

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18536

研究課題名(和文) コンパートメント境界の維持に必要な細胞間認識メカニズムの解明

研究課題名(英文) A research to reveal the cell-cell recognition mechanisms to maintain compartment boundaries

研究代表者

梅津 大輝 (Umetsu, Daiki)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：60620474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物の発生に普遍的な戦略の一つとして、細胞の混ざり合いを外見からは分からないコンパートメントと呼ばれる区画内に制限し、発生を通じてその境界を維持する仕組みがある。本研究では、この仕組みを細胞の自己組織化能力による組織構築の基本プロセスとして位置づけ、そのメカニズムの解明を目指した。ショウジョウバエの組織において最新のゲノム編集技術などを用いた解析から、脊椎動物の免疫細胞による非自己の認識に関わる分子がこの過程に重要な動きをすることを初めて見出した。

研究成果の概要(英文)：The formation of straight compartment boundaries separating groups of cells is an evolutionarily conserved strategy for tissue growth and patterning during multicellular organism development. In this project, I aimed to reveal the mechanisms that underlie this phenomenon by considering as a fundamental process important for tissue organization by cellular self-organization. By using a recently developed genome editing technology, I found that a molecule, whose vertebrate homologues function in immune cells to recognize non-self molecules, plays an important role in maintaining compartment boundaries in a Drosophila epithelial tissue.

研究分野：発生生物学、細胞生物学

キーワード：コンパートメント境界 組織構築 自己組織化 細胞の選り分け 細胞間認識 ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

異なる機能を持つ細胞を選り分け、組織を区画化することは形態形成で最も重要な過程の一つである。この過程は、脊椎動物からショウジョウバエの発生にまで見られ、多細胞生物のボディプランの確立に共通の戦略として用いられている。発生過程で見られる区画はコンパートメントと呼ばれ、40年以上前から存在が知られる。コンパートメントは、境界での細胞の混ざり合いを防ぐことによって維持される。その維持に関わる仕組みについては細胞間のシグナル伝達、物理的特性、細胞動態などが次々と明らかにされてきている一方で、細胞の混ざり合いを防ぐ実行因子は同定されておらず、細胞間の接触面における局所的な相互作用を制御するメカニズムの理解までは至っていなかった。

アクチン繊維とミオシンを主要素とするアクチン細胞骨格の蓄積が、隣接コンパートメントの境界をまたいで接する細胞同士の接触部位に局限していることから、異系譜細胞同士の物理的な接触が重要であることが近年の研究で明らかにされている。細胞同士の接触が直接アクチン細胞骨格を制御する系がいくつか知られている。例えば、ほ乳類のマクロファージは病原体や死細胞の表面提示分子の認識を引き金として、アクチン細胞骨格を局所的に直接制御し、飲み込みを引き起こすことが知られている。同様に、異なるコンパートメントの細胞間においても、細胞表面の認識とアクチン細胞骨格の制御が、局所的に制御されている可能性が考えられるが、その認識に関わる分子はこれまで一つも同定されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、最も解析の進んだショウジョウバエ翅原基のコンパートメント境界をモデルとして用い(図1)、動物の発生で見られる境界の維持に関わる細胞同士の認識メカニズムを分子レベルで理解することを狙いとした。この過程で実行因子として働く、細胞間の認識に関わる分子の同定と、その機能を解析することをめざした。



**図1. ショウジョウバエ翅のコンパートメント境界。後部コンパートメントで特異的に GFP を発現させている。翅と腹部上皮のそれぞれにコンパートメント境界が認められる。**

## 3. 研究の方法

上述の目的を達成するために、以下の3つアプローチで研究を遂行した。

- (1) トランスクリプトーム解析を用いた網羅的解析などによる遺伝子発現からの候補遺伝子の探索
- (2) それらの分子が実際に細胞の選り分けに重要な機能を持つかどうかについての遺伝学的手法を用いた検証
- (3) 同定された分子(群)の機能とアクチン細胞骨格の関係についての検証

