

研究終了報告書

「細胞集団移動が駆動する体毛のコーミング機構の解明」

研究期間:2020 年 11 月～2024 年 3 月

研究者:山崎 正和

1. 研究のねらい

平面内細胞極性(planar cell polarity:PCP)は、組織平面において体毛や繊毛などの向きが特定の方に揃う現象であり、組織や器官の機能発現に重要な役割を果たす。例えば、内耳有毛細胞は、特定の方向に向かって感覚毛を形成するが、その配向性に異常が生じると聴覚機能が低下する。同様の現象は気管や卵管の繊毛上皮細胞においても認められ、「繊毛の運動方向」と「器官の機能(気管:体外への異物の排除、卵管:子宮への卵子の輸送)」が密接に関連する。

約 30 年前、体毛の配向性異常を呈するショウジョウバエ変異体から PCP を司る遺伝子が初めて同定されたのを契機とし、PCP 形成機構を分子の言葉で説明できるようになった。これまでの研究から、7 回膜貫通型タンパク質 Frizzled(Fz)や 4 回膜貫通型タンパク質 Strabismus(Stbm, 別名 Van Gogh)、7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo(Fmi)等によって構成されるコアグループが、文字通り PCP 形成の中核をなすことが明らかとなっている(図 1a)。ここで特筆すべきことは、コアグループ分子が個々の細胞の非対称性を規定するのみならず、組織平面における細胞集団の向きを同調させることができることにある。すなわち、Fz と Stbm は同じ細胞内では排他的に局在するのに対し、隣接する細胞間では Fz を含む複合体と Stbm を含む複合体が親和性を示す(図 1a)。換言すると、両複合体が排他的な局在を示す細胞を「磁石」、細胞間相互作用を「N 極と S 極を介した磁石同士の結合」と捉えることもできよう。最終的に、隣接する細胞間で同調したコアグループ分子の非対称局在を基に、個々の細胞から特定の方向に向かって毛や繊毛が形成される(図 1a)。

コアグループは、細胞集団の向きを同調させる上で合目的な磁石のような性質を細胞に寄与するとともに、ほぼ全ての組織において PCP の制御に関わるという事実から、PCP 形成における中核であると考えられている。しかしながら、以前よりショウジョウバエやマウスの複数の組織においてコアグループに依存しない PCP 制御機構の存在が示唆されており、その実体は本分野における長年の謎である。本研究では、独自の知見を基に、ショウジョウバエ遺伝学やライブイメージング等を駆使することで、コアグループ非依存的 PCP 制御機構の解明を試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

ショウジョウバエ中胸背板(以下、背板と略)の感覚毛(Bristle)(図 1b)は体の後方に向かって配向する。ショウジョウバエ背板においては、コアグループ遺伝子を欠損させても、Bristle の顕著な配向性異常が認められない(図 1b)。コアグループ分子の機能は相互に関連しており、コアグループ分子が 1 つでも欠損すると、コアグループ全体の機能が破綻する(残り全てのコアグループ分子の膜局在や非対称局在が失われる)。この事実は、背板において、コアグループとは異なる未知の機構により PCP が制御されうることの意味する。本研究では、ショウジョウバエ背板の Bristle をモデルにコアグループ非依存的 PCP の制御機構の解明を試みた。

ショウジョウバエ遺伝学やライブイメージング等を駆使した解析の結果、Tissue flow と呼ばれる背板上皮の移動がコアグループに依存しない PCP 制御機構の実体であることを見出した(原著論文 1)。すなわち、上述したように、コアグループの機能を完全に欠損させてもショウジョウバ

