

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650081

研究課題名(和文)細胞のキラリティの初代細胞培養系を用いた検出と形成機構の解析

研究課題名(英文)Development of Drosophila cell culture system to analyze cell chirality

研究代表者

松野 健治 (Matsuno, Kenji)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60318227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、ショウジョウバエの生体内の細胞がキラリティを示すことを明らかにしていた。しかし、生体内の細胞ではライブイメージング解析が困難であるため、その形成機構は不明である。この問題を解決するため、幼虫のヘモサイトを培養し、中心体の挙動をライブ観察した。その結果、核を中心とする中心体の回転方向を指標として、細胞キラリティを検出することに成功した。本研究の成果を利用することで、今後、細胞キラリティの分子レベルの実態を明らかにできると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chirality of cell structure is observed in vivo in Drosophila. However, bio-imaging analysis of cell chirality found in these cells has been difficult in vivo. Therefore, molecular mechanisms of cell chirality formation are still elusive. To overcome this problem, we attempted to develop a cell culture system to detect cell chirality. In this study, we developed a system to observe the chiral behavior of centrosome in cultured cells.

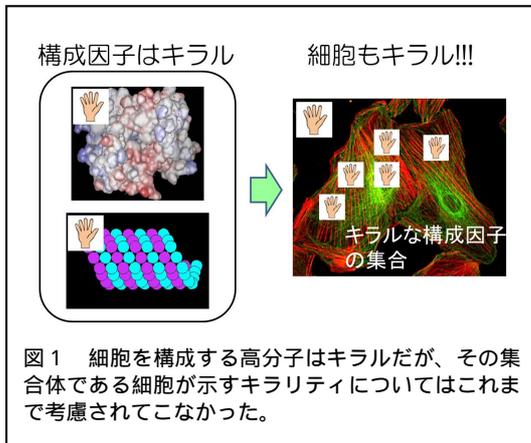
研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞キラリティ 細胞極性 左右非対称性 中心体 ヘモサイト

1. 研究開始当初の背景

動物細胞は、細胞極性を有しており、多くの細胞機能はその極性に従って機能している。したがって、細胞極性は、組織や器官が正常な機能をはたすために必要である。極性には、頂底極性、平面内細胞極性が含まれ、これらについては研究が進展している。研究代表者は、新規な細胞極性として、細胞キラリティの存在を明らかにしている(図1)。ショウジョウバエ胚の消化管では、上皮細胞の頂端面(内腔側)の形態が左右非対称になることで、消化管の形態が左右非対称になる。この左右に歪んだ細胞形態は、その鏡像が元の像と重ならないことから、キラリティを示すと考えられる。研究代表者は、この性質を、細胞キラリティと命名しました。細胞キラリティは、個々の細胞ごとに形成され、組織、器官、個体レベルの左右極性を反映することがないと考えられたが、*in vivo*の研究では明瞭な結論を得ることは困難であった。

一方、哺乳類培養細胞が固有のキラリティを示すことが、これまでに数例報告されてお



り、細胞キラリティが進化的に保存された現象であることが示唆されている。しかし、これらの研究は、細胞キラリティの記載のレベルにとどまっている。また、哺乳類での細胞キラリティの機能については、まったく研究が進展していない。動物のからだの左右非対称性の形成機構は進化的に多様であるが、いずれにしても、胚において左右軸が形成される必要があると考えられてきた。これに対して、研究代表者の研究から、ショウジョウバエでは、胚レベルの左右極性は形成されず、細胞キラリティを示している個々の細胞をユニットとして、左右非対称な組織形態の変化が起こることが示唆されている。

2. 研究の目的

細胞の極性は組織や器官の機能に必要であり、その破綻はヒト疾患の原因となる。研究代表者は、新規な細胞極性として、細胞キラリティ(左右に歪んだ細胞形態がその鏡像と重ならない)の存在を明らかにしている(図1)。この発見の発端となったのは、ショウジョウバエ胚の消化管が、上皮細胞の頂端面(内腔側)の形態が左右非対称になること

