

Title	DE-cadherin細胞外領域の構造と機能が果たす形態形成過程における役割
Author(s)	春田, 知洋
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/23473">https://hdl.handle.net/11094/23473</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

理年 14005

博士論文

DE-cadherin 細胞外領域の構造と機能が果たす形態形成過程における役割

平成 22 年度

春田 知洋

大阪大学大学院理学研究科

博士論文

DE-cadherin 細胞外領域の構造と機能が果たす形態形成過程における役割

平成 22 年度

春田 知洋

大阪大学大学院理学研究科

## 要旨

cadherin はアドヘレンスジャンクション(AJ)を構成する接着タンパク質である。cadherin は一回膜貫通型タンパク質であり、細胞外領域はホモフィリックな接着を行ない、細胞質領域は細胞骨格への裏打ちを行なっている。形態形成過程において、cadherin は、様々な細胞運動に必要とされているが、この時 cadherin は、接着だけでなく、いくつかの複合的な機能が求められている。これまでに cadherin 遺伝子は、幅広い動物で同定され、一次構造が明らかにされた結果、cadherin の細胞質領域は保存されているものの、細胞外領域のドメイン構成には、系統を反映した多様性が存在する。この多様性は、棘皮動物や軟体動物でみられる長いタイプの cadherin を祖先的であると仮定すると、進化的に独立な短縮化によって説明される。この進化を反映した cadherin の構造変化が与えた機能的影響は、よく解っていない。

本研究では DE-cadherin の構造と機能の関係を明らかにすることにより、cadherin の細胞外領域の短縮化が与える機能への影響や、短縮化を許容する要因について検証を試みた。DE-cadherin の細胞外領域は、カドヘリンファミリーを定義する EC ドメインが7回タンデムに存在するのに加え、無脊椎動物の cadherin に保存して見つかる PCCD 複合体と呼ばれるドメイン複合体を細胞膜近傍部に持つ。まず DE-cadherin の接着に必要な領域を明らかにするため、細胞外領域を様々な欠いた欠失分子を作成し、接着活性を測定した。その結果、細胞膜近傍の EC7 と PCCD 複合体(アミノ酸にして細胞外領域全長の 47%)を失いながらも、接着活性をもつ欠失分子、 $\Delta 734-1316$ (DE $\Delta$ P)を見つけた。この結果は、DE-cadherin の細胞外領域は、接着に必要とされる膜遠方部領域(EC1-EC6)と、接着には必要とされない膜近傍部領域(EC7-PCCD)に分けられることを示す。さらに DE $\Delta$ P を用いて、DE-cadherin 変異体である *shotgun* (*shg*)の胚や組織のレスキューを行なうと、上皮形成を始め、多くの形態形成を DE $\Delta$ P は達成する。しかし、腹溝形成過程において DE-cadherin を完全に DE $\Delta$ P に置き換えた胚では、細胞の頂端部収縮が低下、また収縮を達成した細胞における AJ の接着連絡の破綻が観察された。このことから DE-cadherin 細胞外領域の膜近傍部領域(EC7-PCCD)は、腹溝形成過程における効率的な細胞の頂端部収縮の達成するために、AJ の安定化に寄与していると考えられた。cadherin が腹溝形成のような上皮の折れ曲がりが必要としていることは、これまでも信じられていたが、技術的な困難から状況証拠を集めるに留まっていた。この結果は、上皮の折れ曲がりには cadherin が必要とされていることを遺伝学的に直接、証明している。

また DE $\Delta$ P に EC7 を加えた  $\Delta 833-1316$ ( $\Delta$ PCCD)は、 $\Delta$ PCCD 同士のホモフィリック



な接着が失われているが、正常な DE-cadherin とはヘテロに接着し、個体で発現させると細胞膜に局在する。この  $\Delta$ PCCD と DE-cadherin とは異なる接着特異性を持つ DN-cadherin によって、*shg* の胚や組織のレスキューを行なった。この結果、気管の形成や、卵母細胞の位置決定は DN-cadherin で代替できるが、 $\Delta$ PCCD では完全にレスキューできず、これらの組織では接着特異性は関係なく細胞を接着させることが重要であると考えられた。その一方、細胞の遊走や緊密化は、DN-cadherin ではレスキューしないが、 $\Delta$ PCCD によってレスキューし、細胞を接着させるだけでは十分で無かった。また DE-cadherin を完全に  $\Delta$ PCCD に置き換えた胚では、DE $\Delta$ P に置き換えた胚と同様に腹溝形成に異常が観察された。しかし、 $\Delta$ PCCD に置き換えた胚では、頂端部収縮を行なう細胞が間充織状になっており、さらに MyosinII の頂端領域局在が達成されず、DE $\Delta$ P に置き換えた胚の表現型と異なっていた。この結果は、腹溝形成過程において、DE-cadherin は細胞の頂端部収縮における AJ の安定化以外にも機能を持つことを示唆する。

本研究の結果から、形態形成に対する DE-cadherin の役割は、いくつかの機能に分解できることを示す。また人工的に cadherin を短縮化させても、接着活性や、上皮形成に影響を与えないことから、進化の過程の cadherin の短縮化も、一回の大きな変化によって達成できたことを説明する。

## 目次

はじめに p. 5-7

第一章 DE-cadherin の接着に必要とされる領域の探索 p.8-16

序論……………p.8-9

材料と方法……………p.9-14

結果……………p.14-15

議論……………p.15-16

第二章 DE-cadherin の細胞外膜近傍部領域の機能解析

p.17-34

序論……………p.17-18

材料と方法……………p.18-24

結果……………p.24-31

議論……………p.30-34

第三章 DE-cadherin のホモフィリックな接着活性と形態形成  
運動 p.35-39

序論……………p.35

材料と方法……………p.36

結果……………p.36-39

議論……………p.39-41

まとめ p. 42

図 p. 43-58

図の説明 p. 59-65

参考文献 p. 66-78

謝辞 p. 79

## はじめに

後生動物は、多種多様な細胞が秩序をもって集まることによって、形を構築、維持している。細胞の集団が秩序だった構造を形成するためには、細胞同士の接着が重要な役割を果たしている(Borghi and Nelson, 2009)。

その中でアドヘレンスジャンクション(Adherens junction:AJ)は形態形成に關与する普遍的な細胞接着構造である(Nishimura and Takeichi, 2009, Lane et al. 1994, Magie and Martindale, 2008)。AJの分子的な構成は cadherin、 $\beta$ -catenin、 $\alpha$ -catenin、actin 繊維によって構成されている(Gumbiner, 2005)。このAJ構成分子は脊椎動物、尾索動物、棘皮動物、線形動物、節足動物、刺胞動物で共通して見つかる(Levi et al. 1997, Imai et al. 2000, Miller and McClay, 1997, Costa et al. 1998, Broadbent et al. 2002, Oda et al. 1993, Oda et al. 1994, Magie and Martindale, 2008)。

cadherin は、脊椎動物で  $\text{Ca}^{2+}$ イオン依存的な接着を行う一回膜貫通型のタンパク質として見つかった(Takeichi, 1977, Yoshida-Noro et al. 1984)。その構造は、細胞外領域と細胞質領域に機能的に分けられる。細胞外領域は cadherin を定義する Extracellular Cadherin repeat(EC)と呼ばれるドメインが5回繰り返して持ち、ホモフィリックな接着を担っている(Hatta et al. 1988)。一方、C末端側の細胞質領域は  $\beta$ -catenin、 $\alpha$ -catenin と結合し、actin 繊維への裏打ちを担っている(Herrenknecht et al. 1991, Nagafuchi et al. 1991)。cadherin の発見後、ECを持つ分子は、多数発見され、カドヘリンスーパーファミリーを形成していることが明らかにされた(Nollet et al, 2000, Hulpiau and van Roy, 2009)。初めに発見されたAJを構成する cadherin は、現在、classic cadherin と呼ばれ、その他の分子と区別される(今後、cadherin と呼ぶ場合、classic cadherin を指す)。

脊椎動物において cadherin は様々な形態形成に必要とされている(Lien et al. 2006)。脊椎動物型の cadherin の構造と機能の關係が明らかにされ、形態形成過程での cadherin の役割について、推測されている(van Roy and Berx, 2008)。cadherin は転写因子として働く  $\beta$ -catenin を裏打ちとして持つことから、cadherin は接着したことを細胞内へ伝達する受容体として機能が推測されている。例えば、培養細胞では細胞質領域のみで接着阻害による細胞増殖の抑制が観察される(Sasaki et al. 2000, Gottardi et al. 2001)。また E-cadherin を N-cadherin に完全に置き換えたマウス胚では、接着が達成されているにも関わらず、栄養外胚葉の分化に異常が生じ、E-cadherin 依存的な分化シグナルがあると考えられている(Kan et al. 2007)。他にも cadherin の細胞質領域は p120 catenin と結合し、頂端部領域の細胞コンタクトへ輸送、ankyrin-G と結合し、cadherin

の飲食細胞運動(endocytosis)による細胞内へ取り込みと、cadherin の膜上での輸送や安定性に関与している(Peifer and Yap. 2003, Kizhatil et al. 2007)。一方、細胞外領域では、ホモフィリックな接着機構について解析がなされている。ドメイン交換実験やドメイン欠失実験から、脊椎動物の cadherin のホモフィリックな接着活性は細胞外領域 N 末端側の EC1-EC2 領域で達成されている(Nose et al. 1990, Patal et al. 2003, Shan et al. 2004)。In vivo において、EC1-EC2 を交換し接着特異性を変化させた時、運動ニューロンの分布が乱れる(Patel et al 2006)。この結果は、cadherin の EC1-EC2 のホモフィリックな接着活性が選別に機能することを示す。EC3-EC5 は生化学的な実験から EC1-EC2 の接着活性を増強すると報告されているが形態形成過程での役割についてよく解っていない(Chappuis-Flament et al. 2001)。

様々な動物で cadherin 遺伝子が同定された結果、細胞質領域は保存されている一方、細胞外領域には多様性が存在することが明らかとなった(Oda et al 1994, Levi et al, 1997, Miller and McClay, 1997, Costa et al, 1998, Sasakura et al. 2003, Oda et al, 2002, Oda et al.2004, Oda et al. 2005; fig.1)。脊椎動物の cadherin の細胞外領域は EC のみで構成されているが、その他の無脊椎動物の cadherin では EC 以外に Nonchordate specific domain (NC)、Cysteine rich EGF like domain (CE)、Laminin A Globular domain(LG)によって構成される Primitive Classical Cadherin Domain (PCCD)複合体を細胞外領域の基部に持つ(Oda and Tsukita. 1999)。cadherin の細胞外領域の構造は、脊椎動物と尾索動物、また昆虫類と鰓脚類といった系統的に近いと考えられる動物群では保存されているが、系統的に遠い動物群の間では大きな違いが存在する(Putnam et al. 2008, Mallatt and Giribet. 2006, Glenner et al. 2007)。このことから cadherin の細胞外領域のドメイン構成は進化的に起きた稀な変化を反映していることが推測される。また棘皮動物や鉄角類に見つかる長いタイプの cadherin を祖先的であると仮定すると、その他の cadherin の細胞外領域の多様化は、祖先的な cadherin からの独立な短縮化によって説明できる(Oda et al. 2005; fig.1)。

分子の進化はアミノ酸の置換、欠失、挿入といった僅かな変異の連続した蓄積によるものと、大きな領域を欠失や、他の分子と融合をした結果、一度に大きく変化するものがある(Todd et al. 1999)。前者の変化の場合、中立的な変化が多く、分子の機能は大きくは変化しない(Cousins et al. 2000)。一方、後者の場合、機能領域単位であるドメインの消失や付加を受けて、分子の機能が大きく変化することが推測される(Vogel et al. 2004, Bornberg-Bauer et al. 2005)。しかし、このような分子の構造の大きな変化の達成された要因や影響については、あまりよく解っていない。

私は cadherin 構造の変化が与える cadherin の機能や形態形成への影響、そして構造



変化を容認した原因を実験的に検証することを目的とした。本研究ではショウジョウバエ上皮 cadherin(DE-cadherin)を実験のモデルとした。DE-cadherin 細胞外領域は脊椎動物の異なるドメイン構成を持ち、この構造は昆虫類、また昆虫類に近縁な鰓脚類で保存されている(Oda et al. 2005)。その構造は7個の EC と PCCD 複合体によって構成されている(Oda et al. 1994)。また DE-cadherin 変異体は、*shotgun(shg)*として知られ、これまでに *shg* ヌルとなった胚や組織では、気管上皮の融合や頭部・腹部上皮整合性の維持、卵母細胞(Oocyte)の位置決定、境界細胞(border cell)の遊走に異常が現れる(Tepass et al. 1996, Uemura et al. 1996, Oda et al. 1997, Godt and Tepass. 1998, Niewiadowska et al. 1999, Tepass. 1999)。このように様々な細胞運動に関わっている DE-cadherin であるが、構造と機能の関係や、形態形成への寄与の機構はよくわかっていない。そこで私は、人工的に短縮化させた DE-cadherin 分子を作成し、in vivo において、正常な分子と置換することによって、DE-cadherin の構造と機能の関係、また DE-cadherin の構造変化に体する影響を検証できると考えた。

## 第一章 DE-cadherin の接着に必要な領域の探索

### 序論

cadherin はホモフィリックな接着を行なう分子であり、この接着の分子機構については、多くの研究がなされている (Perez et al. 2004, Sivasankar et al. 2009)。その研究の多くが脊椎動物型 cadherin で行なわれている。これまでのドメイン欠失実験やドメイン交換実験から脊椎動物の cadherin では、細胞外領域の 5 つある EC のうち、N 末端側の EC1-EC2 においてホモフィリックな接着がなされていることが示されている (Nose et al. 1990, Chappuis-Flament et al. 2001, Patal et al. 2003, Shen et al. 2004)。X線結晶解析による構造解析の結果から EC1-EC2 は平行に向かいあって配列することによって接着を行ない、この時、EC1-EC2 に存在する N 末端側から 2 番目の tryptophan(Trp)が接着活性に必須である (Boggon et al. 2002)。またホモフィリックな認識は、平行に配置された時に接するわずかな疎水性アミノ酸によってなされていると考えられている (Patel et al. 2006)。また生化学的な実験から接着に必須ではない EC3-EC5 は、EC1-EC2 の接着を増強することが報告されている (Chappuis-Flament et al. 2001)。

脊椎動物の cadherin ではドメインと接着の関係について明らかにされているのに対し、それ以外の動物の cadherin では殆ど解析がなされていない。脊椎動物の cadherin では細胞外領域のドメイン構成が同じでありながら、接着特異性の異なる cadherin が多く存在する。これは脊椎動物型の cadherin の認識に必要とされているわずかなアミノ酸が置換されることによって説明できる (Patel et al. 2006)。一方で、脊椎動物以外の動物では構造が同じでありながら接着特異性の異なる cadherin は多くは見つからない。また、脊椎動物の cadherin では、接着に必須とされている 2 番目 Trp は、その他の動物の cadherin では見つからない。以上のことから、無脊椎動物の cadherin は、脊椎動物の cadherin とは異なる分子機構によって認識・接着を行なっていることが推測される。

私は、DE-cadherin の接着に必要とされている領域の探索を行なった。DE-cadherin の細胞外領域は、7 個の EC と PCCD 複合体から構成される。また PCCD 複合体の NC 領域の 1010 番目のアミノ酸である glycine(Gly)と 1011 番目の serine(Ser)の間で切れることが知られている (Oda et al. 1994)。これまでの研究では、EC が接着に必要とされること、また NC 領域の開裂は DE-cadherin の機能に対して必須でないこと、そして PCCD 領域は AJ への効率的な輸送に必要とされていることが報告されている (Oda and Tsukita. 1999)。

まず、私は DE-cadherin の様々な領域を欠いた欠失分子を作成した。続いて、それぞれの欠失分子の接着活性を測定し、接着活性に必要とされている領域の特定を行なった。

## 材料と実験方法

### DNA の作成

- ・ pUAST-Δ397-1316、pUAST-Δ521-1316、pUAST-Δ623-1316、pUAST-Δ714-1316、pUAST-Δ734-1316、pUAST-Δ754-1316、pUAST-Δ764-1316、pUAST-Δ769-1316、pUAST-Δ774-1316、pUAST-Δ794-1316、pUAST-Δ833-1316

これらのプラスミドは、DE-cadherin の数字で示された領域のアミノ酸を欠いた分子を UAS プロモーター下で発現する(fig.2 A)。また C 末端に GFP が付加されている。

pUAST-Δ397-1316 と pUAST-Δ833-1316 はそれぞれ過去に作成された pUAST-DEEC3 と pUAST-dPCCD と同じプラスミドである(Oda unpublished)。他のプラスミドは pBS-DECH(Oda and Tsukita, 1999)をテンプレートとし forward primer に T7 primer(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')と reverse primer にそれぞれ以下のものを用い、

pUAST- Δ521-1316: 5'-GAAGATCTGAAGTGCGGCTTGTGGTCATTC-3'  
pUAST- Δ623-1316: 5'-GAAGATCTGAACACCGGTGGGTTGTCGTTC-3'  
pUAST-Δ714-1316: 5'-GAAGATCTGACCGTGGTTCCTACTCCATCC-3'  
pUAST- Δ734-1316: 5'-GAAGATCTCAGGAACGGAGCATTGTCGTTG-3'  
pUAST- Δ754-1316: 5'- GAAGATCTCAGTTGCACAACATGTCCGGG-3'  
pUAST- Δ764-1316: 5'- GAAGATCTTGCCCCGGAGTGTCGTCTAG-3'  
pUAST- Δ769-1316: 5'- GAAGATCTGAAGGTGAAGTTACCTGCCCC-3'  
pUAST- Δ774-1316: 5'- GAAGATCTTTCGCTGTCGATGCCGAAGGTG-3'  
pUAST- Δ794-1316: 5'- GAAGATCTGACGTTGGCGTGCAAATAGTC-3'  
(下線部は BglIII 認識配列)

Ex Taq(TaKaRa)でアニーリング温度 60°C、伸長時間 2 分で 30 サイクル PCR 反応を行った。続いて得られた PCR 産物を制限酵素 KpnI、BglIII で処理し pBS-Sal\*Spe\*-DE-Hp-DEdBg-EGFP (H.Oda unpublished)の KpnI、BglIII サイトに導入することによって pBS 欠失分子シリーズを作成した。このようにして作成した

pBS 欠失分子シリーズを KpnI、XbaI で処理し、得られた断片を pUAST (Brand and Perrimon, 1993) の KpnI、XbaI サイトに導入して pUAST- $\Delta$ 521-1316、pUAST- $\Delta$ 623-1316、pUAST- $\Delta$ 714-1316、pUAST- $\Delta$ 734-1316、pUAST- $\Delta$ 754-1316、pUAST- $\Delta$ 764-1316、pUAST- $\Delta$ 769-1316、pUAST- $\Delta$ 774-1316、pUAST- $\Delta$ 794-1316 を作成した。

- pUAST-DEFL、 pUAST-dCR3h(Oda and Tsukita, 1999)。

pUAST-DEFL は DE-cadherin 全長に C 末端に GFP が付加された分子を UAS プロモーター下で発現する。ポジティブコントロールとして使用。

pUAST-dCR3h は EC3 から EC5 (339-574aa) を欠いた分子で C 末端に GFP が付加された分子を UAS プロモーター下で発現する。接着活性がないことから集合実験のネガティブコントロールとして使用。

- pUAST-DECH-KO

pUAST-DEFL は DE-cadherin 全長に C 末端に monomer KusabiraOrange (MBL) が付加された分子を UAS プロモーター下で発現する。共集合活性の測定に使用。

- pWA-gal4 (Y.Hiromi unpublished)

pWA-gal4 は actin プロモーター下で gal4 を発現する。培養細胞での強制発現系における Gal4 ドライバーとして使用。

- pCasper

遺伝子導入ハエ作成のため、P 因子と目を赤くする酵素である White が導入されている。

- pCasper-ubi-DEAP、 pCasper-ubi- $\Delta$ PCCD

pCasper-ubi-DEAP と pCasper-ubi- $\Delta$ PCCD はそれぞれ  $\Delta$ 734-1316、 $\Delta$ 833-1316 を ubiquitin プロモーター下で発現する。pBS- $\Delta$ 734-1316、pBS-833-1316 を EcoRV で処理し、pUP-DECH-Nc(Oda and Tsukita, 2001) の EcoRV サイトに導入し pUP-DEAP、pUP- $\Delta$ PCCD を作成した。このように作成できた pUP-DEAP を KpnI、XbaI で処理し、得られた断片を pCasper の KpnI、XbaI サイトに導入して pCasper-ubi-DEAP、pCasper-ubi- $\Delta$ PCCD を作成した。



- ・ pCasper-ubi-DEFL(Oda and Tsukita,1999)  
pCasper-ubi-DEFL は DE-cadherin 全長に C 末端に GFP が付加された分子を ubiquitin プロモーター下で発現する。
- ・ pCasper-ubi-DN-cadherin  
pCasper-ubi-DN-cadherin は DN-cadherin 全長の C 末端に GFP が付加された分子を ubiquitin プロモーター下で発現する。
- ・ pTURBO(pUChsΔ2-3)  
Δ2-3 transposase が Hsp70 プロモーター下で発現する。ショウジョウバエへの遺伝子導入に使用。

### 細胞培養、遺伝子導入、集合実験

細胞は、ショウジョウバエ浮遊細胞株 S2 細胞を用いた。500 ml Scneider's *Drosophila* medium(GIBCO)に、50 ml FBS(GIBCO)と最終濃度 50~200 IU/ml になるようにペニシリン (明治) とスプレプトマイシン (明治) を加えた Scneider's *Drosophila* medium/10%FBS/PS を S2 細胞培養液として用いた。S2 細胞はこの培養液中、25°Cで培養した。

S2 細胞への遺伝子の導入は、リン酸カルシウム法を用いた。遺伝子導入を行う当日に S2 細胞を  $3.0 \times 10^6$ /ml になるように培養液で希釈し、10cm ディッシュ(CORNING)に 10ml をまきなおした。4~5 時間静置後、溶液 A(DNA(pUAST に組み込んだ欠失分子と pWA-gal4 を 10:1 の割合で計 11  $\mu$ g)、400  $\mu$ l Milli Q 水、40  $\mu$ l 2.5 M CaCl<sub>2</sub>)と溶液 B(400  $\mu$ l 50 mM HEPES, 280 mM NaCl (pH 7.1), 4  $\mu$ l 150 mM NaHPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O)をそれぞれ調整した。溶液 B に溶液 A を 35 $\mu$ l ずつ混ぜ合わせ、10 分静置後、プレートに加えた。遺伝子導入から 12 時間後、培養液を交換し、さらに 40 時間後の細胞を集合実験やウエスタンブロットの試料として用いた。

集合実験は細胞を 1500 rpm, 4°C, 5 min で回収し、再び 5 ml の培養液で懸濁した。懸濁液は 500 $\mu$ l ずつ、24 穴プレート (IWAKI) に入れた後、150 rpm、10 分回転した。回転後、倒立型蛍光顕微鏡(IX-71, Olympus)と冷却 CCD カメラ(CoolSNAP, HQ, Roper Scientific, Tucson, AZ)を用いて、細胞凝集のデジタルイメージ(1392×1040 pixel)を取得した。取得したイメージデータは画像解析ソフト ImageJ v1.38( NIH)の rolling ball 法(ball size 300pixel)でバックグラウンドを差し引いた後、particle size analysis を使用して輝度 30 以上のもの、サイズ 20 pixel 以上のものを細胞凝集として、

凝集のサイズを定量化した

## ウェスタンブロット

トランスフェクション後、細胞を回収し 50 $\mu$ l 蒸留水で懸濁した。50 $\mu$ l 2 $\times$  SDS sample buffer(250mM Tris-HCl(pH 6.8), 4% SDS, 40% glycerol)と最終濃度 5%になるように 2-メルカプトエタノールを加え、5 分煮た。これを SDS-PAGE(7.5% アクリルアミドゲル)で分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。1%ボンソ-S でプロットされていることを確認後、5%スキムミルク in TBS(50 mM Tris-HCl(pH7.6), 150 mM NaCl)で一時間ブロッキングを行った。一次抗体は 5%スキムミルク in TBS で希釈し 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。TBST(50mM Tris-HCl(pH7.6), 150mM NaCl, 0.01%Tween20)で洗ったあと、二次抗体を反応させた。検出は ECL Western blotting detection system(Amasham)を用いて発光により行った。一次抗体はラビットポリクローナル抗 GFP 抗体(1:1000, CLONTECH)を使用した。二次抗体は、Anti Rabbit IgG HRP(1:1000, Amasham)を使用した。

## Fly stock

- Oregon R  
野生型として使用。
- *w<sup>1118</sup>*  
X 染色体に存在する目の赤い色素を作る遺伝子 *white* の変異体で、白い目の表現型を示す。
- *FRT42D, shg<sup>R69</sup>/CyO* (Godt and Tepass, 1998)  
DE-cadherin のヌル変異体。この変異体では DE-cadherin 遺伝子の転写産物は検出されない。また *shg<sup>R69</sup>* とタンデムに第二染色体右腕 42D 領域に Flippase (FLP)の標的領域である FRT が挿入されている。

## ショウジョウバエへの遺伝子導入

*W<sup>1118</sup>* にグレーププレートに室温で 30 分間、卵を産ませ、回収した。回収した卵は両面テープで固定し、実体顕微鏡下で柄付き針を用いてコリオンをむいた。その後、スライドガラスの上に薄く敷いた 1%寒天に前後の方向を合わせて一列に並べた。一列に並べた卵は両面テープに貼付け、新たなスライドガラスに固定し、乾燥を防ぐため halocarbon oil 700(Sigma)をかけて、正立顕微鏡(X2F-15, Nikon)にセットした。

導入する DNA は 0.4mg/ml になるよう injection buffer(0.5mM KCl, 0.1mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)に希釈し、同様に injection buffer で 0.4mg/ml に希釈した pTURBO と 4:1 になるように混ぜた。混ぜ合わせた液は、1ml シリンジ(テルモ)を火で熱して引き延ばしたものをを用いて、微小電極作成装置で作った針に充填した。この針をマニピュレーター(Narishige)にセットし、卵後端部に DNA を注射した。

