになっていない。研究代表者は、この細胞キラリティが、どのように形成されるかを細胞内の分子のふるまいから明らかにした。細胞のかたちをかえるのにはアクチンと呼ばれる繊維状のタンパク質が重要であるが、このアクチンが、方向性をもって動くことが、細胞キラリティを作る際の原動力になっていることを、世界で初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々人の内臓はほとんどが左右非対称な形をしており、内臓が機能するためにその形が必要であることが多い。そのため、再生医療などの最先端の治療には、形態がどのようにしてつくられるかを知ることが必要不可欠であるが、その機構は不明な点が多く残されている。今回の結果は細胞の左右性をつくる仕組みを明らかにしており、それを制御することで、内臓の左右非対称な形態をつくりだす方法に繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been revealed that individual cells have a property which shows left-right asymmetry, and this property is called cell chirality. It is suggested that cell chirality is important for formation of left-right asymmetry of internal organs, but the mechanisms generating cell chirality is not understood well. We revealed that the mechanism of cell chirality generation at molecular levels. It is well established that actin filament is important for cell shape change, and we found the movement of actin filament is important for generation of cell chirality for the first time.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞キラリティ アクチン細胞骨格 左右非対称性 ショウジョウバエ マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物細胞は組織の形成や維持のために細胞極性を形成し、その異常は様々なヒトの疾患につながる。細胞極性として、近年同定された新規の細胞極性が細胞キラリティである。細胞キラリティは、分子のキラリティと同様に、鏡像体が元の画像に重ならない性質の総称として用いられている。

研究代表者の所属する研究室では、生体内における細胞キラリティと、このキラリティが後腸の一定方向の捻転により左右非対称な組織の変形に機能していることを、2011年に世界で初めて報告した。また、細胞キラリティは脊椎動物の様々な種類の細胞で報告があり、細胞キラリティが進化的に保存されている可能性を示唆している。しかしながら、細胞キラリティの形成機構はアクチン細胞骨格が関与していることが知られているだけで、詳細はよくわかっていない。

以上の背景から、研究代表者は、細胞キラリティの形成機構を明らかにするためには、時間的・空間的に、高精度で細胞を観察できるシステムが必要であると考え、ショウジョウバエのマクロファージで細胞キラリティを検索することにした。GAL4-UAS システムにより核と中心体を標識し、ショウジョウバエ3令幼虫より取り出したマクロファージを初代培養、ライブイメージングを行った。その結果、中心体が核のまわりを時計方向に回転する細胞が有意に多いという新規の細胞キラリティを同定した。

2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえて、研究代表者が新規に同定したショウジョウバエマクロファージの中心体の細胞キラリティがどのように形成され、また制御されているのかを分子レベルで明らかにすることにより、他の生物でもいまだ形成機構の不明瞭な細胞キラリティの形成機構の全体像を解明していく。さらに、その分子機構から細胞キラリティの新たな生体内での機能を推察し、解明していくことが研究目的である。

3. 研究の方法

(1) 画像処理解析によるアクチンフィラメントの動きのキラリティの検出

細胞キラリティの形成にはアクチン細胞骨格が重要であることが、いくつかの研究で報告されている。そこで研究代表者はアクチンフィラメントの動きに回転成分が含まれており、それによってキラリティが生じている可能性を考えた。しかし、細胞内のアクチンフィラメントは細胞膜に裏打ちする形で密な網目状構造をしており、通常の方法では、その移動方向を決めることができない。そこで研究代表者は、オプティカルフローと呼ばれる画像処理によってアクチンフィラメントの動きを決定することにした。オプティカルフローは画像処理による動きの検出方法として、確立された方法であり、これをマクロファージのアクチンフィラメントのタイムラプス動画に応用して解析を行った。

(2) 阻害剤および RNA 干渉法による細胞キラリティ制御機構の解析

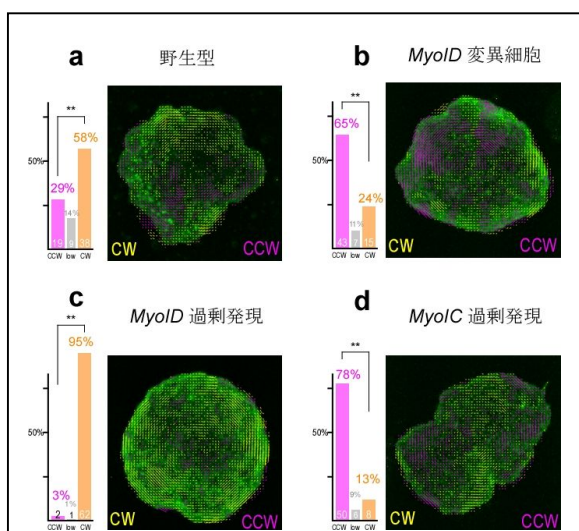


図1 アクチンフィラメントの回転方向。黄色は時計回り、紫は反時計回りを示す。(a)野生型、(b) MyoID 変異体、(c) MyoID 過剰発現、(d) MyoIC 過剰発現細胞における細胞全体としてアクチンがどちらに回転していたかを割合で示したグラフとの割合と、その細胞内の回転方向の例。中心体と同様に野生型は時計回り、MyoID 変異細胞と MyoIC 過剰発現細胞は反時計回り、MyoID 過剰発現細胞はより強い時計回りのキラリティが観察された。

