

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

博士論文

令和4年度

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

大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻

宇佐美 知沙

目次	1
要旨	3
1. 序論	4
1.1 多細胞生物における細胞間接着の機能	4
1.2 アフリカツメガエル胚における原腸形成	4
1.3 組織の境界形成	5
1.4 中胚葉の遊走と境界形成	6
1.5 本研究の目的	7
2. 結果	8
2.1 ラパログ添加による riCAM1/2 発現細胞の接着誘導	8
2.1.1 人工細胞間接着分子 riCAM1/2 の作成	8
2.1.2 ラパログ依存的な接着による checkerboard パターン形成	9
2.2 ラパログ添加による riCAM1/2 の細胞接着面への集積	10
2.2.1 ラパログ依存的な riCAM1/2 の細胞接着面への集積	10
2.2.2 <i>in vivo</i> における riCAM1/2 の細胞接着面への集積	11
2.3 ラパログ依存的な中胚葉遊走の阻害	11
2.4 中胚葉と BCR 間の接着頻度上昇による中胚葉遊走の阻害	12
2.4.1 ラパログ添加による Brachet's cleft 形成への影響	12
2.4.2 ラパログ依存的な中胚葉-BCR 間の接着頻度の上昇	13
3. 考察	14
3.1 ラパログによる人工細胞間接着分子	14
3.2 Ca ²⁺ とラパログによるクラスターサイズの違い	15
3.3 細胞間接着頻度による中胚葉の遊走制御	15
3.4 細胞間接着の増強と Brachet's cleft 形成	16
3.5 結論と展望	17

4. 手法	18
4.1 採卵およびインジェクション	18
4.2 プラスミド合成	18
4.3 Dissociation and reaggregation assay	18
4.4 riCAM1/2 発現細胞の接着パターンの観察	19
4.5 <i>in vitro</i> での riCAM1/2 の集積の観察	19
4.6 <i>in vivo</i> での riCAM1/2 の集積の観察	19
4.7 中胚葉の遊走の観察と定量	19
4.8 Brachet's cleft 形成の観察	20
4.9 Repulsion assay	20
5. 謝辞	22
6. 引用文献	23
7. 図	28

要旨

アフリカツメガエルの原腸形成期において、中胚葉細胞は blastocoel roof (BCR) 上を動物極側に向かって遊走し、両組織間には Brachet's cleft と呼ばれる境界が形成される。この過程において、中胚葉細胞はカドヘリンといった細胞間接着分子を介して BCR と直接接着する。一方、細胞間接着は細胞反発分子である Eph/ephrin を介して反発作用も引き起こす。したがって、中胚葉と BCR は接着と反発を繰り返しており、接着頻度が中胚葉の遊走を制御すると考えられている。実際、カドヘリンや Eph/ephrin のノックダウンは原腸形成運動を強く阻害することが知られている。しかし、カドヘリンと Eph/ephrin は中胚葉 - BCR 間の境界形成だけでなく、両組織の機能維持にも必須であることが報告されている。したがって、カドヘリンや Eph/ephrin のノックダウンにより生じる原腸形成運動の異常が、中胚葉や BCR の機能阻害に起因する可能性を否定できない。

この問題を解消するため、本研究では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。この手法により中胚葉と BCR 間の接着を特異的に増強させると、中胚葉遊走が強く阻害された。さらに、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。

1. 序論

1.1 多細胞生物における細胞間接着の機能

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。細胞接着分子 (cell adhesion molecule, CAM) は、カドヘリン、インテグリン、セレクトリン、免疫グロブリンの4種に大別される (Janiszewska *et al.* 2020) (図 1a)。その中でも主要な役割を担っているカドヘリンは Ca^{2+} 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 (Takeichi 1988)。また、カドヘリンの細胞内ドメインはカテニンタンパク質を介してアクチン細胞骨格と結合し、細胞皮質張力に影響を及ぼす (Lecuit & Yap 2015) (図 1b)。カドヘリンの発現量や活性は動的に制御されており (Niessen *et al.* 2011; Nava *et al.* 2013)、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 (Montero & Heisenberg 2004; Theveneau & Mayor 2012; Cousin 2017; Shindo 2018)。