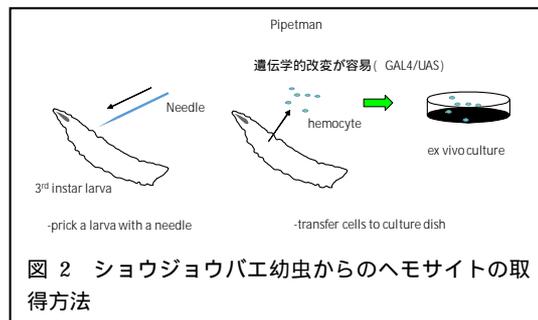
で、左右非対称な形態をとることである。他のグループの研究によって、細胞のキラリティは脊椎動物の培養細胞においても認められることがわかった。しかし、細胞キラリティが形成される機構の関しては、アクチン細胞骨格の構造の関与が示唆されている以外は、ほとんど理解されていない。そこで、本研究では、ショウジョウバエ幼虫由来の貪食細胞でキラリティを検出し、このシステムを用いて細胞キラリティの形成機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞キラリティ解析のための培養細胞系の確立

当初の計画では、ショウジョウバエ胚由来の細胞培養系で細胞キラリティを検出するはずであった。胚から初代培養細胞を得る方法がすでに報告されていたが、この方法を基礎とし条件検討を行っても、効率的に初代培養細胞を得ることができなかった。そこで、幼虫からヘモサイト(哺乳類のマクロファージに相当)を取り出し、培養して用いることとした。幼虫からのヘモサイトの取得は容易であり、昆虫培地を用いれば数日の培養が可能である(図2)。また、GAL4/UASシステムを用いることで、ヘモサイト特異的な遺伝子の強制発現や、RNA干渉法を用いた遺伝子ノックダウンを行うことができる。ヘモサイト特異的にGAL4を発現する系統はすでに樹立されているため、ショウジョウバエ系統を新たに樹立する必要がない。

研究開始時点で、ヒト好中球においては、葉状仮足の伸長方向に左右差があることが報告されていた。この実験では、細胞の前進方向の軸を、核の中心と中心体を結んだ直線で定義している。中心体がある側が、細胞の移動方向(前方)にあたる。この実験系をショウジョウバエのヘモサイトで用いるためには、GAL4/UASシステムを用いることで、ヘモサイトの核と中心体をライブ標識する必要がある。ヘモサイト特異的にGAL4を発現している系統として *Hemese-GAL4*



(*He-GAL4*)を用いた。細胞の核は核局在型RFPをコードする *UAS-RedStinger* を、中心体は *UASp-GFP-Centrosomin1 (Cnn1)* を、ヘモサイト特異的に発現させることで標識した(図2)。 *He-GAL4* 系統と、 *UAS-RedStinger* と *UASp-GFP-Cnn1* の両方をもった系統を交配

して得た F1 の幼虫から体液ごとヘモサイトをとり出し、昆虫用 m3 培地で培養することで、解析系を確立する (図 2)。

(2) 細胞キラリティの検出

当初の計画では、細胞のキラリティを、細胞接着基質を培養皿にマイクロ・パターンでコーティングし、その基質上での細胞挙動にもとづいて検出する計画であった。哺乳類培養細胞では、この方法が有効であることがすでに報告されていた。しかし、ショウジョウバエ細胞が強く接着する基質をマイクロ・パターンでコーティングすることが予想以上に困難で、研究期間内ではこの問題を解決することができなかった。

そこで、別のアプローチで、ヘモサイトのキラリティを検出する。研究期間の途中で、ゼブラフィッシュの黒色の色素細胞 (メラノフォア) が細胞キラリティを示し、細胞質が反時計回りに回転していることが報告された。そこで、核を RedStinger、中心体を GFP-Cnn1 で標識したショウジョウバエのヘモサイトにおいて、核を中心とした中心体の回転を指標として、細胞キラリティを検出する。

接着基質であるコンカナバリン A でコートした培養皿で、ヘモサイトを培養する。蛍光顕微鏡下において、ヘモサイトのライブ撮影を、30 分ごとに 6 時間行う。得られた画像