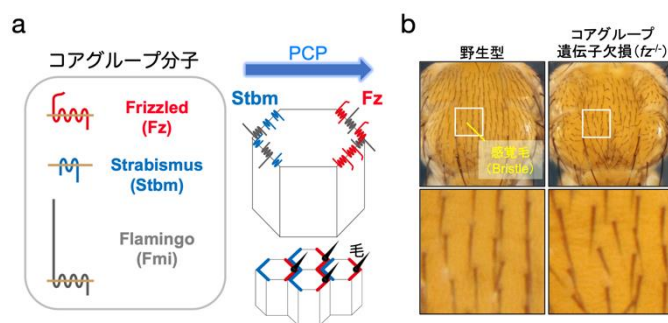


図1 コアグループ分子とショウジョウバエ背板

エ成虫の背板 Bristle の配向性が僅かしか乱れないが、この表現型は「Bristle の形成過程(蛹期)において、コアグループの機能欠損により異常な方向に配向する Bristle が、Tissue flow により正しい方向に修正された」結果であることが分かった(図 2)。さらに、この Bristle の向きの修正には、上皮頂端側の細胞外マトリックス(aECM)と Bristle との物理的接触が必要であることも明らかとなった。言わば、Tissue flow は、aECM を櫛(くし)として利用することで、Bristle を自身の流れの向きとは反対方向に配向させるのである(図 2) (この現象をコーミングと呼ぶ)。本研究により、PCP 分野における長年の謎であった、コアグループ非依存的 PCP の実体が初めて明らかとなった。また、細胞や組織において認められる極性は、細胞内における機能分子の偏りによって駆動されるというのが通説となっているが、本研究により、この既存の概念とは一線を画すユニークな機構により PCP が制御されることも明らかとなった。

(2) 詳細

① コアグループ機能欠損による Bristle の配向性異常は未知のメカニズムにより救済される

コアグループ遺伝子の機能を欠損させてもショウジョウバエ成虫の背板 Bristle の向きはランダムにならない。特に、背板中央部においてこの傾向が顕著であり、この部位ではコアグループ遺伝子の完全欠失変異体においても Bristle はほぼ正常な配向性を呈する(図 1b)。同様の表現型は、RNAi 法を用いて背板上皮特異的にコアグループ遺伝子をノックダウンした場合にも認められる。本研究では、*fz* 変異体および背板上皮特異的 *stbm* ノックダウン個体(*stbm* RNAi 個体)を用いてコアグループ非依存的 PCP の制御機構を明らかにすることを試みた。

ショウジョウバエの背板 Bristle の形成は、蛹期の初期(蛹化後 27~28 時間(27-28 hAPF))に始まる。Moesin のアクチン結合ドメインと GFP との融合タンパク質を発現する sGMCA 系統を用いて、コントロールおよび *stbm* RNAi 個体の Bristle を蛍光標識し、ライブイメージングにより両背板における Bristle の形成過程(28~33 hAPF)を解析した。コントロールの蛹では、Bristle は体の後方に向かって形成を開始し、そのまま後方に伸長した。一方、*stbm* RNAi 個体の蛹では、Bristle はランダムな方向

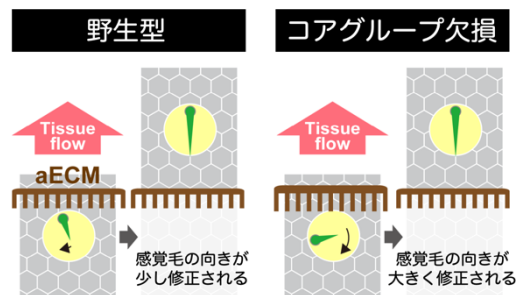


図2 Tissue flowを介したコアグループに依存しないPCP制御機構

に向かって形成を始めるが、この配向性異常は時間経過するにつれて徐々に救済された。以上の結果から、コアグループは Bristle の形成初期において Bristle の配向性に重要な役割を担うが、その後、コアグループに依存しない未知メカニズムが Bristle の配向性異常を救済していることが判明した。

