

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05597

研究課題名(和文)上皮のシートを管に変換するしくみ

研究課題名(英文)Cellular mechanism for converting epithelial sheets into tubes

研究代表者

近藤 武史 (Takefumi, Kondo)

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：60565084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,400,000円

研究成果の概要(和文)：動物の器官形成は上皮組織が適切に変形を繰り返すことで進行する。ショウジョウバエ気管形成における陥入運動をモデルとしてこの上皮形態形成機構の解析を進めた。気管運命決定因子Trhは陥入運動の開始ではなく陥入後にその構造を維持するために必須であること、Trhの下流でCv-c RhoGAPがRho1活性やミオシン活性の低下を介して陥入構造維持を制御している可能性を見出した。本研究により上皮組織安定形状は細胞運命によって決まっていること、形態形成運動の駆動と上皮組織の安定形状は異なる機構により制御され、そしてこの両機構がうまく組み合わさることにより正確に上皮形態形成が進行することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の形作りでは細胞が密に接着したシート状の上皮組織が、適切に折り畳まれていくことで複雑な形状が構築される。この上皮組織の形態形成機構を正確に理解することは動物の発生現象を理解するために必須であるだけでなく、生体外および生体内において器官を作り出す再生医療にとっても重要な基礎的知見となる。これまで細胞が自身の変形を介して力を生み出すことにより組織形状が変化すると主に考えられていた。しかしながら本研究の結果により細胞による力の発生とは異なる仕組みによりそれぞれの上皮組織について内因的に安定形状が決められていることが強く示唆され、動物の形づくりの新たな一面が明らかになった。

研究成果の概要(英文)： Organogenesis in animals is driven by epithelial morphogenesis in a spatiotemporally controlled manner. To address the cellular mechanisms of epithelial morphogenesis, we analyzed the invagination of tracheal placodes during *Drosophila* embryogenesis. We found that *trh* gene that is a master regulator of tracheal cell differentiation is required for maintaining invaginated structures, but is dispensable for driving the invagination movement. Our results suggest that, for maintaining invaginated structures, *trh* control the expression of *cv-c* to downregulate Rho1 small GTPase and Myosin II activity. We propose that the generation of driving forces and stable architecture of epithelial tissues are controlled by genetically separable mechanisms, and epithelial tissues can assume two alternative stable architectures, sheet or tube according to their fate. An appropriate combination of these two control systems is important for robust morphogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：上皮形態形成 ショウジョウバエ 陥入

## 1. 研究開始当初の背景

上皮組織は上皮細胞が互いに接着した一層の細胞シート構造から成り立つ。上皮組織は、その極性やバリア機能を維持したまま様々な形態へと変形することで複雑で機能的な器官を作り上げ、生体の構造的基盤として機能する。この上皮組織の形態形成機構を正確に理解することは動物の発生現象を理解するために必須であるだけでなく、生体外および生体内において器官を作り出す再生医療にとっても重要な基礎的知見となる。

発生過程においてはまず上皮シートが形成され、シートの一部がしばしば陥入し管構造を作り出す。頂端収縮や配置換え運動などの細胞の形態変化により力が発生し、陥入運動が引き起こされることはよく知られている。一方で、器官形成には変形後の上皮組織がそれぞれのかたちを安定に維持する必要もあると考えられるが、その機構についてはあまり理解が進んでいない。我々はショウジョウバエ胚における気管形成において、駆動力の生成とは独立して制御される「かたちの維持」も器官形成に必要であることを示唆する結果を得ていた。そこで本研究では、この組織形状を維持するための原理を明らかにすることを目的として研究を遂行した。

## 2. 研究の目的

ショウジョウバエの気管は体中に酸素を送るためのネットワーク構造であり、管状上皮からなる。気管形成の第一ステップでは、表皮の一部に形成される気管原基が陥入運動を経て管状構造へと変換される。代表者はこれまでにこの陥入運動を引き起こす力の生成機構に焦点を当て研究を進めており、細胞の分裂期進入による球形化(Mitotic cell rounding)が陥入運動を促進することを明らかにしてきた(Kondo & Hayashi, Nature, 2013)。また、気管原基では細胞が分裂期に進行することだけで陥入が引き起こされうる。一方で、同時期の周辺表皮においても気管原基と同様に細胞は分裂期に入るが、表皮はシート構造を保つ。このことから、気管原基は分裂期と陥入運動を連動させるための未知の性質を持つことが強く示唆されていた。

これまでの研究により気管形成を制御するマスター遺伝子として、bHLH-PAS 転写因子をコードする *trachealless* (*trh*) が同定されていた。*trh* は気管細胞特異的に発現する最も初期の遺伝子であり、変異体では気管構造がまったく形成されないことから、気管形成における最上流遺伝子として考えられていた。そこで、分裂細胞による管構造形成は *trh* に依存していると考え、TALEN 法を用いて新たに *trh* ノル変異体を作成し(Kondo et al., DGD, 2014)、ライブ観察を行ったところ、以下のような結果が得られた。

