

研究終了報告書

「接着と張力の操作で明らかにする上皮ダイナミクス」

研究期間:2020年10月～2024年3月

研究者:大谷 哲久

1. 研究のねらい

上皮組織は多細胞動物の体表を覆う一層の細胞シートであり、内部環境を外環境から区画化するバリアとして働く。上皮組織は発生過程や創傷治癒などの過程でダイナミックに変形したり移動したりすることが出来る。上皮組織の形態とその多細胞ダイナミクスは主に接着と張力のバランスで決まると考えられているが、どのようにして接着と張力が協調的に寄与して上皮細胞の多細胞ダイナミクスを制御するかは十分に理解されていない。本研究では、上皮細胞の多細胞ダイナミクスを理解するためにその素過程である接着と張力を人為的に操作する技術を開発し、上皮組織の多細胞ダイナミクスの基盤を解明することを主な目的とした。張力の操作技術に関しては近年になり、化学遺伝学や光遺伝学を用いた様々なアプローチが開発されてきた。一方で、接着の操作技術に関しては遺伝子操作や阻害抗体などがこれまでに用いられてきたが、いずれも接着を定量的に制御することが難しい上、時空間的な操作も困難である。

そこで、本研究では接着を定量的に操作するために、分子間相互作用を厳密に定量的に操作することが可能である DNA に着目した。具体的には、脂質修飾 DNA を用いて DNA ハイブリダイゼーションを介した細胞間相互作用を設計することにより、接着の親和性、特異性、細胞間接着構造の距離など様々なパラメータを定量的に操作することを着想した。また、将来的には DNA を用いた人工細胞間接着技術にケージド・オリゴヌクレオチドや種々の DNA 修飾・切断酵素を組み合わせることにより接着の時空間的な操作も可能となると期待された。一方、DNA を用いた人工細胞間接着技術は分子遺伝学的技術を適応することが困難であるなどの理由から、生体内における適用に障害がある。このため、本研究では DNA を用いた人工細胞間接着技術の開発に加えて、既存の細胞間接着分子であるカドヘリンの光遺伝学的操作ツールの開発にも取り組んだ。これらの細胞間接着の操作技術を用いることにより、細胞間接着を定量的・時空間的に操作することを可能にし、上皮ダイナミクスの制御機構を解明することが本研究のねらいである。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、まず DNA ナノテクノロジーを用いた人工細胞間接着技術の開発における種々の技術的な課題の解決に取り組んだ。ランダムなオリゴヌクレオチド配列を用いた人工細胞間接着では、カドヘリンなどの細胞間接着分子に比して、弱い接着力しか認めることが出来なかった。これは、DNA のリン酸骨格およびリン脂質の頭部に由来する負電荷に起因する静電反発の効果によると考えられた。すなわち、ランダムなオリゴヌクレオチド配列を用いた際にはハイブリダイゼーションが起こるためには細胞膜同士が十分に近接することが必要であると考えられたが、静電反発が大きなエネルギー障壁として働くことにより細胞膜同士の近接を妨げると考えられた。そこで、ランダムなオリゴヌクレオチドに代わり、繰り返し配列 DNA を用いることにより、遠位側からハイブリダイゼーションを開始し、結合・解離を繰り返しで互いの上を“歩く”ことにより安定なハイブリダイゼーション状態に落ち込んでいくことが出来

るような人工細胞間接着を新たに設計した。その結果、繰り返し配列を用いることにより内在性の細胞間接着分子と比肩しうるような強い接着を誘導することに成功した。また、他の繰り返し配列でも同様に接着を誘導できたが、その接着力はオリゴヌクレオチドの T_m 値と負の相関を示した。これは、ハイブリダイゼーションが遠位側から進行するためには結合・解離を繰り返すことが必要だが、 T_m 値が高いと局所安定状態にトラップされてしまうことで接着の進行が妨げられることによると考えられた。さらに、異なる繰り返し配列を用いることにより細胞選別を人工的に設計することが可能であることを示すことができ、DNA を用いた人工細胞間接着によって接着の親和性や特異性を制御可能であることが明らかとなった。

繰り返し配列 DNA を用いた人工細胞間接着構造を観察した結果、人工細胞間接着部位の裏打ちにはアクチン線維が集積した。これまで、細胞間接着構造にアクチン線維が集積する仕組みとしては、カドヘリンなどの接着分子を介して細胞内シグナル伝達が惹起されると考えられてきたが、本研究で得られた結果は、細胞が接着という物理刺激に応答してアクチン線維の再編成を引き起こすことが出来ることを示唆しており、細胞間接着の新たな感知機構の存在を示している。