注射後、17°Cで発生させ、孵化したら 25°Cで生育させた。卵に DNA を注射したハエが成虫まで生育したら、*W<sup>1118</sup>* と掛け合わせ、F1 世代に赤目となったものを遺伝子導入ハエとして使用した。

この方法によって、*ubi-DEFL*(#23, #65、ともに第三染色体に挿入)、*ubi-DEAP*(#4、X 染色体に挿入。#5, #15、第三染色体に挿入)は作成された。*ubi-DEFL#1*(X 染色体)、*ubi-ΔPCCD* (X 染色体) は、以前に確立された系統である(Oda and Tukita, 1999, Oda unpublished)。

## レスキュー実験

- *shg* zygotic null レスキュー

*FRT42D, shg<sup>R69</sup> / CyO; DEFL* と *FRT42D, shg<sup>R69</sup> / CyO; DEAP* は *FRT42D, shg<sup>R69</sup> / CyO* と ubiquitin プロモーター下で恒常的に欠失分子を発現する遺伝子導入ハエ (*ubi-DEFL#1*, *ubi-DEAP#15* を使用)を掛け合わせて作成した。これらのハエの F1 世代は、第二染色体に注目すると *CyO/CyO*, *FRT42D, shg<sup>R69</sup> / CyO*, *FRT42D, shg<sup>R69</sup> / FRT42D, shg<sup>R69</sup>* の 3 種類に分けられる。このうち *FRT42D, shg<sup>R69</sup> / FRT42D, shg<sup>R69</sup>* となっているものを選び、*shg* 接合体ヌル腹部・頭部の上皮の観察を行った。*shg* 接合体ヌル (*shg* zygotic null) となっている遺伝子型は *shg<sup>Z</sup>* と表す。

## 免疫染色

卵は 30% グレーププレートに酵母に塗ったものに 25°C で 12 時間、産ませた。卵は、酵母を取り除くため蒸留水で洗った後、50% ブリーチでコリオンを除いた。

固定は、卵を 4% パラホルムアルデヒド in CGBS (55mM NaCl, 40mM KCl, 15mM MgSO<sub>4</sub>, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM Tricine, pH6.9):ヘプタン=1:1 の溶液中で 300rpm、20 分巡回した。巡回後、固定液を除き、100%メタノールを加え、激しく振り、ビテレン膜を取り除いた。最後にヘプタンを除き、きれいな 100%メタノールに置換した。

100%メタノールに入った卵は、95%エタノール、75%エタノール、35%エタノールを経て PBST(140mM NaCl, 7mM NaHPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.1% Tween20)に置換した。ブロッキングは 5%スキムミルク in PBS で室温、1 時間、震盪した。一次抗体の反応は抗体を 5%スキムミルク in PBS で希釈し 4°C で一晩行っ

た。その後、PBST で洗い、二次抗体を反応させた。発色は ABC kit(Vectastain)を用いて HRP 染色で行った。発色後、3%ホルムアルデヒドで 30 分後固定し、90% glycerol でマウントし、顕微鏡(Axiophoto2, Zeiss)で観察した。

一次抗体はマウスモノクローナル抗 Faciclin III 抗体 D6D6F(1:5, Patel et al .1987)、マウスモノクローナル抗 Elav 抗体 (1:5, O'Neill et al .1994) を用いた。

二次抗体は biotinylated anti mouse IgG (1:200, Amersham)を用いた。

## 結果

### EC7-PCCD 領域は in vitro における接着において必要とされない

DE-cadherin では、EC3-5 の領域を失った dCR3h と呼ばれる欠失分子が接着活性を持たないこと、またいくつかの PCCD 複合体領域のドメインを削っても接着活性を示すことから、DE-cadherin でも接着活性に EC 領域が必要であると考えられている。一方で、PCCD 複合体領域を改変した分子は、細胞膜上の AJ での局在が阻害され細胞質に存在することから、PCCD 複合体は AJ への局在に必要とされている (Oda and Tsukita, 1999)。しかし、接着に必要とされている EC や、PCCD 複合体の接着への寄与についてはあまりよくわかっていない。

これまでの報告を踏まえ、私は様々な領域を失った欠失分子を作成した(Fig.2 A)。続いて、欠失分子をショウジョウバエの浮遊性細胞株である S2 細胞に導入し、集合実験を行った。そして、集合実験によってできた細胞凝集の大きさを接着活性の強さの指標とし、ポジティブコントロールとして DEFL、ネガティブコントロールとして dCR3h を用いて接着活性を比較した(fig, 2 C, D)。

脊椎動物では先端の EC1-EC2 で接着が担われているが、DE-cadherin では、先端部の EC1-EC3( $\Delta$ 397-1316)のみでは、全く接着活性を示さない。また EC1-EC4( $\Delta$ 521-1316)、EC1-EC5( $\Delta$ 623-1316)では、わずかな接着活性が認められるが DEFL と比較すると明らかに弱い。EC1-EC6 ( $\Delta$ 734-1316)はその他の欠失分子と異なり、DEFL と差異のない接着活性を示す。この結果から EC7-PCCD 領域は必ずしも、接着に必要とされないことが明らかとなった。また、接着活性を指標として、接着に必要な膜遠方部領域(EC1-EC6)と、接着に必要とされない膜近傍部領域(EC7-PCCD)で分けられる。今後、膜近傍部領域を欠いた  $\Delta$ 734-1316 は DE $\Delta$  と呼ぶ。接着に必要な EC1-EC6 領域を持っているにも関わらず、DE $\Delta$  に EC7 を付加した  $\Delta$ 833-1316 では、まったく接着活性が見られない(fig.2 A, C, D)。

作成した欠失分子を導入した S2 細胞と DE-cad-KO を導入した S2 細胞を混ぜた集合実験では、欠失分子が正常な DE-cadherin を認識し、接着する場合、DE-cad-KO を



発現する S2 細胞が形成するオレンジ色の細胞凝集に、緑色の欠失分子を発現した細胞が入り込む (fig.3 A)。一方、DE-cadherin と接着特異性の異なる分子(DN-cadherin)を導入した S2 細胞と、DE-cad-KO を導入した S2 細胞を混ぜた集合実験では、それぞれオレンジ色の凝集に緑色の細胞は取り込まれない(fig.3 D)。DEAP を発現する S2 細胞は、オレンジ色の細胞凝集の中には入り込み、接着特異性も正常な DE-cadherin と変化していない(fig.3 B)。また接着活性が見られない  $\Delta 833-1316$  を発現する S2 細胞も、オレンジ色の細胞凝集には入り込む (fig.3 C)。これは  $\Delta 833-1316$  同士ではホモフィリックに接着できないが、正常な DE-cadherin を認識し、ヘテロフィリックな接着は行っていることを示す。また  $\Delta 833-1316$  を発現する遺伝子導入ハエを作成し、 $\Delta 833-1316$  の極性のある上皮細胞での局在を観察すると、細胞質に溜まることはなく細胞膜上の AJ に局在していた(fig.3 G)。これら結果から、 $\Delta 833-1316$  で見られる接着活性の消失が、この欠失分子の膜までの輸送の段階で起きているのではなく、膜に出ている分子自体の接着活性が失われていることが示唆された。今後、PCCD 複合体を欠いている  $\Delta 833-1316$  を  $\Delta PCCD$  と呼ぶ。

### DEAP は in vivo でも接着活性を示す

続いて in vitro で見られた接着が、in vivo においても達成されているか調べる為に、DE-cadherin の変異体である *shotgun (shg)* にこれらの欠失分子を発現させた(*shg* の詳細は次章で述べる)。*shg* では腹部と頭部の上皮の破綻し(fig.4 B, 細矢印と太矢印)、神経組織の露出が観察される。*shg* において DEFL を *ubiquitin* プロモーター下で発現させた胚(*shg<sup>2</sup>; DEFL*)では、上皮は正常に維持される(fig.4 C, H)。同様に、DEAP を発現させた胚(*shg<sup>2</sup>; DEAP*)では、腹部上皮は維持され、in vivo における接着活性を示す。しかし、頭部では脳が露出し、異常が観察される(fig.4 D, I)。一方、接着活性を持たない  $\Delta PCCD$  を発現させた胚(*shg<sup>2</sup>;  $\Delta PCCD$* )では、全く上皮は維持されず、in vivo でも接着活性は認められない (fig.4 E, J)。

## 議論

DE-cadherin の細胞外領域は接着活性に必要とされる膜遠方部領域(EC1-EC6)と、接着活性には必要とされない膜近傍部領域(EC7-PCCD)に分けられることが示された。PCCD 複合体を持たない DEAP や  $\Delta PCCD$  を、胚に発現させた時、DEAP、 $\Delta PCCD$  は正常な DE-cadherin と差異のなく、細胞間のコンタクトに局在する。この結果はこれまでに報告されている PCCD 複合体を改変した変異分子が膜までの輸送に異常に見られることと矛盾する(Oda and Tsukita, 1999)。前回の実験では PCCD 複合体の一部を

欠いた欠失分子や、アミノ酸置換した変異分子が用いられ、これらの分子では、機能を失った PCCD 複合体が残されている。そのため、機能を失った PCCD 複合体が阻害的に働いた可能性がある。一方、今回の実験で用いた DEAP、また ΔPCCD は完全に PCCD 複合体を欠いているためこのような阻害を受けず、細胞の膜への正常な局在を示した。これらの結果から DE-cadherin の正常な膜への輸送には、PCCD 複合体は無くてもよいが、PCCD 複合体が存在する時には完全な構造の PCCD 複合体が必要とされていると考えられる。

DEAP に EC7 を加えた ΔPCCD は、ΔPCCD 同士のホモフィリックな接着を行なわない。接着活性が無い理由は、細胞膜までの輸送に異常がある、または細胞膜までは輸送されるが分子自体に接着活性がない、二つの可能性がある。ΔPCCD は、正常型 DE-cadherin との共集合実験では、正常型の DE-cadherin を認識・接着し、in vivo の上皮で発現させると細胞膜上に局在することから、膜上に提示された分子自体の接着活性が無くなっている。この結果は、付加した EC7 が膜遠方部領域(EC1-EC6)の接着活性に対し、阻害的に機能していることを示唆し、膜遠方部領域(EC1-EC6)と膜近傍部領域(EC7-PCCD)がそれぞれ機能的な領域として、まとまって存在することが重要であることを推測させる。この機能的なまとまりは、進化の過程で選ばれたドメインの領域と一致することから、進化の過程で起きた cadherin 短縮化には機能的な制約があったためではないだろうか。このような機能的な拘束があることが、系統的に近い動物同士では cadherin の構造が保存されている理由であると考えられる(Oda et al. 2005; fig.1)。

*shg<sup>2</sup>*; DEAP では腹部の上皮は維持できていたが、頭部の上皮は維持できていない。これは頭部領域では脳となる神経細胞の陥入や、前腸の陥入、そして頭部上皮の覆いかぶせ運動(head involution)が続いて起こり、接着するだけでは十分ではないのだろう。(Foe. 1989, Younossi-Hartenstein et al. 1996, VanHook and Letsou.2008)。

脊椎動物の接着に必要な領域が EC1-EC2 と狭い領域であるのに対し、DE-cadherin では EC1-EC6 という広い領域が接着に必要とされていた(Nose et al. 1990, Chappuis-Flament et al. 2001, Patal et al. 2003, Shen et al. 2004)。この結果は同じ EC による接着でも脊椎動物の接着の機構と DE-cadherin の接着の機構は異なっていることを示唆する。脊椎動物では狭い領域の僅かなアミノ酸置換によって接着特異性の異なる cadherin の多様化が説明されているが、DE-cadherin のような昆虫型の cadherin は接着には広い領域が必要であり、脊椎動物型の cadherin のように簡単には多様化できないことが推測される(Patel et al.2006)。この仮説は、昆虫類では構造が同じでありながら接着特異性の異なる昆虫型 cadherin が複数ないことを説明する。

## 第2章 DE-cadherin の細胞外 Proximal 領域の機能解析

### 序論

DE-cadherin 遺伝子の変異体である *shotgun* (*shg*)として知られ、*shg* の解析から DE-cadherin の *in vivo* での役割が明らかにされている。*shg* の接合体ヌル(*zygotic null*)となった胚では、初期の細胞化・上皮形成は達成されるが、胚帯の収縮が始まるステージ 13 になると、頭部・腹部の上皮の整合性が破綻する。この時期、上皮から陥入した気管原基が融合し、気管が形成されるが、*shg* 接合体ヌル変異体では気管は融合しない。その他にも、*shg* では後腸から伸展するマルピーギ管が伸展する際に破綻する等、静的な接着の維持を必要とする領域よりも、ダイナミックな形態形成を行う領域に大きな異常が観察される(Tepass et al. 1996, Uemura et al. 1996)。翅成虫原器で *shg* ヌルとなる細胞を作成すると、翅成虫原器を構成する上皮細胞は極性が維持されず、増殖して大きな領域となる前に除かれてしまう(Le Borgne et al. 2002)。遊走する境界細胞(*border cell*)や、その足場となる保育細胞(*nurse cell*)が *shg* ヌルとなると、境界細胞の遊走は阻害される。また卵母細胞(*oocyte*)や、それを取り囲む濾胞細胞(*follicle cell*)を *shg* ヌルとした場合、卵母細胞の後方部への局在が攪乱される (Oda et al. 1997; Godt & Tepass 1998; González-Reyes & St Johnston 1998; Niewiadomska et al. 1999)。接着特異性や接着力が異なる細胞が混在する細胞集団では、同じ接着特異性、接着力を持った細胞同士で凝集を作り、出来た凝集間の親和力の差によってパターンが形成されることを説明する差次粘着説が提案されているが、卵房内の卵母細胞の局在は、保育細胞と卵母細胞、保育細胞と濾胞細胞、卵母細胞と濾胞細胞間での DE-cadherin による接着活性の差によるものであると考えられている (Townes and Holtfeter. 1955, Peifer. 1998)。

また、中胚葉陥入にも DE-cadherin が関与することが示唆されている(Oda et al. 1998, Oda et al. 2001)。ショウジョウバエの中胚葉陥入は、腹部の上皮が折れ曲がりながら体内に陥入することによって達成されている(Leptin et al. 1992)。この時の上皮の折れ曲がりによる溝は、腹溝(*ventral furrow*)と呼ばれる。腹溝形成は、折れ曲がる領域の細胞が頂端面を縮める頂端部収縮によって達成されている(Leptin and Grunewald. 1990, Sweeton et al. 1991)。頂端部収縮を達成する分子機構は詳細に解析されている。Dorsal によって腹部領域が決定された後、腹部領域の細胞は中胚葉を決定する Snail と Twist を発現する(Jiang et al. 1991, Leptin. 1991)。Snail は転写抑制因子であり、DE-cadherin や Crumbs といった上皮の形成、維持する分子の発現を抑え、上皮間充織転換の準備を行なう(Oda et al. 1998)。Twist は分泌タンパク質である

Folded gastrulation (Fog)や T48 を介して、RhoGEF2 を活性化する(Dawes-Hoang et al. 2005, Fox and Peifer. 2007, Kölsch et al. 2007)。RhoGEF2 は基部領域に局在する MyosinII や、亜頂端領域にある AJ を頂端領域に移行する (Kölsch et al. 2007)。また Fog は G タンパク質(Cta)を介して、Myosin II light chain をリン酸化することによって活性化し、細胞内の表層張力を上げ、頂端部収縮を引き起こす (Morize et al.1998)。最近、腹溝形成過程における、個々の細胞の頂端部収縮は、同調していないパルス状の収縮であることが明らかにされた(Martin et al. 2009)。AJ とアクチンをリンクする *canoe* や、AJ 構成 タンパク質である  $\beta$  カテニン(*Armadillo*)の変異体、AJ の形成を阻害する *nullo* の強制発現では、細胞内で MyosinII と actin の凝集が観察され、頂端部収縮は阻害される(Cox et al. 1996, Sawyer et al. 2009, Kölsch et al. 2007)。これらのことから、腹溝は、細胞内の actomyosin 相互作用によって生じた収縮力が AJ を介して隣接する細胞に伝達されて形成されていると信じられている(Lecuit and Lanne. 2007, Harris et al. 2009)。また腹溝形成や前腸陥入の過程では、細胞が押されたり、引っ張られたりといった物理的な力が生じているが、これらの物理的な力は、細胞に受容されることによって、Twist を発現させたり、Myosin II の頂端部への局在を促進することによって、腹溝形成の促進や、また前腸陥入の開始に関与することが報告されている (Brouzés et al. 2004, Pouille et al. 2009)。この腹溝形成過程において DE-cadherin は、細胞内の actomyosin 相互作用によって生じた収縮力の伝達や受容、また折れ曲がる上皮での整合性の維持等に働いていることが想像されているが、直接的、または遺伝学的な証拠は得られていない。その理由は、*shg* 接合体ヌルであれば、腹溝形成は達成されてしまい、また *shg* 母性ヌルであれば卵形成の段階で異常が生じてしまい、腹溝形成について解析できないためである(Tepass et al. 1996, Uemura et al. 1996, Oda et al. 1997; Godt & Tepass 1998; González-Reyes & St Johnston 1998; Niewiadowska et al. 1999)。また、RNAi や DE-cadherin の優性阻害体の強制発現では、細胞化、上皮形成の段階で異常が生じ、腹溝形成の詳細な解析はなされていない (Pilot et al. 2006, Wang et al. 2004)。

これまで挙げてきたように、上皮組織の整合性の維持、上皮組織の融合、上皮細胞の増殖と維持、細胞の遊走、細胞の位置決定等、形態形成過程において、様々な細胞運動に DE-cadherin は必要とされている。これらの異なる細胞運動を達成させるためには、接着だけでなく、様々な機能がそれぞれ複合的に機能していることが推測される。そこで DE-cadherin の膜近傍部領域には接着以外の形態形成に必要とされているという作業仮説を立てた。この仮説では、DE-cadherin の変異体である *shg* を DE $\Delta$ P でレスキューした時、膜近傍部領域を必要とする形態形成に異常が現れることが期待される。



## 材料と実験方法

### Fly stock

- *FRT42D, shg<sup>R69</sup>/CyO; ubi-DEFL*

*FRT42D, shg<sup>R69</sup>/CyO* に、ubiquitin プロモーターによって発現する DEFL が第 3 染色体に挿入されている。独立な 3 ラインを樹立した(#1、#23、#65)。

- *FRT42D, shg<sup>R69</sup>/CyO; ubi-DEAP*

*FRT42D, shg<sup>R69</sup>/CyO* に、ubiquitin プロモーターによって発現する DEAP が第 3 染色体に挿入されている。独立な 3 ラインを樹立した(#4、#5、#15)。

- *hsFLP; FRT42D, ubi-GFP(S65T):nls/CyO*

X 染色体に Hsp70 プロモーター下で発現する FLP が挿入されている。また、第二染色体の右腕には ubiquitin プロモーター下で発現する核移行シグナルが付加された GFP が、また 42D 領域に FRT が挿入されている。

- *hsFLP; FRT42D, ovoD1/CyO*

X 染色体に Hsp70 プロモーター下で発現する FLP が挿入されている。また、第二染色体の右腕には優性に卵形成を阻害する *ovoD1* 遺伝子、さらに 42D 領域に FRT が挿入されている。

- *shg<sup>R69</sup>, mNcGSP*

第 2 染色体に *shg<sup>R69</sup>* と ubiquitin プロモーターによって発現する NC 領域の開裂が阻害されている *mNcGSP* が挿入されている。このラインでは *shg* 変異体で観察される異常は完全に *mNcGSP* によってレスキューされている。

### レスキュー実験

- *shg* 接合体ヌル胚のレスキュー

第一章の方法に準ずる。

- モザイク解析

相同組み換えは FLP-FRT システムを用いた(Harrison and Perrimon, 1993)。

*hsFLP; FRT42D, ubi-GFP(S65T):nls/CyO* の雄と *FRT42D, shg<sup>R69</sup>/CyO; ubi-DEFL*、*FRT42D, shg<sup>R69</sup>/CyO; ubi-DEAP* の雌と掛け合わせ、酵母を多めに塗ったグレープ

プレートに卵を生ませた。卵はグレーププレートごと回収し、25°Cで 60~72 時間、2 齢幼虫になるまで発生させた。発生させた幼虫は 37°Cで 2 時間、熱ショックを与え、相同組み換えを起こさせ、*shg*ヌルとなる細胞を作成した。*shg*ヌルとなった細胞は、核に局在する GFP が発現しない領域として見分けることが可能である。

・ *shg* 母性接合体ヌル胚のレスキュー

*hsFLP; FRT42D, ovoD1/CyO* の雄と *FRT42D, shg<sup>R69</sup>/CyO; ubi-DEFL, FRT42D, shg<sup>R69</sup>/CyO; ubi-DEAP* の雌と掛け合わせ、酵母を多めに塗ったグレーププレートに卵を生ませた。卵は、グレーププレートごと回収し、25°Cで 60~72 時間、2 齢幼虫になるまで発生させた。発生させた幼虫は、37°Cで 2 時間、熱ショックを与え、相同組み換えを起こさせ、*shg*ヌルとなる生殖細胞を作成した。その後、幼虫は、成虫まで育て、*FRT42D, ovoD1/FRT42D, shg<sup>R69</sup>*の雌と、別に用意しておいた *FRT42D, shg<sup>R69</sup> / ubi-GFP(S65T):nls* の雄と掛け合わせ、4 日後、採卵した。採卵の方法は、グレーププレートに 25°C、3~4 時間、卵を生ませ、グレーププレートごと回収した。卵は、すぐにコリオンを剥き、ステージ 5 まで発生させた。このとき、核に局在する GFP が発現していないものが *shg* 母性接合体ヌルとなった卵である。今後、*shg* 母性接合体ヌル(*shg* maternal zygotic null) となった遺伝子型は、*shg<sup>MZ</sup>* と表す。

## 定量的 RT-PCR

卵は 30%グレーププレートに酵母に塗ったものに 25°Cで産ませた。回収した卵は、酵母を取り除くため蒸留水で洗った。50%ブリーチで卵の表層に存在するコリオンを取り除いた。細胞化が終わったステージ(stage 5)の卵を一個ずつ、ホモジナイズ用のエッペンへ移し、Milli Q 水で洗った。

mRNA の抽出は、QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (GE Healthcare)を用いた。Milli Q 水を除いた後、20  $\mu$ l Extraction Buffer を加え、ホモジナイズした。その後、380ml Extraction Buffer、800 $\mu$ l Elution Buffer を加えて、14000rpm、5 分遠心した。遠心後、上清をオリゴ dT セファロースと混ぜ、5 分間震盪した。14000rpm、10 秒遠心し、上清を捨てた後、High salt buffer で 4 回、Low salt buffer で 1 回洗い、カラムにセファロースを移した。カラムに移したセファロースを Low salt buffer で洗った後、65°Cの 400  $\mu$ l Elution Buffer で溶出した。溶出液に 40  $\mu$ l 3M 酢酸カリウム、10  $\mu$ l グリコゲン、1ml 100% エタノールを加え、-80°Cでエタノール沈殿させた。沈殿物した mRNA は最終的に 20  $\mu$ l の DPEC 処理水に溶かした。

cDNA 合成は SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen)を用いた。10 $\mu$ l mRNA 抽出

液に、100ng ランダムプライマー(invitrogen)、10mM dNTP(invitogen)を加え 65°Cで 5分、その後、すぐさま氷上で 1分、置くことによってプライマーをハイブリした。続いて、4 $\mu$ l  $\times$  5 SST buffer、1 $\mu$ l 10mM DDT、1 $\mu$ l SuperScript III reverse transcriptase を加え、25°C 5分、60°C 2時間で cDNA を合成した。このとき、ゲノム DNA が混ざっていないことを示すコントロールとして、SuperScript III reverse transcriptase を加えないものも同時に作成した。最後に酵素を失活させるために 75°Cで 15分、処理し、最終的な量が 50ml になるように Milli Q 水を加えた。

作成した cDNA は、*Histone H1*、*shg 5'UTR*、*shg ECl*、*shg NC* 領域を認識する下記のプライマーを用いて PCR を行い、cDNA が合成されていること、目的の遺伝子型になっていることを確認した。この時、コントロールとして SuperScript III reverse transcriptase を加えていないものも、同様に PCR を行い、ゲノム DNA が混入していないことを確認した。

*Histone H1* :5'- AAA AGT TAG CGC ATT CAT C -3' (forward)

:5'- CAC GTT TGT CAC CAG GAA CT -3'(reverse)

*shg 5'UTR* :5'- CTG GTC TTA CCT GTT TGC GGT GCG -3'(forward)

:5'- TCG AAT CGA ACT CGT ACA GTG CG -3' (reverse)

*shg ECl* :5'- CGA CGT TTG CAC CTT CAA CGT TAC C -3' (forward)

:5'- GCA GAA TCT CGT ACT CGA CCA AAC TG -3' (reverse)

*shg NC* :5'- AGA CCT TCC GCA CGA TCA GTT TAG G -3' (forward)

:5'- GAA TCG GAT GCT GCC GCT CTT ATC C -3' (reverse)

定量的 PCR は SYBR PrimeScript RT-PCR Kit I (Takara)と Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (Takara)を用いた。DEFL、DEAP が共に持つ *shg ECl* 領域を認識するプライマーを用いて、導入遺伝子の発現量の定量化を行い、*Histon H1* 発現量で標準化した。乖離曲線作成し、非特異的な増幅やプライマーダイマーが出来ていないことを確認してから、交差点(crossing-point)において標準曲線法(standard curve method)を用いて発現量を定量化した。

## 免疫染色

卵は 30% グレーププレートに酵母に塗ったものに 25°Cで産ませた。卵は 50% ブリーチでコリオンを取り除き、目的のステージになるまで、蒸留水もしくは TNS(0.4% NaCl, 0.03% Triton X-100)中で発生させた。固定は Armadillo と MyosinII の染色のために

