

令和元年5月30日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07363

研究課題名(和文)細胞外で機能する新規PCP因子shioimeの機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of a novel extracellular PCP component shioime

研究代表者

石川 裕之(Ishikawa, Hiroyuki)

千葉大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：00398819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮組織の表面につくられる平面内細胞極性を制御する新規遺伝子shioimeの機能をショウジョウバエを用いて調べた。その結果、shioimeの強制発現により翅の平面内細胞極性が異常になること、shioimeの機能喪失型の変異体の幼虫において表皮クチクラの平面内細胞極性の異常が観察されること、shioimeは一齢幼虫から二齢幼虫への脱皮に必要であることが明らかになった。さらに、Shioimeは実際に細胞外に分泌されることを明らかにした。以上の結果から、Shioimeは平面内細胞極性の形成と脱皮に必要なとされる多機能な分泌性タンパク質であると結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、多細胞からなるシートから動物の形が正しく作られる仕組みの一端を明らかにすることができた。また、本研究で用いたショウジョウバエは、遺伝子やタンパク質のレベルでヒトと共通した点も多く、本研究で明らかにしたことは、多細胞動物の共通の仕組みである可能性がある。一方で、本研究で明らかにした形作りの遺伝子が、ショウジョウバエを含む節足動物と一部の動物に特有の脱皮という一見すると関係のなさそうな別の生命現象にも必要である点は動物の進化と多様性を考える上で興味深い。

研究成果の概要(英文)：The function of the novel gene shioime, which controls planar cell polarity (PCP) formed on the epithelial tissues, was investigated using *Drosophila*. As a result, it was revealed that the PCP of the adult wing was disrupted by overexpression of shioime, larvae of shioime mutants showed the disruption of PCP on the epidermal cuticle, and shioime was required for molting from the first instar to the second instar larvae. Furthermore, biochemical studies showed that Shioime was secreted protein. Based on the above results, we concluded that Shioime is a multifunctional secretory protein required for establishment of PCP and molting in *Drosophila*.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：平面内細胞極性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の典型的な上皮組織においては、上皮細胞の頂底 (Apico-Basal) 軸と直交する平面内の軸に沿って発達する極性が存在する。これを平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity, PCP) とよぶ (図1)。例えば、ショウジョウバエ成虫の翅や体に生えている毛の配向は PCP 研究の優れたモデルである (図1)。ショウジョウバエの翅において、PCP の異常は翅の表面に生えている毛の配向の異常として顕微鏡下で容易に観察可能である (図1)。そこで、これまでにショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーンにより、PCP の異常を示す多数の変異体の単離および原因遺伝子の同定が進められてきた。その結果、これまでに、グローバル経路 (Fat/Dachsous/Four-jointed 経路) とコア経路 (Frizzled/Flamingo 経路) とよばれる 2 種類の PCP の形成に関わる経路の存在が明らかにされている。また、PCP 形成経路とその構成因子はショウジョウバエと哺乳類の間で高度に保存されている。哺乳類では、内耳細胞の不動毛や気管の繊毛などに PCP がみられ、聴覚や異物の排除に必要であることが知られている。さらに興味深いことに、PCP は細胞非自律的に形成され、PCP の情報は細胞間を伝播する (図2)。しかし、この PCP の情報が細胞間を伝播する仕組みに関しては不明な点が多い。

