

令和元年5月24日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21629

研究課題名(和文) ERK活性の時空間伝搬による上皮陥入の再構成

研究課題名(英文) Reconstructing epithelial invagination by a wave of ERK activity

研究代表者

小椋 陽介(Ogura, Yosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：20733158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)は、細胞の増殖・運動・分化などの多様な現象を制御する。生体内ではERK活性が複雑な時空間パターンで変化するが、その発生現象への寄与については未解明であった。本研究は、器官形成に重要な上皮の陥入の過程で見られるERK活性の伝搬現象に注目し、ERK活性の時空間パターンが形態形成運動を制御する仕組みを解明した。具体的な成果としては、(1) ERKシグナルのポジティブフィードバックがERK活性を細胞間伝搬させることを明らかにし、上皮陥入への寄与を示した。(2) FRET画像の解析手法を確立し、神経外胚葉分化における細胞質と核でのERK活性の差異を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医学においては、適切な形と大きさをもつ器官を試験管内で再構築する技術基盤の確立が期待されている。今回得られた研究成果は、器官の自律的発生の背景にある分子・細胞レベルの仕組みの一端を解明した。このような知見は、モデル生物の発生の理解にとどまらず、上記のような医療の基盤技術の確立にも応用が期待される。このような、学術的・社会的意義の側面については、理化学研究所のウェブサイトのプレスリリースとして掲載し、神戸新聞でも報道された。

研究成果の概要(英文)：Extracellular signal-regulated kinase (ERK) regulates a wide variety of phenomenon including cell proliferation, cell movement and cell differentiation. The complex changes in the spatiotemporal patterns of ERK activity occurring in vivo have yet to be elucidated with respect to its role in the regulation of developmental phenomenon. This study clarified how the propagation of ERK activity during epithelial invagination regulates this morphogenetic movement. Specifically, we obtained the following achievements: (1) The positive feedback in the ERK signaling pathway that enables the propagation of ERK activity and its contribution to the regulation of invagination was clarified. (2) The method of FRET image analysis was established and applied to clarify the difference of ERK activity in the cytoplasmic and nuclear compartments.

研究分野：発生生物学

キーワード：器官形成 細胞間シグナル伝達 形態形成 上皮 Sos Ras ERK 画像解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) は、細胞の増殖・運動・分化などの多様な現象を制御する。ERK の活性化は、上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) を介した細胞間コミュニケーションによって引き起こされる。このような細胞間相互作用は、組織内で複雑な ERK 活性化の時空間パターンをもたらすことが、近年のライブイメージングを用いた研究から明らかになってきた。しかし、その発現現象への寄与については未解明であった。

2. 研究の目的

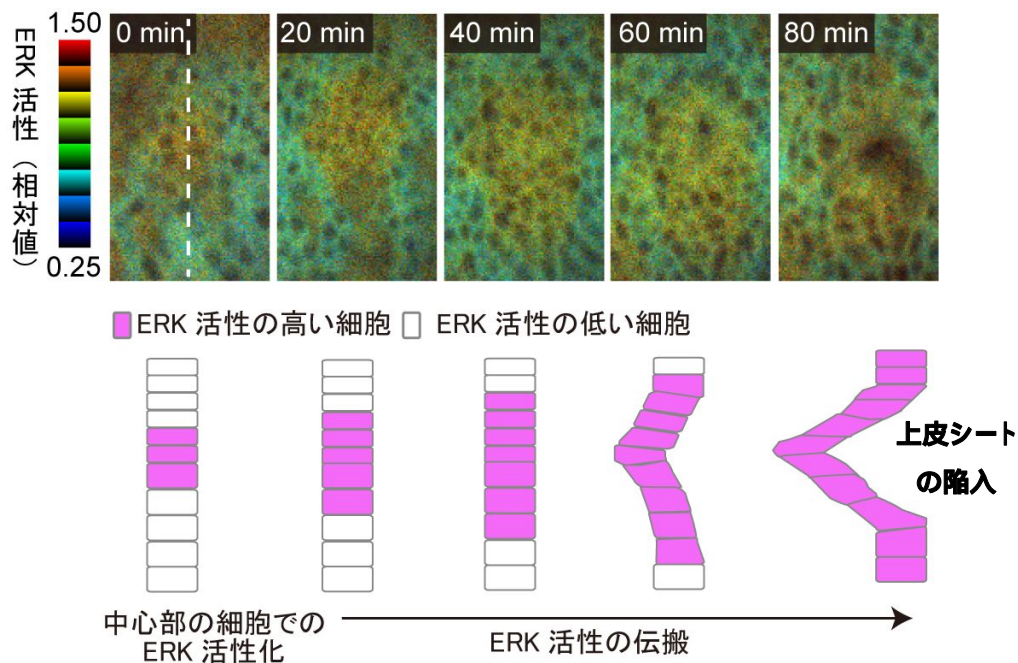
本研究では、EGFR-ERK シグナルによって制御される発現現象の例として、ショウジョウバエの気管プラコードの陥入を選択した。この系を用いて、一定の形とサイズをもつ器官の形成が、ERK 活性化の時空間パターンによってどのように制御されているかという問題に取り組んだ。また、その理解をもとに、ERK の活性化パターンを人工的に操作可能にし、適切な形と大きさをもつ器官の再構成を可能とすることを旨とした。

