

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）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：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570195

研究課題名（和文） 細胞間接着に依存しない始原的な上皮極性形成の機構

研究課題名（英文） Mechanism of primitive polarity formation in epithelial cells independent of cell-cell contact

研究代表者

米村 重信 (YONEMURA SHIGENOBU)

独立行政法人理化学研究所・電子顕微鏡解析室・室長

研究者番号：60192811

研究成果の概要（和文）：

上皮細胞の極性の分子機構の解明を目指した。さまざまな極性に関与する遺伝子やアクチン・ミオシン張力発生に関与する遺伝子などのノックダウンにより、従来知られていた因子の重要性は確認され、また上皮極性に沿った細胞間接着装置の位置決めによりミオシンモーターの活性が重要であること、細胞外基質の偏りは上皮極性形成には不要であるが、極性を一方向に揃えるためには重要であることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

I aimed elucidation of the molecular mechanism of polarity formation of epithelial cells. By knocking down a number of genes known to be involved in polarity formation or in force generation through actomyosin interaction, I confirmed the roles of the known factors. Furthermore, I found that myosin motor activity is important for positioning of the cell-cell junctions according to the polarity. Moreover, positional cues from the ECM are not required for establishment of the epithelial polarity but important for alignment of the polarity of each cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：上皮細胞、極性、ミオシン、細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は生体の外側と内側を区切るシートを作る細胞であり、その細胞膜は生体の外側に接する面と内側に接する面とで組成が異なっており、細胞内の構造にも偏りが出来ていて、それは上皮極性と呼ばれている。この上皮極性は上皮シートの機能に本質的に重要なものである。細胞間接着装置も上皮極性に沿って作られており、細胞間接着装置の形成は上皮シートが生体の外側と内側とを区切る漏れないバリアとして機能するために必須であるため、上皮極性に細胞間接着装置形成が必須であるという考えが強かった。しかし、いくつかの報告はそれと異なり、私たちも細胞間接着装置を形成できない上皮細胞においても上皮極性が見られることを見出していた。それは細胞接着に必須な α カテニンの発現が見られない R2/7 という上皮由来の細胞である。上皮極性ができていることを細胞間接着装置の形成で判断するという研究が多かったが、それでは上皮極性ができていないのか、細胞間接着装置の形成のみができていないのか、区別することができない。R2/7 細胞を使用することにより、細胞間接着装置の関与から逃れて純粋に上皮極性を研究できると考えられた。

2. 研究の目的

これまで上皮極性に重要であるとされてきた因子について、極性形成そのものに重要なのか、単に細胞間接着装置形成にのみ重要なのかについて、もともと細胞間接着装置を形成しない R2/7 細胞を用いて明瞭な結論を得る。またそれぞれの因子がどのように重要であるのかについても知見を得る。さらに他にも上皮極性に重要な因子について理解を深める。

3. 研究の方法

R2/7 について、その上皮極性を示す局在化したタンパク質についてできるだけ多くものを見出す。Par3, Cdc42, Crumbs, ROCK1, II, myosin II-A, -B などについて検証する。

これまでに知られている様々な上皮極性関連因子については RNAi を用いた遺伝子ノックダウンの方法を用いる。

極性化の動的な側面を観察するために、ミオシンやアクチンの動態を GFP 融合蛋白などを R2/7 に発現させ、安定発現株を単離し、ライブイメージングを行う。

4. 研究成果

(1) まず、R2/7 細胞におけるアピカル、バソラテラル、細胞接着装置マーカーの局在を決

定し、R2/7 細胞が α カテニンを発現しないために接着装置は作ることができないものの極性を確立していることを示すと同時に、使いやすい抗体を選び出すことを試みた。アピカルマーカーとして、PKC zeta, ezrin については R2/7 の頂部に帽子状に濃縮することがわかった。また、微細構造的にもアピカル面特有の短い、均一な太さ、長さの微絨毛が生えていることが走査電顕によって確認された。Cdc42, Crumbs についてはアピカルマーカーとも考えられるが、実際にはアピカルとバソラテラルの境界に濃縮していた。バソラテラルマーカーとして Scribble と Na⁺/K⁺ ATPase は頂部よりも下の領域の膜に局在し、R2/7 細胞が膜領域に関して明瞭に極性を持っていることを示すことができた。またその境界には ZO-1, afadin, Par3, occludin など、細胞接着装置を形成する因子が濃縮していることがわかった。Par6, syntaxin 3, PTEN, Lgl, KLB1 については市販の抗体を用いても正しいと確信できる染色は得られていない。