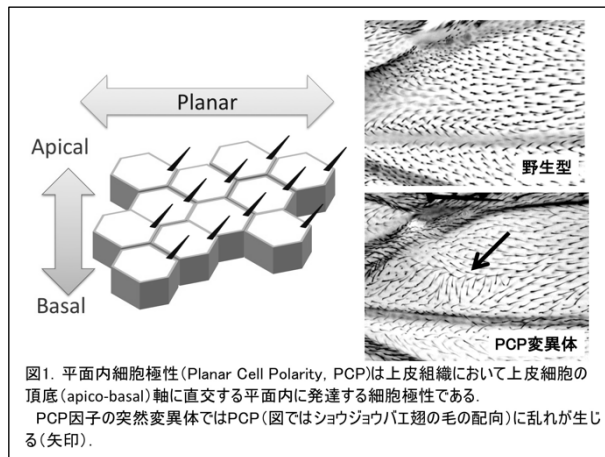


図1. 平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity, PCP) は上皮組織において上皮細胞の頂底 (apico-basal) 軸に直交する平面内に発達する細胞極性である。PCP 因子の突然変異体では PCP (図ではショウジョウバエ翅の毛の配向) に乱れが生じる (矢印)。

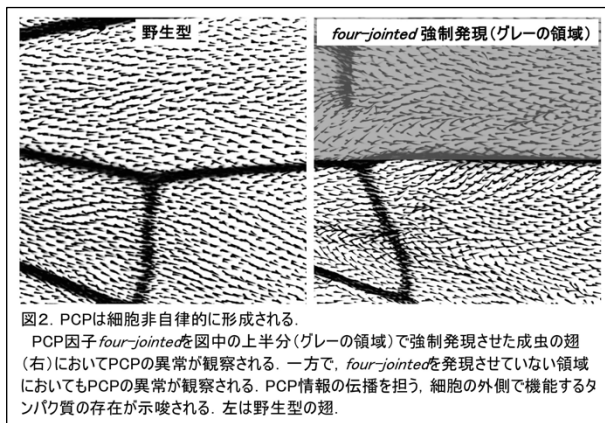


図2. PCP は細胞非自律的に形成される。PCP 因子 *four-jointed* を図中の上半分 (グレーの領域) で強制発現させた成虫の翅 (右) において PCP の異常が観察される。一方で、*four-jointed* を発現させていない領域においても PCP の異常が観察される。PCP 情報の伝播を担う、細胞の外側で機能するタンパク質の存在が示唆される。左は野生型の翅。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、特に細胞外で機能する PCP の新規形成因子の同定を目指すことにした。一般に PCP 因子においては、機能喪失 (loss of function) と機能獲得 (gain of function) の両方の変異体において、共に PCP の異常がおこる。したがって、PCP 情報の伝播に関わる遺伝子の異所的な発現は PCP の異常を引き起こすと予測した。そこで申請者のグループは、N 末端側にシグナルペプチド配列を有し細胞外で機能すると予測されるタンパク質をコードする遺伝子のショウジョウバエを用いた強制発現スクリーンを行った。その結果、翅における強制発現により PCP が異常となる新規遺伝子 *shioime* を同定した (図3)。そこで本研究では、ショウジョウバエを用いて新規 PCP 因子 *shioime* の機能を明らかにすることを目的とした。

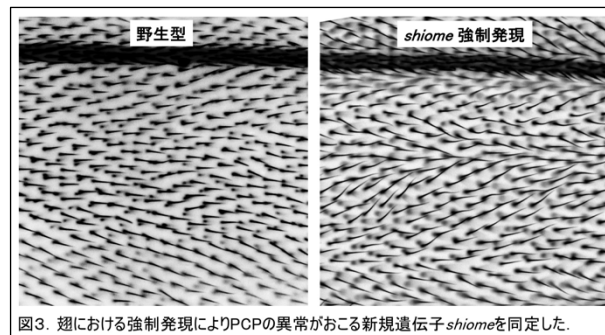


図3. 翅における強制発現により PCP の異常がおこる新規遺伝子 *shioime* を同定した。

3. 研究の方法

新規 PCP 因子 *shioime* の機能を明らかにするために以下の実験を行った。

- (1) ショウジョウバエを用いた遺伝学的な解析を行なった。*shioime* の機能型変異体の作出には CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集を用いた。また、*shioime* の強制発現には *Gal4/UAS* システムを用いた。
- (2) ショウジョウバエの培養細胞を用いて、Shioime の細胞内局在と Shioime が分泌性のタンパク質であるかを生化学的な実験により調べた。