3. 研究の方法

哺乳類培養細胞で開発された蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) プローブをショウジョウバエ胚に導入した (雑誌論文 -)。当初利用したプローブは細胞質での ERK 活性のレポーターであったが、核での ERK 活性のレポーターも導入し、細胞質と核での ERK 活性化の時空間パターンの差異についても明らかにした (雑誌論文)。気管の分化と形態形成に重要な *tracheiless* 遺伝子の変異体では、ERK 活性の伝搬にも異常が見られる。そこで、FRET プローブによる ERK 活性の解析を *tracheiless* 変異体において行った。また、リガンドの活性化によって EGFR シグナルを活性化する Rhomboid に対する抗体を作製して ERK 活性化のパターンと比較した。

4. 研究成果

本研究では、計画に沿って実験を進めながらも、当初想定されていなかった3つの知見を得た。それらの知見をもとに、ERK 活性化と伝搬による上皮の陥入機構を提唱した (下図)。



(1) ERK 活性化のポジティブフィードバックによる制御

ERK 活性の細胞間伝搬が起こる仕組みとして、EGFR リガンドの活性化因子 Rhomboid が EGFR シグナルによる正のフィードバックを受けていることを見出した。Rhomboid を発現する細胞は、はじめプラコードの中心付近に限定されているが、このフィードバック制御により、リガンドを受容した細胞でも Rhomboid の発現が誘導され、ERK 活性が細胞間を伝搬すると考えられる (雑誌論文)。

(2) スイッチ様の ERK 活性化

計画に沿って用いた *tracheiless* 変異体は、ERK 活性の細胞間伝搬が異常になる変異体である。ところが、FRET を用いたライブイメージングを行い、詳しい定量解析を行ったところ、ERK 活性の細胞間伝搬が ERK 活性の ON/OFF (スイッチ様) 応答と密接に関係していることが明らかになった。本来 ERK の活性化はスイッチ様に起こるが、*tracheiless* 変異体では、段階的な活性化になっていることを見出した (雑誌論文)。 (1) の ERK 活性のポジティブフィードバックは、スイッチ様の ERK 活性化にも寄与していると考えられる。従来、ショウジョウ

バエを含む胚の発生過程でのパターン形成は、段階的な ERK 活性化によって説明されてきたが、上記のようなスイッチ様の ERK 活性化はこの枠組みに対立する現象である。この発見をきっかけとして、ERK 活性の勾配が形成される神経外胚葉の分化過程を再検討した。その結果、細胞質での ERK 活性が安定した勾配を示すのに対し、核での ERK 活性化はよりスイッチに近い変化を示すことが明らかになった (雑誌論文)。