(2) 詳細

1. DNA による人工細胞間接着技術の確立

本研究では、まず DNA ナノテクノロジーを用いた人工細胞間接着技術の開発における種々の技術的な課題の解決、また接着力の定量的な評価法の確立に取り組んだ。その結果、研究開始当初は DNA を用いた人工細胞間接着は実験の安定性が大きな課題であったが、培養液中の血清に含まれる DNase が DNA による人工細胞間接着の主な阻害要因であることが明らかとなり、血清不含培地による洗浄を増やすことにより実験の安定性が劇的に改善した。また、細胞同士の接触角は細胞同士の接着力と細胞の表面張力のつり合いによって決まることから、接触角の測定によって細胞間接着の強度を定量的に評価する方法を確立した。

DNA を用いた人工細胞間接着においては、研究開始当初はランダムなオリゴヌクレオチド配列を用いていたが、この方法ではカドヘリンなどの細胞間接着分子に比して、弱い接着力しか認めることが出来なかった。これは、DNA のリン酸骨格およびリン脂質の頭部に由来する負電荷に起因する静電反発の効果だと考えられた。すなわち、ランダムなオリゴヌクレオチド配列を用いた際にはハイブリダイゼーションが起こるためには細胞膜同士が十分に近接することが必要であると考えられたが、静電反発が大きなエネルギー障壁として働いて細胞膜同士の近接を妨げてハイブリダイゼーションの進行を阻害することにより、十分な接着力が発揮されないと考えられた。興味深いことに、ランダムなオリゴヌクレオチドを用いた DNA による人工細胞間接着は三細胞間接着を担う LSR を発現することにより劇的に促進された。これらの結果は、細胞膜の近接というエネルギー障壁を乗り越えることにより強い接着が誘導可能であることを示していた。

そこで、ランダムなオリゴヌクレオチドに代わり、繰り返し配列 DNA を用いた人工細胞間接着を設計した。ランダムなオリゴヌクレオチド配列とは異なり、繰り返し配列を用いた場合には繰り返し配列の遠位側でハイブリダイゼーションが開始し、これが結合・解離をしながらエネルギー的に最も安定な状態であるすべてのヌクレオチドがハイブリダイゼーションに寄与した状態に落ち込んでいくことにより、自発的に接着が進行すると期待された。実際に、繰り返し配列を用いることにより強い接着を誘導することに成功した。この接着の強度は LSR の有無によって影響されなかったことから、繰り返し配列を用いることにより LSR による膜の近接効果をバイパスすることが出来ると考えられた。また、他の繰り返し配列でも同様に接着を誘導できたが、その接着力はオリゴヌクレオチドの T_m 値と負の相関を示した。これは、ハイブリダイゼーションが遠位側から進行するためには結合・解離を繰り返すことが必要だが、 T_m 値が高いと局所安定状態にトラップされてしまうことで接着の進行が妨げられることによると考えられ

た。

さらに、異なる繰り返し配列を用いて人工細胞間接着を誘導した細胞を混合培養したところ、それぞれの細胞群は DNA の塩基配列から予測される通りに選択的な接着活性を示した。これらの結果から、DNA による人工細胞間接着技術を用いることにより、細胞間接着の親和性や特異性を人為的に操作することが可能であること、また、細胞選別を人工的に設計することが可能であることが示された。

2. 人工細胞間接着に対する細胞応答

繰り返し配列 DNA を用いた人工細胞間接着構造を電子顕微鏡観察した結果、隣接する細胞膜同士が近接して並行に向き合う様子が観察された。

興味深いことに、人工細胞間接着部位の裏打ちにはアクチン線維様の繊維構造が集積しており、ファロイジン染色により、DNA による人工細胞間接着構造にアクチン線維が集積することが確認された。DNA による人工細胞間接着においては、オリゴヌクレオチドは脂質修飾を介して細胞膜の外層に挿入されており、細胞内には何の人為的操作も加えていないことから、この結果は細胞が接着という物理的な刺激を感知して細胞骨格の再編成を引き起こすことが出来ることを示している。これまで、細胞間接着構造にアクチン線維が集積する仕組みとしては、カドヘリンなどの細胞間接着分子が細胞内シグナル伝達を惹起するとモデルが想定されてきたが、本研究の結果は、接着に伴う膜張力の変化あるいは細胞膜ドメインの形成などの物理刺激がアクチン線維の再編成に重要であることを示唆しており、細胞間接着の新たな感知機構の存在を示している。