1.2 アフリカツメガエル胚における原腸形成

動物の初期発生過程において、胚の外側に外胚葉、中心に内胚葉、その間に中胚葉という3つの胚葉が形成される。外胚葉からは主に表皮と中枢神経が、内胚葉からは消化器が、中胚葉からは筋組織と循環器が生じる。胚葉や前後軸、背腹軸は初期胚の段階で予備的に規定されるが、胚領域や基本的なボディプランの決定には細胞集団の大規模な再構築が必要となる。この再構築を引き起こす協調的な細胞運動が原腸形成である (Leptin 2005) (図 2)。原腸形成が正しく進行しないと、体軸が正常に形成されず、様々な組織が形成不全となる (Wallingford *et al.* 1997)。アフリカツメガエル胚の原腸形成は、植物極側に存在する内胚葉が胚の内部に入り込むことから始まる (vegetal rotation) (Huang & Winklbauer 2018)。この過程により中胚葉は外胚葉である blastocoel roof (BCR) と直接接触し、BCR 上を動物極方向に遊走する。一般に、背側中胚葉は leading edge mesendoderm、prechordal mesoderm と chordamesoderm に区分される (Huang & Winklbauer 2018) (図 2)。特に先端はその遺伝子発現パターンから中内胚葉とされるが、本論文ではこれらの3領域をまとめて中胚葉と記載する。方向性を持った遊走には、BCR 上の platelet-derived growth factor (PDGF) や stromal-derived factor-1 α

(SDF-1 α)といった化学誘引物質が必要である (Davidson *et al.* 2002; Nagel *et al.* 2004; Fukui *et al.* 2007; Damm & Winklbauer 2011)。さらに、BCR 上に集積した繊維状のフィブロネクチンは、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介して中胚葉のラメリポディア形成を促進する。中胚葉の遊走の結果、隣接する内胚葉の形状も大きく変化し、最終的に背側中胚葉に隣接した内胚葉と腹側中胚葉が胚の前方で融合する。

1.3 組織の境界形成

上述の通り、原腸形成は中胚葉が BCR 上を遊走することで実現される。このとき両組織間には Brachet's cleft と呼ばれる境界が形成される。この形態的に観察可能な境界により、中胚葉と BCR の細胞は分離される (Gorny & Steinbeisser 2012)。透過電子顕微鏡 (TEM) を用いた観察から、中胚葉-BCR 間は細胞外マトリクスで満たされている一方、部分的に細胞同士が密接した領域が存在することが報告されており、この領域はカドヘリンによる接着結合に類似している (Luu *et al.* 2015)。このような境界は、シヨウジョウバエの imaginal disc、アフリカツメガエルの脊索と未分節中胚葉間、脊椎動物のロンボメアなど、Brachet's cleft 以外でも共通して観察される (Garcia-Bellido *et al.* 1973; Cooke *et al.* 2005; Reintsch *et al.* 2005)。

2つの細胞集団が物理的に分離し、組織境界を形成するメカニズムについては複数のモデルが提唱されている。例えば、非混和性液体の物理モデルに基づく Differential adhesion hypothesis (DAH)は、細胞が表面積を最小化する傾向を有し、細胞集団は細胞間の接着性の違いによって選別される (Steinberg 2007)。また、Different interface tension hypothesis (DITH)は、DAH にアクチンによる皮質収縮力を取り入れたモデルであり、皮質張力と細胞間接着という細胞の大局的な拮抗する力のバランスによって細胞集団が選別される (Brodland 2002)。カドヘリンを介した細胞間接着は他の細胞との接着面積を増大させるが、皮質張力は細胞の表面積を減少させる方向に働く。したがって、強い皮質張力は新規の細胞間接着形成を抑制し、さらに既存の細胞間接着を破壊する (Amack & Manning 2012)。このように、DITH モデルは「皮質張力」と「接着」という2つの独立したパラメータに依存している。一方で、カドヘリンは細胞内ドメインを介してアクチン骨格制御に関わる分子群と相互作用することが知られている (Niessen *et al.* 2011)。実際、カドヘリンを介した細胞間接着は接着面でアクチン骨格の

減少を引き起こすことが報告されている(Yamada & Nelson 2007)。したがって、カドヘリンを介した「接着」は、細胞の「皮質張力」にも影響を与えている可能性が高く、両者が従属関係にある可能性を否定できない。

