

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06188

研究課題名(和文)キラルなアクチン動態が細胞キラリティを誘導する機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism by which chiral actin dynamics induces cell chirality

研究代表者

稲木 美紀子 (Inaki, Mikiko)

大阪大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：10747679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞キラリティによる左右性形成機構の重要な課題である分子のキラルな動態による細胞キラリティの誘導機構を解明することを目的とした。細胞キラリティをde novoで誘導できるショウジョウバエ幼虫の表皮を用いたライブイメージングを行った。その結果、一齢から三齢にかけて細胞のキラリティが強まり、それに伴い配向性のあるアクチン繊維が観察されることが分かった。また、1型ミオシンのキラリティ誘導を担うドメインの探索を行った。その結果、アクチン繊維と相互作用する4つのループドメインがMyosin1Cの活性に十分であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞キラリティは、様々な生物種および細胞種で発見されているが、その形成機構は不明であり、まだ分子基盤の明らかにされていない数少ない生命現象の一つである。アクチン繊維を含む多くの生体高分子はキラリティを示すが、アクチン繊維にキラルな動きを誘導できるのは、ショウジョウバエMyosin1Dと藻類の限られたミオシンのみである。本研究により、生体内でMyosin1Dが細胞キラリティを増強する過程で配向性のあるアクチン繊維を誘導することがわかり、生体内での細胞キラリティ形成過程の一端を初めて明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanism of cell chirality induction by the chiral molecular dynamics, which is a major issue in the mechanism of laterality formation by cell chirality. We performed live imaging using larval epidermis, where cell chirality can be induced de novo. As a result, it was found that cell chirality increases from the first to the third instar, and oriented actin fibers are observed. We also searched for the domain responsible for inducing chirality in type 1 myosin. The results showed that four loop domains that interact with actin filaments are sufficient for Myosin1C activity.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞キラリティ Myosin 1D ショウジョウバエ アクチン細胞骨格 Myosin 1C

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多くの生物は、外形、内臓器官や脳などに左右非対称な形態や機能をもつ。その形成機構に関しては、ノード流による胚の左右軸形成など脊椎動物で研究が進んでいる。一方、近年、組織を構成する個々の細胞自身もつ内在的な左右性によって、左右非対称性が形成されることが示されている。細胞の左右性は、細胞キラリティと呼ばれる、細胞の形状がその鏡像と重ならない性質として表すことができる。細胞キラリティは、ショウジョウバエ胚の後腸上皮細胞で初めて発見され、細胞キラリティによって誘導される後腸の一方方向への捻転により、後腸は左右非対称化する (Taniguchi et al., 2011, Inaki et al., 2018)。その後、上皮細胞 MDCK や繊維芽細胞 NIH3T3 など様々な脊椎動物の組織由来の培養細胞でも見つかると、細胞キラリティが細胞のもつ普遍的な属性であることが示されつつある。ショウジョウバエでは細胞キラリティの向きの決定因子として 1 型ミオシンの 1 つである Myosin1D が同定されており、Myosin1D の突然変異体では、後腸の捻転前の細胞キラリティと捻転方向が野生型と比べて鏡像化する (Taniguchi et al., 2011)。また、*in vitro* で、Myosin1D がアクチン繊維の左右非対称な旋回運動や繊維束の渦巻きを誘導できることが示されている (Lebreton et al., 2018、投稿準備中)。このように、分子、細胞、組織のそれぞれにキラリティの存在が明らかになっており、細胞のキラリティにより組織のキラリティが予測可能であることも示されている (Ishibashi, Inaki et al., 2020)。しかしながら、アクチン繊維のキラルな分子動態から細胞キラリティが誘導される仕組みについては、全くわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、細胞キラリティが初めて発見され、組織の左右性形成との関連が示されているショウジョウバエをモデル系として、細胞キラリティが分子のキラルな動態により誘導される仕組みを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 分子のキラリティによる細胞キラリティの誘導機構の解析

ミオシン 1D により、アクチン繊維のキラルな渦巻きが誘導されることをこれまで示してきた (投稿準備中)。また、ヒトの線維芽細胞では、細胞キラリティと関連したアクチン束の旋回運動が観察されている。本研究では、これらのアクチン繊維のキラリティが細胞のキラリティを誘導しているかを示すことを試みる。これまで、ショウジョウバエ胚の後腸をモデル系として、アクチン細胞骨格系の動態の観察を試みてきたが、腸管が胚の深部にあることと、腸管自体がねじれていくため、観察が難しかった。このため、*de novo* でキラリティを誘導できる幼虫の表皮を用いたイメージングを行う。表皮細胞に Myosin1D を強制発現させると細胞キラリティが誘導されることが示されている (Lebreton et al., 2018)。GAL4-UAS システムを用いて表皮全体で Myosin1D-RFP とアクチン繊維を標識するマーカーである Lifeact-GFP を強制発現し、幼虫を麻酔した状態で表皮の観察を行った。