Heat-methanol 法を用い、他の染色には化学固定法を用いた。

Heat-methanol 法は Muller の方法に準ずる(Muller and Weischaus, 1996)。目的のステージとなった卵を TNS で 30 秒、煮た。煮た卵は、すぐさま冷やした TNS に移し、1 分間、静置した。続いて、卵を 100%メタノール：ヘプタン=1:1 の溶液に移し、激しく振り、ピテレン膜を取り除いた後、きれいなメタノールに移し、氷上で一時間、静置した。Heat-methanol 法で固定したものでは GFP の蛍光は完全に見えなくなる。化学固定法は、第一章の方法に準ずる。

95%エタノール、75%エタノール、35%エタノールを経て PBST(140mM NaCl, 7mMNaHPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1%Tween20)に置換し、親水化した。ブロッキングは、5%スキムミルク in PBS で室温、1 時間、震盪した。一次抗体反応は、抗体を 5%スキムミルク in PBS で希釈し 4°Cで一晩行った。核を染色する場合は、このブロッキングの段階で、RNase H(10μg/ml, invtrogen)を加えた。その後、PBST で洗い、二次抗体を反応させた。

退色を防ぐため 2.5%DABCO(1,4-diazobicycol-[2,2,2]-octane, Sigma) in 75% glycerol でマウントした。観察は共焦点レーザー顕微鏡(顕微鏡:Axiophoto2, Zeiss、共焦点レーザーシステム:MRC1024, BioRad)を用いて観察した。

気管の染色には Rhodamine-conjugated Chitin binding probe (1:200, BioLab)を、F-actin の染色には Alexa Fluor 568 conjugated phalloidin (1:1000, Molecular Probe)を、核の染色には YOYO-1(0.1μM/ml, Molecular probes)を用いた。

一次抗体はマウスモノクローナル抗 Neurotactin 抗体 BP106 (1:20, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB))、マウスモノクローナル抗 Armadillo 抗体 N2-7A1 (1:20, DSHB)、ラビットポリクローナル抗 Twist 抗体 (1:1000, Leptin)、ラビットポリクローナル cytoplasmic Myosin II heavy chain (Zipper) 抗体 (1:1000, Kiehart et al. 1986)を用いた。二次抗体は Rhodamine Red-X conjugated goat anti-mouse IgG (1:200, Molecular Probes), FITC conjugated donkey anti-mouse IgG (1:200, Chemicon), Cy3 conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:200, Chemicon)を用いた。

## 電子顕微鏡観察

### ・走査型電子顕微鏡(SEM)

一次固定は、化学固定法もしくは Heat-Methanol 法を用いた。一次固定を終えた卵はピテレン膜を除き、2.5%グルタルアルデヒドで 30 分、後固定を行った。後固定後、PBST で洗い、35%エタノール、75%エタノール、95%エタノールを経て t-ブチルアルコールに置換し、4°Cで 5 分凍結した。凍結した胚は凍結乾燥機

(JFD-300, JEOL)で凍結乾燥させた後、試料台に両面テープでマウントした。その後、イオンスパッタリング装置(JFC-1500, JEOL)で金コートをした。このようにして調整したサンプルは、SEM (JSM-5300LV, JEOL)、10 kV で観察を行った。

#### ・透過型電子顕微鏡(TEM)

一次固定は4%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド in 0.1 M カコジル酸ナトリウム：ヘプタン=1：1の溶液中で300rpm、20分回転した。回転後、卵を新しい4%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド in 0.1 M カコジル酸ナトリウム溶液に移し、微小電極作成装置で作ったガラス針を用いてビテレン膜を取り除いた。ビテレン膜を取り除いた後、アルデヒドの持ち込みがないよう0.1 M カコジル酸ナトリウムでよく洗った。続いて、1%オスミウム酸 in 0.1 M カコジル酸ナトリウムで4℃、一時間、後固定を行った。後固定後、蒸留水でよく洗ったあと、35%エタノール、65%エタノール、75%エタノール、85%エタノール、95%エタノール、99%エタノール、100%エタノールを経て、プロピレンオキシドに置換した。

包埋する樹脂は PolyBed 812 kit (Polyscience, inc.)を用いて作成した。樹脂は11.6 ml Epon 812、6.3 ml DDSA、7.1 ml MNA の割合で混合し、樹脂の固さを調節し、これに重合促進剤0.38ml DMP30 を加え、-20℃で保存した。

包埋の方法は、作成した樹脂とプロピレンオキシドを1:1で混ぜたものに卵を沈め、真空中で12時間、脱気することによってプロピレンオキシドを除いた。脱気後、きれいな樹脂を24穴プレート(Iwaki)に分注し、卵を一個ずつ樹脂に沈め、この状態で、脱気し、気泡を取り除いた。気泡が取り除けたら、60℃、12時間、樹脂を硬化させた。樹脂包埋したサンプルはダイヤモンドナイフ(Drukker International)で70nmの厚さに薄切し、グリッドに貼付けた。薄切したサンプルは酢酸ウランとクエン酸鉛によって染色を行い、TEM (JEM-1010, JEOL)、100 kV で観察を行った。

#### ライブ観察

卵は30%グレーププレートに酵母に塗ったものに25℃で産ませた。卵は50%ブリーチでコリオンを剥き、0.05% Tween20の液中で目的のステージまで発生させた。目的のステージをとなったら、卵をカバーガラス移し、キムワイプで水分をよく除き、腹側をカバーガラスに接するようにセットした。この状態を vacuum silicone grease (Beckman)で固定し、halocarbon oil 700 (Sigma)をかけた。深い溝の入ったスライドガラスに卵をつぶさないようにセットし、共焦点レーザー顕微鏡 (Axiophoto2)、アル

ゴン/488 レーザー、63x/NA1.4 Plan-Apochromat 油浸レンズを用いてライブ観察を行った。ライブ観察の条件は室温、10%のレーザーパワーで10秒おきにイメージを取得した。この条件下で30分間置いた胚はステージ14まで正常に発生することを確認している。

## ウェスタンブロット

第一章の方法に準ずる。SDS サンプルは以下のようにして調整した。25°Cで12時間、卵を産ませた。卵は蒸留水で洗った後、50%ブリーチでコリオンを除いた。ステージ16となっている卵を30個選び、10 $\mu$ l 蒸留水を加えホモジナイズした。10  $\mu$ l 2 $\times$  SDS sample buffer(250mM Tris-HCL(pH 6.8), 4% SDS, 40% glycerol)と最終濃度5%になるように2-メルカプトエタノールを加え、5分煮た。一次抗体はマウスモノクローナル抗 DE-cadherin 抗体 DCAD2 (1:1000, H.Oda et al. 1994)、ラビットポリクローナル抗 GFP 抗体 (1:1000, CLONTECH) を使用した。二次抗体は、Anti-Mouse IgG-HRP(1:1000, Amasham)、Anti-Rabbit IgG-HRP(1:1000, Amasham)を使用した。

## 結果

### 発生過程において DEAP は DE-cadherin の代替として機能できる

*shg* ヌル変異体で観察される組織の異常は ubiquitin プロモーター下で発現する DEFL によって完全にレスキューされる(fig.5 B, E, H, L, M)。私は、同様に ubiquitin プロモーター下で発現する DEAP によるレスキュー実験をデザインした。まず DEAP を ubiquitin プロモーターによって恒常的に発現する遺伝子導入ハエ (*ubi-DEAP*) を作成し、極性をもった上皮細胞での DEAP の局在を調べた(fig.3 F)。その結果、DEAP は AJ に局在し、*in vivo* でも、DEAP が正常に機能することを示唆する。続いて、*shg*<sup>R69</sup> と *ubi-DEAP* を掛け合わせて、*shg* 接合体ヌルにおいて、DEAP を発現する胚(*shg*<sup>z</sup>; *DEAP*)を作成し、頭部・腹部上皮、気管の観察を行った。発生後期ステージ16の *shg*<sup>z</sup>; *DEAP*の胚全体の表現型をSEMによって観察すると、背側の上皮の閉還(Dorsal Closure)は正常に達成され、*shg* 接合体ヌルの胚 (*shg*<sup>z</sup>)で観察される腹部上皮の破綻はレスキューされる。しかし、頭部では異常が観察される(fig.5 A, C)。また気管を Chitin binding-protein (CBP)によって可視化すると、*shg*<sup>z</sup>では気管原基は融合せず断片化した気管が観察されるが、*shg*<sup>z</sup>; *DEAP*では気管原基は正常に融合し、管となった気管が観察される(fig.5 D, F)。

続いて、FLP-FRT システムによって相同組み換えを起こし、*DEAP*の発現している組織で *shg* ヌルとなる細胞を作成した。*shg*<sup>R69</sup>の対立する染色体は、ubiquitin プロモ

一ター下で発現する核移行シグナルを付加した GFP(GFP-nls)を導入しており、相同組み換えを起す前は *shg/GFP-nls* というヘテロな状態で組織を維持している。このような組織において相同組み換えを起させると、GFP-nls が陰性となる *shg/shg* となった *shg* ヌルの細胞と *GFP-nls/GFP-nls* となった核の GFP が強く発現する細胞がセットで形成される。上皮性の組織である翅成虫原器で相同組み換えを起した場合、*DEFL* や *DEAP* が発現していない場合でも、GFP-nls が強く発現している領域が見つかることから、相同組み換えは起こっている(fig.5 G)。しかし、*shg* ヌルとなる GFP-nls 陰性となる領域は観察されないことから、上皮組織では、*shg* ヌルとなった細胞は形成された後、増殖する際、維持されず除かれていることが考えられる。これに対し、*DEFL* もしくは *DEAP* を発現させた場合、*shg* ヌルとなった領域が形成される(fig.5 H,I)。 *shg* ヌルとなった領域の細胞の形態は *DEFL*、*DEAP* ともに差は見られない。しかし、*DEAP* によって形成される *shg* ヌルの領域の境界は、*DEFL* の境界と比較すると滑らかになっている(fig.5 H'-H'', I'-I'')。これは *in vitro* の実験系では検出できなかった接着活性の差が *DE-cadherin* と *DEAP* の間に存在し、*DEAP* 同士のホモフィリックな接着が *DE-cadherin* と *DEAP* の接着よりも好まれていることが推測される。そのため *DEAP* のみで接着を行なう細胞集団が集まる力が働き *DEAP* によって形成される *shg* ヌルの領域の境界が滑らかになっていると考えられる。

ショウジョウバエの生殖細胞は、減数分裂後、4回の分裂を行い、1個の卵母細胞と15個の保育細胞を形成する。これらの生殖細胞は母親由来の濾胞細胞に包まれ、連なって存在し、卵房(egg chamber)を形成している。卵房内において、卵母細胞は濾胞細胞との *DE-cadherin* による強い接着により後方部側へ局在化する。卵形成が進むにつれて、卵母細胞は大きくなり生殖細胞まるごと包んでいた濾胞細胞は卵母細胞のみを包むようになる。また頭方部端の6-8個の濾胞細胞は、境界細胞へと分化し、保育細胞の間を通過して後方部側の卵母細胞に接するように遊走を行う(Spradling, 1993)。生殖細胞を *shg* ヌルとすると、卵母細胞の後方部側の局在が乱れ、境界細胞が遊走しない異常が観察される(fig.5 J, K)。これらの卵形成における異常は *DEFL* もしくは *DEAP* によって、完全にレスキューされる(fig.5 L-O)。この結果は、母親由来の *DE-cadherin* を *DEAP* に置き換えても卵が形成できることを示唆する。

### DEAP は上皮形成を正常に達成し、AJを形成する

母性由来の *DE-cadherin* を *DEAP* に置き換えた卵を作成するために、FLP-FRT システムと卵形成を優性に阻害する *ovoD* を用いた実験をデザインした(Perrimon 1984, Harrison and Perrimon, 1993)。その方法は、*shg* の対立染色体の対立する領域に *ovoD*

を導入した *shg/ovoD* の雌を作成し、FLP-FRT システムによって相同組み換えを引き起こした。この時、相同組み換えが起こらなかった *shg/ovoD* と、相同組み換えによって生じた *shg/shg*、*ovoD/ovoD* の 3 タイプの卵母細胞が得られる。この卵母細胞を発生させると、*ovoD* 遺伝子をもつ *shg/ovoD* と *ovoD/ovoD* の卵形成は阻害され *shg/shg* となった卵のみを得ることができる。DEFL もしくは DEAP を発現していない場合、このような *shg* 母性ヌルとなった卵は全く産卵されない。DEFL もしくは DEAP を発現させたハエでは、正常な形態の卵を産卵した。そこで *shg/ubi-GFP-nls* の雄と掛け合わせて、*shg* 母性接合体ヌルで、DEAP を発現する胚 (*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*) を作成した。まず内在的な DE-cadherin の転写産物が存在しないことを、RT-PCR によって確認した。導入遺伝子には、5'UTR が除かれている。そのため、内在的な転写産物の有無は 5'UTR 領域を認識するプライマーを用いることによって区別できる(fig.6 A-C)。この PCR の結果、得られた卵は内在的な DE-cadherin は存在せず、DEAP に完全に置き換わっていることが確認された(fig.6 D)。同様の実験を DEFL でも行い、内在的な DE-cadherin が導入された遺伝子に置換されていることを確認した。

これまでに、細胞化前の卵での DE-cadherin の RNAi や、DE-cadherin の優性阻害体の過剰発現の実験では、上皮形成に異常が生じ、単層の上皮が形成されず、AJ の局在も乱れることが報告されている(Pilot et al. 2006, Wang et al. 2004)。このことから DE-cadherin は、上皮の形成に必要とされていると考えられている。そこで上皮形成の観察を行った結果、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、正常な細胞化が行なわれ、このとき、細胞の輪郭と核を可視化すると、単層の上皮が形成されていることが確認される(fig.7 A-B')。また中胚葉陥入の始まるステージ 6 の外胚葉上皮において、DEAP は DEFL と差異のない垂頂端領域の局在を示す(fig.7 C-D')。しかし、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* の中胚葉陥入領域である腹部では、組織の破綻が観察される(fig.7 D, fig.11 L, M)。*crumbs* や *stardust* といった上皮の極性や整合性の維持に必要な遺伝子の変異体では、初期上皮は正常に形成されるものの、胚帯伸長の際の細胞の再配列運動によって外胚葉上皮が破綻することが知られている(Tepass et al.1990, Tepass. 1996, Müller et al. 1996)。*shg<sup>MZ</sup>; DEFL* や *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* の外胚葉上皮の上皮形態について観察を行なった。ステージ 7 で見られる後腸の陥入は外胚葉上皮の細胞の頂端部が収縮し、折れ曲がることによって達成している。この時、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では腹側では予定中胚葉の破綻がみられるものの、後腸の陥入は正常に達成していた(fig.7 F)。次に胚帯伸長を行なっているステージ 10 の外胚葉上皮を観察した(fig.7 H, H', J, J')。AJ の裏打ちタンパク質である Armadillo(Arm) の局在を比較すると、Arm は、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では異所的なドット上の局在が見られるが、AJ にも正常に局在する(Fig.7 I, J)。また上皮細胞の形態を見ると、胚帯の伸長す



る際に生じる細胞の挿入運動(intercalation)によって形成されるロゼッタ状の細胞配列が観察され、上皮の運動は正常に達成されていることを示唆する(fig.7 H, J, Blankenship et al, 2006)。この時期の上皮では、ステージ6では亜頂端領域の局在していたAJは頂端の領域へと移行する(fig.7 G', I')。このAJの移行は、DEAPが構成されるAJでも行なわれる(fig.7 H', J')。さらに成熟した外胚葉上皮の超薄切片を作成し、TEMによる観察を行った。*shg<sup>MZ</sup>; DEFL*、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*とも正常に頂端部領域にAJ、またその側方基底領域には無脊椎動物においてバリア機能を担うセプテートジャンクション(SJ)が確認される(fig.7 K, L)。興味深いことに、DEAPの細胞外領域は、DEFLの細胞外領域とアミノ酸の数を比較すると、53%ほどの長さになっているにもかかわらず、TEMによって観察されるAJの細胞間隙の幅は*shg<sup>MZ</sup>; DEFL*、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*ともに20-25nmで差は見られなかった(fig.7 K', L')。以上の結果からDEAPは上皮組織において、DE-cadherinの代わりにAJの構成分子として正常に働くことが示された。

#### *shg<sup>MZ</sup>; DEAP*は腹溝の形成過程に異常が生じる

*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*は外胚葉上皮を正常に形成するが、中胚葉陥入を行なう腹側領域に異常が観察される。中胚葉陥入が終了し、胚帯が伸長を始めるステージ10の腹部を観察すると、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*では腹側正中線の細胞が出会うことが出来ず、一部、もしくは全ての領域で中胚葉が露出している(fig.8 C, D)。この表現型が導入遺伝子(DEFL、DEAP)の発現量に依存したものではないことを示すために、DEFL、DEAPを発現する遺伝子導入ハエの系統を3系統(*DEFL#1*、*DEFL#23*、*DEFL#65*、*DEAP#4*、*DEAP#9*、*DEAP#15*)樹立した。それぞれの系統を用いて*shg<sup>MZ</sup>; DEFL*、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*を作製し、導入遺伝子の発現量と表現型の再現性を調べた。構造の異なるDEFLとDEAPの発現量を比較するために、まず正常に細胞化をすることを確認でき、また内在的な発現の少ないステージ5の胚からmRNAを抽出、cDNAを合成した。そして、このcDNAをテンプレートとして、内在的なDE-cadherin、DEFL、DEAPを共通に存在するEC1領域を認識するプライマーを用いて、リアルタイムPCRを行い、導入遺伝子の発現量を定量化した。野生型での内在的なDE-cadherinの発現量を100%とした時、DEFLの発現量は、それぞれ*DEFL#1*が28.5%、*DEFL#23*が50.7%、*DEFL#65*が14.3%であった(fig.8 A)。これらの系統を用いた*shg*母性接合体ヌルのレスキューを行った場合、すべての系統で腹側正中線の細胞は出会い、中胚葉は露出しない(fig.8 E)。またDEAPの発現量は*DEAP#4*が61.8%、*DEAP#9*が13.5%、*DEAP#15*が11.6%であった(fig.8 A)。このように発現量にばらつきがあるものの、DEAPで*shg*母性接合体ヌルのレスキューを行った場合、60-70%の胚で腹部正中線が、正常に出会うことが出来ない表現

型の示す胚の割合は、*DEAP* の発現量に依存せず、安定している (fig.8 B, E)。また *DEFL* と *DEAP* を比較すると、*DEFL* が最低でも 14.3%あれば正常な腹側正中線が形成されるのに対して、*DEAP* では 61.8%あっても、完全にレスキューされない。この結果は、腹側正中線に見られる異常が、導入遺伝子の量的な差によるものでなく、構造の違いによる質的な差によるものであることを示唆する。

続いて、この腹部正中線で見られる異常の原因を調べた。腹部正中線は、腹側領域の中胚葉上皮が折れ曲がって体内に陥入することによって、中胚葉によって分けられていた外胚葉上皮が接することによって形成される (Costa et al. 1993, Arias. 1993)。腹側正中線が離れて存在する表現型の原因は中胚葉上皮の陥入の失敗が考えられる。ショウジョウバエの中胚葉の陥入は脊椎動物や棘皮動物とは異なり、中胚葉となる運命が決まった細胞が独立に間充織化して、接着を失い体内へ陥入するのではなく、約幅 18×長さ 60 細胞分の腹側領域の細胞が纏まって中胚葉となる運命を受け、この予定中胚葉細胞は上皮の形態を保ったまま、折れ曲がって腹溝を形成し、陥入する (fig.9A-B', Harris et al.2009)。腹溝は、頭部上皮の折れ曲がりである頭部溝(cephalic furrow)とほぼ同時に形成される (Underwood et al. 1980)。そこで頭部溝が入ったことを確認して固定を行い、SEM による観察を行った。その結果、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、腹溝は観察されず、中胚葉陥入に失敗していることが示された (fig.9 C)。腹溝の上皮の折れ曲がりや、上皮の頂端部領域の面積を小さくすることによって達成されており、このとき上皮細胞は頂端部を収縮させて三角錐状の形態となっている (fig.9 B, B')。 *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* の腹部領域では収縮して小さくなっている細胞と、大きな細胞が共に観察され頂端部収縮に異常があることを示唆する (fig.9 D, D')。

このような腹溝の異常は、中胚葉の分化の失敗や、細胞の収縮力を生み出す細胞内の Myosin 局在、活性の異常でも観察される (Leptin. 1991, Sweeton et al.1991, Costa et al. 1994, Dawes-Hoang et al. 2005, Kölsch et al. 2007)。中胚葉の陥入が起こるステージ 7 の胚を中胚葉マーカーである *Twist* によって染色すると、*shg<sup>MZ</sup>; DEFL* では *Twist* 陽性となった殆どの予定中胚葉細胞が、体内に陥入していることが観察される (fig.9 E)。一方、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、腹部領域の細胞は *Twist* 陽性となり、正常に中胚葉に分化していることを示すが、体外に露出したままになっている (fig.9 F)。腹溝形成過程の頂端部収縮において基部側に局在する MyosinII は頂端面に再局在する (Royou et al. 2004)。 *shg<sup>MZ</sup>; DEFL* の横断面を観察すると、腹溝を形成する中胚葉細胞が頂端部収縮している様子が観察される (fig.9 G)。腹部領域において、MyosinII は、基部領域の局在が無く、頂端部領域に強い局在を示す正常な局在パターンが観察される。 *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、腹部領域の細胞の配列が乱れているが、MyosinII の局在は基

底部側になく頂端側に強く濃縮する正常なパターンを示す(fig.9 H)。SEMでの観察と同様に頂端部領域を縮めている細胞と、大きなままの細胞が観察される。細胞骨格とAJをリンクする *Canoe* や *Arm* の変異体、またAJの形成を阻害する *nullo* の強制発現では、頂端部収縮が阻害され、細胞内に MyosinII の凝集が観察されるが、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、収縮して小さくなった細胞も、大きなままの細胞でもこのような MyosinII の凝集は観察されない(fig.9 H)。以上の結果をまとめると、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では中胚葉の運命決定は正常に行われ、この命令を受けて細胞内の actomyosin の調節も正常に達成され、また収縮している細胞も見られることから細胞内の収縮力も十分に生じていることが示唆された。しかし、この細胞内で生じた力を腹溝の形成といった上皮の折れ曲がり に転換する際、DEAP は十分な機能を持っていない。

また腹溝と同様に上皮の折れ曲がり を必要とする形態形成に後腸の陥入が挙げられる。後腸の陥入も、腹溝と同様に細胞内の actomyosin 相互作用によって生じた力による頂端部収縮によって達成されていると信じられている。*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* での外胚葉上皮の折れ曲がり は達成していることを示した。また同様に上皮から陥入して形成される気管にも異常が見られないことから、DEAP は腹溝での頂端部収縮特異的に必要とされる役割が果たせていないことが示唆される。

### *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では効率的な頂端収縮を達成しない

*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* における腹溝の形成過程を、共焦点レーザー顕微鏡によるタイムラプス観察を行った。AJを構成しているDEAPを観察すると、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、頂端部収縮は始まるものの、その後収縮し続けず、最終的に接着連絡が破綻していた(fig.10 A)。この表現型を *shg<sup>MZ</sup>; DEFL* と比較して解析するためには、比較可能な基準点が必要となる。頂端部収縮は *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* でも開始されていることから、この頂端部収縮の始まる時間を基準点とした。もっとも腹側の20細胞分の面積を計測し、この面積の連続的な減少が始まるタイムポイントを基準点とした(fig.10 B)。続いて幅5-6細胞、長さ11-12細胞の領域の個々の細胞の収縮率を測定した(fig.10 C)。収縮率の平均を比較すると、頂端部収縮開始されてから、最初の2分間は *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* とともに収縮率はともに約  $1.6 \mu\text{m}^2/\text{min}$  で、差は見られなかった。しかし、*shg<sup>MZ</sup>; DEFL* ではその後、2-4分間で  $3.3 \mu\text{m}^2/\text{min}$ 、4-6分間で  $5.6 \mu\text{m}^2/\text{min}$  と収縮率が上昇し、収縮が加速している対し、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、次の2-4分間では、収縮率が上昇せず頭打ちとなった。さらに続く4-6分間では、収縮率の低下が見られた(fig.10 D)。

*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* における収縮率低下の原因を調べる為に、個々の細胞の収縮率を追跡した。結果、*shg<sup>MZ</sup>; DEFL* では時間が経つごとに、多くの細胞が収縮を加速し、4-6分

間では約 60%の細胞が  $4.5 \mu\text{m}^2/\text{min}$  以上の収縮率を示すのに対し *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、4-6 分間において  $4.5 \mu\text{m}^2/\text{min}$  以上の収縮をする細胞はわずか 10%に留まっている。さらには、周りの細胞の収縮によって、頂端部領域を広げてしまい、収縮率がマイナスになる細胞が 30%近く観察される(fig.10 E)。

以上の結果から *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では頂端部収縮の収縮率の低下が起きており、これは頂端部収縮開始後、効率的な収縮を維持できないことが原因であると考えられる。

### *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* において頂端部収縮を達成した細胞は AJ による接着連絡の破綻の原因となる

上皮形成されてから、腹溝形成の達成までに、AJ の局在は大きく変化する(Kölsch et al. 2007)。まず、細胞化が達成され上皮が形成した段階では AJ は垂頂端領域に局在する(fig.11 A, B)。続いて、頂端部収縮が開始され、上皮が平面化した段階では、AJ は頂端領域に再局在する(fig.11 E, F)。そして、腹溝形成によって、中胚葉上皮が体内に陥入するまで AJ は頂端部領域に維持される(fig.11 I 矢印)。中胚葉陥入が終了すると AJ は破綻し、中胚葉は間充織化する。

