

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22423

研究課題名(和文)細胞集団挙動を介した発生時間軸制御の遺伝的基盤

研究課題名(英文) Robust, time-dependent coordination of tissue growth through cell-cell communications

研究代表者

大澤 志津江(Ohsawa, Shizue)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：80515065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：発生中の生体が様々な攪乱に対処する過程で、発生プロセスに遅れが生じることがある。しかしながら、個体の発生遅延を補正して正常な組織形成を行う仕組みはいまだ不明である。我々は、幼虫期に顕著な発生遅延を示すショウジョウバエMinute変異体を起点とした解析を行なった結果、ショウジョウバエ幼虫が成長遅延を起こした際に、その遅延を補正する細胞集団挙動「細胞ターンオーバー」が翅原基で誘発されること、およびこの細胞ターンオーバーが成虫翅の表現型を制約する上で重要な役割を果たしていることを明らかにした(Akai, Ohsawa et al, PLoS Genetics, 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、「細胞集団挙動を介した発生時間軸制御」という、多細胞コミュニティが内包する新しい動的恒常性維持機構の存在を示唆するものであり、発生生物学や、表現型制約の仕組みを解析する進化生物学の発展に大きく貢献し得ると期待される。また興味深いことに、今回モデルとして用いたMinute変異体と同様のリボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異が様々なヒトの疾患(リボソーム病と総称される)を引き起こすことが知られている。今後、分子基盤を明らかにすることで、いまだ大きな謎であるリボソーム病の発症機序の解明とその新たな治療戦略の基盤構築に将来的にはつながり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Highly reproducible tissue development is achieved by robust, time-dependent coordination of cell proliferation and cell death. To study the mechanisms underlying robust tissue growth, we analyzed the developmental process of larval *Drosophila* Minute mutants, a series of mutants for a ribosomal protein gene, which show significantly prolonged larval period but develop into normal flies. Surprisingly, we found that both cell death and compensatory cell proliferation were dramatically increased in developing wing discs of Minute animals. Blocking the cell-turnover resulted in various morphological defects, indicating the essential role of cell-turnover in Minute wing morphogenesis. Genetic analyses showed that Minute wing discs elevate Wg expression, which cooperates with developmental delay for the induction of cell-turnover. Our findings suggest a novel paradigm for robust coordination of tissue growth by cell-turnover, which is induced when developmental time axis is distorted.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：組織成長 細胞間相互作用 成長遅延 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生は、種々の外的・内的攪乱のもとでも正確な形・大きさの組織を形成しようとする頑健(ロバスト)な現象である。ここで、発生中の個体が様々な内的(遺伝的)・外的(環境変化)攪乱に対処する際に、発生プロセスに遅れが生じることがある。この発生プロセスの遅れは何らかの機構により補正され、正常な組織形成が実現されると考えられるが、その仕組みはいまだ不明である。我々は、幼虫期に顕著な発生遅延を示すショウジョウバエ *Minute* 変異体(※リボソームタンパク質遺伝子の機能欠損変異をヘテロに持つ一連の変異体の総称)を起点とした解析を開始した結果、幼虫期のショウジョウバエが成長遅延を起こした際に、その遅延を補正する細胞集団挙動「細胞ターンオーバー(細胞死と細胞増殖による細胞の入れ替え)」が翅原基で誘発される可能性を予備的実験により見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、個体の成長遅延が「細胞ターンオーバー」を翅原基に誘発する現象とその意義を検証すると同時に、その分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 個体の成長遅延が「細胞ターンオーバー」を翅原基に誘発する現象とその意義の検証

個体の成長遅延を引き起こした際に、*Minute* 変異体と同様に翅原基で細胞ターンオーバーが誘発されるかどうかを検証すると同時に、*Minute* 変異体の翅原基において遺伝学的に細胞ターンオーバーを抑制した際の表現型を解析する。また、*Minute* 変異体の翅原基において細胞ターンオーバーが誘発される仕組みを遺伝学的に解析する。

(2) 個体の成長遅延が「細胞ターンオーバー」を翅原基に誘発する分子機構の解明

まず RNA-seq 解析を行い、個体の成長遅延にตอบสนองして翅原基でその転写産物の発現量が変動する遺伝子群を単離する。単離した遺伝子群のうち、細胞ターンオーバーに関わる遺伝子群を同定する *in vivo* RNAi スクリーニングを行う。同定された遺伝子群の機能と役割を遺伝学的に明らかにすることで、細胞集団挙動を介した発生時間軸制御の分子基盤の解明を目指す。