(1) *trh* 変異体においてもコントロールと同様に頂端収縮と分裂期球形化により気管原基は管構造へと変換された。

(2) しかしながら、この管構造は維持されずにシート構造(表皮)へと戻ってしまい、最終的に気管構造がまったく形成されない表現型を示した。

(3) シート構造に戻った予定気管細胞は上皮極性や細胞間接着を失うことはなく、上皮細胞としての基本的な性質は維持し、表皮の一部を構成している。

上記の予備的結果をもとに、本研究では *trh* に依存した管状上皮構造の維持メカニズムを解析し、シート状で安定な組織と管状で安定な組織ではどのような違いがあるのか、その詳細を明らかにすることを目的とした。そして上皮形態形成は「駆動力の生成」のみでは不十分であり、それとは異なる機構により制御される「かたちの安定化」と協調することで正確な三次元器官構造が作り上げられる、という新たな概念の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

これまでの報告により、*trh* 下流遺伝子はいくつか同定されているが、いずれの変異体においても *trh* 変異体とは異なり管構造は維持される。つまり、管状構造の維持は複数の *trh* 下流遺伝子が冗長性を持って制御する可能性が考えられた。そこでまずその可能性を検討するために以下の計画(1)~(4)を行った。また、未知の *trh* 下流遺伝子の関与についても検討するために以下の計画(5)を行った。

(1) 既知の *trh* 下流遺伝子の強制発現による遺伝学的スクリーニング

遺伝学的スクリーニングを行い、管構造維持に必要な最小要素の同定を目指した。具体的には、過去の知見から *trh* の下流で働くことが予想される候補遺伝子を、GAL4-UAS 系を用いて *trh* 変異体の予定気管細胞で強制発現させることにより、管状構造の維持における作用を検証した。候補遺伝子としては、細胞間接着因子、細胞骨格構造制御因子、上皮細胞極性制御因子、管の内腔形状の制御に関与する ZP タンパク質群、細胞内情報伝達系等を検討した。

(2) 管構造維持のメカニズムに関する細胞生物学的な解析

(1) で同定した制御遺伝子セットから、陥入した気管細胞においてどのような上皮細胞性質が変化しているのかを推定し、その変化の寄与について検討した。具体的には(1)により small Rho GTPase 活性制御の関与が考えられたため、各種 small Rho GTPase の恒常活性化型もしくはドミナントネガティブ型の過剰発現による作用を解析し、各 small Rho GTPase の関与を検討した。次に、細胞および上皮組織形態を規定すると考えられる細胞骨格、small Rho GTPase 活性パタ

ーンについて各種蛍光マーカーを用いて解析した。この解析を野生型胚、*trh* 変異体に対して行い特徴を抽出した。

#### (3) 管構造維持に関わる遺伝子セットの陥入運動への関与の検証

管状構造維持を保証する遺伝子セットが陥入運動の駆動に寄与するかを検討した。具体的には、計画 1 で同定した管構造安定化遺伝子の変異体およびその遺伝子の過剰発現を行った *trh* 変異体のライブイメージング解析を行った。

#### (4) *Trh* による管構造維持に関わる遺伝子の発現制御メカニズムの検討

*trh* 変異体において実際に計画 1 で同定した管構造安定化遺伝子の発現が低下しているかについて、*in situ*ハイブリダイゼーション法、および GFP トラップシステムを用いて検討した。

#### (5) Dam-ID 解析による気管細胞のトランスクリプトーム解析

未知の *trh* 下流遺伝子の関与について検討するために、Dam-ID 法により気管細胞特異的なトランスクリプトーム解析を行い、さらなる候補遺伝子の同定を進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 既知の *trh* 下流遺伝子の強制発現による遺伝学的スクリーニング

以前の研究により、EGF シグナル、細胞分裂、FGF シグナルがそれぞれ独立に気管原基の陥入を誘導できることを明らかにしていた。FGF シグナルは *trh* の下流で FGF レセプター遺伝子の *breathless(btl)* が発現誘導されることにより活性化し、それにより近傍から分泌される FGF リガンドへと向かって走化性を示すことにより、FGF シグナル単独で陥入が起こる。そこでまず、*trh* 変異体の予定気管原基細胞で *btl* の過剰発現を行ったが細胞は走化性を示さず、*trh* 変異体と同様に管構造は維持されなかった。つまり、FGF シグナルによる気管形成には、*btl* 以外の *trh* 下流遺伝子の作用が必要であることが示された。