一方で、Eph/ephrin によって生じる細胞の局所的な収縮も組織分離に寄与する。隣り合う組織で Eph レセプタと ephrin リガンドが相補的に発現すると、組織境界面において Rho GTPase によりアクチンを介した皮質収縮が生じ、局所的な反発作用が起こる (図 3) (Rohani *et al.* 2014; Fagotto 2014; Cayuso *et al.* 2015)。具体的な例として、脊索と未分節中胚葉間の境界や体節の境界の形成には Eph/ephrin が必要である (Durbin *et al.* 1998; Fagotto *et al.* 2013)。また、Eph/ephrin はロンボメアの分節化に関わるコンパートメント境界の形成にも寄与している (Cooke *et al.* 2005)。

しかしながら、中胚葉と BCR では複数の Eph および ephrin のアイソフォームが共発現しており、状況はより複雑である (Rohani *et al.* 2014)。境界での組織分離には複数の Eph/ephrin ペアが相互作用する。一方で、Eph/ephrin ペアは中胚葉と BCR の機能維持にも関わっている。例えば、ephrinB1 は BCR におけるタイトジャンクション形成を促進し、EphA4/ephrinB2 のペアは中胚葉陥入の制御に関与することが報告されている (Lee *et al.* 2008; Evren *et al.* 2014)。

1.4 中胚葉の遊走と境界形成

中胚葉が BCR 上を遊走する際も、カドヘリンと Eph/ephrin が重要な役割を果たしている。例えば、両組織間の接着が亢進すると Eph/ephrin シグナルによる反発作用が引き起こされ、逆に組織が離れると反発は弱まり細胞間接着が促進される。上述の通り、方向性を持った遊走は化学走性によって引き起こされる。過去の研究では、この組織間の接着—乖離頻度が中胚葉遊走の程度を決めると考えられてきた (Rohani *et al.* 2011)。実際、morpholino antisense oligonucleotide (MO)によって Eph/ephrin シグナルをノックダウンすると、中胚葉と BCR が混ざり合うことで Brachet's cleft が消失し、中胚葉の遊走が阻害される (Park *et al.* 2011; Rohani *et al.* 2011)。同様に、C-カドヘリンをノックダウンした場合も中胚葉遊走が阻害される。しかし、この場合、組織間が乖離した状態を保ち、Brachet's cleft 形成には大きな影響を与えない (Ninomiya *et al.* 2012)。これらの結果は、中胚葉と BCR 間の接着頻度の乱れが遊走阻害を引き起こすことを示唆

している。しかし、Eph/ephrin は中胚葉と BCR の機能維持にも必要であり、C-cadherin も両組織内の細胞間接着に寄与する。従って、ロックダウンによる中胚葉遊走の阻害は、各組織の内部機能の異常に起因する可能性を排除できない。接着頻度が遊走に与える影響を解析するには、両組織内の細胞間接着や皮質張力には影響を与えずに、中胚葉—BCR 接着面で接着を特異的に制御する必要があるが、それを可能とする実験手法は確立されていない。

1.5 本研究の目的

そこで本研究では、中胚葉—BCR 間の接着頻度と遊走の関係性をより直接的に解析するために、両組織境界面特異的に接着擾乱を付与する新規実験系の開発を試みた。具体的には、FK506-binding protein (FKBP) と FKBP12-rapamycin associated protein の FKBP-rapamycin binding domain (FRB) が小分子化合物ラパログによってヘテロ二量体を形成するという性質を利用した (Kolos *et al.* 2018)。これらのドメインを細胞外領域に付加した膜タンパク質である rapalog-induced cell adhesion molecule 1 (riCAM1) および riCAM2 を作製することで、ラパログ依存的に細胞間接着を誘起することを可能とする。開発した riCAM1 と riCAM2 をそれぞれ BCR と中胚葉に独立に発現させ、ラパログによってこれらの組織境界面における接着を増強させることで、中胚葉遊走に与える影響を解析した。最後に、実験結果に基づき、中胚葉と BCR 間の接着頻度と組織境界形成および中胚葉遊走の関係について議論する。