4. 研究成果

(1) 個体の成長遅延が「細胞ターンオーバー」を翅原基に誘発する現象とその意義の検証

上述の通り我々は、幼虫期に顕著な発生遅延を示すショウジョウバエ *Minute* 変異体をモデルとした解析を開始し、幼虫期のショウジョウバエが成長遅延を起こした際に、その翅原基において細胞ターンオーバーが誘発される可能性を予備的実験により見いだした。具体的には、*Minute* 変異体においてインスリン様ペプチド *dilp8* の発現量を遺伝学的に減少させる、あるいは、変態ホルモン Ecdysone を *Minute* 変異体幼虫に与えることで幼虫期の成長遅延を抑制すると、翅原基における細胞ターンオーバーが有意に抑制されることを発見した。また、(1) 幼虫から蛹への変態が抑制された *ecdysone* 変異体、(2) 複眼原基において、進化的に保存された apico-basal 極性遺伝子 *scribble* を遺伝学的に欠損させて腫瘍を誘導し、一時的に個体発生を中断させた幼虫、あるいは、(3) Ecdysone の産生に必要な ergosterol を欠損した酵母で幼虫を成長させ、個体発生を中断させた幼虫について、その翅原基を調べた結果、いずれの場合も細胞ターンオーバーが誘発されていることが、本研究期間において明らかになった。さらに、このような幼虫期の成長遅延に加えて、翅原基においてモルフォゲン Wingless (Wg, Wnt ホモログ) の発現量が上昇し、これにより、Wg の濃度勾配が通常よりも強くなると、細胞ターンオーバーがさらにさかんに引き起こされることが明らかとなった(図1)。*Minute* 変異体の翅原基について、Wg シグナルの活性化

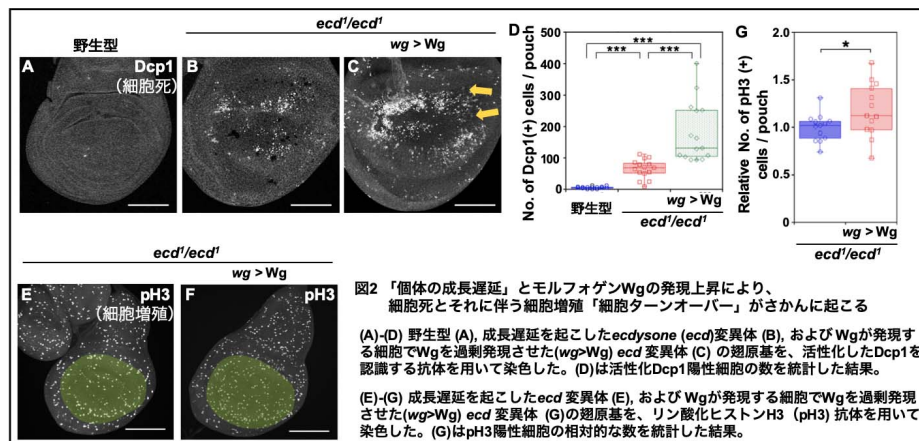


図2 「個体の成長遅延」とモルフォゲンWgの発現上昇により、細胞死とそれに伴う細胞増殖「細胞ターンオーバー」がさかんに起こる (A)-(D) 野生型 (A), 成長遅延を起こした*ecdysone* (*ecd*)変異体 (B), およびWgが発現する細胞でWgを過剰発現させた(*wg>Wg*) *ecd* 変異体 (C) の翅原基を、活性化したDcp1を認識する抗体を用いて染色した。(D)は活性化Dcp1陽性細胞の数を統計した結果。(E)-(G) 成長遅延を起こした*ecd* 変異体 (E), およびWgが発現する細胞でWgを過剰発現させた(*wg>Wg*) *ecd* 変異体 (G)の翅原基を、リン酸化ヒストンH3 (pH3) 抗体を用いて染色した。(G)はpH3陽性細胞の相対的な数を統計した結果。

パターンを調べてみると、興味深いことに、Wgシグナルの活性化が低い細胞が細胞死を起こしていることが分かった(図2)。すなわち、幼虫期の成長遅延が起きた際に、Wgシグナルの強度差が異なる細胞同士が翅原基において隣接すると、Wgシグナルが相対的に低い細胞が細胞死を起こして組織から排除され、その分、Wgシグナルが相対的に高い細胞が余分に増殖する「細胞競合」と類似した現象が引き起こされていると考えられた。

では、幼虫期の成長遅延にตอบสนองして翅原基で誘導される細胞ターンオーバーは、どのような役割を果たしているのだろうか。*Minute*変異体の翅原基 pouch 領域(将来翅のブレードを形成する領域)において、開始カスパーゼ Dronc の機能を遺伝学的に抑制する、あるいは、細胞死遺伝子 *reaper*, *hid*, *grim* を含む染色体領域の量を半分にし、細胞死を抑制し、それにより、細胞ターンオーバーを抑制した結果、興味深いことに、形態異常や様々な翅脈パターンの異常が成虫翅に引き起こされることが分かった(図3)。重要な点は、野生型の翅原基において、同様の方法で細胞ターンオーバーを抑制しても、成虫翅に異常をきたさない(図3)。これらの事実は、個体の成長遅延を補正する細胞ターンオーバー機構の偶発的なエラーが多様な表現型を出現させ得る可能性を示唆している(#Akai, #\*Ohsawa (# Equal contribution, \*Co-corresponding author) et al, PLoS Genetics, 2021)(図4)。