② コアグループ機能欠損個体の Tissue flow の向きは正常である

野生型ショウジョウバエの背板では、21~36 hAPF の間に Tissue flow と呼ばれる上皮細胞集団の前方への移動が観察される。コアグループ遺伝子欠損の Tissue flow への影響を調べるために、E-cadherin::GFP を発現するコントロール系統および *fz* 変異体を用いて蛹背板上皮のライブイメージングを実施した。コントロールの蛹では、報告通り、前方に向かう Tissue flow が観察され、その速度は時間経過とともに徐々に減弱した。*fz* 変異体においては、コントロールと比較して Tissue flow の速度が若干減弱するものの、前方への Tissue flow が観察された。同様の表現型は、*stbm* RNAi 個体においても認められた。これらの結果から、コアグループは Tissue flow の方向制御に関与しないことが示唆された。

③ Bristle は Tissue flow の反対方向に配向する

以上の結果から、本研究実施者は「Tissue flow には、コアグループに依存せずに自身の流れの向きとは反対方向に Bristle を配向させる役割がある」のではないかと考えた。この仮説を検証するために、*chascon* (*chas*) 遺伝子とコアグループ遺伝子との二重欠損により背板 Bristle の配向性が逆転する現象に着目した。Tissue flow がこの二重欠損個体における Bristle の向きの逆転の原因であれば、この個体における Tissue flow の向きは逆転しているはずである。*chas* と *fz* の二重変異体 (*chas, fz* 二重変異体) における Tissue flow をライブイメージングにより観察したところ、Tissue flow の向きが逆方向 (後方) になることが分かった。同様の結果は、*chas* と *stbm* を背板上皮特異的にノックダウンした場合 (*chas, stbm* 二重 RNAi 個体) においても認められた。以上の結果から、Tissue flow はコアグループに依存せずに自身の流れの向きとは反対方向に Bristle を配向させることが示唆された。

④ Tissue flow の操作による Bristle の向きの改変

Bristle の配向性制御における Tissue flow の関与をさらに検証するため、*chas, fz* 二重変異体における逆向きの Tissue flow の改変を試みた。この操作を行うために、本研究実施者は、ショウジョウバエの間接飛翔筋 (indirect flight muscle: IFM) に着目した。筋前駆細胞特異的に Notch 受容体の恒常的活性化型 (*N^{act}*) を過剰発現することにより IFM を除去したところ、*chas, fz* 二重変異体における Tissue flow の向きが逆方向 (後方) から正常方向 (前方) に変化した。一方、IFM の除去はコントロールおよび *fz* 変異体における Tissue flow の向きにはほとんど影響しなかった。以上の結果から、IFM による背板上皮の牽引は、*chas, fz* 二重変異体における逆向きの Tissue flow の原因であるが、コントロールおよび *fz* 変異体における正常方向の Tissue flow には関与しないことが示唆された。

上述の結果と合致するように、IFM の除去は *chas, fz* 二重変異体における Bristle の向きの

逆転を完全に抑制し、Bristle の向きはほぼ正常となった。一方、この操作はコントロールおよび *fz* 変異体における Bristle の配向性には影響を与えなかった。以上の結果から、Tissue flow はショウジョウバエ背板上皮におけるコアグループ非依存的 PCP の実体であり、自身の流れの向きとは反対方向に Bristle を配向させることが強く示唆された。

⑤ 物理現象を介した Bristle 細胞の位置変化

Tissue flow はどのようにして自身の流れの向きとは反対方向に Bristle を配向させるのであろうか。この点を明らかにするために、コントロールおよび *fz* 変異体、*stbm* RNAi 個体における外部感覚器の挙動を解析した。コントロールでは、Bristle の形成が始まる前のステージ (26 hAPF) において、Bristle 細胞はソケット細胞に包まれた状態で、ソケット細胞の前方側辺縁部に配置されていた。その後、Tissue flow に伴い、Bristle 細胞はソケット細胞の前方側辺縁部により正確に配置された。一方、*fz* 変異体および *stbm* RNAi 個体においては、26 hAPF のステージにおいて、Bristle 細胞はソケット細胞の辺縁部にランダムに局在するが、発生が進むにつれて、ソケット細胞の前方側辺縁部の方にその位置を変化させた。最終的に、30~32 hAPF までに、Bristle 細胞はソケット細胞の前方側辺縁部付近に位置するようになった。