(3) 細胞境界への RasGEF Sos の蓄積とミオシンの活性化

Ras-ERK 経路と Myosin をつなぐ分子機構を明らかにするために、Myosin と共同在する Ras 活性化因子を探索した。その結果、Ras の活性化に関わる RasGEF Sos が細胞膜上において Myosin と共同在することが判明した。このことは、ERK 活性化によって起こるミオシンの活性化に Sos が関与することを示唆する。続いて、EGFR-ERK 経路が細胞膜での Sos の蓄積を誘導する過程で、スイッチ様と段階的な ERK 活性のどちらが効率的かを検討するために、MATLAB を用いて物理モデルを構築した。このモデルでは、Sos によってミオシンが細胞境界に蓄積して張力が強化される仮定が含まれているが、ERK 活性化がスイッチ様のときに効率良くプラコードの陥入が起こる。このことは、(2) で明らかにされた *tracheiless* の表現型とも対応した。さらに、本研究期間中に Sos の活性化を光遺伝学によって操作する実験系が米国のグループによって開発された (Johnson et al. 2017)。そこで、この実験系を用いて Sos を異所的に活性化し、上皮の陥入を誘導することを目指して条件検討を行っている。

< 引用文献 >

Johnson HE, Goyal Y, Pannucci NL, Schüpbach T, Shvartsman SY, Toettcher JE (2017)
The spatiotemporal limits of developmental Erk signaling.
Developmental Cell 40:185-192.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Yosuke Ogura, Mustafa M. Sami, Housei Wada, Shigeo Hayashi (2019)
Automated FRET quantification reveals distinct subcellular ERK activation kinetics in response to graded EGFR signaling in *Drosophila*
Genes to Cells, 査読有, Vol.24, 297-306.

Yosuke Ogura, Fu-Lai Wen, Mustafa M. Sami, Tatsuo Shibata, Shigeo Hayashi (2018)
A switch-like activation relay of EGFR-ERK signaling regulates a wave of cellular contractility for epithelial invagination
Developmental Cell, 査読有, Vol.46, 162-172.

Tetsuhisa Otani, **Yosuke Ogura**, Kazuyo Misaki, Takuya Maeda, Akiyo Kimpara, Shigenobu Yonemura, Shigeo Hayashi (2016)
IKKε inhibits PKC to promote Fascin-dependent actin bundling.
Development, 査読有, Vol.43, 3806-3816.

[学会発表] (計 8 件)

小椋 陽介

ショウジョウバエ胚発生過程における EGFR-ERK シグナル活性化のダイナミクス
細胞集団運動の統合的理解に向けたメカノバイオロジー研究の国際共同ネットワーク構築 (SPIRITS: 「 知の越境 」 融合チーム研究プログラム) (招待講演) 2018 年

Yosuke Ogura, Fu-Lai Wen, Mustafa M. Sami, Tatsuo Shibata, Shigeo Hayashi
Iterative relay of epidermal growth factor receptor signaling regulates epithelial invagination via a wave of cellular contractility
第 70 回日本発生生物学会 (日本細胞生物学会合同大会) 2018 年

Yosuke Ogura, Fu-Lai Wen, Mustafa M. Sami, Tatsuo Shibata, Shigeo Hayashi
Intercellular propagation of EGF-ERK signaling by relay mechanism directs epithelial invagination
Taiwan-Japan Joint Meeting on Bioimaging for Young Researchers (国際学会) 2018 年

小椋 陽介, Fu-Lai Wen, Mustafa M. Sami, 柴田 達夫, 林 茂生
EGF-ERK/MAPK シグナルの反復リレーによる上皮の陥入
分子生物学会年会 (生命科学系学会合同年次大会) 2017 年

Mustafa M. Sami, **Yosuke Ogura**, Yu-Chiun Wang, Shigeo Hayashi
Automated image processing and analysis software for epithelial cells quantification

17th international ELMI meeting 2017 年

Yosuke Ogura, Fu-Lai Wen, Mustafa M. Sami, Tatsuo Shibata and Shigeo Hayashi
Iterative EGF-ERK signaling relay directs mechanical force required for epithelial invagination

18th international Congress of Developmental Biology 2017 年

Yosuke Ogura, Fu-Lai Wen, Mustafa M. Sami, Tatsuo Shibata and Shigeo Hayashi
An intercellular relay of EGF-ERK signaling polarizes the mechanical force to facilitate invagination of organ placode

EMBL Symposium: Mechanical Forces in Biology 2017 年

小椋 陽介, 林 茂生

ERK 活性の細胞間伝搬が制御する上皮の陥入、4D 細胞計測若手の会、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://signaling.riken.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。