#### (2) Myosin1D のドメイン解析によるキラリティ誘導領域の同定

Myosin1D の細胞キラリティの誘導能とアクチンの渦巻きの誘導能は、アクチンと相互作用するモータードメインにあることがわかっている。ショウジョウバエには、Myosin1D によく似た 1 型ミオシンで、Myosin1C が存在するが、Myosin1C にはアクチンの渦巻きの誘導能がない (投稿準備中)。アクチンとの結合にモータードメインのループ構造が重要なのではないかと考え、ループ構造をこれらの 1 型ミオシン間でスワップすることにより、キラリティの誘導能に必要な領域を特定した。ショウジョウバエでは、Myosin1D をコードする遺伝子の突然変異体で後腸逆位がみられ、Myosin1D を後腸上皮細胞特異的に発現することにより、その表現型が救済される。この実験系を利用して、Myosin1D のループ構造を Myosin1C のものにスワップすることで、ループの必要性を、Myosin1C ループ構造を Myosin1D のものにスワップすることで、ループの十分性を調べた。また、Myosin1C は野生型において過剰発現させることで、逆位の表現型を誘導する。このことを指標にして Myosin1C の活性に必要な十分な構造の解析も行った。

#### (3) 貪食細胞を用いた細胞の動きのキラリティ誘導活性の検証

(2) で、Myosin1D および Myosin1C の活性に必要なかつ/または十分な構造が同定された場合、それらにより細胞の動きのキラリティの誘導にも必要かつ/または十分であることをショウジョウバエの幼虫から単離培養した貪食細胞を用いて調べた。野生型および *Myosin1D* 突然変異体から単離した貪食細胞はそれぞれ右向きと左向きの回転運動を示す傾向がある。Myosin1D または Myosin1C を過剰発現させると、それぞれ右向きまたは左向きの傾向が強まることがわかっている。この系を利用して、ループ構造をスワップした Myosin1D および Myosin1C に関して細胞のキラルな動きの誘導活性があるかを検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 分子のキラリティによる細胞キラリティの誘導機構の解析

Myosin1D および Myosin1C を幼虫表皮に過剰発現させると、これまでの報告通り幼虫のねじれが観察され、表皮細胞も Myosin1D では右に傾き Myosin1C では左に傾くことがわかった(図1上)。この時、Myosin1Dの過剰発現では左に傾いたアクチン繊維束が観察された(図1下)。強制発現していない細胞では見られないことから、これらの構造が細胞を傾かせている可能性が示唆された。また、ショウジョウバエの幼虫は1齢から3齢まで成長するが、2齢から3齢になる際に細胞のキラリティが増強され、1齢から徐々に強まる可能性が示唆された。1齢幼虫はサイズが小さく観察が難しいため、明瞭なアクチン繊維構造の観察に至っていないが、今後観察を進めることで、キラリティ形成過程とアクチンの構造体の形成の関係が明らかになると期待される。

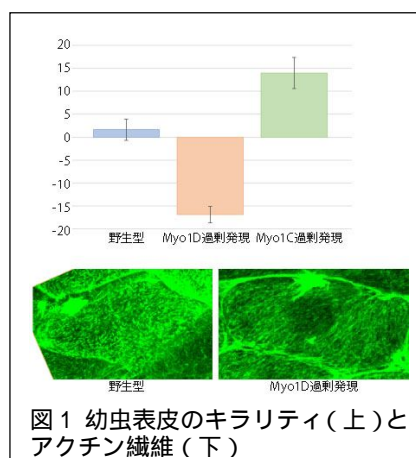


図1 幼虫表皮のキラリティ(上)とアクチン繊維(下)

### (2) Myosin1Dのドメイン解析によるキラリティ誘導領域の同定

Myosin1DとMyosin1Cのモータードメインのうちアクチン繊維と相互作用することが構造上予想されている4つのループ構造(ループL2,L3,L4およびCM)に関してMyosin1DとMyosin1Cのものをそれぞれ、また4つすべて入れ替えた。その結果、Myosin1Dのループに関しては、L4,CMはMyosin1Cの対応するループに置き換えが可能であるが、L2とL3はその活性に必要であり、置き換えるとMyosin1Dの右手活性がそれぞれ約10%と約40%低下することがわかった(図2)。十分にに関しては、4つのループをMyosin1Cへ入れても、Myosin1Dの右手活性を誘導するには十分でないことがわかった。一方、Myosin1Cのループは個別および4つを入れ替えてもMyosin1Cの活性を保ったことから、必要性はなくループ以外の部分にもMyosin1Cの活性があることがわかった。十分にに関してはMyosin1Dの4つのループをMyosin1Cのものに入れ替えると、Myosin1D突然変異体においてMyosin1Cと同じ左手活性を示したことから、4つのループで十分であることがわかった(図2)。