*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* の接着連絡の破綻の原因について解析を行った。*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* でも、腹部の予定中胚葉が平面化する過程での垂頂端領域から頂端への AJ の局在の変化は達成され、頂端部収縮を開始した段階では、DEAP によって構成された AJ は正常に振る舞うことを示す(fig.11 C, D, G, H)。しかし、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、頂端部収縮を達成した細胞で、接着連絡の破綻が観察される(fig.11 I)。その後、DEAP は細胞膜を含む凝集を形成する(fig.11 L, M)。AJ の破綻は中胚葉化の段階で生じるが、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* の破綻したタイミングにおいて *shg<sup>MZ</sup>; DEFL* では、接着連絡は維持され、上皮の形態を保持している(fig.11 I, J, K)。よって、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、本来、頂端部収縮達成後も維持されるべき AJ を維持することができなくなっていることが考えられる。

これまでの観察から *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* の腹溝形成過程の接着連絡の破綻は、頂端部収縮での効率的な収縮の失敗の後に起きている。これは腹溝形成過程において DE-cadherin の膜近傍部領域(EC7-PCCD)は、まず効率的な頂端部収縮に必要とされ、次の段階では、収縮した細胞における接着連絡の維持に必要とされていることを示唆する。

### DE-cadherin NC 領域の開裂は腹溝形成に必要とされない

DEAP は、本来、切断される NC 領域を欠いている。脊椎動物では cadherin の切断、分解が、機能を調節している(Reiss et al. 2005, Marambaud et al. 2002, Ozawa et al. 1990)。DEAP では開裂による調節が行われないことが、腹溝での異常の原因だと仮定

できる。この仮説を証明するために、切断領域を改変し、切断されなくなった変異分子 (mNcGSP)によるレスキュー実験を行なった(fig.12 A)。mNcGSPは ubiquitin プロモーター下で発現させることによって、*shg* 接合体ヌルを完全にレスキューし、DE-cadherin の代わりに世代を維持できる。DE-cadherin を mNcGSP に完全に置き換えた *shg<sup>MZ</sup>, mNcGSP*における腹溝の観察を行った。まず *shg<sup>MZ</sup>, mNcGSP*において、内在的な DE-cadherin が、導入された mNcGSP に置き換わっていることをウェスタンブロットによって確認した(fig.12 B)。その結果、N 末端側を認識する DCAD2 抗体も、C 末端を認識する GFP 抗体も、切れていないことを示す 200KDa 以上のバンドがメインのバンドとして検出される(fig.12 B 中括弧)。NC 領域で切断された産物とは異なる分子量のバンドが複数検出されるが、これらのバンドは分解物だと考えられる(fig.12 B 矢頭)。この結果から、NC 領域で開裂した分子は *shg<sup>MZ</sup>, mNcGSP*において存在しないことが示された。この *shg<sup>MZ</sup>, mNcGSP* の stage.10 での腹側正中線を観察すると、中胚葉は完全に陥入し、腹側正中線は正常に形成されている(fig.12 C)。またステージ6での腹溝を SEM によって観察すると、予定中胚葉細胞が正常に頂端部収縮を行い、腹溝が形成されていることが確認される(fig.12 D-D”)。

これらの結果は DE-cadherin の NC 領域の切断は、腹溝形成における頂端部収縮に重要な役割を持っていないことを示す。

## 議論

正常な DE-cadherin を完全に DE $\Delta$ P に置き換えた *shg<sup>MZ</sup>; DE $\Delta$ P*では、正常に上皮が形成され、AJ による接着連絡が形成される。この結果は、これまでに報告されている DE-cadherin の優性阻害体の過剰発現や RNA 干渉、また AJ の構成分子である *armadillo* のマイルドな変異体の胚で観察される単層の上皮が形成されない、また上皮が分化していないという結果と異なっている(Cox et al. 1996, Wang et al. 2004, Dawes-Hoang et al. 2005, Pilot et al. 2006)。

DE $\Delta$ P が構成する AJ は正常に形成され、DEFL によって構成されている AJ と比較しても、細胞間隙の幅も差異は見られない。脊椎動物のデスモソームでは cadherin が規則正しく配列している様子が TEM トモグラフィーによって観察されている(Al-Amoudi et al. 2007)。AJ でも脊椎動物のデスモソームと同様に cadherin が規則正しく配列するとするならば、DE $\Delta$ P によって構成される AJ は、DE $\Delta$ P が短くなった分だけ狭くなっていなければならない。また動物群ごとに持っている cadherin の細胞外領域の分子長は異なっているにもかかわらず、AJ の細胞間隙の距離が 20-25 nm であることが報告されている (Lane et al. 1994, Oda et al. 2005)。これらのことから、AJ

では cadherin は規則正しくは配向せず、cadherin の細胞外領域の長さとは別に、細胞間隙の距離を決める仕組みがあると推測される。

*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* において腹溝形成過程に特異的に異常が観察された結果は、DE-cadherin が腹溝の形成に関与していることを示唆する。腹溝形成の前段階として、中胚葉決定転写因子である Snail や Twist によって DE-cadherin の発現は抑えられていることが知られているが、DE-cadherin の発現が、*shg* プロモーターではなく、ubiquitin プロモーターによって調節されている *shg<sup>MZ</sup>; DEFL* でも、正常な腹溝が形成されることから DE-cadherin の転写調節は腹溝形成に必要とされていない (Oda et al. 1998)。腹溝形成過程における頂端部収縮は、最初の収縮速度の遅い段階と、収縮速度が加速する収縮速度の早い段階の 2 段階に分けられ、遅い段階は腹部上皮の平面化の段階と一致すると考えられている (Oda and Tsukita. 2001, Martin et al. 2009)。*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、遅い収縮は正常に観察され、頂端部収縮は開始されている。*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* において観察される最初の異常は、頂端部収縮が加速しないことであり、接着連絡や上皮の整合性の破綻は続いて起きる異常である。これらの結果は *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* における頂端部収縮の低下は、接着連絡が破綻した結果生じたものではなく、DEAP によって構成される AJ の頂端部収縮に対する機能の低下した結果であることを示唆する。これまでに cadherin が上皮形態形成を駆動する細胞の形態変化に重要な役割を果たしていることは広く信じられているが、今回の発見は、cadherin の頂端部収縮への関与を示す初めての遺伝的な証拠である。

AJ に繫留された actomyosin による同調していないパルス状の頂端部収縮が腹溝形成を達成している (Martin et al. 2009)。このとき、収縮している細胞と収縮していない細胞が存在するが、ある細胞が収縮した時、隣接した細胞は引っ張られるが、引っ張られた細胞が引き延ばされてしまったのでは、細胞が収縮したのにも関わらず、組織全体の面積は変わらず、上皮は折れ曲がらない。上皮が折れ曲がるためには、収縮をしていない時は、周りの張力に抵抗して、頂端部領域の面積を広げないように留めておく接着領域の硬さが必要とされている。この AJ の硬さは効率的な頂端部収縮を達成するための重要なパラメーターであることが予想される。膜近傍部領域は、側方部での DE-cadherin 同士のシスな相互作用、細胞膜やその他の上皮を維持する分子との相互作用、接着を行なう膜遠方部領域の基部として働くことによって接着領域の硬さに関わる AJ の安定化に関わっているのかもしれない。

予定中胚葉において完全に収縮した細胞での DEFL と DEAP の振る舞いの違いは、膜近傍部領域が細胞の頂端部領域における AJ の安定化に重要な役割を果たしていることを示唆する。膜近傍部領域に含まれる CE や LG ドメインは外胚葉上皮において AJ

の形成、維持を行なう Crumbs にも存在する(Knust et al. 1987, Tepass et al. 1990)。Crumbs は DE-cadherin と同様に予定中胚葉では、Twist、Snail によって発現が抑制されている(Grawe et al. 1996)。予定中胚葉と外胚葉において AJ を安定化させる分子機構が異なっているのかもしれない。外胚葉上皮では Crumbs が行なう AJ の安定化を、予定中胚葉では、膜近傍部領域によって達成していることが考えられる。そしてこの外胚葉と予定中胚葉の AJ 安定化の分子機構の違いが、腹溝形成特異的に膜近傍部領域を必要とする原因だと推測している。

正常な頂端部収縮において、AJ は Myosin による収縮によって、曲げられる様子が観察されている(Martin et al. 2009)。また収縮した細胞のアピカル面は、余った細胞膜だと考えられるバブル状の構造が観察され、非常にダイナミックであることが知られている(Sweeton et al. 1991)。shg<sup>Mz</sup>; DEAP において中胚葉上皮の破綻後、DEAP の凝集が観察される。このような DE-cadherin の凝集は、頂端部収縮に異常を示す *folded gastrulation (fog)* の変異体の中胚葉でも観察される(Oda et al. 1998)。これらの結果は DE-cadherin の細胞膜からの除去は頂端部収縮と共役していることを示唆する。細胞膜に近接して存在することからも膜近傍部領域は、AJ の安定化に関与する開講放出(exocytosis)や飲食細胞運動(endocytosis)といった細胞膜のダイナミクスに関与しているのかもしれない。膜近傍部領域を欠くことが腹溝形成特異的に影響を与えるメカニズムについて理解するためには、DEFL と DEAP によって構成される AJ の振る舞いや特徴のさらなる詳細な解析が必要である。

NC、CE、LG から構成される PCCD 複合体は、無脊椎動物の cadherin では細胞外領域基部に存在する。DE-cadherin と同様のドメイン構成をもった cadherin は節足動物門の昆虫類や鰓脚類に保存されて見つかる(Oda et al. 2005)。近縁の動物群において昆虫型の cadherin が保存されていることに対し、外胚葉上皮の発生において PCCD 複合体を必要としないという発見は驚くべきものである。一方、DEAP の細胞外は EC ドメインのみで構成され、これは脊椎動物の cadherin や、protocadherin、desmosomal cadherin を模した構造となっている。この構造的な同一性から、DEAP が接着活性を持つことも理解できる。

本研究の重要な側面の 1 つは、cadherin における構造変化の機能的重要性について実験的に解析したことである。これまでに脊椎動物/尾索動物型、頭索動物型、昆虫類/鰓脚類型の cadherin は進化の過程において、それぞれ独立な短縮化によって形成されたと考えられている(Oda et al. 2005)。特に、脊椎動物/尾索動物型のカドヘリンでは NC、CE、LG を完全に失っている。この短縮化が、連続した複数回の変化の蓄積の結果なのか、それとも一回の大きな変化によるものなのかは、わかっていない。本研究の

実験では、細胞外領域が半分になるほどの大きな短縮化を、上皮形成に異常を与えることなく達成した。このことから、cadherin の多様化は、上皮のみで体を構成するような単純な体制を持った原始的生物では、レアな一回の短縮化によって形成できたと考えられる。cadherin の短縮化は、起きた段階では機能への影響が小さいが、短縮化したことによって cadherin 自体や、接着の機構、また細胞の形態に対して、進化的な柔軟性を与えたことが考えられる。例えば、特に短い cadherin を持つ脊椎動物において、タイトジャンクションやデスモソームといった特徴的な接着構造の多様化、カドヘリンファミリーやその他の接着タンパク質の増加したことは、cadherin の短縮化が細胞接着に対し、新たな進化を許容したことを推測させる。



### 第三章 DE-cadherin のホモフィリックな接着活性と形態形成運動

#### 序論

cadherin のホモフィリックな接着活性は、いくつか形態形成運動の達成に必要とされている。例えば、ショウジョウバエの卵母細胞の位置決定は卵母細胞と保育細胞、そして濾胞細胞の間の接着力の差によるものだと考えられている (Peifer, 1998)。またニワトリでは、接着特異性を改変することによって、運動ニューロンのパターンが攪乱される (Patel et al. 2006)。

一方、近年、形態形成に関与するカドヘリンの接着以外の機能が注目されている。マウスにおいて E-cadherin の遺伝子座に N-cadherin を導入 (Knock in) し、完全に E-cadherin を N-cadherin に置換したものでは、接着は達成しているにも関わらず、胚盤胞の形態に異常が生じる。本来、マウスの胚盤胞は体を形成する内部細胞塊と、内部細胞塊を取り囲み胎盤となる栄養外胚葉によって構成されるが、E-cadherin を N-cadherin に置き換えた胚では、栄養外胚葉が正常に形成されない。このとき異常となった栄養外胚葉では、内部細胞塊のマーカーである Oct4 を発現しているため、栄養外胚葉の分化に E-cadherin が必要とされていることを示す (Kan et al. 2007)。この結果は、上皮状の組織の形成する過程において E-cadherin は N-cadherin にはない分化に関わる機能を持つことを示唆する。ショウジョウバエにも上皮 cadherin である DE-cadherin と、神経 cadherin である DN-cadherin の 2 種類の AJ を構成する cadherin が存在する。DE-cadherin と DN-cadherin は脊椎動物の E-cadherin と N-cadherin の関係と同様に接着特異性が、異なっている。また脊椎動物の cadherin では AJ を構成する cadherin の構造は皆、同じドメイン構成をもつが DE-cadherin と DN-cadherin の細胞外領域のドメイン構成は異なっている。DN-cadherin の構造は鋏角類や棘皮動物にみられる EC が 17 回タンデムに並び、その基部に PCCD 複合体を持った構造をしている (Iwai et al. 1997)。DN-cadherin の変異体では神経索誘導に攪乱が見られるだけで、*shg* 変異体で見られるような上皮形態形成の異常は観察されない (Iwai et al. 1997, Iwai et al. 2002)。このようにショウジョウバエにおいても同じ AJ を構成する cadherin でも、相補できない機能があることが推測できる。

私は DE-cadherin の接着以外の機能が形態形成に関与するメカニズムについて、接着活性のない  $\Delta 833-1316(\Delta PCCD)$  や、また接着は行なうが異なる構造と接着特異性を持つ DN-cadherin によって *shg* ノルの胚や組織のレスキュー実験により解析を行なった。これらの分子のレスキュー実験では、接着以外の機能を必要とする形態形成と、接着活性さえあれば達成できる形態形成について明らかにできることが期待される。

## 実験と方法

### Fly stock

- $\Delta PCCD; FRT42D, shg^{R69} / CyO$

$FRT42D, shg^{R69} / CyO$  に、ubiquitin プロモーターによって発現する  $\Delta PCCD$  が第 X 染色体に挿入されている。

- $FRT42D, shg^{R69} / CyO; ubi-DN-cad$

$FRT42D, shg^{R69} / CyO$  に、ubiquitin プロモーターによって発現する GFP を C 末端に付加した DN-cadherin が第 3 染色体に挿入されている。

### レスキュー実験、SEM、免疫染色、RT-PCR

第 2 章の方法に準ずる

### ライブ観察

卵は 30% グレーププレートに酵母に塗ったものに 25°C で産ませた。卵は 50% ブリーチでコリオンを剥き、0.05% Tween20 の液中で目的のステージまで発生させた。目的のステージをとったら、卵をカバーガラス移し、キムワイプで水分をよく除き、側方面をカバーガラスに接するようにセットした。この状態を vacuum silicone grease (Beckman) で固定し、halocarbon oil 700 (Sigma) をかけた。倒立顕微鏡 (IX-71, Olympus)、20 x/NA 0.7 UPlanApo 対物レンズを用いてライブ観察を行った。ライブ観察の条件は室温、15 秒おきに DIC イメージを取得した。

## 結果

### $\Delta 833-1316(\Delta PCCD)$ は in vivo において細胞遊走のための足場として機能する

これまでの DE-cadherin の接着活性の持たない欠失分子では、局在にも異常が生じていた。 $\Delta PCCD$  は、 $\Delta PCCD$  同士のホモフィリックな接着をしない分子でありながら、in vivo では正常に局在する (fig.2 C, D, fig.3 C, G)。この分子を *shg* ヌルの胚、組織に発現させ、DE-cadherin の接着と形態形成の関係を解析した。

*shg* 接合体ヌルを  $\Delta PCCD$  でレスキューした胚 (*shg<sup>2</sup>; ΔPCCD*) では、頭部・腹部上皮とも整合性は維持されない (fig.13 A)。一方、気管では融合自体は達成されるが、融合ポイントは太くならない (fig.13 C)。このような気管の表現型は、これまでに作成された接着活性を持たない欠失分子による気管のレスキューでも観察される (Oda and Tsukita, 1999)。

$\Delta$ PCCD を発現している翅成虫原器では *shg* ヌルとなった上皮細胞は維持され、GFP-nls 陰性の領域が観察される (fig.13 E)。同様に  $\Delta$ PCCD を発現している生殖細胞を *shg* ヌルとすると卵母細胞の後方部側の局在はレスキューされず、卵母細胞は中央に局在する。しかし保育細胞の形態は、なにも発現していない保育細胞と異なり、お互いに接着し、緊密化する (fig.5 J, fig.13 G)。また、境界細胞は、 $\Delta$ PCCD のみを発現する保育細胞の間を遊走する (fig.13 H)。この時、遊走する境界細胞は *shg* ヌルでは無く、正常な DE-cadherin を発現していることから、 $\Delta$ PCCD は細胞が遊走する際の足場として機能することを示す。

### 構造と接着特異性の異なる DN-cadherin は細胞の緊密化、遊走を達成しない

ショウジョウバエの cadherin は上皮 cadherin である DE-cadherin の他に、神経 cadherin である DN-cadherin が存在する。DN-cadherin の構造は EC を 17 個タンデムに持ち、PCCD 複合体は NC、CE 1、LG 1、CE 2、LG 2 の順に並び、DE-cadherin のドメイン構成と大きく異なる。しかし、細胞質領域は保存されており、DE-cadherin と同様、Arm と結合する。DN-cadherin 変異体では軸索誘導に異常が観察され、その表現型は *shg* 変異体と異なる (Iwai et al. 1997)。

DE-cadherin と DN-cadherin はお互い異なる接着特異性を持ち、DE-cadherin と DN-cadherin はヘテロフィリックに接着しない (fig.3 D)。この DE-cadherin と同じ裏打ちを持った構造と接着特異性の異なる分子を用いて、*shg* のレスキューを行った。*shg* 接合体ヌルを DN-cadherin でレスキューした胚 (*shg<sup>2</sup>; DN-cad*) は、*shg<sup>2</sup>; DEAP* と同様、腹部・頭部上皮は維持されない (fig.13 B)。しかし気管は、正常に融合し、管を形成する (fig.13 D)。

DN-cadherin を発現する翅成虫原器では *shg* ヌルとなった上皮細胞が維持され、GFP-nls 陰性な領域が観察される (fig.13 F)。同様に DN-cadherin を発現している生殖細胞を *shg* ヌルとすると卵母細胞は後方部側に正常に局在する。しかし、保育細胞の形態は緊密化せず、異常が観察される (fig.13 I)。また境界細胞は頭方部側に位置し、遊走できていない (fig.13 J)。このとき、遊走する境界細胞、足場となる保育細胞ともに DN-cadherin を発現しているが、DN-cadherin を用いた遊走は達成されず、DE-cadherin と大きな機能的な違いを示す。

### $\Delta$ PCCD は上皮を形成できる

母性由来の DE-cadherin を  $\Delta$ PCCD、DN-cadherin に置き換えた卵を作成するために、FLP-FRT システムと卵形成を優性に阻害する *ovoD* を用いた実験をデザインした。

*shg<sup>MZ</sup>; DN-cad*はわずかに産卵されるものの、張りがなくピテレン膜に穴が空いて、発生するものは得られなかった。一方、*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD*はわずかであるが、発生する卵が得られた。この卵から cDNA を抽出し、DE-cadherin の 5'UTR、EC1、NC 領域を認識するプライマーを用いて PCR を行なうと、EC1 のプライマーを用いた時にのみ増幅されたバンドが検出され、内在的な DE-cadherin が完全に  $\Delta PCCD$  に置き換わっていた (fig. 14 A)。これは、*shg* ノルとなった生殖細胞では、卵房での卵母細胞の局在が攪乱されランダムとなるが、運良く後方部に局在できた卵母細胞が発生した結果であると考えられる。

*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* の上皮形成を観察すると、*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* では、正常に細胞化が達成されていた。この時、細胞の輪郭と核を可視化すると、単層の上皮が形成されていることが確認される (fig. 14 B)。このステージ 5 の一次上皮において、 $\Delta PCCD$  と Arm は垂頂端領域に局在する (fig. 14 C, D)。続いて中胚葉陥入が始まるステージ 6 では、外胚葉上皮では  $\Delta PCCD$  と Arm は垂頂端領域に局在し続けるが、予定中胚葉領域では頂端面への、正常な局在の変化が観察される (fig. 14 E, F)。

これらの結果は、 $\Delta PCCD$  は上皮を形成し、 $\Delta PCCD$  によって構成される AJ は、正常に振る舞っていることを示す。

### *shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* は頂端部収縮に必要とされる Myosin II の局在に異常が生じる

ステージ 10 の腹部を観察すると、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* と同様に *shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* は腹側正中線の細胞が出会うことが出来ず、中胚葉が露出している (fig. 15 A)。SEM によってステージ 6 の腹側を観察すると、腹溝は観察されず、*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* も中胚葉陥入に失敗していることが示された (fig. 15 B)。この時、予定中胚葉細胞は輪郭が観察されない間充織状の細胞となっており、また Myosin II は、頂端部側に濃縮せず基底側に多く残っている (fig. 15 C, C', D)。これらの結果は、*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* で観察される腹溝形成の異常は、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* とは異なる理由によって生じていることを示唆する。

同じように腹溝の形成に異常がある *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* と *shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* であるが胚帯伸長が始まると、形態に大きな差が見られるようになる。*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では、腹溝の形成に失敗しても胚の後端は、頭部方向へ伸展する (fig. 16 A)。一方、*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* では胚の後端は伸展せず、外胚葉に異所的な皺が観察される (fig. 16 B)。胚の後方部に局在する極細胞 (pole cell) に注目して、胚帯伸長の観察を行なうと、*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* でも胚帯伸長が観察される (fig. 16 C)。しかし、後腸陥入も遅れ、胚帯伸長が進むと腹部が破綻し、破綻した細胞は後腸の陥入領域に向かう (fig. 16 細矢印)。この結果はステージ 9 の *shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* の後方部が、ステージ 6 の腹側で見られた間充織状の細胞で覆

われていることを説明する。後腸陥入をする細胞を観察すると頂端部収縮はしているものの、*shg<sup>MZ</sup>; DEFL*、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*と比較すると弱い、そして、予定中胚葉でも観察されていたように頂端部収縮を行なう細胞での頂端面の局在が見られない(fig.16 D)。

## 議論

$\Delta$ PCCD は、*in vitro* の実験系では接着活性を認められないが、*in vivo* では保育細胞の緊密化や一次上皮の形成など、接着活性があるように振る舞う。極性の無い S2 細胞での発現とは異なり、組織に発現させた場合、接着に関する様々な分子機構によって細胞接着がなされている。この中には DE-cadherin の接着を保障するシステムや、多少異常な分子でも直すシャペロンが存在し、EC7 の接着阻害を抑えていることが考えられる。しかし、気管の表現型は、これまでに作成された接着活性は無い欠失分子と同様の表現型であり、完全には接着活性が回復していないのであろう(Oda and Tsukita, 1999)。卵母細胞の位置決定は、卵母細胞と濾胞細胞の DE-cadherin の接着によって達成されていると考えられている(Peifer, 1998)。今回の実験では、生殖細胞である保育細胞と卵母細胞が  $\Delta$ PCCD のみを発現しており、濾胞細胞では正常な DE-cadherin が発現している。この場合、 $\Delta$ PCCD と DE-cadherin はヘテロフィリックに接着できることから、卵母細胞は後方部に局在してもよいはずである。しかし、生殖細胞系列の DE-cadherin を  $\Delta$ PCCD 置き換えた場合には卵母細胞の局在の攪乱が観察される。これは従来の卵母細胞と濾胞細胞の接着だけでなく、卵母細胞と保育細胞の生殖細胞間の接着も、卵母細胞の位置決定には必要とされているのであろう。DN-cadherin でも卵母細胞の位置決定を達成することから、接着の機能のみが卵母細胞の位置決定には必要とされているのだろう。

DN-cadherin は気管の融合や、翅成虫原器で見られる上皮細胞の増殖の際の維持を DE-cadherin の代わりに達成できる。レスキューできた組織の共通点は折れ曲がったり、細胞の数を増やしたりしても、接着領域を維持し続けることを求められている。このように、上皮組織の接着領域の維持には接着活性が関与していると考えられる。一方、維持できなかった外胚葉上皮では神経細胞の陥入に伴う上皮間充織転換、陥入後空いた領域の修復や、境界細胞の遊走、保育細胞の緊密化では、新たな細胞と新たに接着したり、一度、接着した領域を新たに広げたりする必要がある。このように新たな接着を必要とする細胞や組織では、DN-cadherin では代替できない DE-cadherin に特異的な接着を調整する機構があると考えられる。

保育細胞で接着活性のない  $\Delta$ PCCD によって細胞の緊密化がなされ、一方、接着活性をもつ DN-cadherin によって緊密化がなされない事態は非常に興味深い。細胞の緊密

化は、接着した細胞間で、さらに接着領域を広げることによって達成している(Adams et al. 1998, Carthew. 2005)。この時、相手の細胞と同調して接着領域を広げる為には細胞内の actin や微小管といった細胞骨格を調節して細胞の形態を変化させ、新たな接着構造を形成する必要がある(Gallicano. 2001)。保育細胞の緊密化では、接着以外に細胞骨格の制御する機能が必要とされていることが考えられた。この DPCCD によってレスキューされるが、DN-cadherin ではレスキューできない形態形成に関して、細胞外領域の違いによるものなのか、それとも細胞質領域の違いによるものなのかは、この実験では明らかにできていない。同様のことは、マウスの E-cadherin と N-cadherin の交換実験でも問題となっている(Kan et al. 2007)。細胞外領域と細胞質領域、どちらが重要なのか明らかにするためには、DE-cadherin と DN-cadherin の細胞質領域の交換実験をする必要があるだろう。