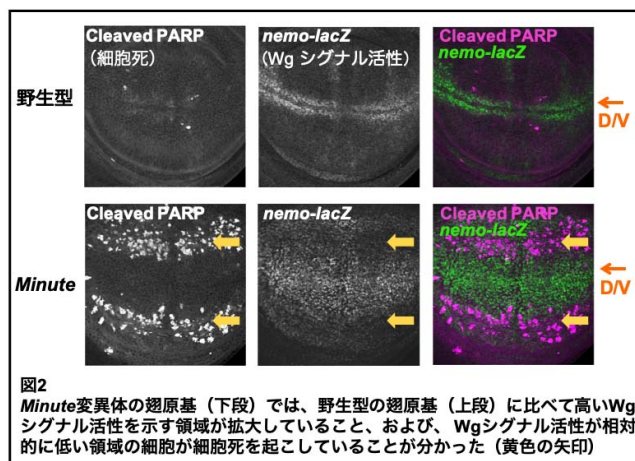


図2 *Minute*変異体の翅原基(下段)では、野生型の翅原基(上段)に比べて高いWgシグナル活性を示す領域が拡大していること、および、Wgシグナル活性が相対的に低い領域の細胞が細胞死を起こしていることが分かった(黄色の矢印)

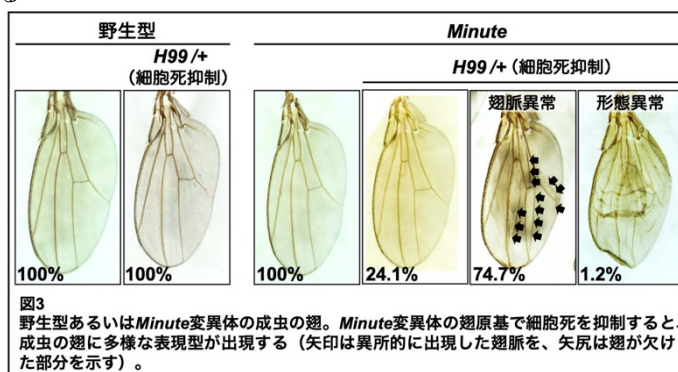


図3 野生型あるいは*Minute*変異体の成虫の翅。*Minute*変異体の翅原基で細胞死を抑制すると、成虫の翅に多様な表現型が出現する(矢印は異所的に出現した翅脈を、矢尻は翅が欠けた部分を示す)。

(2) 個体の成長遅延が「細胞ターンオーバー」を翅原基に誘発する分子機構の解明

上述の通り、幼虫期において個体の成長遅延が起こると、翅原基において細胞ターンオーバーが誘発され、これにより正常発生が実現する(表現型を制約する)という新しい現象が明らかとなったが、翅原基が個体の成長遅延を“感知”して細胞ターンオーバーを誘発する分子機構は不明である。そこでこの未知の仕組みを明らかにするために、まずRNA-seq解析を実施した。具体的には、(i) 野生型コントロール、(ii) 幼虫期に顕著な発生遅延を示す *Minute* 変異体、および (iii) JNKシグナルを遺伝学的に抑制して発生遅延を抑制した *Minute* 変異体 幼虫の翅原基の細胞をFACS (fluorescence activated cell sorter) により分取してRNAを抽出、次世代シーケンサーNextseq500 (イルミナ) を用いてRNA-seq解析を行い(近藤武史博士、井垣達吏博士(京都大学大学院生命科学研究科)との共同研究)、発生遅延に伴って発現変動する遺伝子群を単離した。次に、同定された遺伝子群に対する*RNAi*をそれぞれ、野生型コントロール(i)あるいは成長遅延が引き起こされた *Minute* 変異体 (ii)の翅原基において特異的に発現させ、これにより細胞ターンオーバーに影響をきたすものを、死細胞の数(カスパーゼ依存的な細胞死を抗体染色により可視化)を指標に単離する *in vivo RNAi* スクリーニングを行った。その結果、細