細胞キラリティの形成にはアクチン細胞骨格が重要な機能を果たしていることが明らかになっている。アクチン細胞骨格は多様な機能を持つが、それらは多くのアクチン制御分子が機能することによって成し遂げられている。しかし、どのような分子がアクチン細胞骨格を制御することで細胞キラリティを制御しているかは不明瞭である。そこで、細胞キラリティを形成・制御している分子を明らかにするために、代表的なアクチン制御分子の機能を機能阻害剤の添加および RNA 干渉法により阻害し、細胞キラリティに異常が生じるかを観察することで、キラリティを制御する分子を同定した。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエマクロファージのアクチンフィラメントの動きにキラリティがある

ショウジョウバエマクロファージのアクチンフィラメントの動態を調べるために、アクチンフィラメントを可視化する Lifeact-GFP をマクロファージ特異的に発現させ、アクチンフィラメントを15秒おきに超解像度顕微鏡 LSM880 を用いてタイムラプス動画を撮影した。撮影した画像を Python および OpenCV によるオプティカルフロー計算を

用いてアクチンフィラメントの動きを決定し、その動きのうち、回転成分のみを計算により算出、積算することで、細胞全体で時計方向と反時計方向のどちらの回転成分が強いかを算出した。その結果、中心体のキラリティと同様の時計回りに回転している細胞が有意に多いことが明らかになった（図1）。ショウジョウバエ後腸の上皮細胞のキラリティは2種類のI型ミオシンであるMyoIDとMyoICによってその方向が決定されていることが知られている。そこで、MyoID突然変異体、MyoIDおよびMyoIC過剰発現細胞で、アクチンフィラメントの回転を計算したところ、後腸の捻転方向および中心体の回転方向と同様のキラリティの変化が観察された（図1）。すなわち、MyoID過剰発現細胞で、野生型よりも強い時計方向のキラリティが観察され、反対にMyoID変異細胞とMyoIC過剰発現細胞ではキラリティが反転しており、反時計回りの回転を示す細胞が有意に多かった。さらに、中心体とアクチンフィラメントの動態を同時に撮影し、その動きの相関を求めたところ、正の相関があることがわかった。以上の結果から、我々は、細胞のアクチンフィラメントの動きに回転成分が含まれており、その動きにより、細胞内の回転成分が生じ、中心体の一方向への回転を生じさせていると考えている。

(2) アクチンフィラメントの回転成分は細胞内で一様ではない

、アクチンフィラメントの動態の解析により、細胞キラリティがどのように生じてくるのかの手がかりが明らかになった。アクチンの回転成分は細胞内で均一には存在せず、パッチ状に時計回りと反時計回りの部分が混在していることがわかった（図1）。しかも、このパッチ状の回転成分は同じ場所にとどまっているのではなく、動的に変更されることがわかった。以上の結果は、これまで考えられていた、細胞ごとに決まったキラリティがあるのではなく、それぞれの細胞内に、パッチ状にキラリティが混在しており、その総和としてそれぞれの細胞のキラリティが決定されているまったく新しいモデルを打ち出すことができた。

(3) I型ミオシンはアクチンフィラメントの動きを促進する

I型ミオシンであるMyoIDとMyoICはキラリティ形成において反対の機能を持っており、MyoIDは時計回り、MyoICは反時計回りのキラリティを誘導する。しかし、どのようにしてMyoIDとMyoICがキラリティを生じるのかについては不明であった。そこで、MyoIDおよびMyoICの過剰発現細胞のアクチンの動きの大きさを、オプティカルフローにより算出し、野生型の細胞でのアクチンフィラメントの動きの大きさを比較した。その結果、どちらの場合でも、アクチンフィラメントの動きの大きさは、過剰発現により、大きくなった。このことは、ふたつのI型ミオシンが、キラリティを生み出す、回転の力だけではなく、通常のアクチンフィラメントの動きであるレトログレードフローを促進させていることが明らかになった。したがって、これらの結果は、MyoIDとICがアクチンフィラメントを直接または間接的に動かすことによって、キラリティを生み出していることを示唆している。