3. 分子遺伝学的に応用可能な細胞間接着の操作技術の開発

DNA の人工細胞間接着技術は、細胞間接着の親和性・特異性・距離など様々なパラメータを定量的に操作できる点で優れている。一方、個体レベルにおける細胞間接着の操作を視野に入れた際には、DNA による人工細胞間接着は分子遺伝学的な技術の適用が難しいことが今後の障壁として考えられた。そこで、本研究ではビオチン化 DNA を単量体ストレプトアビジンと融合した膜タンパク質に結合した DNA-蛋白質ハイブリッド型人工細胞間接着が技術的に可能であることを確認することが出来た。しかし、一方で生体内に存在する内在性 DNase や自然免疫経路の存在など今後克服すべき課題も依然として多い。

一方、DNA-蛋白質ハイブリッド型人工細胞間接着の開発過程で、細胞間接着分子カドヘリンの細胞外ドメインと単量体ストレプトアビジンの融合タンパク質を作成したことを通して、Furin convertase によるカドヘリンのプロドメインの切断がその接着活性の発揮に必須であることを認識し、これを契機としてプロドメイン切断の制御によるカドヘリンの光遺伝学的操作ツールの開発を着想した。実際に、E-カドヘリンのプロドメイン切断部位の上流に光照射依存的な構造変化をする LOV ドメインを挿入した分子をいくつか作成したところ、暗条件で接着活性を示さず、青色光の照射依存的に細胞間接着部位に集積する光-ON 型 E-カドヘリン光スイッチ分子のプロトタイプを作成することに成功した。カドヘリンのプロドメインの切断は全てのクラシックカドヘリン、また一部のデスモソーム・カドヘリンやプロトカドヘリンに保存されていることから、今後様々なカドヘリン分子の光操作ツールの開発につながると期待される。

3. 今後の展開

本研究では DNA による人工細胞間接着技術を確立することにより、細胞間接着の定量的な操作が可能となった。本研究期間では、細胞間接着の定量的な操作が集団的細胞運動などの多細胞ダイナミクスにどのような影響を与えるかまでは着手することが出来なかったが、本研究において確立した人工細胞間接着技術を用いることにより、今後細胞間接着の定量的・体系的な操作が集

团的細胞移動にどのような影響を与えるかを解明したい。また、DNA による人工細胞間接着技術においてオリゴヌクレオチド長を変化させることにより、細胞膜間の距離を操作できると期待される。これまで、膜タンパク質がその細胞外ドメインの大きさ位に応じて自発的に局在が分離することが報告されており (Schmid, E.M. et al., *Nat. Phys.*, 12:704-711. 2016)、密着結合や接着結合など異なる細胞膜間距離を持つ接着構造が互いに分離することの基本原理ではないかと想定されている。そこで、今後人工細胞間接着技術を用いて細胞膜間の距離を変化させることによりこのモデルを検証したい。

また、本研究により、予想外なことに、細胞が接着という物理刺激に応答して細胞骨格の再編成を引き起こすことが出来ることが明らかとなった。今後、DNA による人工細胞間接着技術を分子細胞生物学的な解析ツールと組み合わせることにより、細胞が細胞間接着を感知する分子機構の解明に取り組みたい

4. 自己評価

当初の研究目的は上皮細胞の形態を決める主要なパラメータである接着と張力を独立に操作することであったが、研究を進める過程で細胞が接着という物理刺激に応答することが出来ることが明らかとなり、当初想定していたように接着と張力を分離することは困難だということが明らかとなった。当初の狙いは達成できなかった事になるが、その一方で結果的に細胞間接着への細胞応答の基本メカニズムの一端を明らかにした重要な発見だと考えている。

また、人工細胞間接着技術を開発の過程で様々な試行錯誤をする中で、カドヘリンを骨格とした分子設計に取り組んだことにより、副産物としてカドヘリンの光遺伝学的な操作技術を着想し、光-ON型 E-カドヘリン光スイッチ分子のプロトタイプを得ることに成功した。分子遺伝学技術が適応可能な細胞間接着の操作技術として今後の展開が期待される。