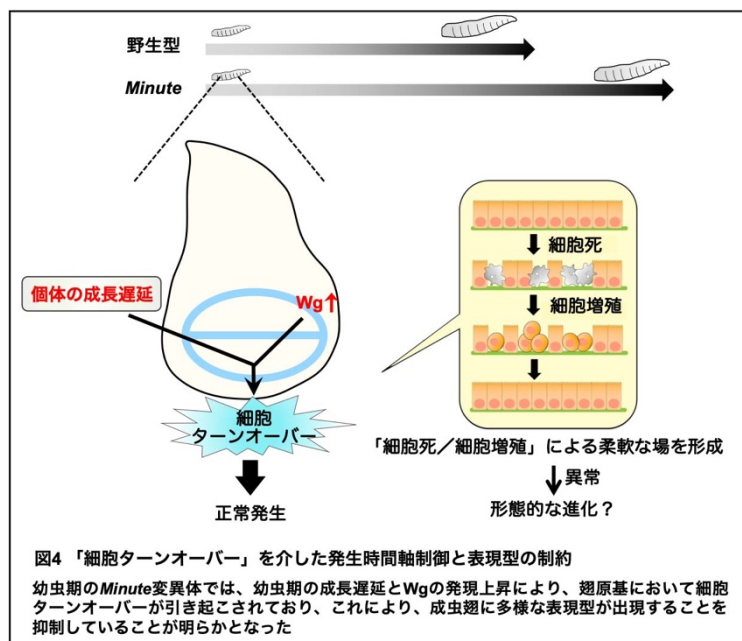


図4 「細胞ターンオーバー」を介した発生時間軸制御と表現型の制約  
幼虫期の*Minute*変異体では、幼虫期の成長遅延とWgの発現上昇により、翅原基において細胞ターンオーバーが引き起こされており、これにより、成虫翅に多様な表現型が出現することを抑制していることが明らかとなった

細

胞ターンオーバーを翅原基に誘導する遺伝子群を複数同定することに成功した。このことは、個体の成長遅延に応答して、翅原基において細胞ターンオーバーを誘発する仕組みが確かに翅原基に内包されていることを示唆している。

時間情報を利用した生体システムの制御機構は、種々のモデル生物を用いて古くから解析されてきた。なかでも、組織の成長タイミングについては、ホルモンを介したシステミックなシグナルが重要な役割を果たすことが明らかになり、その分子機構解析も進展しつつある。一方で、個体と組織の時間軸（成長速度）を調和させる仕組みは分かっていなかった。本研究では、細胞集団挙動を介した時間軸制御機構の存在を原著論文として発表し、また、その仕組みを担う候補遺伝子群を同定することに成功した。今後は、個体の成長遅延に応答して翅原基に細胞ターンオーバーを誘発する遺伝子群をさらに絞り込むために、成長遅延を誘発した野生型幼虫の翅原基で発現する転写産物を RNA-seq により解析すると同時に、本研究において同定した、細胞ターンオーバー制御因子として同定された遺伝子群の機能とその細胞ターンオーバーにおける役割を、遺伝学的実験および分子生物学的実験により明らかにすることで、細胞集団挙動を介した発生時間軸制御の分子基盤の解明を目指す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 #Akai N, #*Ohsawa S(# Equal contribution; *Co-corresponding author), Sando Y, *Igaki T	4. 巻 17
2. 論文標題 Epithelial cell-turnover ensures robust coordination of tissue growth in Drosophila ribosomal protein mutants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iida C, Ohsawa S, Taniguchi K, Yamamoto M, Morata G, Igaki T	4. 巻 9
2. 論文標題 JNK-mediated Slit-Robo signaling facilitates epithelial wound repair by extruding dying cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci., Rep.	6. 最初と最後の頁 19549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56137-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohsawa S	4. 巻 61
2. 論文標題 Elimination of oncogenic cells that regulate epithelial homeostasis in Drosophila	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev. Growth. Differ.	6. 最初と最後の頁 337-342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ohsawa S, Akai N, Sando S, Igaki T
2. 発表標題 Epithelial turn-over through cell competition ensures robust coordination of tissue growth in Drosophila
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤志津江
2. 発表標題 細胞ターンオーバーを介した発生口バストネスの遺伝的基盤
3. 学会等名 第19回 日本タンパク質科学学会年会 第71回 日本細胞生物学会大会 合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤志津江
2. 発表標題 折り畳まれた上皮組織から3D形態へと変形を開始するメカニズム
3. 学会等名 第1回日本メカノバイオロジー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤志津江
2. 発表標題 Elimination of oncogenic cells through tumor-suppressive cell competition in Drosophila
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤志津江
2. 発表標題 3D morphogenesis of adult appendages from the Folded Epithelial Sheets in Drosophila
3. 学会等名 The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium "Imaging and Quantitative Biology" (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野崎勝也、柳田晃佑、中山萌美、前川絵美、井垣達史、大澤志津江
2. 発表標題 ショウジョウバエ成虫原基から外部形態への変形を制御するメカニズムの解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------