

## 論文の内容の要旨

### 異方性張力による平面内細胞極性制御機構の解明 Anisotropic tension and its effect on the regulation of planar cell polarity

平野 咲雪

多細胞生物の体を構成する細胞は、互いに様々な形で情報のやり取りを行いながら、個体生命の維持や外部環境への適応に寄与している。細胞同士の情報のやり取りの形としては、タンパク質やその他の小分子を介した生化学的なシグナル伝達経路が長年研究され、様々なシグナル分子の存在や細胞内外での情報伝達の仕組みが明らかにされてきた。一方で、細胞間に生じる張力や剪断応力、圧力といった機械的刺激も、細胞分化や個体の形態形成など様々な生命現象を制御する情報伝達因子として働くことが、この数十年で徐々に明らかになってきた。しかし、これらの機械的刺激の情報伝達因子としての役割は、非常に注目されてきたにもかかわらず、生化学的シグナルほどそのメカニズムの解明は進んでいない。その背景には、生体内の機械的刺激を観察することの難しさがある。生体内の物理的環境は常に変化し続けており、それぞれがどのように生命現象に寄与しているかを調べるためには、生体内の機械的刺激を連続的に・広範囲に観察できる手法が求められている。そこで本研究では、第1章でまず生体内の張力を非侵襲的、広範囲に観察できる新規の細胞張力センサーの開発を行い、発生初期の胚の張力観察を試みた。そしてこの結果を受けて、第2章では張力が初期発生に果たす役割について検討し、平面内細胞極性の形成に異方性の張力が寄与することを明らかにした。

#### 〈第1章〉新規細胞張力センサーの開発と神経外胚葉における張力観察

非侵襲的かつ広い範囲での張力観察が可能である方法のひとつとして、FRET (Förster resonance energy transfer) を利用したものが挙げられる。この方法では、二つの蛍光タン

パク質を伸縮性のリンカーで繋いだ FRET モジュールを用いる。FRET の効率は二つの蛍光分子間の距離に依存するため、モジュールにかかる張力に応じてその FRET 効率は変化する。本研究では、この FRET モジュールを、LIM ファミリータンパク質の一種である Lima1 のドメイン間に挿入することで、新規の FRET 張力センサー (Lima1 Tension Sensor: LimaTS) を開発した (図 1)。また、Lima1 にかかる張力によって FRET 効率の変化しないコントロールセンサーとして、Lima1 の C 末端に FRET モジュールを付加した Lima1 Control Sensor (LimaCS) も作製した (図 1)。Lima1 は、アドヘレンスジャンクション内のカドヘリン-カテニン複合体やアクチンフィラメントと相互作用することが知られている。よって張力センサー LimaTS は、これらの構造体間にかかる張力を観察できると期待される。

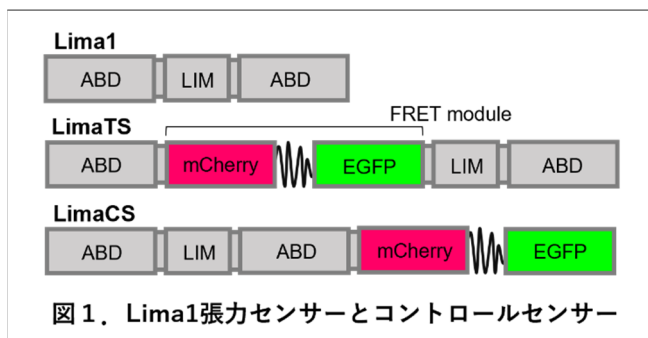


図 1. Lima1 張力センサーとコントロールセンサー

まず、LimaTS と LimaCS がそれぞれ張力センサーとコントロールセンサーとして機能することを、HeLa 細胞を用いて検証した。FRET 効率の計算は、当研究室の先行研究と同様の方法で行った (Yamashita et al., 2016)。まず、LimaTS または LimaCS を発現した細胞を低張液中で短時間培養することでアクチンストレスファイバーにかかる張力を大きくしたところ、LimaCS では FRET 効率に有意な変化は見られなかったが、LimaTS では FRET 効率は有意に低下した。次に、細胞をアクチン重合阻害剤 Cytochalasin B または ROCK 阻害剤 Y-27632 で処理することでアクチンストレスファイバーにかかる張力を小さくしたところ、LimaCS では FRET 効率に有意な変化は見られなかったが、LimaTS では FRET 効率は有意に上昇した。これらの結果から、LimaTS、LimaCS はそれぞれ張力センサー、コントロールセンサーとして機能的であることが確かめられた。