2. 結果

2.1 ラパログ添加による riCAM1/2 発現細胞の接着誘導

2.1.1 人工細胞間接着分子 riCAM1/2 の作成

本研究では、*in vivo*において特定の細胞間接着を制御するため、小分子化合物を利用した細胞間接着誘導系の開発を試みた。タンパク質間相互作用を誘導できる様々な小分子化合物は chemical inducers of dimerization (CIDs)と呼ばれ、ラパマイシンもその一種である (Putyrski & Schultz 2012)。ラパマイシンは FK506-binding protein (FKBP) と FKBP12-rapamycin associated protein の FKBP-rapamycin binding domain (FRB) のヘテロ二量体化を引き起こすことが知られている (Kolos *et al.* 2018)。天然のラパマイシンは FKBP と複合体を形成し、さらに細胞の成長や増殖に関わるタンパク質キナーゼである mTOR に結合する (Banaszynski *et al.* 2005)。これにより mTOR の機能が阻害され、免疫の抑制や細胞毒性がもたらされる (Abraham & Wiederrecht 1996)。このような影響を避けるため、本研究ではラパマイシンのアナログ (ラパログ) の一種である AP21967 (C16-(*S*)-7-methylindolerapamycin)を使用した。AP21967 は FRB の結合が阻害されるため細胞毒性を有さないが、変異型の FRB (T2098L)とは特異的に結合することが報告されている (Bayle *et al.* 2006)。

ラパログ依存的な細胞間接着を誘導するため、細胞外ドメインに FKBP あるいは FRB (T2098L)を付加した膜タンパク質を作製した (図 4a)。分泌シグナル、蛍光タンパク質、膜貫通ドメイン、リンカーやペプチドタグを様々な組み合わせで融合させ、ラパログによって細胞間接着を誘導できる機能的なコンストラクトを選別した。その結果、図 4b および図 5 に示す rapalog-induced cell adhesion molecule 1 (riCAM1) と riCAM2 のペアが最も効率的に細胞間接着を誘導した。この膜タンパク質は、ヒト Interleukin-6 (IL-6)遺伝子の分泌シグナル、細胞内局在を可視化するための mCherry あるいは sfGFP、マウス CD28 遺伝子の膜貫通ドメイン、GS リンカー、V5 タグの配列を有する。

具体的なコンストラクトの選定は、Dissociation and reaggregation assay によって行った。4 細胞期にそれぞれのコンストラクトをインジェクションし、Ca/Mg-free medium (CMFM)中で発生させることでカドヘリンによる細胞間接着を阻害した。その後、解離した 2 種類の細胞を同量ずつ回収、混合し、ラパログ依存的に細胞間接着が誘導されるかどうか解析した。CMFM 中の細胞は 240 分が経過しても解離した状態を維

持したが (図 6a)、Ca²⁺を加えた CMFM 中では 30 分でクラスターを形成し、240 分後には大きな凝集体を形成した (図 6b)。同様に、riCAM1/2 を発現している細胞も CMFM 中では解離状態を維持し (図 6d)、Ca²⁺を加えた CMFM 中では凝集体を形成した (図 6e)。これらの結果は、riCAM1/2 の発現はカドヘリンによる細胞間接着に影響を与えないことを示している。また、riCAM1/2 を発現していない細胞では、ラパログ依存的なクラスター形成が見られないことから、ラパログ自体には接着誘導能がないと考えられる (図 6c)。一方、riCAM1/2 発現細胞にラパログを添加したところ、Ca²⁺添加よりも早く (10 分以内) クラスターを形成した (図 6f)。また、このクラスターは 240 分が経過しても、Ca²⁺添加時のような大きな凝集体を形成することはなかった (図 6e および 6f)。これらの結果は、ラパログが riCAM1 および riCAM2 を発現している細胞間の接着を誘導するが、クラスターの大きさは Ca²⁺添加と比して小さくなることを示している。

また、ラパログによる接着の可逆制御が可能かを検討するため、メディウムを交換することでラパログ濃度を 10⁶ 倍希釈した。その結果、細胞が再び解離することはなく、可逆制御は困難であることが示された (図 7)。

2.1.2 ラパログ依存的な接着による checkerboard パターン形成

次に、Ca²⁺とラパログによる接着パターンの違いについて解析した。細胞標識のため、*riCAM1* mRNA と Alexa Fluor 647 (10 kDa)、*riCAM2* mRNA と Alexa Fluor 488 (10kDa) を同時にインジェクションし、Dissociation and reaggregation assay を行った。Ca²⁺添加によるカドヘリン接着の場合、細胞はランダムに接着し、riCAM1—riCAM2 発現細胞間に特徴的な接着パターンは観察されなかった (図 8a-b)。しかし、ラパログ添加により形成されたクラスターでは、riCAM1 発現細胞と riCAM2 発現細胞が主に接着し、checkerboard パターンを形成した (図 8c)。一部、同じ riCAM を発現する細胞が接着している箇所も観察されたが、これは細胞分裂に伴う娘細胞同士の接着であると考えられる (図 8c、矢頭)。また、riCAM1 および riCAM2 のみを発現している細胞集団にラパログを添加してもクラスターは形成されなかった (図 8d-e)。接着パターンをより詳細に解析するために、Ca²⁺あるいはラパログで誘起した細胞間接着の異種性 (riCAM1—riCAM2 発現細胞間の接着)、同種性 (riCAM1 発現細胞同士あるいは riCAM2 発現