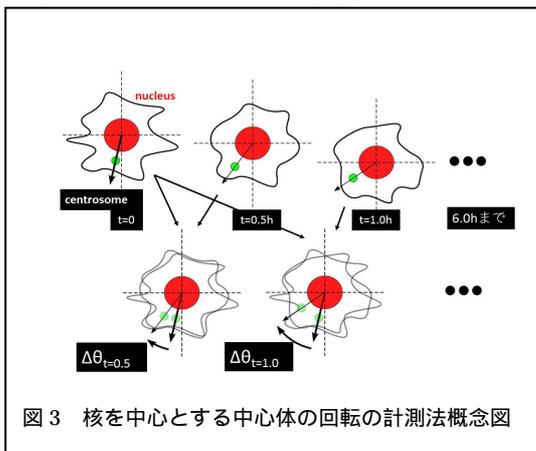


図 3 核を中心とする中心体の回転の計測法概念図

データから、核と中心体をそれぞれ円に近似し、中心を求める。スタート時点の、核中心と中心体を結ぶ直線を 0 度とする (図 3)。核中心は移動するので、最初 ($T=0$) の核中心と中心体を結ぶ線を並行移動させて、移動後の核中心を通し、 $T=0$ で核中心と中心体を結ぶ直線と、各時間での核中心と中心体を結ぶ線の角度の差 (図 3 の θ) を計測していく (図 3)。

(3) 細胞キラリティの形成に必要な因子の探索

研究代表者の研究から、ショウジョウバエの生体内で観察される細胞キラリティは、Myosin IC によって制御されていることがわかっている。ショウジョウバエ *Myosin IC* 遺伝子 [*Myosin31DF* (*Myo31DF*)] の突然変異体では、色々な器官の左右非対称性と細胞キラリティが鏡像化する。そこで、ヘモサイトの

細胞キラリティも *Myo31DF* によって制御されている可能性を考え、この実験を、*Myo31DF* の突然変異のバックグラウンドでも実施する。また、*Myo31DF* 遺伝子を強制発現させたヘモサイトにおいてもこの実験を行う。そのために、*He-GAL4* を用いて、*UAS-RedStinger* と *UASp-GFP-Cnn1* に加えて、*UAS-Myo31DF* をヘモサイトで強制発現させる。この同様の解析によって、中心体の回転方向を解析する (図 3)。

4. 研究成果

ショウジョウバエ幼虫の体液から得たヘモサイトを培養し、それが細胞キラリティを示すことを明らかにした。ヘモサイトの中心体を GFP-centrosomine1、核を RedStinger でそれぞれ標識し、核の中心を回転中心としたときの中心体の移動角度を経時的に計測した。その結果、野生型のヘモサイトの中心体は、細胞を下から見て右回りに回転する、統計的に有意な傾向があることが明らかになった。これに対して、*Myo31DF* 突然変異から得たヘモサイトでは、中心体の回転方向が統計的に有意

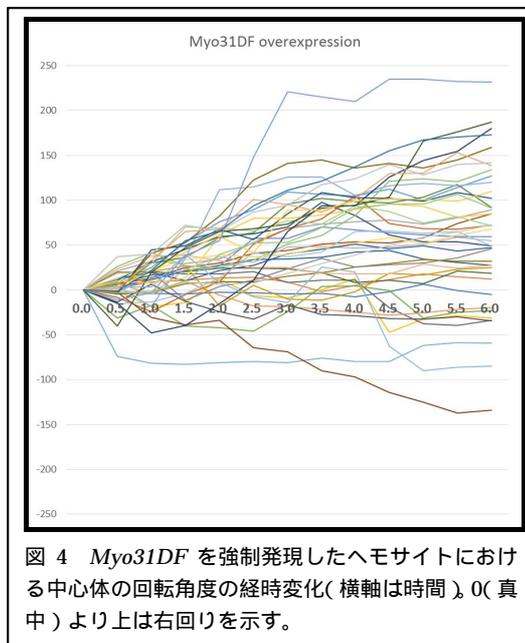


図 4 *Myo31DF* を強制発現したヘモサイトにおける中心体の回転角度の経時変化 (横軸は時間)。(0 (真中) より上は右回りを示す。

意に逆転 (左回り) することを明らかにした。

野生型のヘモサイトで *Myo31DF* 遺伝子を強制発現させた場合には、強制発現なしの野生型ヘモサイトにおける統計的に有意な右回り傾向がより顕著になり、ほぼ 100% のヘモサイトにおいて、中心体は右回りに回転した (図 4)。この結果は、ショウジョウバエの生体内で明らかにされた細胞キラリティに対する *Myo31DF* 遺伝子の影響と類似していた。