作製したセンサーをツメガエル胚に導入し、発生初期の胚における張力観察を行った。後期原腸胚期の神経外胚葉で観察を行ったところ、どちらのセンサーも隣接細胞との接着部分に主に局在することがわかった。この時期の外胚葉組織は、形態形成運動によって頭尾軸方向の張力を受けていると考えられる。そこで、細胞間接着を角度によって分類し、FRET 効率を比較することで、形態形成運動から予想されるような異方性の張力が観察されるかを検証した。その結果、LimaTS 発現胚では、左右軸方向の細胞間接着部分に比べて頭尾軸方向の細胞間接着部分で FRET 効率が有意に低いことが分かった。一方 LimaCS 発現胚では、FRET 効率に有意な差は見られなかった。これらのことから、後期原腸胚期の神経外胚葉には、形態形成運動から予想された通り、頭尾軸方向に張力が働いていると考えられる。第 2 章では、本章で観察された異方性の張力が発生制御にどのように寄与しているのかを調べた。異方性の張力が観察された後期原腸胚期から初期神経胚期にかけて、神経外胚葉では平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity: PCP) の形成が見られる。張力の方向と PCP の方

向が一致していることから、張力による細胞極性制御が行われているのではないかと仮定し、これを検証することとした。

## 〈第2章〉異方性張力による平面内細胞極性制御

平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity: PCP) は、細胞シートの平面内で一定方向に整列した細胞極性のことであり、様々な動物組織の正常な発生に関与している。PCP は、進化的に保存された種々のコア PCP タンパク質によって制御されており、これらのタンパク質は特定の複合体を形成し、細胞内で排他的な局在をすることで細胞極性を形成する。同一細胞内および隣接細胞間でのコア PCP タンパク質の相互作用など、局所的な極性形成の分子メカニズムについてはこれまでによく研究されてきたが、一方で、組織全体で細胞極性の初期軸を決定する長距離伝達因子についてはいまだに議論的となっており、生化学的勾配や機械的刺激などを含むいくつかの候補が提案されている。本研究では、第1章で観察した張力の方向・時期と PCP 形成の方向・時期が一致していたことから、この張力が PCP を制御する長距離伝達因子として働く可能性を考え、これを検証することとした。

まず、第1章で観察した頭尾軸方向の張力が PCP 形成に必須であるかを調べるため、外胚葉組織の一部を切断することで張力を緩和し、PCP 形成への影響を調べた。細胞極性の指標には、コア PCP タンパク質の一種であり細胞の頭側に局在することが知られている Prickle3 を用いた。Prickle3 に蛍光タンパク質を付加した mRuby2-Prickle3 は、切断を行わなかった組織では、野生型の Prickle と同様各細胞の頭側に局在することが観察された。外胚葉の一部を頭尾軸に対して垂直方向に切断し、頭尾軸方向の張力を緩和したところ、mRuby2-Prickle3 の膜局在はほとんど消失した。このとき、平均極性値 (極性タンパク質の膜局在の不均一さを表す) は有意に低下し、極性軸の分布は特定の方向性を示さなかった (図2)。一方で、頭尾軸と平行な方向に組織を切断したところ、PCP 形成に大きな影響は見られなかった。これらのこ

とから、Prickle3 が細胞膜に局在し正常に PCP を形成するためには、組織平面を頭尾軸方向に伝播する張力、あるいはその他の要因が必須であると考えられる。

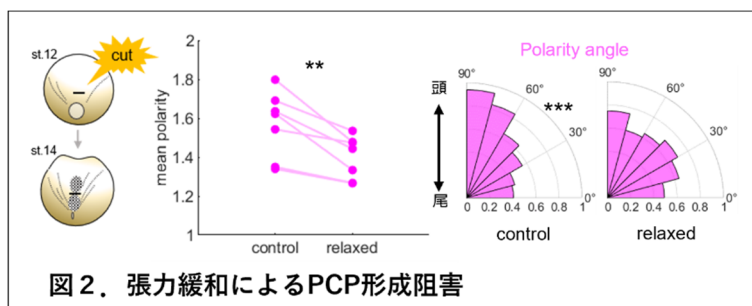
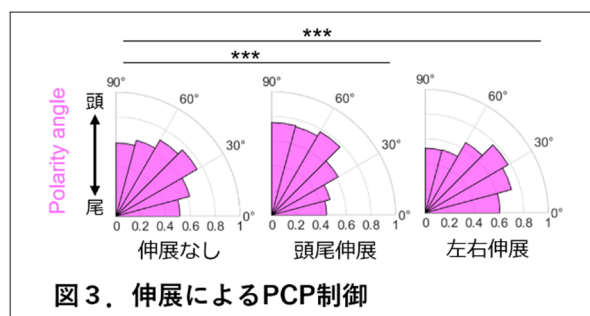