細胞同士の接着)の比率を定量した。ラパログで誘起した凝集体では、異種性接着が同種性接着よりも高い割合を示した(図 8g-h)。一方、Ca²⁺によるクラスター形成では、異種性接着と同種性接着の割合に大きな差は見られなかった(図 8f, h)。以上の結果は、カドヘリンによるランダムな接着とは異なり、ラパログは riCAM1—riCAM2 発現細胞間の接着を特異的に誘導することを示している。

2.2 ラパログ添加による riCAM1/2 の細胞接着面への集積

2.2.1 ラパログ依存的な riCAM1/2 の細胞接着面への集積

次に、ラパログ依存的な接着が、riCAM1/2 の細胞内局在にどのような変化を引き起こすか解析を行った。riCAM1/2 を構成する蛍光タンパク質のシグナルを共焦点顕微鏡で観察し、細胞内局在を解析した(図 4b)。CMFM 中では、riCAM1/2 は細胞膜上に一様に分布しており(図 9a)、Ca²⁺添加によりクラスターを形成させても変化は見られなかった(図 9b)。一方、ラパログにより形成されたクラスターでは、riCAM1/2 の細胞接着面への集積が観察された(図 9c)。興味深いことに、一部の細胞では riCAM1 が接着面に強く集積し(図 9c、マゼンタ矢印)、他細胞では riCAM2 が主に接着面に集積していた(図 9c、緑矢印)。集積が強い細胞では、riCAM と一緒にインジェクションした mTurquoise2-CAAX (細胞膜局在型 mTurquoise2) のシグナルが弱い(図 9c、青丸)、riCAM の発現量の差が集積の程度と関係していると推察された。この仮説を検証するため、*riCAM1* と *riCAM2* の mRNA を 1:4 あるいは 4:1 の比率でインジェクションし、ラパログ依存的にクラスターを形成させた。その結果、発現量が多い riCAM は細胞膜上に一様に分布したが(図 9d-e、丸)、発現量が少ない riCAM は細胞接着面に強く集積した(図 9d-e、矢頭)。発現量の少ない riCAM が細胞接着面に集積する一つの可能性として、単体の riCAM は細胞膜上を自由に側方拡散するが、riCAM1/riCAM2 複合体は接着面に繫留される可能性がある。例えば、riCAM1 の発現量が riCAM2 の発現量に比べて十分に少ない場合、ほとんどの riCAM1 は riCAM2 と相互作用し、接着部位に留まる(図 9f)。一方、riCAM2 は、riCAM1 と結合していない単体の riCAM2 が豊富に存在するため、細胞膜全体に分布できると考えられる。以上から、ラパログ誘導下では riCAM1/2 の細胞接着部位への集積が生じ、その集積比率は接着細胞間の riCAM1/2 の発現比率に依存することが明らかとなった。

2.2.2 *in vivo*における riCAM1/2 の細胞接着面への集積

続いて、ラパログによる riCAM1/2 の集積が *in vivo* においても生じるのか解析した。riCAM1 と riCAM2 の mRNA を 4 細胞期の異なる 1 割球の動物極側にインジェクションし、ラパログをステージ 9 において胞胚腔に直接インジェクションした (100 μ M/12nl)。ラパログが発生に与える影響を解析するため、riCAM1 と riCAM2 の mRNA を発現していない胚の胞胚腔にラパログ (100 μ M/12nl) を直接インジェクションしたが、胚発生への影響は観察されなかった (図 10a-b)。riCAM1 と riCAM2 の mRNA 量を 1:4 あるいは 4:1 でインジェクションしたところ、ラパログ非添加条件では riCAM1/2 の集積は観察されなかった (図 10c、e)。一方、ラパログを添加した場合には、riCAM1 発現細胞と riCAM2 発現細胞の接している領域においてのみ riCAM1/2 が集積した (図 10d、f)。集積比に関しては *in vitro* と同様に、発現量の少ない riCAM が接着部位に集積していた (図 10d、f、矢頭)。以上の結果は、*in vivo* においても、ラパログ依存的に riCAM1—riCAM2 発現細胞間の接着を制御できる可能性を示唆している。