4. 研究成果

- (1) ショウジョウバエを用いた解析

shioime の翻訳産物 (172 アミノ酸) は、N 末端側から、シグナルペプチド、膜貫通領域、コイルドコイルドメイン、アルギニンリッチドメインからなると一次構造から予測された (図 4)。また、コイルドコイルドメインとアルギニンリッチドメインの間に、プロテアーゼ Furin の認識配列の存在が予測された。さらに、膜貫通領域推定プログラムにより、膜貫通領域以降の領域は細胞外領域であることが予測された。

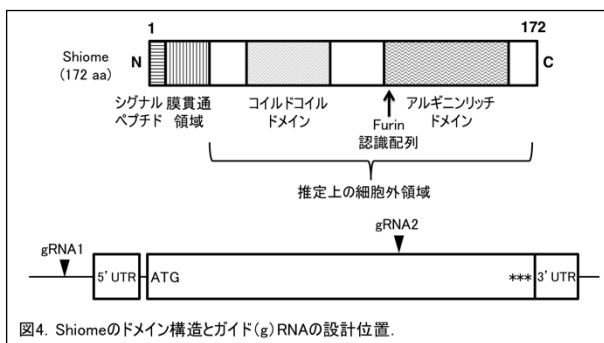


図4. *Shioime* のドメイン構造とガイド (g) RNA の設計位置。

CRISPR/Cas9 を用いて *shioime* の機能喪失型変異体を作成した。ガイド RNA を *shioime* の開始コドンの 5' 側とアルギニンリッチドメイン中の 2 箇所

に設計して、*shioime* の開始コドンを含む ORF の大部分を欠失した変異体を得ることを期待した (図 4)。Cas9 を発現するショウジョウバエ系統の受精卵にこれらのガイド RNA を発現するベクターをマイクロインジェクションした結果、期待通りに、設計した 2 箇所のガイド RNA の認識配列で挟まれた領域を欠失した *shioime* のショウジョウバエ変異体を得ることができた (図 4)。作出された *shioime* 変異体のホモ接合体は、生存率が低下するものの生存可能であった。この生存率の低下は、熱ショックタンパク質プロモーターの制御下で野生型の *shioime* の cDNA を発現する外来遺伝子 (*hs-shioime*) の挿入によって回復した。また、*shioime* 変異体の成虫

においては、*shioime* の強制発現により観察された翅の毛の PCP の異常は観察されなかった。一方で、*shioime* 変異体の一齢幼虫においては、腹側のクチクラに存在する歯状突起の形成が異常になることが分かった (図 5)。この表現型も *hs-shioime* の挿入によって救済された。この歯状突起の表現型は *wingless (wg)* と *crinkled (ck)* の二重変異体の表現型に類似している (Bejsovec and Chao, 2012)。*ck* は非筋型

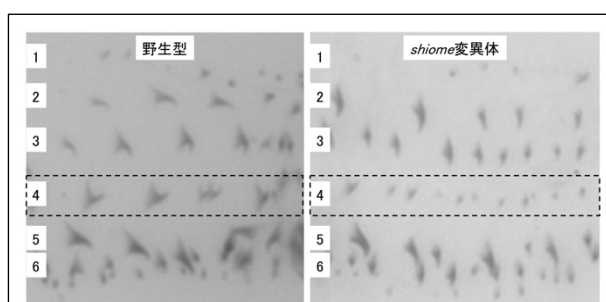


図5. *shioime* 変異体の一齢幼虫のクチクラでは歯状突起の異常が観察される。

幼虫の腹部の各体節には歯状突起とよばれる突起が生えており、この大きさと生える方向は決まっている (左)。 *shioime* 変異体のホモ接合体では、4 列目の歯状突起 (点線で囲まれた部分) が小さくなる表現型を示す (右)。