次に *trh* 変異体での陥入構造の消失における細胞死の寄与を明らかにするために、*trh* 変異体の予定気管原基細胞でアポトーシス抑制因子 p35 の過剰発現を行った。この場合においても管構造は維持されず、*trh* 変異体における管構造の消失は細胞が排除されたことによるものではないことが明らかになった。

そこで、気管形成における管構造維持に関与する遺伝子群もしくは制御機構を同定するために、候補遺伝子群の過剰発現、もしくは候補機構の活性操作によるスクリーニングを行った。アクチン骨格および微小管の制御因子や上皮細胞極性制御因子、細胞外マトリックス因子の過剰発現や、*trh* 活性制御に関与すると報告されている Akt シグナル伝達系やその他気管形成に関与する Wg シグナル伝達系や Src キナーゼの活性操作等を行った結果、*crossveinless-c(cv-c)* を同定した。*cv-c* は RhoGTPase Activating Proteins (RhoGAP) をコードしており、small Rho GTPase の活性抑制を介して細胞骨格系を制御すると考えられている。*trh* の下流で発現が制御されていると報告されていた。また、*Cv-c* とは逆に Rho GTPase の活性を亢進する RhoGEF2 や上皮細胞極性制御因子の *Crumbs* の過剰発現によっても一部の気管原基で管構造が維持され、アクチン重合因子 *Dia* の恒常活性型の過剰発現によってもシート構造へ戻る現象が阻害された。以上の結果から、これら制御因子を介した small Rho GTPase 活性やアクチン細胞骨格系の調節が上皮組織構造の決定に寄与していることが示唆された。

#### (2) 管構造維持のメカニズムに関する細胞生物学的な解析

計画 1 により、small Rho GTPase の関与が強く示唆された。small Rho GTPase には複数種類が知られており、その中でも *Cv-c* は主に Rho1 の活性制御に関与するが、*cdc42* の活性も制御しうることが報告されている。そこで、主要な small Rho GTPase (Rho1, *cdc42*, *Rac1*, *Rap1*) の恒常活性化型およびドミナントネガティブ型を過剰発現させることで、気管の管構造維持に関与する small Rho GTPase の同定を試みた。その結果、Rho1 のドミナントネガティブ型の過剰発現により *cv-c* 過剰発現と同様の表現型が観察された。つまり、*Cv-c* は Rho1 の活性低下を介して管構造維持を制御すると考えられた。一方で、Rho1 の恒常活性型の過剰発現によっても管構造が維持される様子が観察された。これは Rho1 活性を正に制御する RhoGEF2 の効果とも一致する。これらの結果から Rho1 活性の亢進もしくは低下が気管における管構造維持に関与することが示唆された。

この二つの可能性を区別するために Rho1 活性の GFP レポーター発現システムを用いて気管細胞における Rho1 活性の解析を行った。その結果、陥入前の気管原基では細胞の頂端面に Rho1 活性が局在化していたが、陥入後の気管細胞では周辺表面の表皮細胞と比較して Rho1 活性が顕著に低下していることが明らかとなった。また、Rho1 はその下流でアクチン細胞骨格系の制御を介して細胞形態を変化させる。そこで、アクチン繊維および上皮細胞における主要なモータータンパク質である非筋ミオシン II の局在様式の変化について解析したところ、非筋ミオシン II は Rho1 活性と同様に頂端面への局在が低下していることが明らかになった。一方、アクチン繊維は陥入後の気管細胞の頂端面で周辺の表皮細胞と比較してより集積していた。以上の結果から、陥入後の気管細胞では Rho1 活性およびミオシン集積の低下すること、アクチン繊維がより発達することが明らかとなり、これらの変化が気管組織の形状制御における重要な制御点であ

ることが示唆された。

(1)で恒常活性化型 Dia により陥入構造が維持されたが、Dia は Rho1 によって活性化される。つまり、陥入した気管細胞におけるアクチン重合の亢進は Dia 以外の因子を介していること、恒常活性化型 Dia や RhoGEF2、恒常活性化型 Rho1 による陥入構造維持の表現型はこのメカニズムをバイパスし、通常とは異なる機構によりアクチン重合が促進されたためである可能性が考えられた。

一般的に上皮組織の陥入運動では細胞が頂端面にミオシンを集積させ、形態を変化させることが重要な駆動力であると知られている。しかしながら、この気管陥入過程ではミオシンの集積がむしろ低下しており、一般的な考えとは異なる制御により陥入運動と管構造維持が制御されていることを示している。今後さらに詳細な解析を進めることにより、上皮形態形成制御メカニズムの多様性の解明につながることを期待される。