上皮の形成には cadherin が必須であると考えられている(Lilien et al. 2002)。shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD でも、単層の上皮が形成され、外胚葉上皮も正常に振る舞っていた。卵形成さえできれば、上皮形成には DE-cadherin の接着は必要としていないらしい。AJ を裏打ちする Arm の母性ヌルとなった胚や、DE-cadherin の RNA 干渉胚では上皮が乱れることから、DE-cadherin が上皮形成の際に必要なとされている機能は細胞質領域によって、Arm などの細胞内分子を頂端部領域の膜に繫留することなのかもしれない。胚帯伸長を行なう過程において、腹部領域の予定中胚葉は破綻するが外胚葉上皮には異常が見られない。外胚葉上皮は DE-cadherin 以外の分子によって接着がなされているか、DE-cadherin の EC 領域とヘテロフィリックに接着する分子が存在する、または ΔPCCD の接着を保障するシステムの存在し、これらの上皮を維持する機構は、予定中胚葉では Twist や Snail などの中胚葉分化のシグナルを受けて、抑制されていることが考えられた。

shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD は shg<sup>MZ</sup>; DEAP と同様に腹溝形成過程に異常を示す。しかし、その異常となる過程は異なっている。shg<sup>MZ</sup>; DEAP では予定中胚葉細胞の頂端部収縮に異常が生じていた。このとき、予定中胚葉細胞は上皮状の形態を維持し、アピカル面への MyosinII の濃縮も達成しているが、shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD の予定中胚葉細胞は上皮状の形態を維持せず、間充織状となり MyosinII の局在の変化も起きない。MyosinII の局在の異常は中胚葉領域だけでなく、後腸の陥入領域でも観察される。これまでに Myosin のコンタクト領域に局在することによって細胞内の表層張力の発生・維持や、AJ の接着の増強に機能していることが知られている(Inagaki et al. 1997, Miyake et al. 2006, Breshears et al 2007)。またショウジョウバエの前腸や中胚葉の陥入において、押されたり、引っ張られたりといった物理的なシグナルが Twist を介して、または直接、

MyosinII の局在を変化させていることが報告されている(Brouzés et al. 2004, Pouille et al. 2009)。さらに、ショウジョウバエの腹溝における頂端部収縮は同調して行なわれているのではなく、個々の細胞がバラバラなパルス状の収縮によって行なっていることが明らかにされた(Martin et al.2009)。これらの報告からショウジョウバエの腹溝形成ではまず、ランダムに数個の細胞が収縮を始める。この引っ張られた物理的なシグナルを DE-cadherin の接着により受容し、周りの細胞は MyosinII の頂端面へ局在を促進させる。頂端面に局在した MyosinII は AJ の接着活性を増強し、上皮細胞状の形態を維持すると共に、更なる収縮を起こさせる。これが連続的なポジティブフィードバックとなって個々の細胞で起きていた頂端部収縮を、組織の折れ曲がりに転換しているであろう。

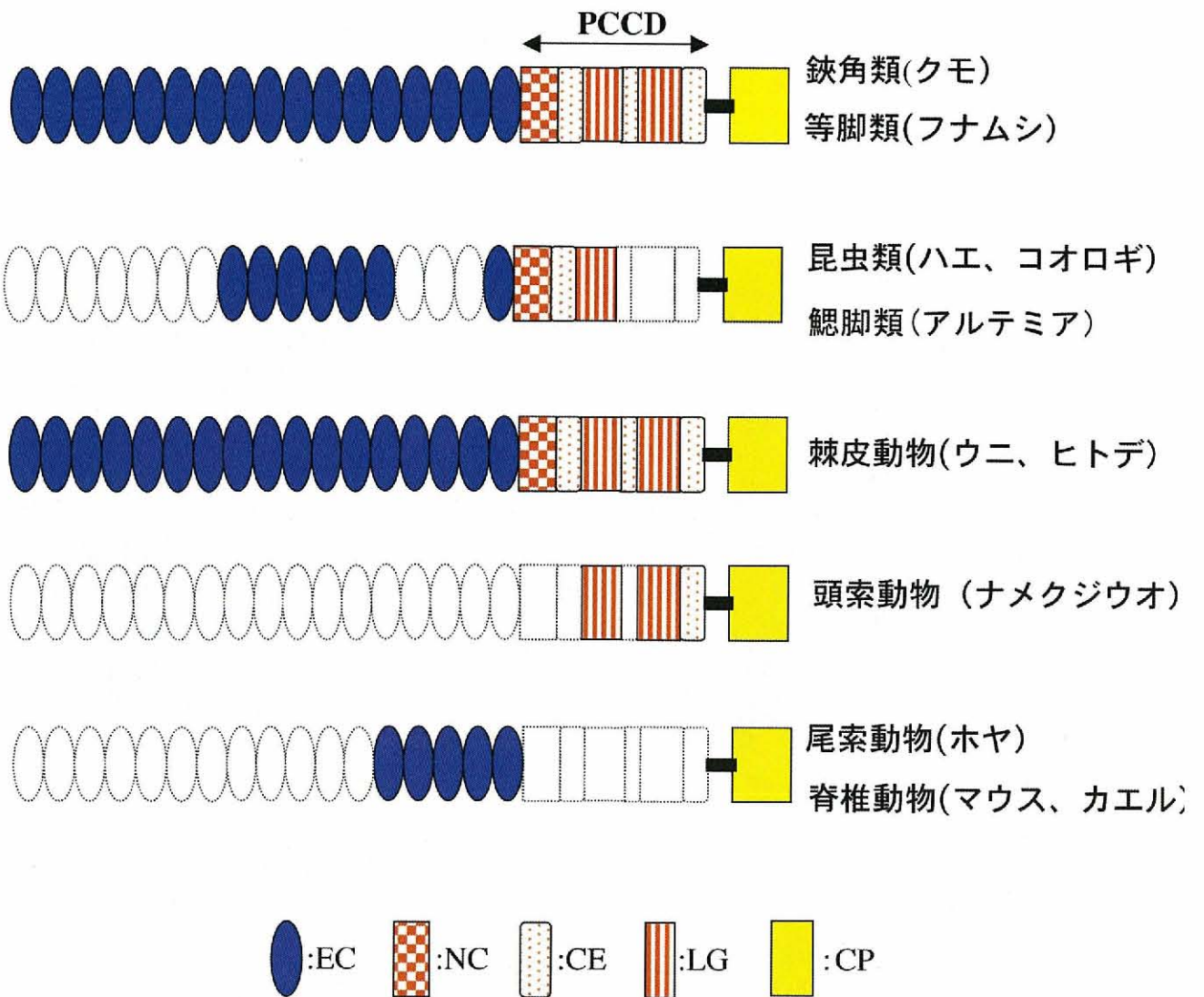
## まとめ

本研究の結果から、ショウジョウバエの形態形成過程での DE-cadherin の機能をまとめたい。まず卵形成を達成するためには、卵母細胞の位置決定に接着活性が、保育細胞の緊密化と境界細胞の遊走には細胞骨格と共役して、新たなコンタクトを形成する機能が求められている。続いて、産卵され発生していく過程では、細胞化し、一次上皮形成するためには、Armadillo などの細胞内の分子を頂端部領域に繫留することが重要である。続く、中胚葉の陥入過程では、収縮を始めた細胞で生じた収縮力を周りの細胞へ伝達、受容し、細胞内の MyosinII の頂端面への局在を促進する。頂端部収縮を達成する過程において DE-cadherin の膜近傍部領域(EC7-PCCD)は AJ を安定化させ、効率的な頂端部収縮を保障する。また収縮を完了しても AJ を維持し続けることによって、個々の細胞で起きる頂端部収縮を、腹溝形成という組織の折れ曲がりへ転換していると考えられる。

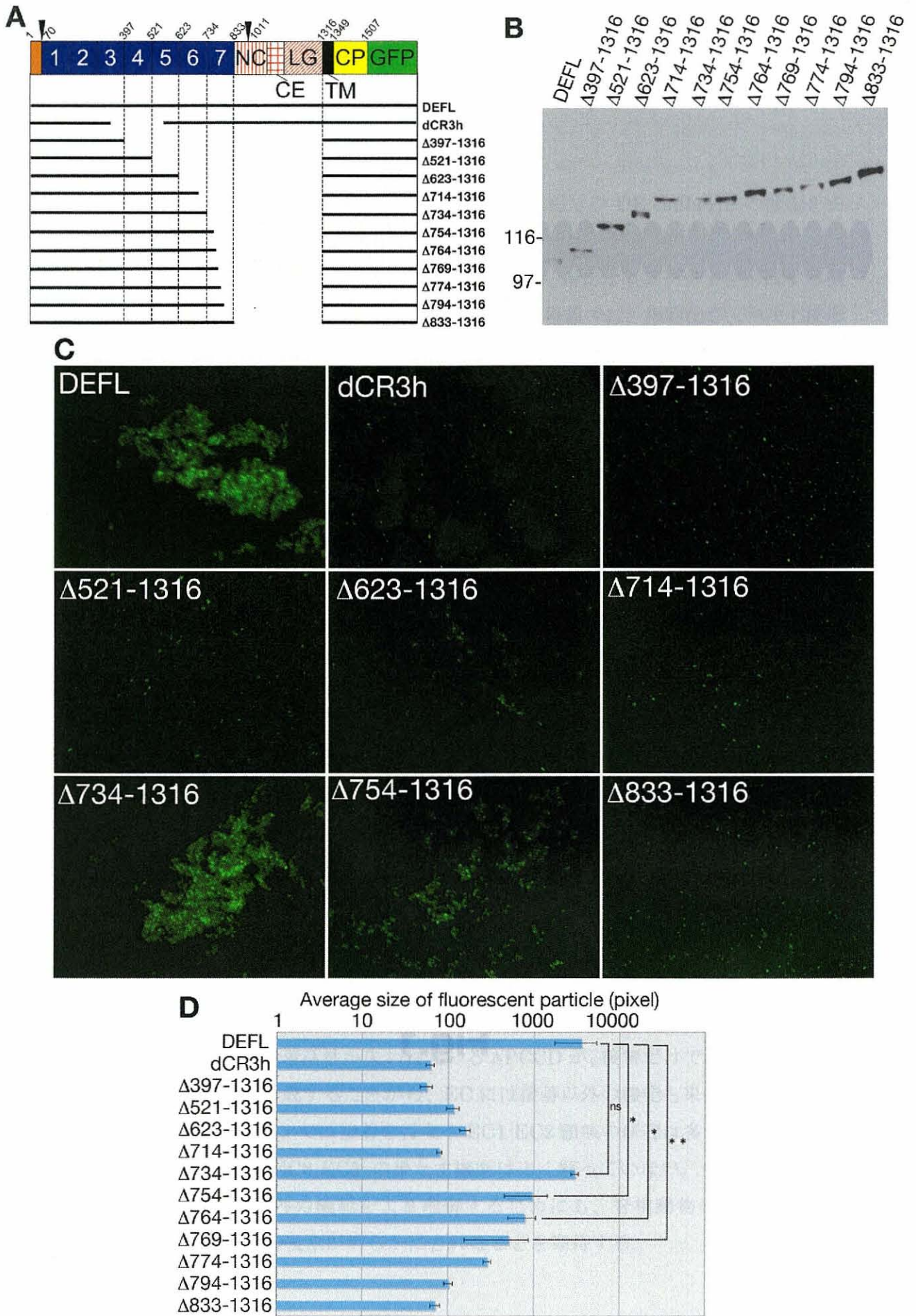
DE-cadherin において、細胞外領域のおよそ半分を失うような大きな短縮化があっても、DEAP のような多くの形態形成を達成する分子ができたことは、進化過程でおきた cadherin の短縮化は一回の大きな変化によって達成できることを説明し、また短縮化が起きた段階では大きな影響を与えなかったことが考えられた。脊椎動物の cadherin と比較を行なったとき、DEAP や  $\Delta$ PCCD の細胞外領域は EC のみで構成されており、脊椎動物型の cadherin を模している。この DEAP、 $\Delta$ PCCD によって、いくつかの形態形成を達成することは、脊椎動物型の cadherin も進化できることを説明する。

DEAP で構成した AJ の構造や細胞間隙の距離が維持されることや、 $\Delta$ PCCD によって構成した外胚葉上皮では正常に振る舞うことから、cadherin の構造や機能の変化に対して、上皮の構造や AJ の機能を維持する機構が存在することが想像できる。このような機構の存在が、cadherin の構造変化を許す下地になったのではないだろうか。またホモフィリックな接着活性が失われている  $\Delta$ PCCD が、接着だけでは達成できない細胞の遊走や緊密化を達成することから、EC には接着以外の機能も果たしているのだろう。脊椎動物カドヘリンでは接着を行なう EC1-EC2 領域の研究は多くなされているが、接着に必須でない EC3-EC5 の果たす機能はよく解っていない。今回、発見した DE-cadherin の接着以外の機能をより理解するためにも、脊椎動物のカドヘリンの EC3-EC5 の in vivo での役割が明らかにされることを期待する。