## 4. 研究成果

### (1) RNA-seq を用いた網羅的発現解析による候補遺伝子の同定

RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析から、コンパートメント間で発現に差異が見られる遺伝子の探索を行い、隣接コンパートメント由来のそれぞれの細胞表面に提示されている分子の量的又は質的違いの同定を試みた。過去の文献に基づいた情報との照合により、細胞間の認識に関わることが示唆されている Toll 遺伝子群に注目し、翅原基において発現量が高かった Toll-1、Toll-2、Toll-7、Toll-8 の4 遺伝子を候補として絞った。Toll 遺伝子群は哺乳類では TLR ファミリーと呼ばれ、免疫細胞による非自己分子の認識に関わることがよく知られており、ショウジョウバエの上皮組織において、同系譜、違系譜の認識に関わる可能性が考えられた。

発現パターンから機能を類推するために行ったレポーター遺伝子の解析から、Toll-1 遺伝子はコンパートメントごとに異なる発現レベルを有することが示唆された。

### (2) Toll 遺伝子群の細胞の選り分けへの寄与

隣接細胞間における Toll-1 遺伝子の発現量の差異が細胞の選り分けを引き起こす要因となっているとする仮説を立て、ショウジョウバエの遺伝学的手法を用いてその仮説を実際の組織内で検証した。Toll-1 を過剰に発現する細胞集団を異所的に作出すれば、それらの細胞集団の輪郭はコンパートメント境界を模して滑らかなになると考えられた。実際、正常組織に Toll-1 を過剰に発現する細胞の集団をモザイク状に誘導したところ、それらの細胞集団の輪郭は滑らかな曲線を描いた。このことから、Toll-1 の発現の差異が実際に細胞の選り分けに機能することを示

すことができました。さらに、RNAiによるToll-1の機能阻害によって、組織のコンパートメント境界が乱れてしまうことが明らかになった。これらの解析により、免疫細胞による異物表面認識に関わるToll遺伝子群が細胞の選り分けや組織境界の維持に関わるという報告は前例がなく、Toll遺伝子群の新たな機能という意味においても新規の成果が得られた。

### (3) アクトミオシンの局在制御によるコンパートメント維持機構との機能的関連

コンパートメント境界に接する細胞はその部分にアクトミオシン細胞骨格を蓄積することで細胞間結合の張力を増し、細胞の混ざり合いを防ぐというメカニズムが先行研究において示されている。細胞が境界に接する部位を認識し、そこにアクトミオシン細胞骨格を集積させる仕組みの存在が示唆されるが、この過程におけるToll-1の寄与を検証した。まずは、内在性のアクトミオシンの動態を生きた組織で観察することができるようにするために、ゲノム編集によってMyosin IIに黄緑色蛍光タンパク質(Venus)を付加したノックイン系統を新たに樹立した。この系統を用い、Toll-1を過剰発現した細胞集団の周縁部におけるアクトミオシン細胞骨格の局在を観察したところ、コンパートメント境界上で見られるような蓄積は認められなかった。このことから、Toll-1は境界の維持に寄与するものの、その働きはMyosin IIの細胞内局在制御を介さないことが示唆された。

境界の維持に関わる未知のメカニズムの存在が示唆されたことから、細胞動態を詳細に観察することによって、洞察を得ようと試みた。定量的ライブイメージング観察によって1細胞レベルでの動態解析を行ったところ、Toll-1は局所的に乱れた境界を短時間で元に戻す役割を担っていることが示された。境界の維持がこれまで考えられていた以上にダイナミックなプロセスであることが明らかになったとともに、その過程には哺乳類にまで保存されている分子が寄与していることが明らかとなり、組織形成における細胞動態の制御に関する新たな知見が得られた。細胞間の認識にどう関わるかに関してはさらに解析が必要とされるが、今後の研究によって、新たな組織構築の原理の解明や胚操作などへの応用技法の開発につながるような展開も期待される。

### 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4件)

1. Tsuboi, A.<sup>\*</sup>, Umetsu, D.<sup>\*,#</sup>, Kuranaga, E. and Fujimoto, K.<sup>#</sup>  
Inference of Cell Mechanics in

Heterogeneous Epithelial Tissues Based on Multivariate Clone Shape Quantification. *Front. Cell Dev. Biol.*, frontiers, 査読有, 5:68, 2017