これらの結果から、本研究実施者は、*fz* 変異体および *stbm* RNAi 個体において観察される Bristle 細胞の再配置に摩擦のようなシンプルな物理現象が関与するのではないかと考えた。すなわち、Bristle の先端は物理的な障壁として機能する細胞外の物質と接しており、Bristle が異常な方向に形成された場合、細胞外物質による Bristle の動きの制限と Tissue flow が協調的に働くことで、Bristle が Tissue flow とは反対方向に配向されるという仮説である (コーミング仮説)。本仮説は以下の観察結果等から支持される。*fz* 変異体および *stbm* RNAi 個体における Bristle 細胞の再配置の際、Bristle 細胞はソケット細胞の辺縁部を沿うように時計回りまたは半時計回りに移動するが、この方向選択はソケット細胞における Bristle 細胞の初期位置に依存しており、最短ルートを通して目的地であるソケット細胞の前方側辺縁部の方に移動した。さらに、Bristle 細胞の再配置の過程において Bristle の先端が弯曲する様子が観察されたことから、Bristle の先端は細胞外の物質と物理的に接している可能性が提示された。以上の結果から、Bristle の先端と細胞外の物質との間に、摩擦のようなシンプルな物理現象が働いていることが示唆された。

⑥ aECM は Bristle の先端と近接する

次に本研究実施者は、Bristle 細胞の再配置における細胞外物質の関与を調べるために、細胞の頂端側にある細胞外マトリックス (apical extracellular matrix: aECM) の構成因子の一つである Dumpy (Dpy) に着目した。Dpy は最大 22,949 アミノ酸残基から構成される巨大タンパク質であり、上皮細胞と蛹表面を覆うクチクラ (蛹クチクラ) の間を繋いでいる。Dpy::YFP Protein Trap 系統と sChMCA 系統を用いて、コントロールおよび *chas*, *stbm* 二重 RNAi 個体における内在性の Dpy と Bristle の位置関係をライブイメージングにより解析したところ、Bristle の形成が始まる蛹化後 28 時間のステージにおいて、Bristle の先端が Dpy に近接している様子が観察された。また、Tissue flow の最中に Dpy はほとんど動かないことも明らかとなった。これらの結果

から、aECM は Tissue flow を介した Bristle 極性制御に重要な細胞外物質の実体である可能性が提示された。

⑦ *Dpy* の発現量低下により Tissue flow を介した Bristle の角度変化は抑制される

最後に本研究実施者は、*Dpy* の発現量の低下が Tissue flow による Bristle の配向性制御に影響を与えるか否かについて検討を行った。*dpy* の機能欠失は背板上皮と蛹クチクラとの接着を減弱させ、背板上皮を IFM による牽引に対して脆弱にすることが知られている。本解析を行うに際し、コアグループ機能を欠失させた個体において *dpy* をノックダウンし、Bristle の配向性の変化を解析する必要があるが、(前方に向かう Tissue flow が観察される)コアグループ機能欠損個体とは異なり、*dpy* をノックダウンすると、IFM による背板上皮の牽引により Tissue flow の向きが逆転してしまう。この問題を回避するために、*dpy* をノックダウンした場合と同様に、IFM による上皮の牽引により Tissue flow の向きが逆転する *chas, stbm* 二重 RNAi 個体を本解析のコントロールとして使用した。ライブイメージングにより Bristle の配向性の変化を経時的に解析したところ、*chas, stbm* 二重 RNAi 個体(コントロール)では、発生が進むにつれて、逆向きの Tissue flow の反対方向に Bristle の向きが変化した。しかしながら、*chas, stbm* 二重 RNAi 個体において *dpy* をノックダウンすると、Tissue flow により惹起される Bristle の角度変化が抑制された。また、これらの結果と合致するように、*dpy, chas, stbm* 三重 RNAi 個体の成虫では、Bristle の配向性の逆転が抑制された。以上の結果から、aECM は背板 Bristle の物理的な障壁として働き、Tissue flow と協調して機能することで Bristle の向きを Tissue flow の反対方向に変化させることが明らかとなった。