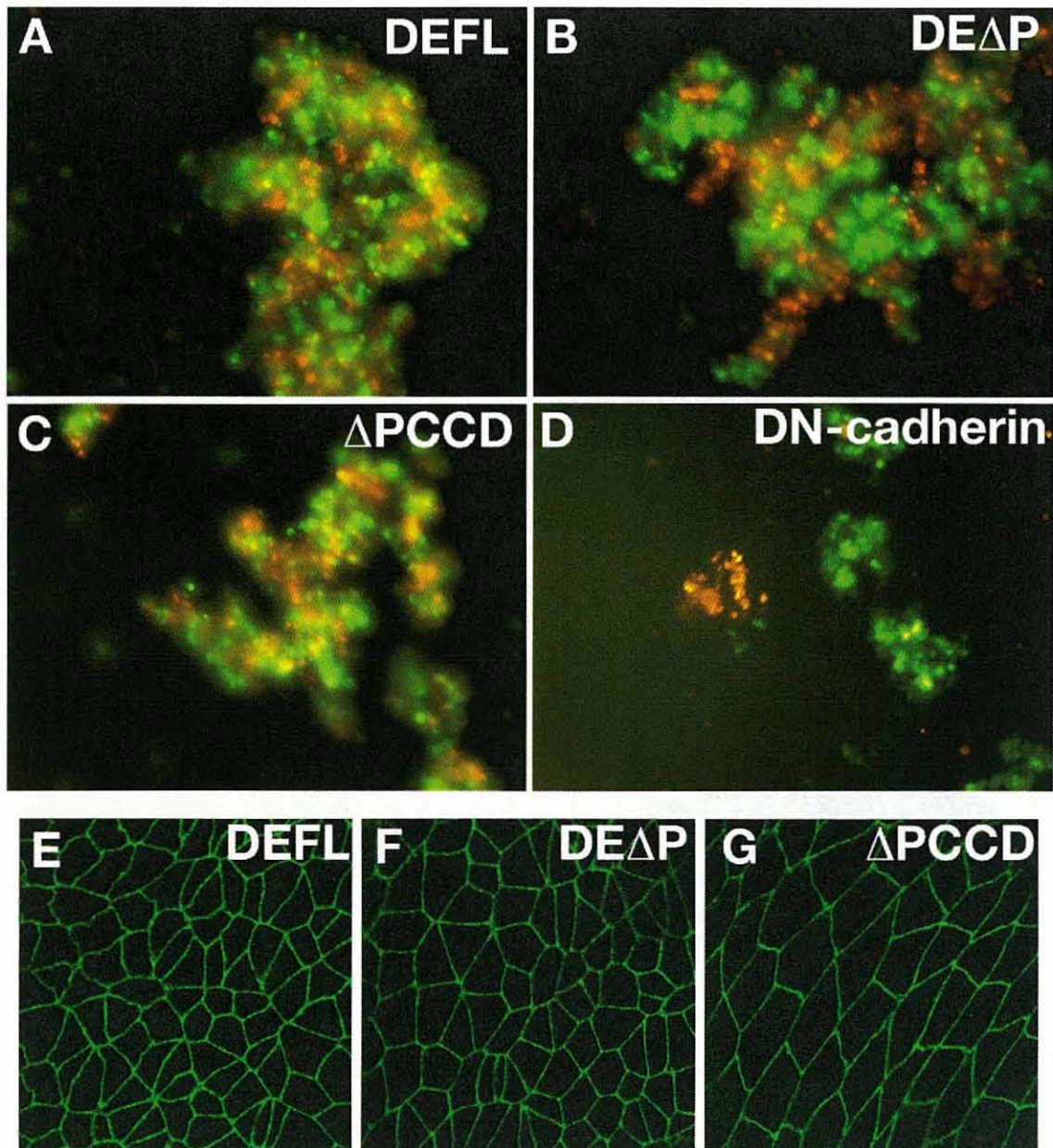


**Fig.1**



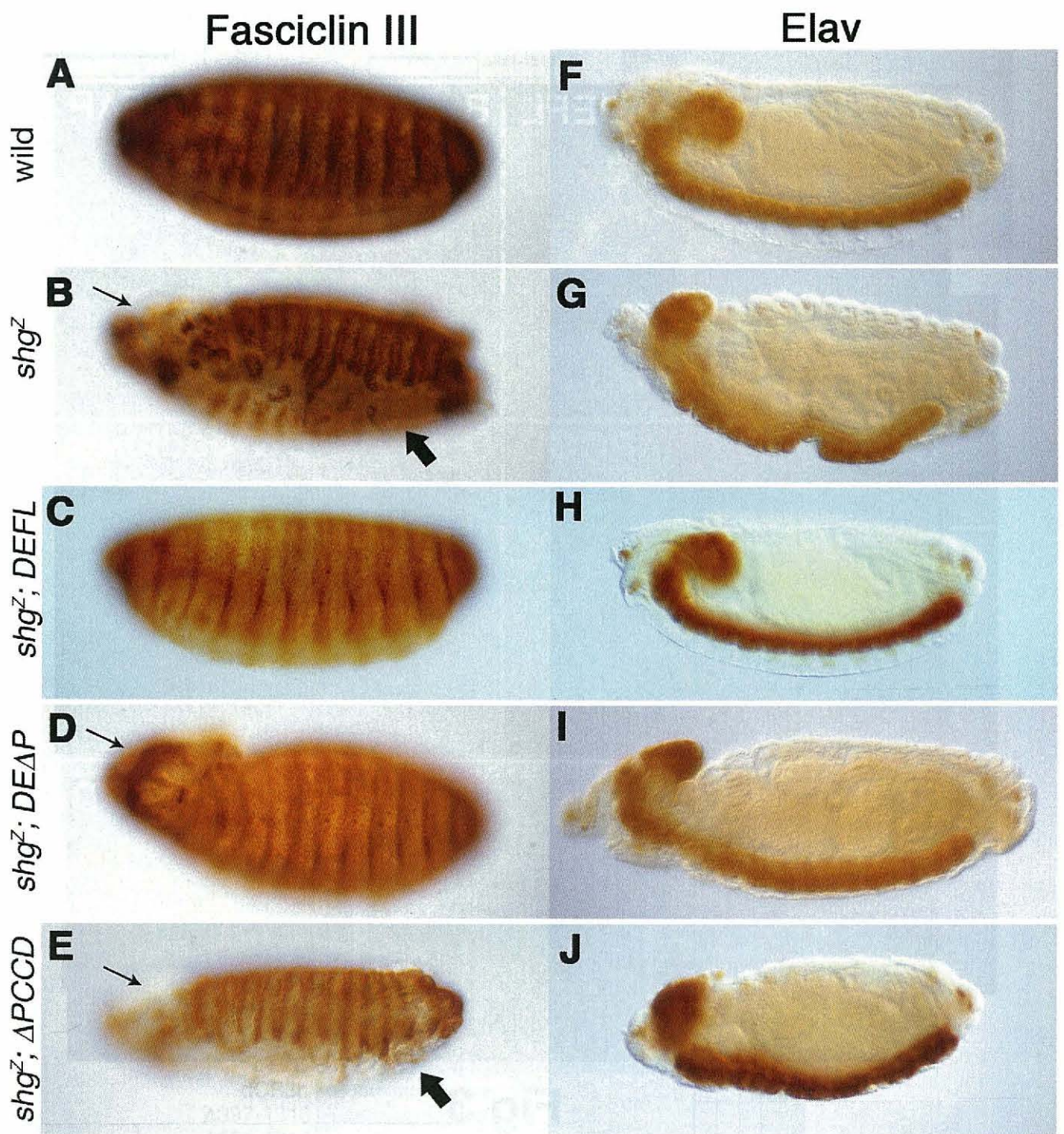
**Fig.2**





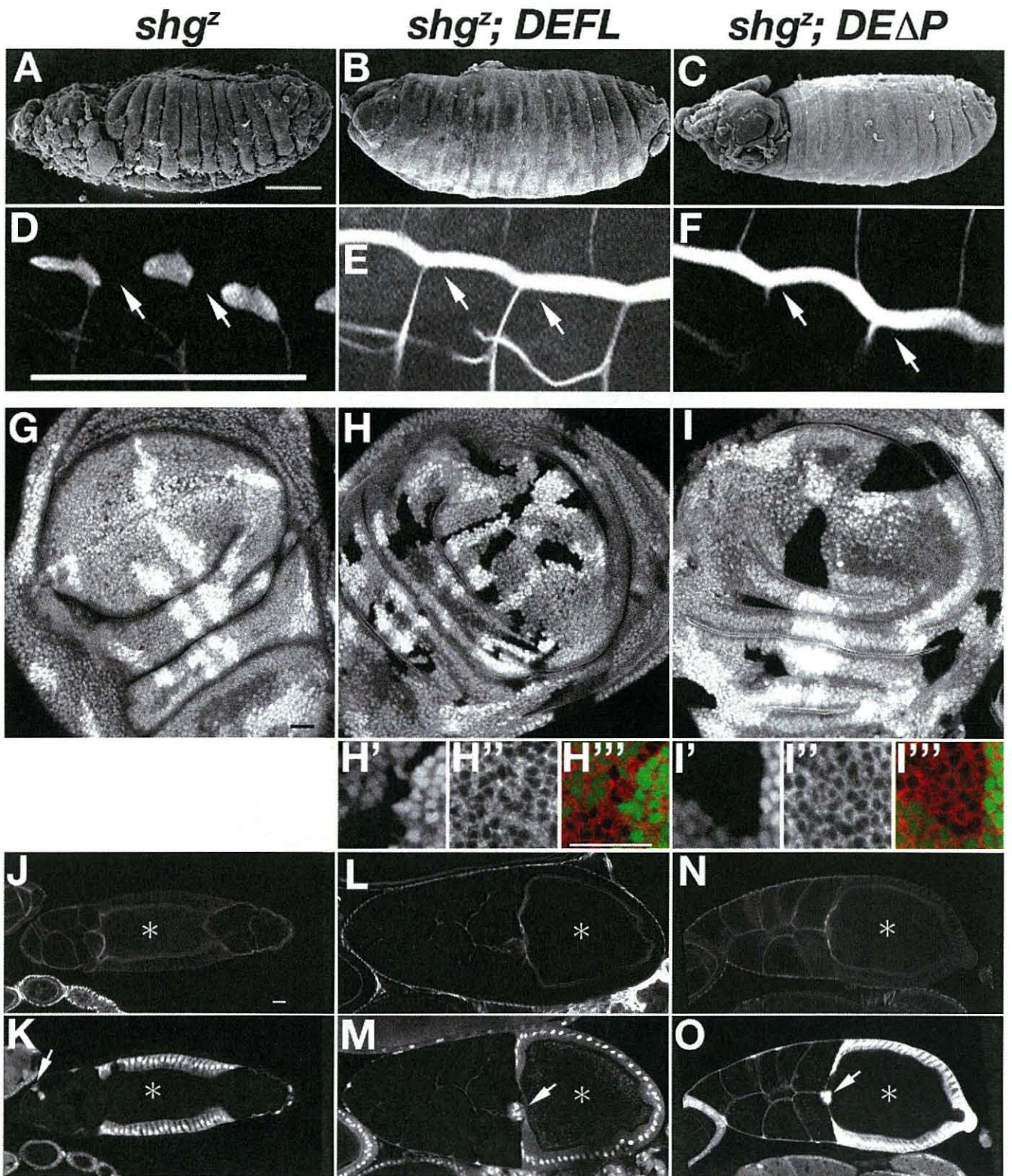
**Fig.3**



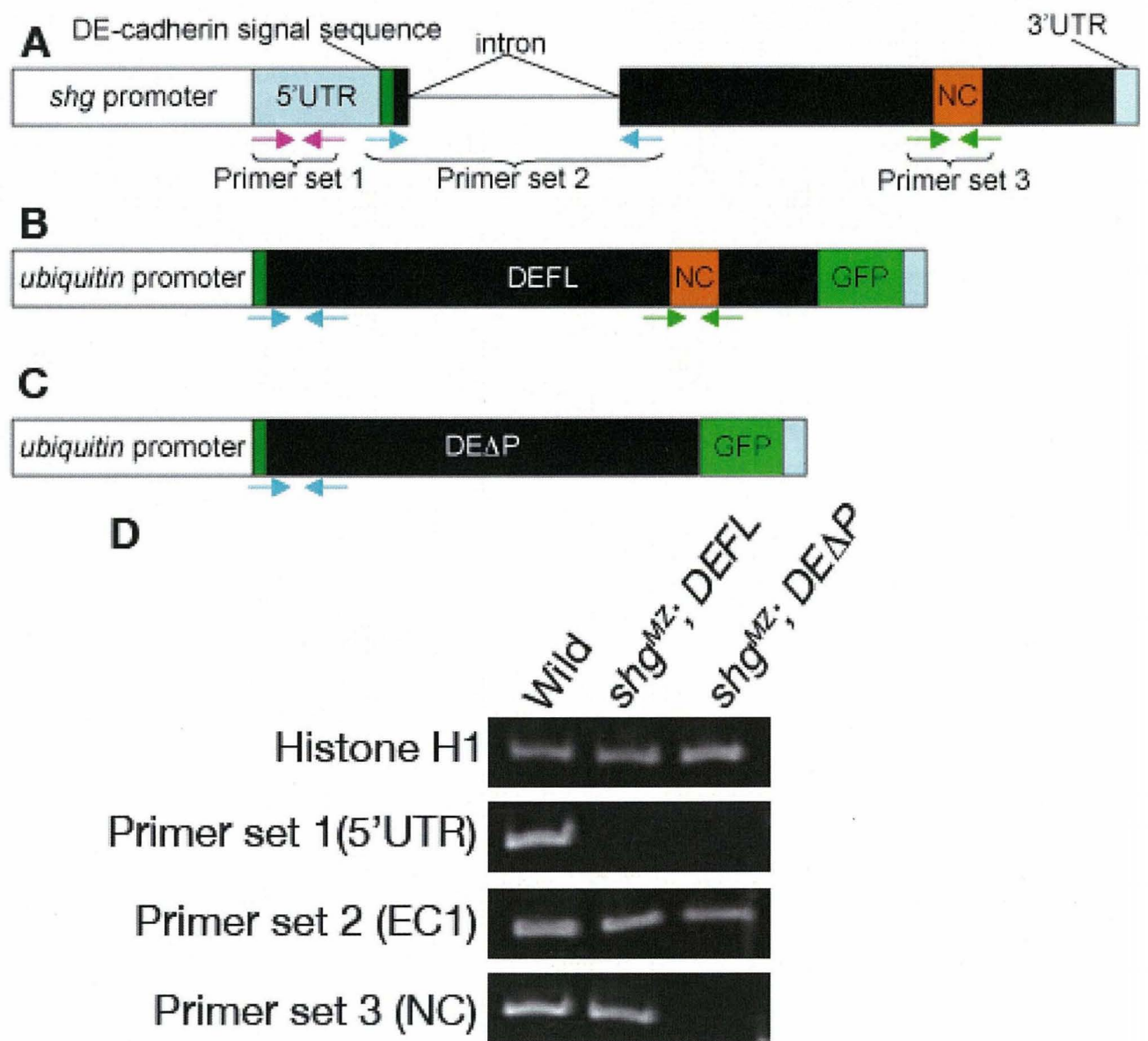


**Fig.4**



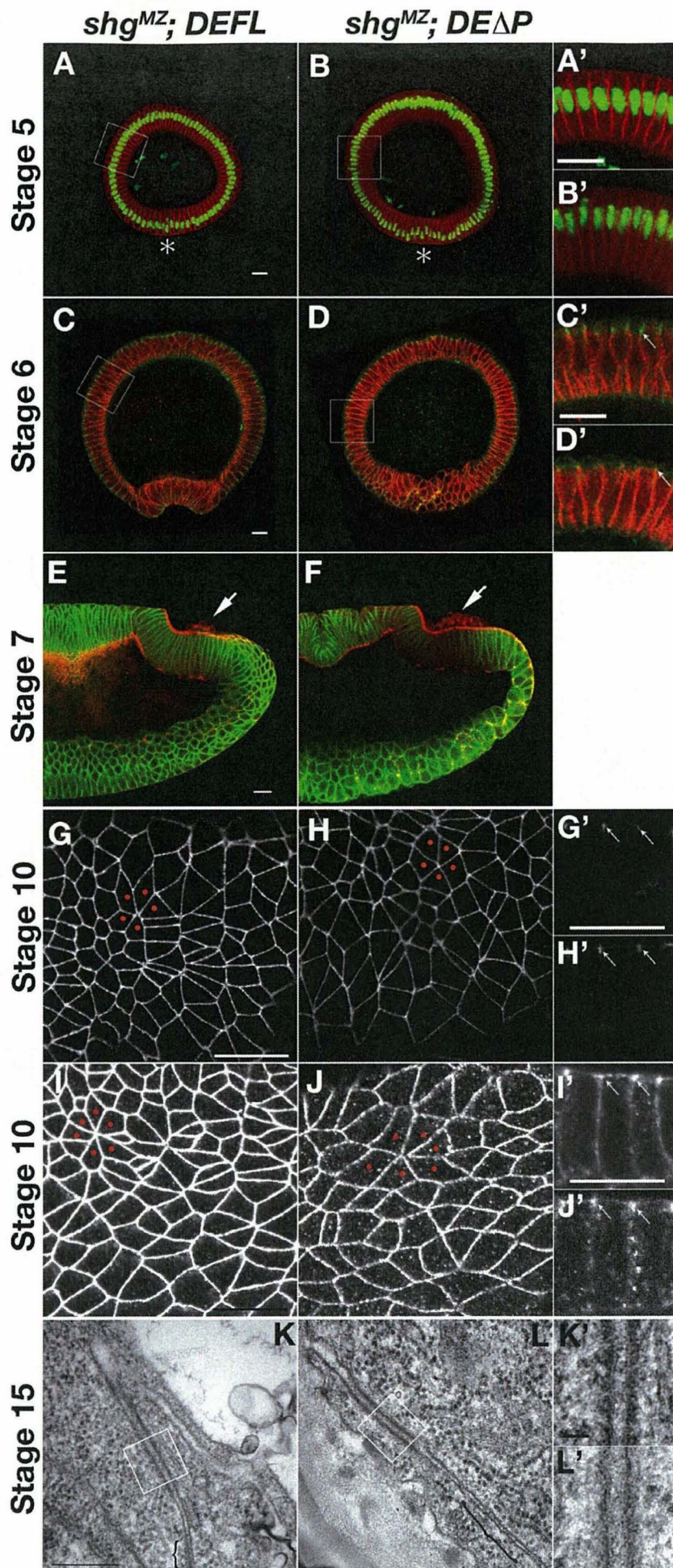


**Fig.5**



**Fig.6**





**Fig.7**



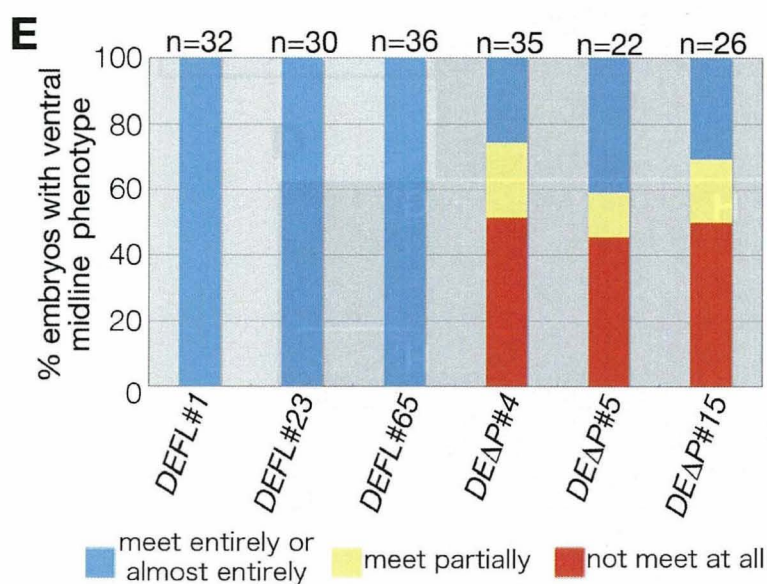
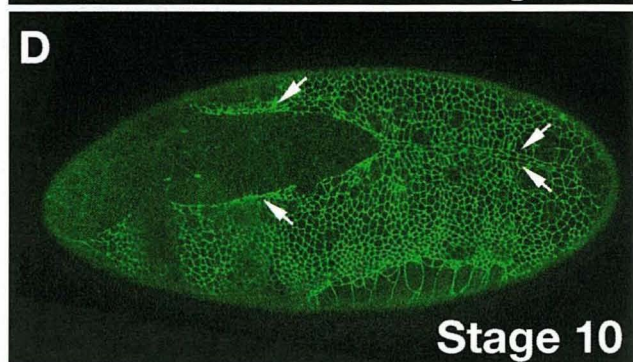
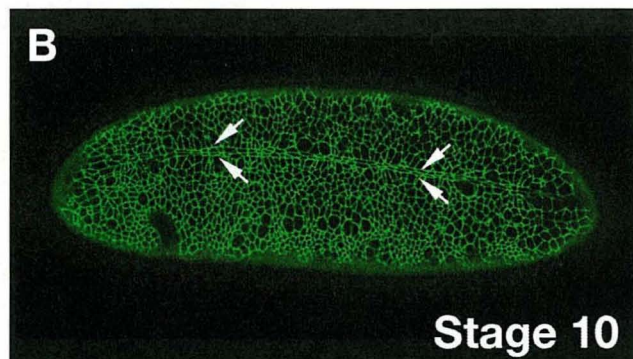
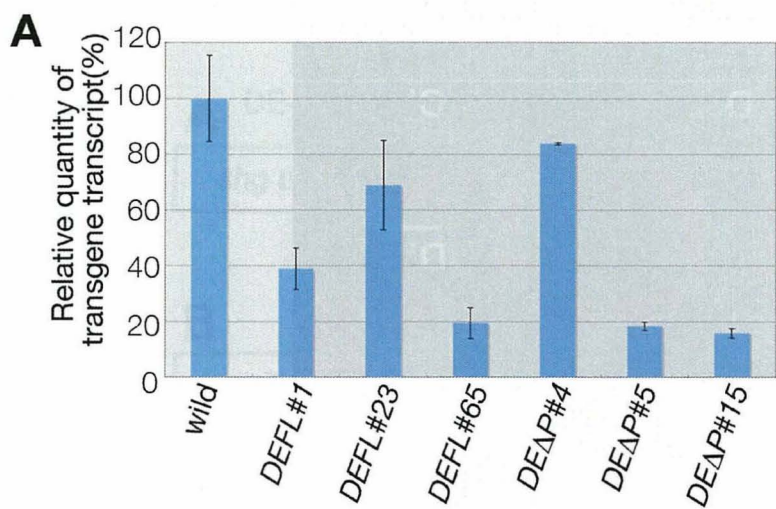
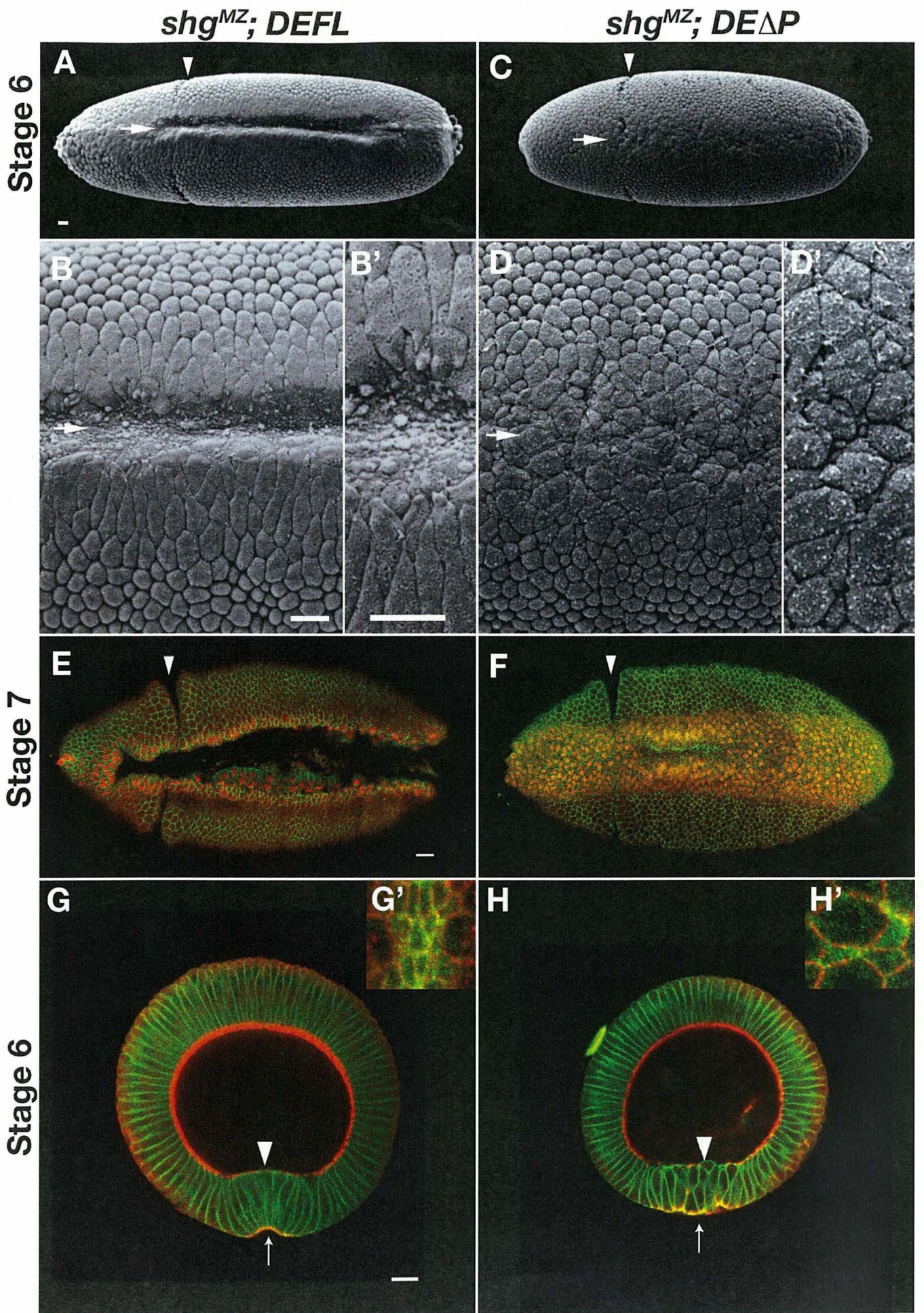