の重合が必要であることが示されている。このことから、*shioime* はアクチンの重合に関与する可能性が考えられる。さらに、

shioime 変異体の一齢幼虫は、二齢幼虫への脱皮が遅れることが分かった。通常の飼育条件において、野生型のショウジョウバエの一齢幼虫は約 24 時間で二齢幼虫に脱皮する。一方で、*shioime* 変異体の一齢幼虫は、脱皮までに約 72 時間かかることが分かった。この表現型もまた、*hs-shioime* により救済された。これらの実験から、*shioime* 変異体で観察された、生存率の低下、クチクラの歯状突起の異常、脱皮の遅延という表現型の原因遺伝子は *shioime* であることを確かめることができた。言い換えると、*shioime* はこれらの現象に必要な遺伝子であることが分かった。

shioime の翅における強制発現は PCP の異常を誘発した (図 3)。ショウジョウバエに関するデータベースである FlyBase 上の RNA-seq データによれば、成虫原基での *shioime* の mRNA の発現は検出されていない。したがって、*shioime* の翅成虫原基での異所的な発現が PCP を乱すことが示唆された。次に、*shioime* のさらなる機能を調べるために、*shioime* の様々な組織での強制発現実験を行なった。その結果、*shioime* の全身での強制発現は胚性致死となることが分かった。さらに、致死の要因となる組織を同定するために、種々の *Gal4* ドライバーを用いて強制発現を行なったが、*shioime* の強制発現による致死の要因となる組織を同定することはできなかった。その原因としては、組織特異的な *shioime* の強制発現量が十分ではなかった可能性や、致死を誘発するためには複数種類の組織に発現させる必要がある可能性などが考えられる。

(2) 培養細胞を用いた解析

ショウジョウバエ胚由来の培養細胞 (S2 細胞) に、C 末端側に V5 タグ配列を付加した *Shioime* を発現させて V5 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行なった。その結果、*Shioime* はシグナルペプチドが切断されて分泌されること、コイルドコイルドメインとアルギニンリッチドメインの間の Furin 認識配列で切断されること、コイルドコイルドメインは培地中に分泌されていること、が明らかになった。一方で、C 末端側のアルギニンリッチドメインは培地中に含まれていないことが分かった。このような結果になった原因としては、Furin 認識配列以降に、ドメイン予測プログラムでは予測されなかった膜貫通領域が存在し、アルギニンリッチドメインは細胞質側に存在する可能性と、アルギニンリッチドメインは細胞外に分泌されるが、アルギニンの正電荷により細胞膜と相互作用して培地中から検

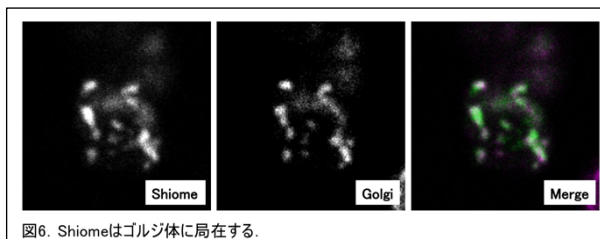


図6. *Shioime* はゴルジ体に局在する。

出できなかった可能性が考えられる。さらに、V5 抗体を用いて V5 タグされた *Shiome* の細胞内局在の観察を行なった。その結果、*Shiome* とゴルジ体タンパク質 GM130 が共局在する像が得られた (図 6)。

以上の研究により、*Shiome* は平面細胞極性の形成と脱皮に必要とされる多機能な分泌性タンパク質であると結論した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件) (全て査読有り)

① Hirai K, Wang Z, Miura K, Hayashi T, Awasaki T, Wada M, Keira Y, Ishikawa HO, Sawamura K. Genetic Analyses of Elys Mutations in *Drosophila* Show Maternal-Effect Lethality and Interactions with Nucleoporin Genes. *G3 (Bethesda)*. 2018, 8:2421-2431. doi: 10.1534/g3.118.200361.

② Keira Y, Wada M, Ishikawa HO. Regulation of *Drosophila* Development by the Golgi Kinase Four-Jointed. *Curr Top Dev Biol*. 2017, 123:143-179. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.11.003.