さがけ研究期間中に東京都立大学の准教授として独立した研究グループを主宰することとなり、研究者としての飛躍の機会をさがけ研究を通していただいた。今後、さがけ研究を通して得られた研究の芽を大きく育て、細胞間接着研究分野を国際的に牽引していけるようさらに研鑽をつんでいきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 10件

1. Tight junction membrane proteins regulate the mechanical resistance of the apical junctional complex. Thanh Phuong Nguyen, Tetsuhisa Otani*, Motosuke Tsutsumi, Sachiko Fujiwara, Tomomi Nemoto, Toshihiko Fujimori, Mikio Furuse*. *bioRxiv*, 2023.08. 02.551232. (2023)

密着結合の膜タンパク質であるクローディンと JAM-A を欠損する細胞が機械ストレスに対して脆弱であることを示し、密着結合の裏打ちタンパク質 ZO-1 の分子構造の異常がこれに関わることを示した。さらに、クローディンと JAM-A に加えて CAR と呼ばれる膜タンパク質が ZO-1 の N 末端の膜係留に必須であることを示し、クローディン・JAM-A・CAR が細胞間接着の力抵抗性を協調的に制御することを明らかにした。

2. Mechanism of interdigitation formation at apical boundary of MDCK cell. Shintaro Miyazaki, Tetsuhisa Otani, Kei Sugihara, Toshihiko Fujimori, Mikio Furuse, Takashi Miura. *iScience*, 26:

106594. (2023)

MDCK 細胞をモデルとして数理生物学者との連携研究により、細胞間接着の湾曲構造の形成機構を明らかにした。具体的には、MDCK 細胞の細胞間接着の湾曲構造が平滑化項とノイズ項からなる Edwards-Wilkinson 方程式によって記述され、ノイズ項の分子の実体が細胞間接着部位に垂直に接続するアクチオシン束が生み出す張力の不均一性であることを示した、湾曲構造が傍細胞輸送の容量調節に寄与することを示した。

3. Tight Junction Structure and Function Revisited. Tetsuhisa Otani*, Mikio Furuse. *Trends Cell Biol.*, 30:805-817. (2020)

密着結合の構造と機能に関する古典モデルを筆者らの近年のゲノム編集細胞に関する実験結果を基に再考し、密着結合の構造がクローディングが作るストランド構造と JAM 依存的な膜の近接構造によること、またその機能については、クローディングが作る低分子バリアと JAM 依存的な高分子バリアという二つのバリアによることを提案すると共に、近年進展著しい ZO-1 の力感受性や相分離が密着結合形成にどのように関与するかを総合的に論じた。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【主要な学会発表】

- ・大谷哲久、古瀬幹夫 「密着結合の構造と機能の再考」2020 年 12 月 2 日、第 43 回日本分子生物学会年会
- ・Otani T, Furuse M. (2021.9.27~28) Competitive elimination of tight junction deficient cells regulate epithelial barrier homeostasis. The 4th International Tight Junction Conference
- ・Otani T, Furuse M. (2021.12.7) Competitive elimination of tight junction deficient cells regulate epithelial barrier homeostasis. 51st NIPS International Symposium
- ・大谷哲久 (2022.12.1) 細胞間接着装置と上皮恒常性 第 45 回日本分子生物学会年会
- ・Otani T. (2023.6.25~30) Tight junction membrane proteins regulate the mechanical resistance of the apical junctional complex. Gordon Research Conference “Cell Contact and Adhesion”
- ・Otani T, Miura T. (2023.11.2) Mechanisms underlying cell junction interdigitation. 第 96 回日本生化学会大会
- ・大谷哲久 (2023.12.6) 細胞競合を介した上皮バリアの恒常性維持機構 第 46 回日本分子生物学会年会

【学会・シンポジウム等のオーガナイズ】

- ・ワークショップ・オーガナイザー 「Establishment and maintenance of epithelial order - mechanics, morphogenesis, and physiology」 第 43 回日本分子生物学会年会
- ・Organizer, 51st NIPS International Symposium
- ・シンポジウム・オーガナイザー 「細胞のかたちづくりの原理に数理と実験で迫る」 第 96 回日本生化学会大会
- ・シンポジウム・オーガナイザー 「多細胞生命システムの自律性の生成機構」 第 46 回日本分子生物学会年会

【受賞】

•2021年9月 Poster award, 4th International Tight Junction Conference