### (3) 管構造維持に関わる遺伝子セットの陥入運動への関与の検証

*cv-c* の陥入運動における寄与を明らかにするために、まず *cv-c* 変異体の陥入過程における表現型をライブ観察および抗体染色法により解析したところ、陥入過程に顕著な異常は認められず、管構造も形成された。つまり、*cv-c* 以外の遺伝子も冗長的に管構造維持に寄与していることが考えられた。また、*cv-c* を過剰発現した *trh* 変異体のライブ観察を行ったところ、*trh* 変異体での陥入運動に大きな変化は見られなかったが、その後陥入した細胞はそのまま管構造を維持すること、*cv-c* 過剰発現細胞の一部は陥入せず、その後表皮にとどまったこれらの細胞では上皮構造が崩壊してしまうことが明らかになった。つまり、*cv-c* は管構造を形成した細胞ではその構造維持を制御する一方で、シート状上皮では管構造形成を促進することはなく、むしろ過剰に存在する場合には上皮構造維持において阻害的に作用する。また、管構造は *cv-c* 過剰発現に対して上皮構造を維持する上で抵抗性があると考えられた。これらの結果から、*cv-c* は陥入運動の駆動ではなく、主に管構造維持もしくは気管細胞に管構造で安定となるコンピテンスを与えるために働いていることが示唆され、管構造と *cv-c* 発現が一致することによってその後管構造が安定して維持されると考えられた。

### (4) Trh による管構造維持に関わる遺伝子の発現制御メカニズムの検討

以前に *trh* 変異体では *cv-c* 遺伝子発現が消失すると報告されていた。この点について改めて詳細な検討を進めた結果、陥入前の気管原基における *cv-c* の発現は *trh* 変異体においてもほとんど変化していないこと、一方で陥入後の気管細胞において *trh* 変異体では *cv-c* 発現が消失してしまうことが明らかになった。つまり、*trh* は *cv-c* の発現開始ではなく発現維持に必要であることを示している。また、*trh cv-c* 二重変異体を解析したところ、*trh* 変異体で観察される一過的な陥入の程度が低下することが明らかになった。(3) とこれらの結果から、*cv-c* は細胞に管構造でより安定となる性質を付与していることが強く示唆された。

### (5) Dam-ID 解析による気管細胞のトランスクリプトーム解析

上述のように *cv-c* 変異体では管構造は維持され気管形成が進行していた。つまり、*cv-c* 以外の Trh 下流遺伝子が冗長的に管構造維持を制御していると考えられた。そこで、DNA メチル化酵素 Dam と RNA ポリメラーゼ II の融合タンパク質を気管細胞特異的に発現させた胚を用いて Dam-ID 法による解析を行うことで、気管細胞のトランスクリプトームを取得した。その結果 *cv-c* を含む 1,532 遺伝子の発現が検出され、細胞骨格関連因子、*cv-c* 以外の RhoGAP、様々な膜タンパク質も含まれており、気管細胞においてこれらの遺伝子群が冗長的に作用していることが考えられた。今後これら遺伝子の中から Trh によって制御される遺伝子を同定し解析することにより、細胞運命の制御下で上皮組織の安定形状が決定される機構の理解が進むと期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Shigeo Hayashi and Takefumi Kondo, Development and Function of the *Drosophila* Tracheal System, *Genetics* Vol. 209, 367-380 (2018) 査読有  
DOI: 10.1534/genetics.117.300167

Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Mechanism of cell height changes that mediate epithelial invagination, *Development Growth and Differentiation*, Vol. 57(4), 313-323 (2015) 査読有  
DOI: 10.1111/dgd.12224

[学会発表](計 8 件)

Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Tissue-geometry-dependent transcriptional

feedback coordinates tubular architecture with cell fate during epithelial invagination, The 13th Japanese Drosophila Research Conference, 2018 年

Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, A positive transcriptional feedback coordinates tissue architecture with cell fate during tubulogenesis, Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB, 2018 年

Takefumi Kondo, Shaping three-dimensional epithelial architecture harmonized with cell differentiation, International Mini-Symposium "Frontline in Developmental Biology", 2018 年

Takefumi Kondo, Genetic programs and mechanical feedback to shape three dimensional epithelial architecture, 第19回生命科学研究科シンポジウム, 2017 年

Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, A positive transcriptional feedback coordinates tissue architecture with cell fate during tubulogenesis, Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists, 2017 年

Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Tissue geometry triggers a positive transcriptional feedback for the maintenance of tubular epithelial architecture, The 12th Japanese Drosophila Research Conference, 2016 年

Takefumi Kondo, Morphogenetic forces and architectural preference in epithelia, The Second International Meeting for Epithelial Tubulology, 2015 年

Takefumi Kondo and Shigeo Hayashi, Tube or Sheet? : The Architectural Preference of Epithelial Tissues, 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：近藤 武史

ローマ字氏名：Takefumi Kondo

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院生命科学研究科

職名：特定助教

研究者番号 (8 桁)：60565084

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。