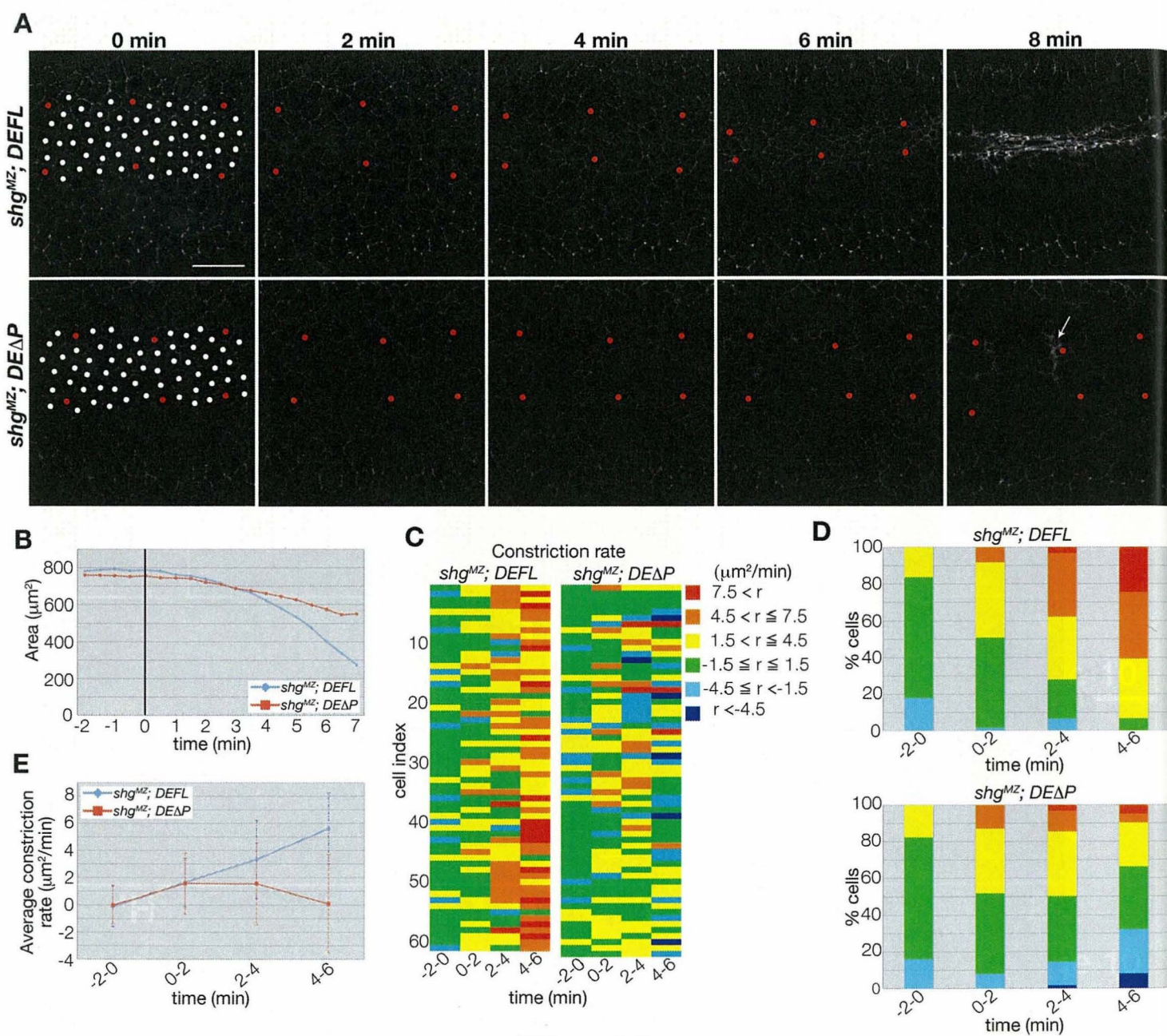
Fig.8





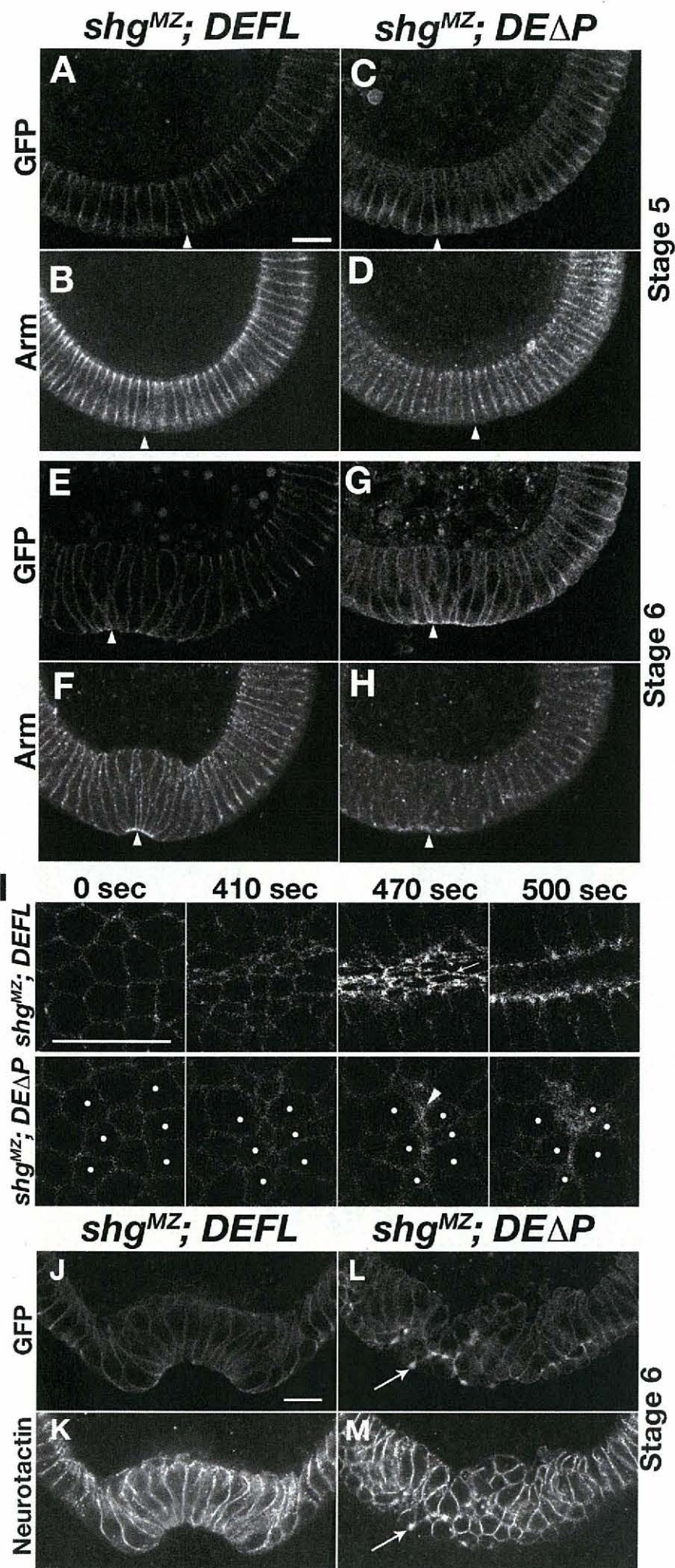
**Fig.9**





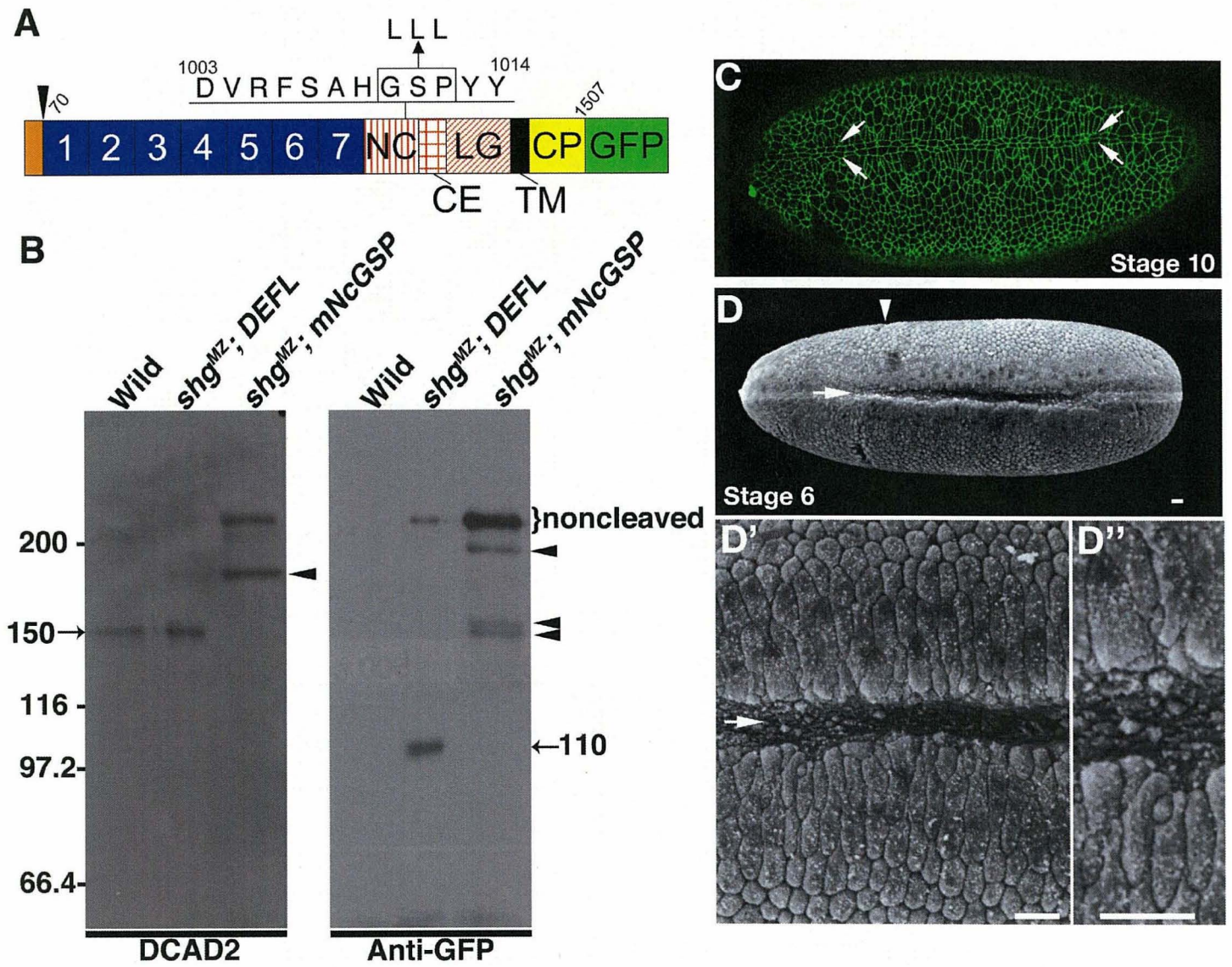
**Fig.10**





**Fig.11**



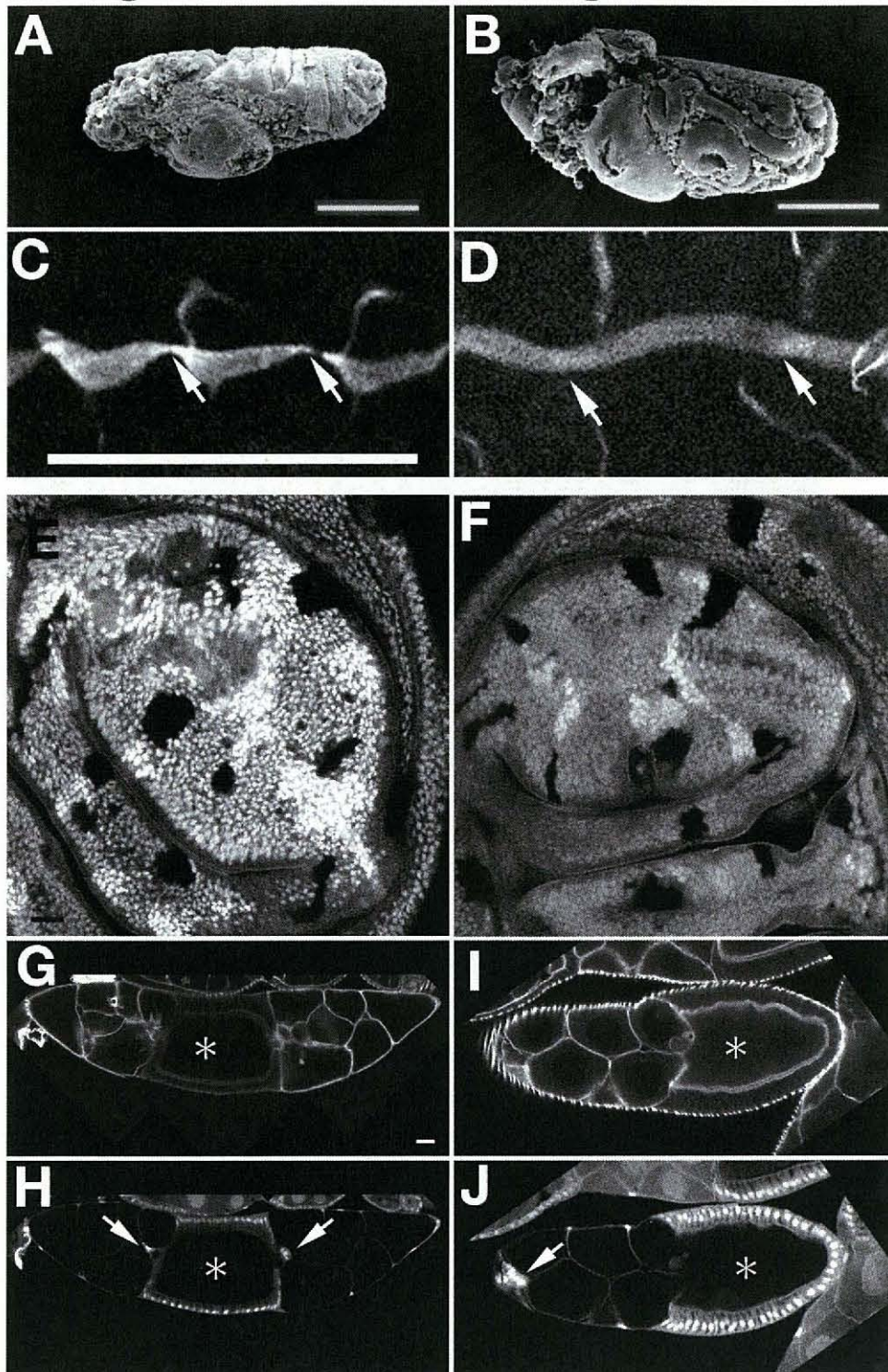


**Fig.12**

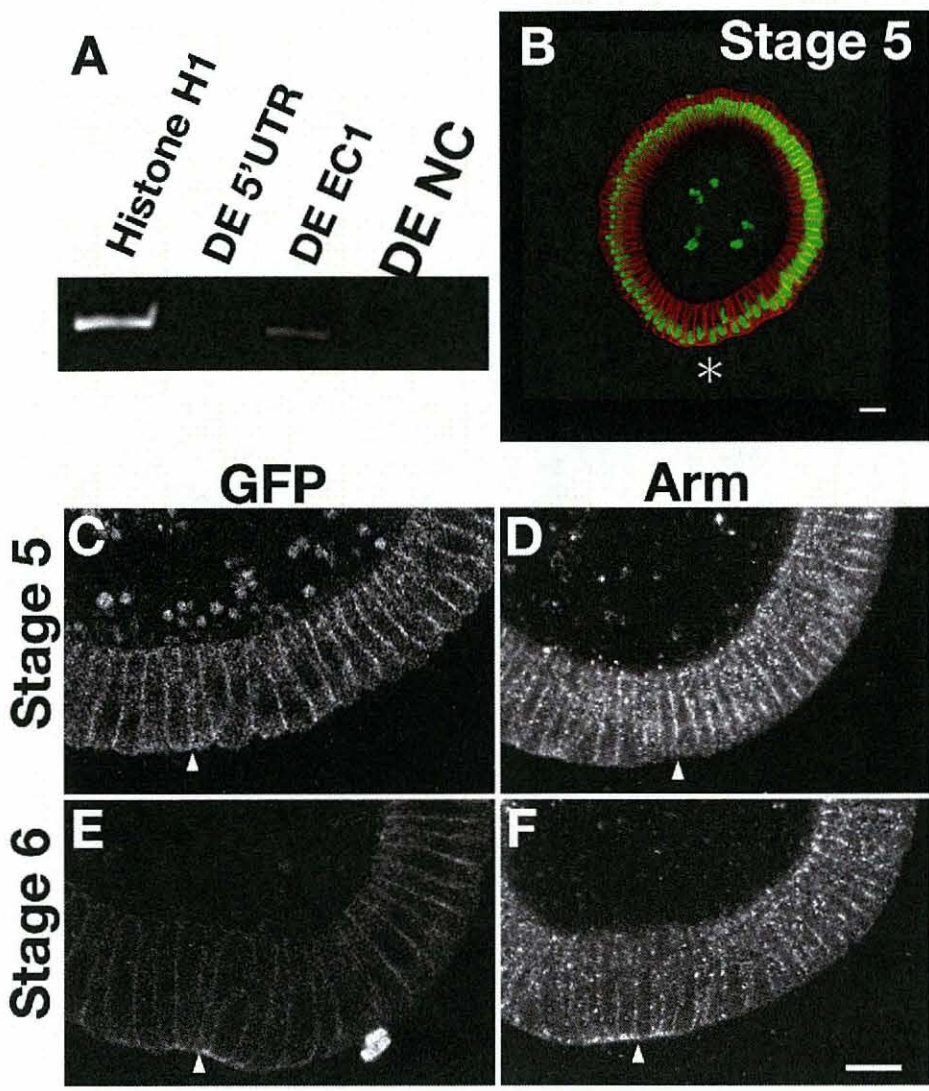


*shg<sup>z</sup>; ΔPCCD*

*shg<sup>z</sup>; DN-cad*

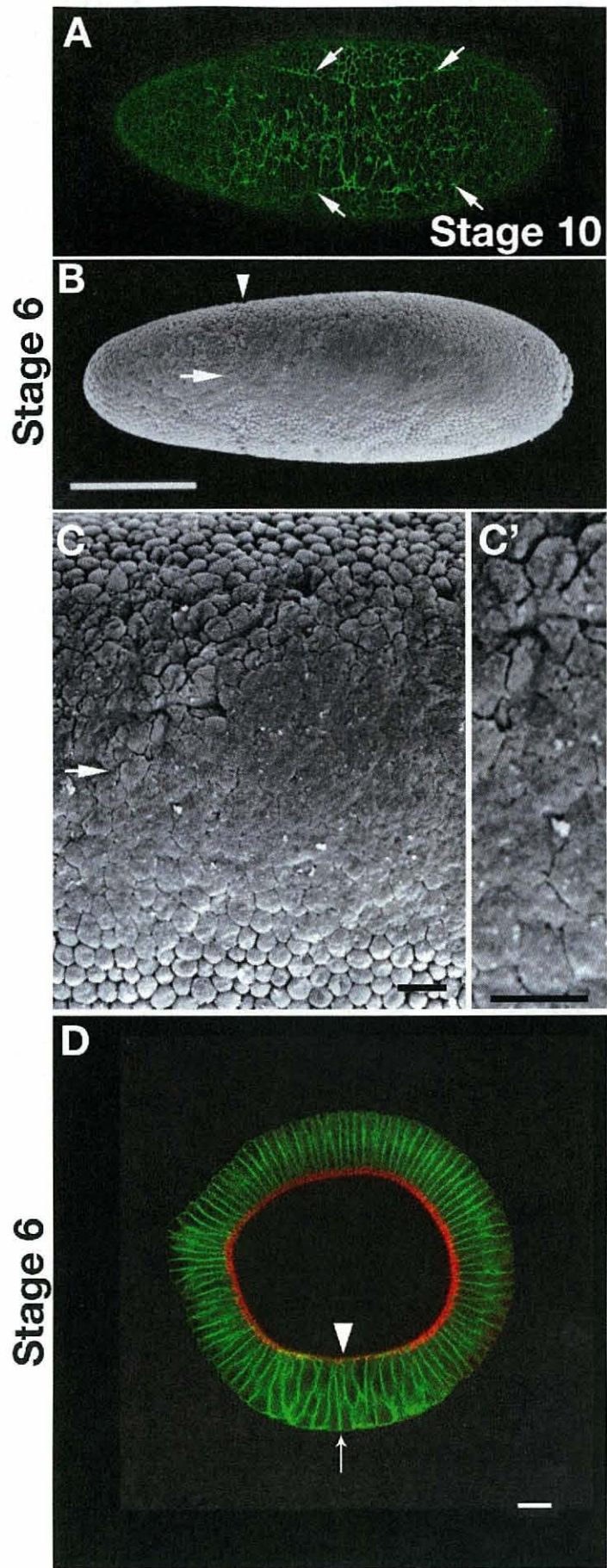


**Fig.13**

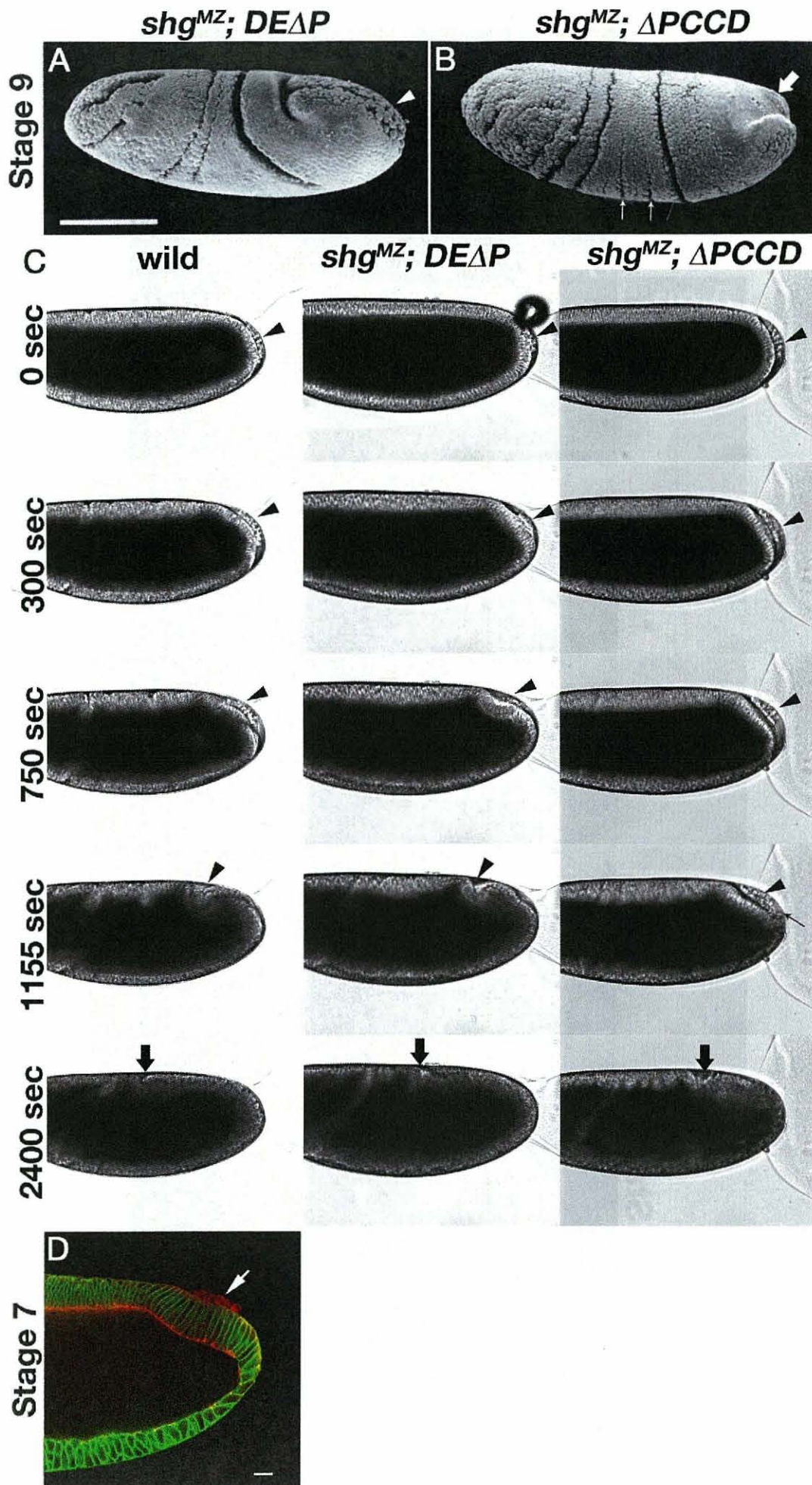


**Fig.14**





**Fig.15**



**Fig.16**



## 図の説明

### Fig.1 カドヘリンの多様化は独立な短縮化によって説明できる

AJ を構成する上皮 cadherin のドメイン構成を模式的に表す。白抜きとなっている領域は、鋏角類や棘皮動物にみられる cadherin と祖先的であると仮定した時、失われている領域をしめす。EC: Extracellular Cadherin repeat, NC: Nonchordate specific domain, CE: Cysteine-rich EGF like domain, LG: Laminin Globular like domain, CP: Cytoplasmic region を示す。PCCD は Primitive Classic Cadherin Domain complex の略で、NC、CE、LG からなる脊椎動物型 cadherin にはないが、その他の cadherin には存在するドメイン複合体。

### Fig.2 DE-cadherin デリションシリーズの接着活性の測定

(A) DE-cadherin と模式図と作成した欠失分子。矢頭はそれぞれ、シグナル配列と NC 領域で起きる開裂を示す。EC は 7 つあり、それぞれ N 末端側から 1-7 の数字が振られている。すべての分子の C 末端側には GFP が付加されている。(B) 作成した分子を S2 細胞に導入し、抗 GFP 抗体で検出した。DEFL では NC の開裂により C 末端側の短い断片が検出される。NC を欠いている欠失分子では開裂は起きていない。(C) 欠失分子を導入した S2 細胞が形成する細胞凝集。分子に付加された GFP の蛍光を可視化している。(D) 細胞凝集のサイズを指標とした接着活性の定量化。GFP の蛍光の粒径の平均の大きさを取得した画像から計測した。同様の実験を dCR3h 以外では、4 回繰り返し、平均を求めた(dCR3h のみ実験は 2 回)。エラーバーは標準偏差を示し、標準偏差は、welch の方法による t 検定によって計算した。

### Fig.3 $\Delta 734-1316(\Delta EDP)$ と $\Delta 833-1316(\Delta PCCD)$ の振る舞い

(A-D) DE-cad-KO を発現する細胞と DEFL(A)、 $\Delta EAP(\Delta 734-1316)$  (B)、 $\Delta PCCD(\Delta 833-1316)$ (C)、DN-cadherin(D)を発現する細胞を混ぜたときの細胞凝集。DE-cad-KO が導入された細胞はオレンジの、欠失分子を導入した細胞は緑の蛍光で確認できる。作成した欠失分子が正常な DE-cadherin を認識し、接着する場合、DE-cad-KO を導入した細胞と欠失分子を導入した細胞は、それぞれの細胞が混ざった凝集を作る。一方、DN-cadherin のように DE-cadherin とは異なる接着特異性を持つ場合は、それぞれ別々の細胞凝集を作る。(E-G) DEFL(E)、 $\Delta EAP$ (F)、 $\Delta PCCD$ (G)の in vivo での発現と局在。DEFL、 $\Delta EAP$ 、 $\Delta PCCD$  を ubiquitin プロモーターによって胚に発現させると、細胞膜上に輸送され AJ に局在する。ポジティブコントロールであ

る DEFL と DE $\Delta$ P、 $\Delta$ PCCD の間に、局在の差異は見つからない。

#### Fig.4 DEFL、DE $\Delta$ P、 $\Delta$ PCCD の in vivo における接着活性

ショウジョウバエ胚発生後期(stage 16)の上皮を FasciclinIII(A-E)、神経組織を Elav (F-J)で染色して可視化した。左側が頭方部側、下側が腹側を示す。Wild type では上皮によって神経も含め胚全体が包まれている(A, F)。しかし、*shg* 接合体ヌルとなった胚 (*shg*<sup>z</sup>)では、頭部と腹部の上皮が破綻し神経組織が露出している(B, G)。*shg* 接合体ヌルに DEFL を発現させると (*shg*<sup>z</sup>; DEFL)では、上皮の破綻はレスキューされる(C, H)。同様に DE $\Delta$ P を発現させると (*shg*<sup>z</sup>; DE $\Delta$ P)腹部上皮は維持されるが、頭部は脳が露出したままになっている(D, I)。 $\Delta$ PCCD を発現させた場合、上皮の破綻は全くレスキューしない(E, J)。細矢印は頭部の上皮の破綻領域を、太矢印は腹部の上皮の破綻領域を示す。

#### Fig.5 DEFL と DE $\Delta$ P の *shg* ヌルの異常をレスキューする活性

(A-C) *shg*<sup>z</sup> (A)、*shg*<sup>z</sup>; DEFL (B)、*shg*<sup>z</sup>; DE $\Delta$ P (C)の stage 16、latetal 側からの SEM 像。左側が Anterior 側、下側が腹側である。(D-F) *shg*<sup>z</sup> (D)、*shg*<sup>z</sup>; DEFL (E)、*shg*<sup>z</sup>; DE $\Delta$ P (F)の気管を CBP によって可視化した。矢印は気管上皮の融合ポイントを示す。(G-I'') 導入遺伝子がない (G)、また DEFL (H-H'')、DE $\Delta$ P (I-I'')を発現している時、*shg* ヌルの細胞クローンを翅成虫原器で作成した。(G-I)GFP の発現を観察すると、すべての場合で核内に局在する強い GFP を発現する領域が観察され、相同組み換えは達成されたことを示す。*shg* ヌルとなった細胞クローンは核内の GFP が陰性となった領域である。(G'-G'', H'-H'') *shg* ヌルとなった領域の拡大。GFP の蛍光(G', H')と、phalloidin で染色したもの(G'', H'')、そして merge 像(G''', H''')。(J-O) 導入遺伝子がない (J, K)、また DEFL (L-M)、DE $\Delta$ P (N-O)を発現している時、*shg* ヌルの細胞クローンを生殖細胞系列で作成した。phalloidin 染色(J, L, N)と GFP の蛍光(K, M, O)を観察した。左側が頭方部側である。アスタリスクは卵母細胞を、矢印は境界細胞を示す。なにも導入していないものでは、卵母細胞の局在が攪乱され、中央に位置し、境界細胞は遊走せず、頭方部側に残されている。一方、DEFL、DE $\Delta$ P を発現させたものでは卵母細胞は後方部に位置し、境界細胞は卵母細胞に接するように局在している。これは境界細胞が保育細胞の間を遊走したことを示す。A のスケールバーは 50 $\mu$ m、D、G、J のスケールバーは 20 $\mu$ m を示す。

**Fig.6 DE-cadherin を DEAP に完全に置き換えた *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* の作成**

(A-D) 内在性の DE-cadherin の(A)と導入遺伝子 DEFL(B)、DEAP(C)の転写産物の構造。ピンクの矢印のセットは DE-cadherin の 5' UTR を、青の矢印のセットは EC1 領域を、そして緑の矢印セットは NC 領域を認識するプライマーセットを示す。導入遺伝子には DEFL、DEAP 共に 5'UTR が存在せず、さらに DEAP には NC 領域が存在しない。(D) PCR の結果。*shg<sup>MZ</sup>; DEFL*、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*とも、内在性の DE-cadherin の発現は認められず、目的の転写産物のみが検出された。

**Fig.7 *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* は上皮形成を達成する**

(A-B') ステージ 5 における *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*(A, A')、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* (B, B')の横断面。細胞の輪郭を Neurotactin(赤)、核を YOYO-1(緑)の染色によって可視化した。アスタリスクは腹側の細胞の核が頂端部から基部へ上昇している領域を示す。(A', B')A、B の白い枠に囲われた領域を拡大した。(C-D') Stage 6 における *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*(C, C')、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* (D, D')の横断面。細胞の輪郭を Neurotactin の染色によって赤で、DEFL、DEAP の局在を緑で示す。下側が腹側である。(C', D')C、D の白い枠で囲われた外胚葉領域を拡大した。(E-F) ステージ 7 における *shg<sup>MZ</sup>; DEFL* (E)、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* (F)の後腸陥入。Neurotactin (緑)と MyosinII(赤)を可視化した。矢印は極細胞を示す。(G-J') ステージ 10 における *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*(G, G', I, I')、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* (H, H', J, J')の外胚葉上皮の頂端表面(G-J)と上皮細胞の横断面(G'-J')。DEFL、DEAP の局在(G-H')と AJ 構成分子の Armadillo の局在(I-J')。この時期では胚帯伸長が行なわれているが、細胞の挿入伸長を起こしていることをしめすロゼッタ状の細胞配列が観察される (赤いドットで示す)。(K-L') *shg<sup>MZ</sup>; DEFL* (K, K')、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* (L, L')の成熟した外胚葉側方上皮頂端部領域の TEM 像。白い枠で AJ を、中括弧で SJ を示す。(K'-L') A、B の白い枠に囲われた AJ を拡大した。スケールバーは A-G'では 20  $\mu\text{m}$  を、K では 200nm、K'では 40 nm を示す。

**Fig.8 *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では腹部領域に異常が観察される**

(A) *shg<sup>MZ</sup>; DEFL* は DEFL#1、DEFL#23、DEFL#65、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* は DEAP#4、DEAP#5、DEAP#15 のそれぞれ 3 つの独立な系統によって作成し、ステージ 5 における導入遺伝子の発現量を比較した。それぞれ導入遺伝子の発現量は Histone H1 の発現量で標準化し、野生型の内在的な DE-cadherin の発現量を 100%として比較した。(B-D) *shg<sup>MZ</sup>; DEFL* (B)と *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* (C, D)の stage 10 における腹部の様子(それぞれ DEFL#1、DEAP#15 で作成したもの)。腹側正中線細胞が 2 列に整列して接してい

ることが B で観察される。しかし、C や D では、腹側正中線細胞は全くもしくは一部、接していない。矢印は腹側正中線細胞を示す。(E) *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*, *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* のステージ 10 で観察される腹側正中線の表現型を、それぞれ完全に接している(B、青)、一部接している(D、黄)、全く接していない(C、赤)に場合分けし、それぞれの系統が示す表現型の割合をヒストグラムで示す。

#### Fig.9 *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では腹溝形成に異常を示す

(A-D') *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*, *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* のステージ 6 の腹側の SEM 像。左側が頭部である。矢頭は頭部溝、矢印は最も腹側の領域を示す。B, B', D, D' はそれぞれ A と C の腹側の領域を拡大したものである。(E, F) *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*, *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* のステージ 7 の腹側、中胚葉マーカーである Twist で染色した結果。赤で Twist の局在を、緑で DEFL、DEAP を示す。矢頭は頭部溝を示す。(G-H) *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*, *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* のステージ 6 の横断面、Neurotactin(緑)と MyosinII heavy chain(赤)で染色した結果。予定中胚葉細胞の頂端側を矢印で、基部側を矢頭で示す。どちらの胚も、Myosin の局在は基部領域で消え、頂端領域に濃縮している。(G'-H') 同じタイミングの腹側頂端部表面。Neurotactin(赤)と MyosinII heavy chain(緑)で示す。*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* で収縮していない細胞でも、*Armadillo* の母性ヌルや、ショウジョウバエの Afadin である Canoe、また AJ の形成を阻害する *nullo* の強制発現で見られる Myosin ball と呼ばれる異所的な MyosinII の濃縮は見られない。スケールバーは A, B では 10  $\mu\text{m}$ 、E, G では 20  $\mu\text{m}$  を示す

#### Fig.10 *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では頂端部収縮が抑制される

(A) *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*, *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* の腹溝形成過程のタイムラプス像。DEFL、DEAP を可視化している。左側が頭方部側である。計測に用いた最も腹側の細胞をドットで示す。矢印は DEAP が形成する凝集を示す。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  である。(B) 20 細胞分の頂端部領域の面積の経時変化のグラフ。黒い線は連続的な収縮が始まるタイムポイントを示す。(C) 個々の細胞の収縮率の変化。それぞれの列が 1 つの細胞を示す。-2、0、2、4、6 分のタイムポイントで計測した面積から、収縮率を計算した。得られた個々の細胞の収縮率は、収縮率に対応したカラーコードで示している。(D) 収縮率の平均の経時変化をグラフで表す。エラーバーは S.D. を表す。(E) C の収縮率によって色分けした細胞集団をヒストグラムで表す。カラーコードは C と同様。

Fig.11 *shg<sup>MZ</sup>; DEAP*において頂端部収縮を達成した細胞は接着連絡の破綻を引き起こす

(A-H) stage 5(A-D)とステージ 6 (E-H)の *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*の腹部領域の横断面。DEFL(A, E)、DEAP(C, G)と Arm(B, D, F, H)を可視化した。DEFL、DEAP、そして Arm は、共に頂端部収縮を始める前の細胞では亜頂端領域に局在するが、頂端部収縮が開始されると頂端面へ局在を移す(矢頭)。(I) 頂端部収縮をする細胞での DEFL、DEAP の局在。Fig.10 の収縮している細胞を拡大した。矢印は *shg<sup>MZ</sup>; DEFL* で収縮した細胞で維持され続ける AJ による接着連絡を示す。*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* で収縮する細胞を取り囲む細胞をドットで、DEAP の凝集を矢頭で示す。*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* では収縮した細胞から接着連絡の破綻が始まる。(J-M) Stage 6 における *shg<sup>MZ</sup>; DEFL*(J, K)、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP* (L, M)の腹部領域の横断面。細胞の輪郭を Neurotactin の染色によって赤で、DEFL、DEAP の局在を緑で示す。Fig.7 C, D の拡大。Neurotactin を含む DEAP の凝集を矢頭で示す。スケールバーはすべて 20  $\mu\text{m}$  を示す。