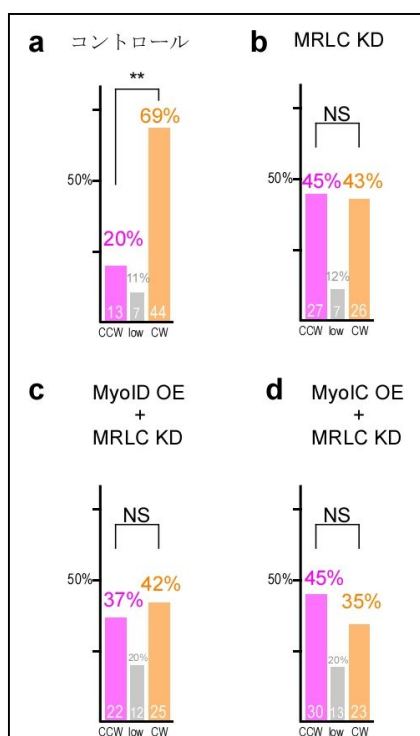


図2 MyoIIのノックダウン実験。黄色は時計回り、紫は反時計回りを示す。(a)コントロール、(b)MyoIIノックダウン、(c)MyoID過剰発現細胞でMyoIIのノックダウン、(d)MyoIC過剰発現細胞でMyoIIのノックダウン。細胞全体としてアクチンがどちらに回転していたかを割合で示したグラフとの割合。MyoIIのノックダウンにより、MyoID、MyoIC過剰発現の表現型は抑制される（図1参照）。

(4) II型ミオシンの機能がキラリティの形成に重要である

これまでの結果から、アクチンフィラメントの動きのキラリティにはI型のミオシンが重要であることが明らかになった。しかし、I型ミオシンだけではキラリティの形成を十分には説明できない。MyoIDとMyoICの二重突然変異体でも、キラリティがなくなることが知られているためである。そこで、キラリティの形成に関わる他のアクチン制御因子を同定するために、アクチン制御因子の阻害剤を用いて、マクロファージの中心体のキラリティを観察した。その結果、II型ミオシンのキラリティへの関与が示唆されたため、確認のためにII型ミオシンのサブユニットである調節軽鎖に対する二本鎖RNAをマクロファージに発現し、その効果を確認した。その結果、中心体とアクチンフィラメントのキラリティの両方が、キラリティが失われ、方向がランダム化した（図2a,b）。以上の結果から、I型に加え、II型ミオシンもキラリティの形成に重要であることが明らかになった。

(5) I型ミオシンのキラリティ制御にはII型ミオシンが必要である

キラリティの形成にI型とII型の両方のミオシンが必要であることが明らかとなり、次にそれらの関係性を調べることにした。MyoIDをマクロファージに過剰発現すると、

ほとんどの細胞のアクチンフィラメントの回転方向が時計回りになる。そこで、Myo1D 過剰発現細胞で II 型ミオシンのノックダウンを行ない、アクチンフィラメントの回転方向を決定した結果、Myo1D 過剰発現の効果が消失し、野生型細胞で Myo1I をノックダウンした場合と同じく、回転方向がランダム化した(図 2、図 1)。同様に、Myo1C の過剰発現の効果は、Myo1I のノックダウンにより消失した。以上の結果は Myo1D と IC の機能に Myo1I が必要であることを示しており、Myo1D と IC の下流で Myo1I が機能していることを示唆している。Myo1I のキラリティへの関与はまったく知られておらず、また I 型ミオシンの機能に必要なことについても、報告はなく、どちらもキラリティの形成に関する重要な新規の発見となる。

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 Inaki Mikiko, Sasamura Takeshi, Matsuno Kenji	4. 巻 6
2. 論文標題 Cell Chirality Drives Left-Right Asymmetric Morphogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2018.00034	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笹村剛司
2. 発表標題 Actin cytoskeleton generates cell chirality in <i>Drosophila</i> macrophages
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹村 剛司、栗栖 大祐、須志田 隆道、秋山 正和、大友 康平、根本 知己、水野 裕昭、渡邊 直樹、三好 洋美、金子 新、松野 健治
2. 発表標題 ショウジョウバエ血球細胞のキラリティはアクチン細胞骨格によって形成 される
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Sasamura, Daisuke Kurisu, Masakazu Akiyama, Kohei Otomo, Tomomi Nemoto, Hiroaki Mizuno, Naoki Watanabe, Hiromi Miyoshi, Arata Kaneko, Kenji Matsuno
2. 発表標題 Chirality in the dynamic behavior of blood cell cytoplasm in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 日本発生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Sasamura, Daisuke Kurisu, Masakazu Akiyama, Kohei Otomo, Tomomi Nemoto, Hiroaki Mizuno, Naoki Watanabe, Kenji Matsuno
2. 発表標題 Chirality in the dynamic behavior of blood cell cytoplasm in Drosophila
3. 学会等名 日本細胞生物学会・日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹村剛司・栗栖大祐・秋山 正和・大友 康平・根本 知己・水野 裕昭・渡邊 直樹・松野健治
2. 発表標題 シヨウジョウバエ血球細胞が示す細胞質動態のキラリティ
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹村剛司・栗栖大祐・秋山 正和・松野健治
2. 発表標題 シヨウジョウバエ血球細胞が示す細胞質動態のキラリティ
3. 学会等名 日本動物学会 第88回 富山大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹村剛司・栗栖大祐・秋山正和・大友康平・根本知己・水野裕昭・渡邊直樹・松野健治
2. 発表標題 Chirality in the dynamic behavior of blood cell cytoplasm in Drosophila
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017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
---------	---------