[学会発表] (計 16 件)

① Ishikawa HO, Okada T, Nakazawa A, Kurihara Y, Keira Y. Subcellular localization of the Golgi kinase Four-jointed in *Drosophila* development. 60th Annual *Drosophila* Research Conference, 2019 年 (国際学会)

② 石川 裕之
ショウジョウバエ翅成虫原基におけるゴルジ体キナーゼ Four-jointed の細胞内局在
Looking to the future of Developmental Cell Biology Symposium, 2018 年 (招待講演)

③ 石川 裕之
ショウジョウバエ細胞のゴルジ体におけるリン酸化ゾーン
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ワークショップ「限定的な翻訳後修飾の制御と機能」,
2017 年(招待講演)

④ Kubo Y, Doi Y, Ishikawa HO. Identification of the *Drosophila* ecto-phosphatase Nekomata. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年

⑤ Wada M, Tanaka T, Doi Y, Ishikawa HO. Implication of a *Drosophila* nuclear membrane protein Jirass in Notch signaling. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年

⑥ 石川 裕之、明石 孝平、計良 陽子
ショウジョウバエ組織形成におけるゴルジ体キナーゼ Four-jointed の細胞内局在のダイナミクス
第 88 回日本動物学会大会, 2017 年

⑦ 澤村 京一、平井 和之、Wang Zhuo、栗崎 健、和田 萌、計良 陽子、石川 裕之
核膜孔複合体タンパク質 ELYS の変異によるショウジョウバエの発生異常
日本遺伝学会第 89 回大会, 2017 年

⑧ Kubo Y, Doi Y, Ishikawa HO. Involvement of the ecto-phosphatase Nekomata in planar cell polarity. 4th Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, 2017 年 (国際学会)

⑨ Wada M, Tanaka T, Doi Y, Ishikawa HO. An overexpression screen identifies genes that regulate intercellular signaling. 58th Annual *Drosophila* Research Conference, 2017 年 (国際学会)

⑩ 石川 裕之、白石 穂高、和田 萌、久保 瑛子、栗原 優介、計良 陽子
ショウジョウバエ発生におけるゴルジ体キナーゼ Four-jointed のリン酸化局域
第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「細胞機能を駆動する局域ダイナミズム」, 2016 年
(招待講演)

⑪ 和田 萌、田中 友子、土井 由香、石川 裕之
ショウジョウバエ核膜タンパク質 Jirass は Notch シグナルを制御する

第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

⑫ 白石 穂高、野々山 裕文、土井 由香、栗原 優介、石川 裕之
ショウジョウバエ発生におけるゴルジ体キナーゼ Four-jointed の細胞内局在のダイナミクス
第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

⑬ Shiraishi H, Kubo Y, Kurihara Y, Doi Y, Keira Y, Ishikawa HO.
Dynamics of subcellular localization of the Golgi kinase Four-jointed in Drosophila development.
The 22nd International Congress of Zoology, 2016 年 (国際学会)

⑭ Shiraishi H, Kubo Y, Keira Y, Ishikawa HO.
Dynamics of subcellular localization of Four-jointed in imaginal disc development.
The 12th Japanese Drosophila Research Conference, 2016 年

⑮ Wada M, Tanaka T, Doi Y, Ishikawa HO.
An overexpression screen identifies regulators of cell-cell signaling.
The 12th Japanese Drosophila Research Conference, 2016 年

⑯ 石川 裕之、白石 穂高、和田 萌、計良 陽子
ショウジョウバエ組織形成におけるゴルジ体キナーゼ Four-jointed のリン酸化局域
第 68 回日本細胞生物学会大会 シンポジウム「オルガネラ局域の間取り図」, 2016 年 (招待講演)

[その他]

ホームページ等

千葉大学理学部生物学科発生遺伝学研究室

<http://www.bio.s.chiba-u.ac.jp/ishikawa.html>

※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。