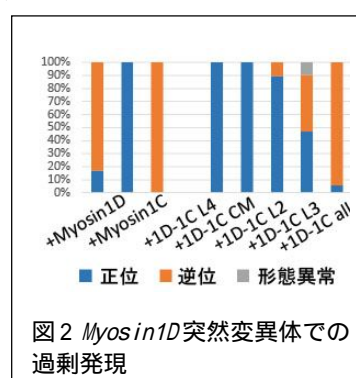


図2 Myosin1D突然変異体での過剰発現

### (3) 貪食細胞を用いた細胞の動きのキラリティ誘導活性の検証

(2)の実験で用いたMyosin1Cの4つのループをMyosin1Dに入れた改変ミオシンを、貪食細胞に発現させた。その結果、Myosin1Cを発現させた時と同様に反時計回りの動きが誘導された。このことから、Myosin1Cの4つのループ構造が普遍的な左手活性を示すのに十分であることが示された。

これらの結果から、Myosin1DおよびMyosin1Cが特異的なアクチンとの相互作用を介して、アクチン構造を構築し細胞にキラリティを与えることが示唆された。

## 引用文献

Inaki M, Hatori R, Nakazawa N, Okumura R, Ishibashi T, Kikuta J, Ishii M, Matsuno K, Honda H

Chiral cell sliding drives left-right asymmetric organ twisting.

eLife 7: e32506 (2018)

Ishibashi T, Inaki M, Matsuno K

Statistical validation verifies that enantiomorphic states of cell chirality are determinant dictating the left- or right-handed direction of the hindgut rotation in *Drosophila*.

Symmetry 12: 1991 (2020)

aniguchi K, Maeda R, Ando T, Okumura T, Nakazawa N, Hatori R, Nakamura M, Hozumi S, Fujiwara H, Matsuno K \*Equal contribution

Chirality in planar cell shape contributes to left-right asymmetric epithelial morphogenesis.

Science 15;333(6040):339-41 (2011)

Lebreton G, Geminard C, Lapraz F, Pyrpassopoulos S, Cerezo D, Speder P, Ostap EM, Noselli S.

Molecular to organismal chirality is induced by the conserved myosin 1D.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Lai Yi-Ting, Sasamura Takeshi, Kuroda Junpei, Maeda Reo, Nakamura Mitsutoshi, Hatori Ryo, Ishibashi Tomoki, Taniguchi Kiichiro, Ooike Masashi, Taguchi Tomohiro, Nakazawa Naotaka, Hozumi Shunya, Okumura Takashi, Aigaki Toshiro, Inaki Mikiko, Matsuno Kenji	4. 巻 150
2. 論文標題 The Drosophila AWP1 ortholog Doctor No regulates JAK/STAT signaling for left-right asymmetry in the gut by promoting receptor endocytosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev201224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.201224	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 Shin Dongsun, Nakamura Mitsutoshi, Morishita Yoshitaka, Eiraku Mototsugu, Yamakawa Tomoko, Sasamura Takeshi, Akiyama Masakazu, Inaki Mikiko, Matsuno Kenji	4. 巻 148
2. 論文標題 Collective nuclear behavior shapes bilateral nuclear symmetry for subsequent left-right asymmetric morphogenesis in Drosophila	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.198507	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Inaki M, Okuda S, Matsuno K
2. 発表標題 Twist and elongation of gut tube independently arise through chiral cell sliding and convergent extension, respectively, in epithelial tissue.
3. 学会等名 第55回 日本発生生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikiko Inaki, Kengo Yada, Kenji Matsuno
2. 発表標題 Elucidation of the mechanism by which epithelial cells acquire mobility stepwisely.
3. 学会等名 第45回 分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inaki M, Matsuno K
2. 発表標題 Twist and elongation of gut tube independently arise through chiral cell sliding and convergent extension, respectively, in epithelial tissue.
3. 学会等名 第44回 分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inaki M, Matsuno K
2. 発表標題 Twist and elongation of gut tube independently arise through chiral cell sliding and convergent extension, respectively, in epithelial tissue.
3. 学会等名 ショウジョウバエ研究会第14回研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inaki M, Matsuno K
2. 発表標題 Twist and elongation of gut tube independently arise through chiral cell sliding and convergent extension, respectively, in epithelial tissue.
3. 学会等名 第54回 日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2021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
---------	---------