DOI: 10.3389/fcell.2017.00068

<sup>\*</sup> Co-first author

<sup>#</sup> Co-corresponding author

2. Umetsu, D. and Kuranaga, E.  
Planar polarized contractile actomyosin networks in dynamic tissue morphogenesis *Current Opinion in Genetics & Development*, Elsevier Ltd, 査読有, 45:90-96, 2017  
DOI: 10.1016/j.gde.2017.03.012

3. Rudolf, K., Umetsu, D., Aliee, M., Sui, L., Jülicher, F. and Dahmann, C.  
A local difference in Hedgehog signal transduction increases mechanical cell bond tension and biases cell intercalations along the Drosophila anteroposterior compartment boundary. *Development*, The Company of Biologists Ltd, 査読有, 142: 3845-3858, 2015  
DOI: 10.1242/dev.125542

4. Umetsu, D. and Dahmann, C.  
Signals and mechanics shaping compartment boundaries in Drosophila *WIREs Developmental Biology*, Wiley-Blackwell, 査読有, 4(4):407-417, 2015  
DOI: 10.1002/wdev.178

[学会発表](計12件)

1. Daiki Umetsu, Norihiro Iijima and Erina Kuranaga  
Differential expression of an ancient cell surface recognition molecule guides cell sorting at the anteroposterior compartment boundary in Drosophila *EMBO|EMBL Symposium: Tissue Self-Organization: Challenging the Systems*, 112, Heidelberg, Germany, March 11-14, 2018

2. 梅津 大輝  
「力」が生き物の形をつくるしくみ」  
小型魚類研究会 サテライトシンポジウム 第2回 帰ってきた ムシ vs. サカナ  
甲府、2017年8月29日

3. Daiki Umetsu, Alice Tsuboi, Koichi Fujimoto and Erina Kuranaga  
Inference of cell mechanics in heterogeneous epithelial tissue based on multivariate clone shape quantification  
第2回 次世代生命科学の研究会

福岡、2017年7月13-14日

4. Daiki Umetsu, Inference of cell mechanics in heterogeneous epithelial tissue based on multivariate clone shape quantification

2nd Morphomeostasis Meeting  
Sendai, Japan, June 10-11 2017

5. Daiki Umetsu, Alice Tsuboi, Koichi Fujimoto and Erina Kuranaga

Inference of cell mechanics in heterogeneous epithelial tissue based on multivariate clone shape quantification  
4th Asia Pacific Drosophila Research Conference, P40, Osaka, Japan, May 8-11, 2017

6. Umetsu, D. and Kuranaga, E.

A Link between Mechanical Control of Tissue Growth and Cell Competition  
12th Japanese Drosophila Research Conference, P-9, Tokyo, Japan, September 9-11, 2016

7. 梅津 大輝

アクチン細胞骨格と原癌遺伝子 Myc による組織成長制御メカニズム  
第一回 次世代生命科学の研究会  
徳島、2016年8月12-13日

8. Daiki Umetsu

A link between mechanical control of tissue growth and cell competition  
1st Morphomeostasis Meeting  
Mishima, Japan, June 26-27, 2016

9. Umetsu, D. and Kuranaga, E.

“Identification of mechanisms that protect cells from cell competition at anteroposterior compartment boundary in developing Drosophila wings”  
1st International Symposium on Cell Competition, Cell Competition in Development and Cancer, Kyoto, 2015, September 10th

10. Umetsu, D. and Kuranaga, E.

“Tissue proliferation control by mechanical stresses”  
The 26th CDB Meeting, Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization, Kobe, September 8-9, 2015

11. 梅津大輝、倉永英里奈

「機械的ストレス応答による組織増殖の制御機構」

“Tissue proliferation control by mechanical stresses”

第27回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム

△、演題番号 8、比叡山、2015年8月

12. Daiki Umetsu

Local increases in mechanical tension guide cell sorting along compartment boundaries by biasing cell intercalations  
48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, S04-3, Tsukuba, Japan, June 2-5, 2015

〔図書〕(計1件)

1. Benoit Aigouy, Daiki Umetsu, Suzanne Eaton

Segmentation and Quantitative Analysis of Epithelial Tissues.

Methods in Molecular Biology, 1478:227-239, 2016

〔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

[http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/kuranaga\\_lab/](http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/kuranaga_lab/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅津 大輝 (UMETSU, Daiki)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号: 60620474