本研究において、ショウジョウバエ生体内で明らかとされた細胞キラリティを、*in vivo* で再現することができた。生体内での解析では、バイオイメージングにおける解像度に問題があり、細胞キラリティの形成に関連するタンパク質の細胞内のキラリな挙動を解析

することが困難であった。これが障害となり、細胞キラリティ形成の機構の解明が進展してこなかった。今後は、本研究において確立したヘモサイトの系を活用し、細胞キラリティの分子レベルの実態や、その形成に關与するタンパク質のキラリな動態についての研究を効果的に行うことができる。特に、ここ数年の研究によって、細胞キラリティが哺乳類培養細胞で一般的に認めら現象であることがわかり、その重要性が認知され始めていることから、本研究の成果は、タイムリーなものであった。

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 6 件)

Matsumoto, K., Ayukawa, T., Ishio, A., Sasamura, T., Yamakawa, T. and Matsuno, K. Dual roles of *O*-glucose glycans redundant with monosaccharide *O*-fucose on Notch in Notch Trafficking. *J. Biol. Chem.* in press (2016).

Okumura, T., Sasamura, T., Inatomi, M., Hozumi, S., Nakamura, M., Hatori, R., Taniguchi, K., Nakazawa, N., Suzuki, E., Maeda, R., Yamakawa, T., and Matsuno, K. Class I myosins have overlapping and specialized functions in left-right asymmetric development in *Drosophila*. *Genetics* 199 (4) 1183-1199 (2015). doi: 10.1534/genetics.115.174698.

Ishio, A., Sasamura, T., Ayukawa, T., Kuroda, J., Ishikawa, H. O., Aoyama, N., Matsumoto, K., Gushiken, T., Okajima, T., Yamakawa, T., and Matsuno, K. *O*-fucose monosaccharide of *Drosophila* Notch has a temperature-sensitive function and cooperates with *O*-glucose glycan in Notch transport and Notch signaling activation. *J. Biol. Chem.* 290, 505-519 (2015). doi: 10.1074/jbc.M114.616847.

Sawamura, K., Maehara, K., Keira, Y., Ishikawa, H. O., Sasamura, T., Yamakawa, T., and Matsuno, K. A test of double interspecific introgression of nucleoporin genes in *Drosophila*. *G3* 4, 2101-2106 (2014). doi: 10.1534/g3.114.014027.

Hatori, R., Ando, T., Sasamura, T., Nakazawa, N., Nakamura, M., Taniguchi, K., Hozumi, S., Kikuta, J., Ishii, M., and Matsuno, K. Left-right asymmetry is formed in individual cells by intrinsic cell chirality. *Mech. Dev.* 133, 146-162 (2014). doi: 10.1016/j.mod.2014.04.002.

Nakayama, M., Ishibashi, T., Ishikawa, H. O., Sato, H., Usui, T., Okuda, T., Yashiro, H., Ishikawa, H., Taikou, Y., Minami, A., Kato, K., Taki, M., Aigaki, T., Gunji, W., Ohtsu,

M., Murakami, Y., Tanuma, S., Tsuboi, A., Adachi, M., Kuroda, J., Sasamura, T., Yamakawa, T., and Matsuno, K. A gain-of-function screen to identify genes that reduce lifespan in the adult of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genetics* 15: 46 (2014). doi: 10.1186/1471-2156-15-46.

[学会発表](計 2 件)

Kenji Matsuno, Cell chirality drives the left-right asymmetric development in *Drosophila*. 3rd Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2015 年 5 月 11-14 日

Kenji Matsuno, Cell chirality drives the left-right directional torsion of *Drosophila* gut. MBI-Japan Joint symposium 2014 The mechanobiology of development 2014 年 12 月 4 日、シンガポール

[図書](計 3 件)

山川智子、松本顕治郎、松野健治 暁の Notch シグナル - 無脊椎モデル動物の役割の過去と未来 実験医学 34 (3), 390-396 (2015).

羽鳥僚、松野健治 ねじれる細胞のキラリティの普遍性と機能 実験医学 33 (3), 423-428 (2015).

羽鳥僚、松野健治 細胞のキラリティが誘発する組織のねじれ 日本数理生物学会ニューズレター 73, 20-21 (2014).

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/matsuno/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 健治 (MATSUNO, Kenji)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：60318227

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：