(2) 極性化に必要であると既に他の系で報告されている遺伝子に関してノックダウンを試みた。まず、Par 複合体

(Par6/aPKC/Par3/Cdc42)についてノックダウンを行った。どの遺伝子のノックダウンを行っても結果はほぼ同じで、細胞のアピカル面が小さくなり消失した。R2/7 細胞は極性形成に関して感受性が高く、この研究に適した材料であることがわかった。Basolateral 形成に重要と考えられる、Lgl のノックダウンでは apical 面の増大が見られた。そのとき細胞が扁平化するので、細胞内のミオシンの活性が apical 面積の調節に重要化と考え、ミオシン II やそのリン酸化を行う ROCK のノックダウンも行ったところ、ミオシン II が存在しなければ、あるいはミオシン II のリン酸化が効率よく起こらなければ、apical 面積が広がって行くことがわかった。

(3) また、別の観点から、apical と basolateral とのバランスを調節しうる要因として膜輸送による細胞膜の挿入、取込みについても検討をおこなった。16°C と言う低温の処理を行い、エンドサイトシスは起こるがエキソサイトシスとリサイクリングとを抑制された状態にすると apical 面積は小さくなった。これは apical 面でのエンドサイトシスとエキソサイトシスが apical 面積の調節に重要であるが、エキソサイトシスが阻害されたためにエンドサイトシスが優勢となり、apical 面積が小さくなったと解釈される。さらに R2/7 では分裂期に入ると明確な極性が見られなくなるということがわかった。これらの特徴は R2/7 に α カテニンを導入し、正常な上皮シートを形成できるようにした細胞では全く見られ

ず、細胞間接着は上皮極性を乱すようなさまざまな要因に対して、極性の保持を支える役割があるということが明確になった。

上皮極性に強く関わる因子について、さらに知るためには網羅的な RNAi をする必要があり、それは予算の点で現段階では不可能である。そのため、上皮極性の性質をさらに追求する実験を行った。

(4) R2/7 細胞を培養プレートに吊るした液滴の中で培養すると、重力に従って細胞が液滴の底である、培養液と空気との界面に集合する。その界面は固い基質ではない。このとき、R2/7 細胞は、一つ一つがめいめい勝手な方向に極性を形成していた。上皮極性の形成に細胞外基質が重要であることは知られていたが、この実験から、上皮極性の形成自体には細胞外基質の位置情報は不要であることがわかった。しかし、細胞外基質が培養基質表面にコートされていれば、上皮極性は綺麗に揃うのだから、細胞外基質はそれぞれの細胞が持っている上皮極性の軸を揃える役割を果たすということが明瞭になった。

(5) R2/7 細胞をノコダゾール存在下で培養し、微小管を破壊したところ、上皮極性を示すリングが消失する傾向を示した。このことは、微小管が上皮極性の形成に重要なことを示し、細胞周期の分裂期において上皮極性が消失するのは、(4)の実験から基質との接着が弱くなるためでなく、微小管のネットワークの様態が分裂期に変化するためと考えやすいと思われた。

(6) R2/7 細胞のアクチン繊維をイメージングするために LifeAct-TagRFP を遺伝子導入し、安定発現株を得た。そのライブイメージングにより、上皮細胞極性を示すリングは常にアクチン繊維が細胞周辺から細胞中央へ動いていき、環状に集まる結果であることがわかった。リングは動的なものである。

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 20 件)

- 1 Takeishi A, Kuranaga E, Tonoki A, Misaki K, Yonemura S, Kanuka H, Miura M. Homeostatic epithelial renewal in the gut is required for dampening a fatal systemic wound response in *Drosophila*. *Cell Rep*. 2013;3:919-30. 査読有
- 2 Vassilev VS, Mandai M, Yonemura S, Takeichi M. Loss of N-cadherin from the endothelium causes stromal edema and epithelial dysgenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:7183-93. 査読有