Fig.12 DE-cadherin の NC 領域の開裂は腹溝形成に必要とされない

(A) NC の開裂領域を改変した mNcGSP の模式図。本来、1010 番目のグリシンと 1011 番目のセリンの間で開裂する。mNcGSP ではこの領域のアミノ酸をロイシンに置換している。(B) *shg<sup>MZ</sup>; mNcGSP* における、NC の開裂の阻害をウェスタンブロットによって確認した。DCAD2 は、EC2-EC3 の領域を認識する抗体であり、NC で開裂したとき N 端側の断片を検出する。抗 GFP 抗体は、C 端末に付加された GFP を認識し、NC で開裂したとき C 端側の断片を検出する。この抗体を用いてウェスタンブロットを行なうと *shg<sup>MZ</sup>; DEFL* では約 150 kDa の N 端側の断片と約 110 kDa の C 端側の断片が検出される(矢印)。さらにわずかではあるものの 200 kDa を超える切れなかった断片(noncleaved)が検出される。*shg<sup>MZ</sup>; mNcGSP* では、200 kDa を超える切れなかった断片(noncleaved)がメインのバンドとして検出される。また多くの分解物だと思われるバンド(矢頭)が検出されるが、NC の開裂による N 端側の 150 kDa の断片や、C 端側の 110 kDa の断片は検出されない。(C) *shg<sup>MZ</sup>; mNcGSP* の stage 10 における腹部の様子。腹側正中線細胞が 2 列に整列して接している。矢印は腹側正中線細胞を示す。(D-D'') *shg<sup>MZ</sup>; mNcGSP* の stage 6 の腹側の SEM 像。左側が頭部である。矢頭は頭部溝、矢印は最も腹側の領域を示す。D', D'' は D の腹側の領域を拡大したものである。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  である。

**Fig.13  $\Delta PCCD$  と DN-cadherin の *shg* ノルの異常をレスキューする活性**

**(A-B)** *shg<sup>Z</sup>;  $\Delta PCCD$*  (A) *shg<sup>Z</sup>; DN-cad* (B)のステージ 16、側方からの SEM イメージ。左側が頭方部側、下側が腹側である。**(C-D)** *shg<sup>Z</sup>;  $\Delta PCCD$*  (C)、*shg<sup>Z</sup>; DN-cad*(E)のトラキアを CBP によって可視化した。矢印は気管上皮の融合ポイントを示す。**(E-F)** *shg* ノルの細胞クローンを、 $\Delta PCCD$  (E)、DN-cad (F)を発現している翅成虫原器において作成した場合。 $\Delta PCCD$ 、DN-cad を発現させている時、核の GFP が陰性となる *shg* null となった領域が形成される。**(G-I)** *shg* ノルの細胞クローンを、 $\Delta PCCD$  (G, H)、DN-cad(I, J)を発現させている生殖細胞系列において作成した場合。phalloidin 染色(G, I)と GFP の蛍光(H, J)を観察した。左側が頭方部側である。アスタリスクは卵母細胞を、矢印は境界細胞を示す。スケールバーは A,B では 100  $\mu\text{m}$ 、C、E、G は 20  $\mu\text{m}$  を示す。

**Fig.14  $\Delta PCCD$  によって構成される AJ は正常に振る舞う**

**(A)** 得られた卵の DE-cadherin が完全に  $\Delta PCCD$  に置き換わっていることを RT-PCR によって確認した。用いたプライマーセットは、Fig.6 で用いたものと同じである。 $\Delta PCCD$  の転写産物には、5'UTR と NC 領域は存在しない。**(B)** Stage 5 における *shg<sup>MZ</sup>;  $\Delta PCCD$*  の横断面。細胞の輪郭を Neurotactin(赤)、核を YOYO-1(緑)の染色によって可視化した。アスタリスクは、腹側の核の頂端部から基部へ移動していることを示す。**(C-F)** ステージ 5 (C, D)とステージ 6 (E, F)の *shg<sup>MZ</sup>;  $\Delta PCCD$*  の腹部領域の横断面。 $\Delta PCCD$  (C, E) と Arm(D, F)を可視化した。 $\Delta PCCD$ 、そして Arm は、共に頂端部収縮を始める前の細胞では亜頂端領域に局在するが、頂端部収縮が開始されると頂端面へ局在を移す(矢頭)。スケールバーはすべて 20  $\mu\text{m}$  を示す。

**Fig.15 *shg<sup>MZ</sup>;  $\Delta PCCD$*  では予定中胚葉細胞での MyosinII の局在変化に異常が生じる**

**(A)** *shg<sup>MZ</sup>;  $\Delta PCCD$*  のステージ 10 における腹部の様子。腹側正中線細胞は、接していない。矢印は腹側正中線細胞を示す。**(B-C')** *shg<sup>MZ</sup>;  $\Delta PCCD$*  のステージ 6 の腹側の SEM 像。左側が頭部である。矢頭は頭部溝、矢印は最も腹側の領域を示す。C, C'は B の腹側の領域を拡大したものである。**(D)** *shg<sup>MZ</sup>;  $\Delta PCCD$*  のステージ 6 の横断面、Neurotactin(緑)と MyosinII heavy chain(赤)で染色した結果。予定中胚葉細胞の頂端部側を矢印で、基側を矢頭で示す。*shg<sup>MZ</sup>;  $\Delta PCCD$*  では、予定中胚葉細胞の配列に乱れが生じ、Myosin の局在は基部領域で残り、頂端面に濃縮していない。スケールバーは B では 100  $\mu\text{m}$  を、C, C'では 10  $\mu\text{m}$  を、D では 20  $\mu\text{m}$  を示す。

Fig.16 *shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* は germband extension の過程で腹部組織が破綻する  
(A-B) *shg<sup>MZ</sup>; DEAP* (A)、*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD* (B)のステージ9のSEM像。*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*で中胚葉陥入領域が破綻していながらも、後方部は前方部へ向かって伸長している(矢頭)。一方、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*では後方部は輪郭の見えない細胞に覆われている(太矢印)。そして、外胚葉には異所的な皺が観察される(細矢印)。(C) wild、*shg<sup>MZ</sup>; DEAP*、*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD*の胚帯伸長のタイムラプス像。矢頭は極細胞を、太矢印は後端を、細矢印は*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD*で観察される破綻した細胞を示す。(D) ステージ7における*shg<sup>MZ</sup>; ΔPCCD*の後腸陥入。Neurotactin(緑)とMyosinII(赤)を可視化した。矢印は極細胞を示す。スケールバーはAでは100 μmを、Dでは20 μmを示す。

## 参考文献

1. Adams, C.L., Chen, Y.T., Smith, S.J., and Nelson, W.J. (1998). Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J Cell Biol* 142, 1105-1119.
2. Al-Amoudi, A., Díez, D.C., Betts, M.J., and Frangakis, A.S. (2007). The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* 450, 832-837.
3. Arias, A.A. (1993). Development and patterning of the larval epidermis of *Drosophila*, In *The Development of Drosophila melanogaster*, (Cold spring harbor laboratory press), pp. 517-608.
4. Blankenship, J.T., Backovic, S.T., Sanny, J.S., Weitz, O., and Zallen, J.A. (2006). Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis. *Dev Cell* 11, 459-470.
5. Boggon, T.J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B.M., and Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296, 1308-1313.
6. Borghi, N., and James Nelson, W. (2009). Intercellular adhesion in morphogenesis: molecular and biophysical considerations. *Curr Top Dev Biol* 89, 1-32.
7. Bornberg-Bauer, E., Beaussart, F., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A., and Weiner, J. (2005). The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks. *Cell Mol Life Sci* 62, 435-445.
8. Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
9. Breshears, L.M., and Titus, M.A. (2007). Motor Proteins: tightening your belt with myosin VI. *Curr Biol* 17, R915-R917.



10. Broadbent, I.D., and Pettitt, J. (2002). The *C. elegans* *hmr-1* gene can encode a neuronal classic cadherin involved in the regulation of axon fasciculation. *Curr Biol* 12, 59-63.
11. Brouzés, E., Supatto, W., and Farge, E. (2004). Is mechano-sensitive expression of twist involved In mesoderm formation? *Biol Cell* 96, 471-477.
12. Carthew, R.W. (2005). Adhesion proteins and the control of cell shape. *Curr Opin Genet Dev* 15, 358-363.
13. Chappuis-Flament, S., Wong, E., Hicks, L.D., Kay, C.M., and Gumbiner, B.M. (2001). Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol* 154, 231-243.
14. Costa, M.C., Sweeton, D.S., and Wieschaus, E.W. (1993). Gastrulation in *Drosophila*: Cellular mechanisms of morphogenetic movement, In *The Development of Drosophila melanogaster*, (Cold spring harbor laboratory press), pp. 425-465.
15. Costa, M., Wilson, E.T., and Wieschaus, E. (1994). A putative cell signal encoded by the folded gastrulation gene coordinates cell shape changes during *Drosophila* gastrulation. *Cell* 76, 1075-1089.
16. Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J., and Priess, J.R. (1998). A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol* 141, 297-308.
17. Cousins, G.R., Poulsen, S.A., and Sanders, J.K. (2000). Molecular evolution: dynamic combinatorial libraries, autocatalytic networks and the quest for molecular function. *Curr Opin Chem Biol* 4, 270-279.
18. Cox, R.T., Kirkpatrick, C., and Peifer, M. (1996). Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Biol* 134, 133-148.

19. Dawes-Hoang, R.E., Parmar, K.M., Christiansen, A.E., Phelps, C.B., Brand, A.H., and Wieschaus, E.F. (2005). folded gastrulation, cell shape change and the control of myosin localization. *Development* 132, 4165-4178.
20. Foe, V.E. (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* 107, 1-22.
21. Fox, D.T., and Peifer, M. (2007). Abelson kinase (Abl) and RhoGEF2 regulate actin organization during cell constriction in *Drosophila*. *Development* 134, 567-578.
22. Gallicano, G.I. (2001). Composition, regulation, and function of the cytoskeleton in mammalian eggs and embryos. *Front Biosci* 6, D1089-D1108.
23. Glenner, H., Thomsen, P.F., Hebsgaard, M.B., Sørensen, M.V., and Willerslev, E. (2006). Evolution. The origin of insects. *Science* 314, 1883-1884.
24. Godt, D., and Tepass, U. (1998). *Drosophila* oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. *Nature* 395, 387-391.
25. González-Reyes, A., and St Johnston, D. (1998). The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. *Development* 125, 3635-3644.
26. Gottardi, C.J., Wong, E., and Gumbiner, B.M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 153, 1049-1060.
27. Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E., and Skaer, H. (1996). The *Drosophila* genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* 122, 951-959.
28. Gumbiner, B.M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 622-634.

29. Harris, T.J., Sawyer, J.K., and Peifer, M. (2009). How the cytoskeleton helps build the embryonic body plan: models of morphogenesis from *Drosophila*. *Curr Top Dev Biol* 89, 55-85.
30. Harrison, D.A., and Perrimon, N. (1993). Simple and efficient generation of marked clones in *Drosophila*. *Curr Biol* 3, 424-433.
31. Hatta, K., Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988). Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol* 106, 873-881.
32. Herrenknecht, K., Ozawa, M., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Lenter, M., and Kemler, R. (1991). The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9156-9160.
33. Hulpiau, P., and van Roy, F. (2009). Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 349-369.
34. Imai, K., Takada, N., Satoh, N., and Satou, Y. (2000). (beta)-catenin mediates the specification of endoderm cells in ascidian embryos. *Development* 127, 3009-3020.
35. Inagaki, N., Nishizawa, M., Ito, M., Fujioka, M., Nakano, T., Tsujino, S., Matsuzawa, K., Kimura, K., Kaibuchi, K., and Inagaki, M. (1997). Myosin binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase at the cell-cell adhesion sites in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 552-556.
36. Iwai, Y., Usui, T., Hirano, S., Steward, R., Takeichi, M., and Uemura, T. (1997). Axon patterning requires DN-cadherin, a novel neuronal adhesion receptor, in the *Drosophila* embryonic CNS. *Neuron* 19, 77-89.
37. Iwai, Y., Hirota, Y., Ozaki, K., Okano, H., Takeichi, M., and Uemura, T. (2002). DN-cadherin is required for spatial arrangement of nerve terminals and ultrastructural organization of synapses. *Mol Cell Neurosci* 19, 375-388.

38. Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y.T., and Levine, M. (1991). The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 5, 1881-1891.
39. Kan, N.G., Stemmler, M.P., Junghans, D., Kanzler, B., de Vries, W.N., Dominis, M., and Kemler, R. (2007). Gene replacement reveals a specific role for E-cadherin in the formation of a functional trophectoderm. *Development* 134, 31-41.
40. Kiehart, D.P., and Feghali, R. (1986). Cytoplasmic myosin from *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 103, 1517-1525.
41. Kizhatil, K., Davis, J.Q., Davis, L., Hoffman, J., Hogan, B.L., and Bennett, V. (2007). Ankyrin-G is a molecular partner of E-cadherin in epithelial cells and early embryos. *J Biol Chem* 282, 26552-26561.
42. Knust, E., Dietrich, U., Tepass, U., Bremer, K.A., Weigel, D., Vässin, H., and Campos-Ortega, J.A. (1987). EGF homologous sequences encoded in the genome of *Drosophila melanogaster*, and their relation to neurogenic genes. *EMBO J* 6, 761-766.
43. Kölsch, V., Seher, T., Fernandez-Ballester, G.J., Serrano, L., and Leptin, M. (2007). Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2. *Science* 315, 384-386.
44. Lane, Dallai, Martinucci, and Burighel (1994). Electron microscopic structure and evolution of epithelial junction, In *Development to Disease microscopic structure and evolution of epithelial junctions*, (R.G. Landes company).
45. Le Borgne, R., Bellaïche, Y., and Schweisguth, F. (2002). *Drosophila* E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr Biol* 12, 95-104.

46. Lecuit, T., and Lenne, P.F. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 633-644.
47. Leptin, M., and Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73-84.
48. Leptin, M. (1991). twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* 5, 1568-1576.
49. Leptin, M., Casal, J., Grunewald, B., and Reuter, R. (1992). Mechanisms of early *Drosophila* mesoderm formation. *Dev Suppl* , 23-31.
50. Levi, L., Douek, J., Osman, M., Bosch, T.C., and Rinkevich, B. (1997). Cloning and characterization of BS-cadherin, a novel cadherin from the colonial urochordate *Botryllus schlosseri*. *Gene* 200, 117-123.
51. Lien, W.H., Klezovitch, O., and Vasioukhin, V. (2006). Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Curr Opin Cell Biol* 18, 499-506.
52. Lilien, J., Balsamo, J., Arregui, C., and Xu, G. (2002). Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins. *Dev Dyn* 224, 18-29.
53. Magie, C.R., and Martindale, M.Q. (2008). Cell-cell adhesion in the cnidaria: insights into the evolution of tissue morphogenesis. *Biol Bull* 214, 218-232.
54. Mallatt, J., and Giribet, G. (2006). Further use of nearly complete 28S and 18S rRNA genes to classify Ecdysozoa: 37 more arthropods and a kinorhynch. *Mol Phylogenet Evol* 40, 772-794.
55. Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., et al. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 21, 1948-1956.

56. Martin, A.C., Kaschube, M., and Wieschaus, E.F. (2009). Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature* 457, 495-499.
57. Miller, J.R., and McClay, D.R. (1997). Characterization of the role of cadherin in regulating cell adhesion during sea urchin development. *Dev Biol* 192, 323-339.
58. Minshull, J., and Stemmer, W.P. (1999). Protein evolution by molecular breeding. *Curr Opin Chem Biol* 3, 284-290.
59. Miyake, Y., Inoue, N., Nishimura, K., Kinoshita, N., Hosoya, H., and Yonemura, S. (2006). Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and zonula occludens formation. *Exp Cell Res* 312, 1637-1650.
60. Morize, P., Christiansen, A.E., Costa, M., Parks, S., and Wieschaus, E. (1998). Hyperactivation of the folded gastrulation pathway induces specific cell shape changes. *Development* 125, 589-597.
61. Müller, H.A., and Wieschaus, E. (1996). *armadillo*, *bazooka*, and *stardust* are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J Cell Biol* 134, 149-163.
62. Nagafuchi, A., Takeichi, M., and Tsukita, S. (1991). The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 65, 849-857.
63. Niewiadowska, P., Godt, D., and Tepass, U. (1999). DE-Cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* 144, 533-547.
64. Nishimura, T., and Takeichi, M. (2009). Remodeling of the adherens junctions during morphogenesis. *Curr Top Dev Biol* 89, 33-54.
65. Nollet, F., Kools, P., and van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin

superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 299, 551-572.

66. Nose, A., Tsuji, K., and Takeichi, M. (1990). Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61, 147-155.

67. O'Neill, E.M., Rebay, I., Tjian, R., and Rubin, G.M. (1994). The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* 78, 137-147.

68. Oda, H., Uemura, T., Shiomi, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1993). Identification of a *Drosophila* homologue of alpha-catenin and its association with the armadillo protein. *J Cell Biol* 121, 1133-1140.

69. Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y., and Takeichi, M. (1994). A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev Biol* 165, 716-726.

70. Oda, H., Uemura, T., and Takeichi, M. (1997). Phenotypic analysis of null mutants for DE-cadherin and Armadillo in *Drosophila* ovaries reveals distinct aspects of their functions in cell adhesion and cytoskeletal organization. *Genes Cells* 2, 29-40.

71. Oda, H., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol* 203, 435-450.

72. Oda, H., and Tsukita, S. (1999). Nonchordate classic cadherins have a structurally and functionally unique domain that is absent from chordate classic cadherins. *Dev Biol* 216, 406-422.

73. Oda, H., and Tsukita, S. (2001). Real-time imaging of cell-cell adherens junctions reveals that *Drosophila* mesoderm invagination begins with two phases of apical constriction of cells. *J Cell Sci* 114, 493-501.

74. Oda, H., Wada, H., Tagawa, K., Akiyama-Oda, Y., Satoh, N., Humphreys, T., Zhang, S., and Tsukita, S. (2002). A novel amphioxus cadherin that localizes to epithelial adherens junctions has an unusual domain organization with implications for chordate phylogeny. *Evol Dev* 4, 426-434.
75. Oda, H., Akiyama-Oda, Y., and Zhang, S. (2004). Two classic cadherin-related molecules with no cadherin extracellular repeats in the cephalochordate amphioxus: distinct adhesive specificities and possible involvement in the development of multicell-layered structures. *J Cell Sci* 117, 2757-2767.
76. Oda, H., Tagawa, K., and Akiyama-Oda, Y. (2005). Diversification of epithelial adherens junctions with independent reductive changes in cadherin form: identification of potential molecular synapomorphies among bilaterians. *Evol Dev* 7, 376-389.
77. Ozawa, M., and Kemler, R. (1990). Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *J Cell Biol* 111, 1645-1650.
78. Patel, N.H., Snow, P.M., and Goodman, C.S. (1987). Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48, 975-988.
79. Patel, S.D., Chen, C.P., Bahna, F., Honig, B., and Shapiro, L. (2003). Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* 13, 690-698.
80. Patel, S.D., Ciatto, C., Chen, C.P., Bahna, F., Rajebhosale, M., Arkus, N., Schieren, I., Jessell, T.M., Honig, B., et al. (2006). Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* 124, 1255-1268.
81. Peifer, M. (1998). Developmental biology. Birds of a feather flock together. *Nature* 395, 324-325.
82. Peifer, M., and Yap, A.S. (2003). Traffic control: p120-catenin acts as a gatekeeper to



control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *J Cell Biol* 163, 437-440.

83. Perez, P.T., and Nelson, N.W. (2004). Cell Adhesion, In *Cadherin Adhesion: Mechanisms and Molecular Interactions*, (Springer-Verlag), pp. 3-21.

84. Perrimon, N. (1984). Clonal Analysis of Dominant Female-Sterile, Germline-Dependent Mutations in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 108, 927-939.

85. Pilot, F., Philippe, J.M., Lemmers, C., and Lecuit, T. (2006). Spatial control of actin organization at adherens junctions by a synaptotagmin-like protein Btsz. *Nature* 442, 580-584.

86. Pouille, P.A., Ahmadi, P., Brunet, A.C., and Farge, E. (2009). Mechanical signals trigger Myosin II redistribution and mesoderm invagination in *Drosophila* embryos. *Sci Signal* 2, ra16.

87. Putnam, N.H., Butts, T., Ferrier, D.E., Furlong, R.F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., et al. (2008). The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453, 1064-1071.

88. Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 24, 742-752.

89. Royou, A., Field, C., Sisson, J.C., Sullivan, W., and Karess, R. (2004). Reassessing the role and dynamics of nonmuscle myosin II during furrow formation in early *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell* 15, 838-850.

90. Sasaki, C.Y., Lin, H., Morin, P.J., and Longo, D.L. (2000). Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin. *Cancer Res* 60, 7057-7065.

91. Sasakura, Y., Shoguchi, E., Takatori, N., Wada, S., Meinertzhagen, I.A., Satou, Y., and

- Satoh, N. (2003). A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. X. Genes for cell junctions and extracellular matrix. *Dev Genes Evol* 213, 303-313.
92. Sawyer, J.K., Harris, N.J., Slep, K.C., Gaul, U., and Peifer, M. (2009). The *Drosophila* afadin homologue Canoe regulates linkage of the actin cytoskeleton to adherens junctions during apical constriction. *J Cell Biol* 186, 57-73.
93. Shan, W., Yagita, Y., Wang, Z., Koch, A., Svenningsen, A.F., Gruzglin, E., Pedraza, L., and Colman, D.R. (2004). The minimal essential unit for cadherin-mediated intercellular adhesion comprises extracellular domains 1 and 2. *J Biol Chem* 279, 55914-55923.
94. Sivasankar, S., Zhang, Y., Nelson, W.J., and Chu, S. (2009). Characterizing the initial encounter complex in cadherin adhesion. *Structure* 17, 1075-1081.
95. Spradling, A.S. (1993). Developmental genetics of oogenesis, In *The Development of Drosophila melanogaster*, (cold spring harbor laboratory press), pp. 1-70.
96. Sweeton, D., Parks, S., Costa, M., and Wieschaus, E. (1991). Gastrulation in *Drosophila*: the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations. *Development* 112, 775-789.
97. Takeichi, M. (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75, 464-474.
98. Tepass, U., Theres, C., and Knust, E. (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61, 787-799.
99. Tepass, U. (1996). Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev Biol* 177, 217-225.
100. Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T.A., Omatyar, L., Török, T., and Hartenstein,

V. (1996). *shotgun* encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev* 10, 672-685.

101. Tepass, U. (1999). Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 11, 540-548.

102. Todd, A.E., Orengo, C.A., and Thornton, J.M. (1999). Evolution of protein function, from a structural perspective. *Curr Opin Chem Biol* 3, 548-556.

103. Townes, P.T., and Holtfreter, J.H. (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *Journal of Experimental Zoology* 128, 53-120.

104. Tracewell, C.A., and Arnold, F.H. (2009). Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Curr Opin Chem Biol* 13, 3-9.

105. Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., Kotaoka, Y., and Takeichi, M. (1996). Zygotic *Drosophila* E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 10, 659-671.

106. Underwood, E.M., Turner, F.R., and Mahowald, A.P. (1980). Analysis of cell movements and fate mapping during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 74, 286-301.

107. van Roy, F., and Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65, 3756-3788.

108. VanHook, A., and Letsou, A. (2008). Head involution in *Drosophila*: genetic and morphogenetic connections to dorsal closure. *Dev Dyn* 237, 28-38.

109. Vogel, C., Berzuini, C., Bashton, M., Gough, J., and Teichmann, S.A. (2004). Supra-domains: evolutionary units larger than single protein domains. *J Mol Biol* 336, 809-823.

110. Wang, F., Dumstrei, K., Haag, T., and Hartenstein, V. (2004). The role of DE-cadherin during cellularization, germ layer formation and early neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 270, 350-363.

111. Yoshida-Noro, C., Suzuki, N., and Takeichi, M. (1984). Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev Biol* 101, 19-27.

112. Younossi-Hartenstein, A., Nassif, C., Green, P., and Hartenstein, V. (1996). Early neurogenesis of the *Drosophila* brain. *J Comp Neurol* 370, 313-329.

## 謝辞

私は、生命誌研究館の進化・発生・細胞研究室(小田研究室)に在籍し、指導していただきました。

小田広樹研究員・大阪大学招へい准教授には、研究するにあたって終始適切な助言を頂き、丁寧に指導して頂きました。特に、この5年間で学んだ研究に対する姿勢や、アカデミックサイエンスに対する哲学は、今後の私の人生の指針になるものだと感じております。小田・秋山康子研究員には、ハエの扱い方を始めとした、細かな実験のアドバイスだけでなく、私生活においても様々な差し入れをいただきました。この小田夫妻の公私にわたったご支援がなければ、研究どころか、一人で生活することすら出来なかったと思います。野田彰子実験補助員は研究室、また研究館で研究を行うにあたって、備品の整備を行っていただきました。野田彰子実験補助員のきめ細やかな心配りによって、気持ちよく研究生活に打ち込むことができました。

橋本主税研究員・大阪大学招へい教授には学位審査の主査を引き受けて頂きました。SEM観察は吉田昭広研究員にご指導いただきました。また生命誌研究館に所属している学生の皆さんとの、情報交換や助け合いがあったからこそ大学から離れた研究室での研究ができたのだと思います。特に同じ研究室だった金山真紀さんとの、様々な議論は楽しんで研究を行なう原動力となりました。研究生活の場となった生命誌研究館の皆様には、研究する場を与えていただいただけでなく、陰ながら多くの支援がありました。

*shg*の母性接合体ヌルの胚の作成のために、*hsFLP; FRT42D, ovoD1/CyO*をカルフォルニア大学アーバイン校のRahul Warrior教授に供与していただきました。私の研究の多くの発見は*shg*の母性接合体ヌルの胚によるものであり、パブリックになっていないハエを供与いただけたことは幸運でした。

TEM観察は理化学研究所発生・再生科学総合研究センター電子顕微鏡解析室の米村重信研究員にご指導いただきました。ショウジョウバエでの個体を用いた研究をしている私にとって、分子レベルでの構造に関する議論は、エキサイティングなものでした。

大阪大学理学研究科BMCプログラムの一環として、大阪大学蛋白質研究所細胞内シグナル伝達研究室の三木裕明教授に副専攻として、ご指導いただきました。異なる視点からの助言や具体的な実験の提案は、自分の研究を客観的に考えるきっかけとなりました。

本研究はこのように多くの方々のご支援があつて行うことができました。この場を借りて深く感謝いたします。