図2. 張力緩和によるPCP形成阻害

組織平面を伝播する一方向性の張力によって PCP 形成が制御されるかどうかを検証するため、神経外胚葉組織を任意の方向に伸展し、PCP 形成を観察した。神経外胚葉組織は初期原腸胚期に胚から切り出してシリコン製のチャンバーに張り付け、後期原腸胚期～初期神経胚期 (PCP 形成時期) にかけて一方向に伸展した。その結果、極性軸の方向は組織の伸展方向に応じて変化した (図3)。つまり、極性軸は、頭尾軸方向に組織を伸展した際には頭尾軸方向に整列し、左右軸方向に組織を伸展した際には左右軸方向に整列した。このこ

とから、一方向性の張力は、組織全体での極性軸の決定に寄与することが明らかになった。

最後に、組織伸展により PCP が制御される際、細胞が何を機械的シグナルとして検知しているのかについて検討した。細胞が張力の変化を直接検知する可能



性、あるいは張力による細胞形状や細胞骨格系の変化を検知する可能性など、複数のメカニズムを検討した結果、組織伸展に伴う細胞形状の変化が極性軸の決定に特に重要であることを示唆する結果が得られた。PCP 形成時期の細胞で細胞長軸と極性軸とのなす角  $\theta$  を計測したところ、 $\theta$  は  $0^\circ$  に偏った分布を示すことがわかった。これはつまり、PCP 形成期の細胞では、細胞の伸展方向と極性軸の方向とが一致する傾向にあることを示している。さらに、細胞をそのアスペクト比によって分類し、アスペクト比の小さい（丸い）細胞とアスペクト比の大きい（細長い）細胞とで  $\theta$  の分布を比較したところ、 $\theta$  は丸い細胞群よりも細長い細胞群でより小さくなる傾向が見られた。これらの結果は、PCP 形成期のよく伸びた細胞では細胞の伸長方向と極性方向とがよく一致することを示しており、細胞の伸長が極性軸の決定に寄与していることを示唆している。次に、組織伸展実験について細胞長軸の方向と  $\theta$  の分布を調べた。組織の伸展が終了した時点で、細胞長軸は、非伸展組織ではランダムな分布を示したが、頭尾伸展および左右伸展では組織の伸展方向によく揃っていた。一方で  $\theta$  は、伸展組織でも非伸展組織でも、 $0^\circ$  に偏った分布を示しており、細胞長軸と極性軸の方向はよく一致していた。これらの結果からまず、組織が伸展されると細胞長軸は組織の伸展方向に整列し、さらに極性軸も同じ方向に整列することが示されている。また、非伸展組織では細胞長軸がバラバラな方向を向いていたにもかかわらず、細胞長軸と極性軸は各細胞でよく一致していたことから、細胞長軸と極性軸との対応は一細胞レベルで起きている細胞自律的な現象であることが示唆された。本研究のこれまでの実験結果と合わせて考えると、PCP が形成される際には、細胞の伸長方向と極性軸の方向とが細胞レベルで一致しており、頭尾軸方向に働く一方向性の張力によって細胞長軸が整列することにより、極性軸の方向も組織平面全体にわたって頭尾軸方向に整列すると考えられる。

#### 参考文献

Ossipova, O., Kim, K., and Sokol, S.Y. (2015). Planar polarization of Vangl2 in the vertebrate neural plate is controlled by Wnt and Myosin II signaling. *Biol. Open* 4, 722–730. 10.1242/bio.201511676.

Yamashita, S., Tsuboi, T., Ishinabe, N., Kitaguchi, T., and Michiue, T. (2016). Wide and high resolution tension measurement using FRET in embryo. *Sci. Rep.* 6, 28535. 10.1038/srep28535.