- 3 Tsujioka M, Yumura S, Inouye K, Patel H, Ueda M, Yonemura S. Talin couples the actomyosin cortex to the plasma membrane during rear retraction and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:12992-7. 査読有
- 4 Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, Saito K, Yonemura S, Eiraku M, Sasai Y. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*. 2012;10:771-85. 査読有
- 5 Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Hayashi Y, Enomoto M, Ibi M, Urano T, Yonemura S, Kiyono T, Izawa I, Inagaki M. Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J Cell Biol*. 2012;197:391-405. 査読有
- 6 Yanagihashi Y, Usui T, Izumi Y, Yonemura S, Sumida M, Tsukita S, Uemura T, Furuse M. Snakeskin, a membrane protein associated with smooth septate junctions, is required for intestinal barrier function in *Drosophila*. *J Cell Sci*. 2012;125:1980-90. 査読有
- 7 Obata Y, Takahashi D, Ebisawa M, Kakiguchi K, Yonemura S, Jinnohara T, Kanaya T, Fujimura Y, Ohmae M, Hase K, Ohno H. Epithelial cell-intrinsic Notch signaling plays an essential role in the maintenance of gut immune homeostasis. *J Immunol*. 2012;188:2427-36. 査読有
- 8 Suga H, Kadoshima T, Minaguchi M, Ohgushi M, Soen M, Nakano T, Takata N, Wataya T, Muguruma K, Miyoshi H, Yonemura S, Oiso Y, Sasai Y. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature*. 2011;480:57-62. 査読有
- 9 Tajiri R, Misaki K, Yonemura S, Hayashi S. Joint morphology in the insect leg: evolutionary history inferred from Notch loss-of-function phenotypes in *Drosophila*. *Development*. 2011; 138:4621-6. 査読有
- 10 Wada K, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*. 2011;138:3907-14. 査読有
- 11 Yonemura S. A mechanism of mechanotransduction at the cell-cell interface: emergence of α -catenin as the center of a force-balancing mechanism for morphogenesis in

- multicellular organisms. *Bioessays*. 2011;33:732-6. 査読有
- 12 Yonemura S. Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23:515-22. 査読有
- 13 Tanaka-Okamoto M, Hori K, Ishizaki H, Itoh Y, Onishi S, Yonemura S, Takai Y, Miyoshi J. Involvement of afadin in barrier function and homeostasis of mouse intestinal epithelia. *J Cell Sci*. 2011;124:2231-40. 査読有
- 14 Sansores-Garcia L, Bossuyt W, Wada K, Yonemura S, Tao C, Sasaki H, Halder G. Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J*. 2011;30:2325-35. 査読有
- 15 Otani T, Oshima K, Onishi S, Takeda M, Shinmyozu K, Yonemura S, Hayashi S. IKK ϵ regulates cell elongation through recycling endosome shuttling. *Dev Cell*. 2011;20:219-32. 査読有
- 16 Iida A, Sakaguchi K, Sato K, Sakurai H, Nishimura D, Iwaki A, Takeuchi M, Kobayashi M, Misaki K, Yonemura S, Kawahara A, Sehara-Fujisawa A. Metalloprotease-dependent onset of blood circulation in zebrafish. *Curr Biol*. 2010 ;20:1110-6. 査読有
- 17 Yamamoto M, Morita R, Mizoguchi T, Matsuo H, Isoda M, Ishitani T, Chitnis AB, Matsumoto K, Crump JG, Hozumi K, Yonemura S, Kawakami K, Itoh M. Mib-Jag1-Notch signalling regulates patterning and structural roles of the notochord by controlling cell-fate decisions. *Development*. 2010;137:2527-37. 査読有
- 18 Tajiri R, Misaki K, Yonemura S, Hayashi S. Dynamic shape changes of ECM-producing cells drive morphogenesis of ball-and-socket joints in the fly leg. *Development*. 2010;137:2055-63. 査読有
- 19 Yonemura S, Wada Y, Watanabe T, Nagafuchi A, Shibata M. alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol*. 2010;12:533-42. 査読有
- 20 Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, Mizuno A, Tominaga M. The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *J Biol Chem*. 2010;285:18749-58. 査読有

[学会発表] (計 6件)

- 1 Yonemura, S. Mechanosensing function of alpha-catenin in epithelial morphogenesis Session 1 BSCB & BSDB joint meeting. March 18th, 2013 Coventry, UK.
- 2 米村重信 隣り合う細胞を引っ張る力が多細胞形態形成を制御する ワークショップ 1W6III-4 第35回日本分子生物学会年会 12月11日(2012) 福岡
- 3 米村重信 細胞間接着装置形成における張力伝達の調節の意義 シンポジウム 1S07-6 第85回日本生化学会大会 12月14日(2012) 福岡
- 4 米村重信 隣接する細胞からの張力刺激に対する細胞の応答 シンポジウム 4S1 第34回日本分子生物学会年会 12月16日(2011)横浜
- 5 米村重信 アドヘレンスジャンクション(AJ)におけるメカノセンシング ミニシンポジウム(MS3) 第63回に本細胞生物学会大会 6月27日(2011)札幌
- 6 米村重信 柴田真依 上皮損傷修復の特性とバリア機能の維持 ワークショップ **2W6 第33**回日本分子生物学会年会 12月8日(2010) 神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.cdb.riken.go.jp/cm/g/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米村 重信 (YONEMURA SHIGENOBU)

独立行政法人理化学研究所・電子顕微鏡解析室・室長

研究者番号：60192811

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし