The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | ラパログ依存的な新規細胞間接着制御系による中胚葉遊走の解析 |
| Author(s) | 宇佐美, 知沙 |
| Citation | 大阪大学, 2022, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/89497 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

様式３

# 論　文　内　容　の　要　旨

| 氏　名　（　宇佐美　知沙　） | |
|---|---|
| 論文題名 | ラパログ依存的な新規細胞間接着制御系による中胚葉遊走の解析 |

論文内容の要旨

細胞間接着は多細胞生物の構造を確立し維持する上で非常に重要である。その中でも主要な役割を担っているカドヘリンはカルシウムイオン依存性の細胞間接着分子であり、細胞外ドメインを介して近隣細胞のカドヘリンと結合し、細胞同士を接着させる。カドヘリンの発現量や活性は動的に制御されており、そのダイナミクスはエピボリー運動や神経堤細胞の遊走、収斂伸長運動といった様々な発生プロセスに関与することが知られている。

動的な細胞間接着制御が重要な発生プロセスの一つとして、原腸形成運動が挙げられる。原腸形成は初期胚における主要な発生イベントの1つであり、組織の大きな変形を伴い、前後軸・神経パターン・原腸といった基本的なボディプランが構築される。

アフリカツメガエルの原腸形成過程において、中胚葉はblastocoel roof (BCR)上を動物極方向へと遊走する。この時、中胚葉-BCR間の接着頻度が遊走を制御していると考えられているが、接着頻度と遊走の関係を直接的に解析する実験手法は確立されていない。そこで本研究では、小分子化合物ラパマイシンのアナログであるラパログを用いて、異なる組織間の接着を特異的に誘起する実験系を新たに開発した。

まず、ラパログ特異的に細胞間接着を誘起させるための細胞膜タンパク質であるriCAM1とriCAM2を作製した。細胞にこれらのタンパク質を発現させ、カルシウムイオンを含まないメディウム中で解離させた状態でラパログを添加すると、細胞間接着が誘起された。また、接着パターンを解析した結果、ラパログはriCAM1発現細胞とriCAM2発現細胞間の接着のみを誘起し、同種のriCAMを発現している細胞間の接着には影響を与えなかった。

続いて、BCRにriCAM1、中胚葉にriCAM2を独立に発現させ、ラパログを添加することでこれらの組織間の接着を特異的に増強させると、中胚葉の遊走が強く阻害された。また、riCAMの発現とラパログの添加は、中胚葉とBCR間の組織境界であるBrachet's cleftの形成には影響を及ぼさなかった。さらに、riCAM1を発現しているBCR断片上にriCAM2を発現している中胚葉組織をマウントし、組織境界における細胞の挙動を観察した結果、ラパログが両組織間の接着頻度を増強させることを定量的に明らかにした。

これらの結果は、中胚葉-BCR間の接着頻度が中胚葉遊走を制御するというモデルを強く支持している。さらに、本実験系が*in vivo*において組織間接着を特異的に制御できる有用な手法であることを示している。

様式３

# 論　文　内　容　の　要　旨

| 氏　名　（　宇佐美　知沙　） | |
|---|---|
| 論文題名 | ラパログ依存的な新規細胞間接着制御系による中胚葉遊走の解析<br>Analysis of mesoderm migration in *Xenopus* embryos using rapalog-induced cell adhesion molecule |

論文内容の要旨

Cell-cell adhesion is very important in establishing and maintaining the structure of multicellular organisms. Cadherins, which play a major role in this process, are $Ca^{2+}$-dependent intercellular adhesion molecules that bind to cadherins of neighboring cells via their extracellular domains, resulting in cell-cell adhesion. Cadherin expression and activity are dynamically regulated, and its dynamics are known to be involved in various developmental processes such as epiboly, neural crest cell migration, and convergent extension.

One developmental process in which dynamic regulation of intercellular adhesion is important is the gastrulation movement. Gastrulation is one of the major developmental events in the early embryo and involves major tissue deformation and the establishment of basic body plans such as the anterior-posterior axis, neural patterns, and archenteron.

During the gastrulation of the *Xenopus laevis*, the mesoderm migrates toward the animal pole on the blastocoel roof (BCR). Although the frequency of adhesion between mesoderm and BCR is thought to regulate migration, no direct experimental method has been established to analyze the relationship between the frequency of adhesion and migration. In this study, I developed a new experimental system that specifically induces adhesion between different tissues using rapalog, an analog of rapamycin.

First, I produced two membrane proteins, riCAM1 and riCAM2, to induce cell-cell adhesion specifically with rapalog. When cells expressed these proteins and dissociated them in $Ca^{2+}$-free medium and added rapalog, intercellular adhesion was induced. Analysis of adhesion patterns showed that rapalog induced adhesion only between riCAM1- and riCAM2-expressing cells and did not affect adhesion between cells expressing the same riCAM.

When riCAM1 and riCAM2 were independently expressed in the BCR and mesoderm, respectively, and adhesion between these tissues was specifically enhanced by the addition of rapalog, migration of the mesoderm was strongly inhibited. Expression of riCAM and addition of rapalog had no effect on the formation of Brachet's cleft, the tissue boundary between the mesoderm and BCR. Furthermore, I mounted mesodermal tissue expressing riCAM2 on BCR fragments expressing riCAM1 and observed cell behavior at the tissue boundary, quantitatively demonstrating that rapalog enhanced the frequency of adhesion between the two tissues.

These results strongly support the model that mesoderm-BCR adhesion frequency regulates mesoderm migration. Furthermore, they demonstrate that this experimental system is a useful method for specifically regulating intertissue adhesion *in vivo*.

様式 7

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏　名　（　宇佐美　知沙　） | | |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | （職） | 氏　名 |
| | 主 査　教授 | 西田　宏記 |
| | 副 査　教授 | 松野　健治 |
| | 副 査　個人事業主（元・理化学研究所体軸動態研究チームリーダー） | 猪股　秀彦 |

## 論文審査の結果の要旨

胚発生過程において、細胞間接着の動的制御は細胞遊走、収斂伸長運動、境界形成など、様々な発生イベントに関わることが知られている。アフリカツメガエル胚（*Xenopus laevis*）においても、中胚葉細胞が胞胚腔蓋上を動物極に向かって遊走する際、両組織間の接着頻度が中胚葉遊走を制御するモデルが提唱されている。しかし、*in vivo* において、組織間接着に擾乱を付与する実験系の欠落がモデルの検証を困難にしていた。本博士論文では、上記問題に取り組むために、以下に示す研究が実施された。

（１）組織間接着を特異的に制御する新規手法の開発

本研究では異なる細胞間の接着を特異的に誘起するために、小化合物ラパログ（ラパマイシンのアナログ）を活用した新規手法の確立を行っている。ラパログに結合する FRB ドメインと FKBP ドメインをそれぞれ膜タンパク質の細胞外領域に融合し、2 種類の rapalog-induced cell adhesion molecule 1（riCAM1）および riCAM2 を作製している。riCAM1/2 をそれぞれ異なる細胞に発現することで、ラパログ依存的に riCAM1/2 発現細胞間の接着が誘導されること、および riCAM1/2 が接着部位に集積することが *in vitro* で示された。

（２）中胚葉－胞胚腔蓋間の接着頻度亢進と中胚葉遊走の解析

上記で開発した手法を *in vivo* に応用するために、riCAM1/2 を中胚葉と胞胚腔蓋に別々に発現させ、ラパログ依存的に両組織間の接着を特異的に増強させている。ラパログ非添加では、野生胚と同様に背側および腹側中胚葉は動物極に向かって遊走し、胚前方で互いに接触する。しかし、ラパログを胞胚腔にインジェクションすると、背側－腹側中胚葉の遊走が強く阻害され、両組織間に大きなギャップが形成されることが示された。さらに、両組織間の接着頻度を tissue separation assay により評価したところ、ラパログ添加により接着頻度が大きく亢進することが示された。以上の結果を踏まえて、中胚葉－胞胚腔蓋間の接着頻度と中胚葉遊走の相互機構が議論された。

なお、本博士論文の内容は、Genes to cells に宇佐美を筆頭著者として印刷中である。

本研究成果は、新規手法を開発・応用することで、モデルの妥当性をより直接的に検証しており、新規性が高い内容であると考えられる。また、新規手法は riCAM1/2 のタンパク質発現に基づく実験系であるため、アフリカツメガエル胚だけでなく様々な動物胚に応用可能である。本手法を介した接着擾乱の付与は、発生過程における細胞・組織間接着の動態制御を理解する上で有効な手法であり、学術的価値が高いと思われる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値があるものと認める。