⑧ 本研究のまとめ

コアグループに依存しない PCP 制御機構は、PCP 分野における数十年來の謎であったが、ショウジョウバエ背板を用いた本研究により、Tissue flow はコアグループに依存しない PCP 制御機構の実体であること、さらに、Tissue flow と aECM との間で生じる物理現象が Bristle の向きを制御していることが明らかとなった(原著論文 1)。すなわち、Tissue flow が美容師として働き、櫛として機能する aECM を利用することで、Tissue flow の向きとは反対方向に Bristle を配向させることが分かった(図 2)。

3. 今後の展開

今回見出した新たな機構は他の動物の PCP にも関与するのであろうか。興味深いことに、哺乳動物の内耳有毛細胞の不動毛は aECM である蓋膜と接しているのみならず、コアグループに依存せずにその配向性が制御される可能性が報告されている。今後、本研究で見出した、シンプルな物理現象を介した PCP 制御機構が高等動物の PCP にも関与するの否かを明らかにする必要があるであろう。また、将来的に、本研究の成果は、医療や創薬に資する知識基盤の発展やオルガノイドの創出技術の進展などに貢献することが期待される。

4. 自己評価

本さがけ研究は、PCP 分野における長年の謎である、コアグループ非依存的 PCP の分子実体の解明に挑む挑戦的な提案である。さがけ研究期間内に、Tissue flow と aECM との間に生じる物理現象がその実体であることを明らかにし、当該研究の成果を論文(原著論文 1)として発表できたことから、当初の想定以上にスムーズに研究が進展したと言える。本研究で得た知見は、当該研究分野の発展に寄与するのみならず、医療・創薬を含む様々な分野におけるイノベーション創出のための貴重な礎になると信じている。

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: 1件

1. Tomonori Ayukawa, Masakazu Akiyama, Yasukazu Hozumi, Kenta Ishimoto, Junko Sasaki, Haruki Senoo, Takehiko Sasaki and **Masakazu Yamazaki (corresponding author)**:
Tissue flow regulates planar cell polarity independently of the Frizzled core pathway.
***Cell Reports*, 40, 111388 (2022)**

平面内細胞極性(PCP)とは、組織において体毛等の向きが特定の方角に揃う現象である。膜貫通型分子 Frizzled 等から構成されるコアグループは PCP 制御系の中核であると認知されているが、分子実体は不明ながら、コアグループに依存しない PCP 調節機構の存在が示唆されている。本研究において我々は、Tissue flow と呼ばれる上皮組織の移動がコアグループに依存しない PCP 制御機構の実体であることを見出し、PCP 分野における長年の謎を解明した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(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)

1. **山崎正和**

日本解剖学会 第 68 回東北・北海道連合支部集会 学会賞(2022 年)

2. **山崎正和**

秋田医学会学術賞(2022 年)

3. **山崎正和**、秋山正和、八月朔日泰和、鮎川友紀

組織の流れが体毛の向きを制御する仕組み

第 128 回日本解剖学会総会・全国学術集会(シンポジウム)

2023 年 3 月 19 日(東北大学)

本研究実施者と富山大学の秋山正和博士が企画したシンポジウム。さがけ多細胞 3 期生の戸田聡博士をシンポジストとして招待した。

4. **Masakazu Yamazaki**

Tissue flow regulates core group-independent PCP on the *Drosophila notum*

The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
(Symposium)

July 23, 2023 (東北大学)

本研究実施者とさきがけ多細胞 1 期生の三井優輔博士が企画したシンポジウム。

5. Tomonori Ayukawa and **Masakazu Yamazaki**

2023 Drosophila Image Award (2nd Runner Up) (2023 年)

(The Genetics Society of America 主催)