2.3 ラパログ依存的な中胚葉遊走の阻害

先行研究より、中胚葉—BCR 間の接着頻度が中胚葉遊走を制御していると考えられているが、接着頻度を直接的に制御した例は報告されていない。そこで本研究では、中胚葉—BCR 間の接着をラパログ依存的に増強し、中胚葉遊走への影響を解析した。まず、8 細胞期において riCAM1 mRNA と fluorescent dye Alexa647 (10 kDa) を動物極側の 4 割球に、riCAM2 mRNA と fluorescent dye Alexa488 (10 kDa) を植物極側の 4 割球にインジェクションした (図 11a)。続いて、ラパログ (100 μ M/6nl) をステージ 9 の胞胚腔にインジェクションし、中胚葉と BCR 間の接着を誘起した。benzyl alcohol/benzyl benzoate (BABB) solutions によって胚を透明化したところ、中胚葉と BCR は効率的に異なる蛍光色素で標識されていた (図 11b-f)。これは、riCAM1 と riCAM2 が BCR と中胚葉で別々に発現していることを示している。原腸陥入期において、前方中胚葉 (緑色組織、矢頭) は BCR (マゼンタ) 上を動物極方向に遊走する (図 11c-e)。最終的に背側中胚葉に隣接した内胚葉と腹側中胚葉は胚の前方で融合し、BCR 上の隙間は消失する

(図 11f、細胞系譜は Sive *et al.* 2000 の Figure 9.4.を参照)。胚に riCAM1/2 を発現させても、ラパログ非添加では中胚葉遊走に影響を与えなかった (図 11g、k)。しかし、riCAM1/2 を発現している胚にラパログを添加したところ、中胚葉遊走は強く阻害され、腹側中胚葉と背側内胚葉は融合しなかった (図 11h、k)。これまでの研究で、BCR 上には PDGF-A といった化学誘引物質や繊維状のフィブロネクチンが存在し、中胚葉遊走の方向性やラメリポディアの伸長に寄与することが知られている (Winklbauer & Keller 1996; Nagel *et al.* 2004; Damm & Winklbauer 2011; Hara *et al.* 2013)。したがって、riCAM1 の発現が BCR 上におけるこれら因子の分布を乱している可能性がある。この可能性を調べるために、*riCAM1* mRNA のみを BCR にインジェクションしラパログを添加したが、中胚葉遊走に影響を及ぼさなかった (図 11i、k)。また、riCAM2 の発現が中胚葉の運動能や化学誘引物質への応答能を阻害している可能性がある。しかし、*riCAM2* mRNA のみを中胚葉にインジェクションした胚にラパログを添加したが、中胚葉は正常に遊走した (図 11j、k)。これらの結果は、中胚葉-BCR 間の接着を特異的に増強すると、中胚葉の遊走が阻害されることを示している。

2.4 中胚葉と BCR 間の接着頻度上昇による中胚葉遊走の阻害

2.4.1 ラパログ添加による Brachet's cleft 形成への影響

中胚葉が BCR 上を遊走する際、両組織間には Brachet's cleft と呼ばれる境界が生じる (Gorny & Steinbeisser 2012)。これまでの研究から、Frizzled-7、PAPC、Eph4 や ANR5 といった分子群が、中胚葉-BCR 間の境界形成に関わることが報告されている (Winklbauer *et al.* 2001; Chung *et al.* 2007; Park *et al.* 2011; Rohani *et al.* 2011; Luu *et al.* 2015)。実際、MO によりこれらの遺伝子をノックダウンすると、Brachet's cleft 形成および中胚葉遊走が強く阻害される。したがって、ラパログにより BCR-中胚葉間の接着を増強させると Brachet's cleft の形成阻害が生じ、結果的に中胚葉遊走を抑制している可能性がある。この可能性を調べるために、fluorescent dye Alexa647 をインジェクションした胚をステージ 11 で BABB により透明化して観察したところ、コントロール胚およびラパログ非添加の riCAM1/2 発現胚では正常な Brachet's cleft が形成された (図 12a、b)。また、riCAM1/2 発現胚にラパログを添加しても境界形成への影響は観察されなかった (図 12c)。

2.4.2 ラパログ依存的な中胚葉-BCR 間の接着頻度の上昇

次に、中胚葉-BCR 間の接着頻度上昇が中胚葉遊走を阻害しているか解析するため、tissue separation assay を行った (図 13a) (Rohani *et al.* 2011)。具体的には、外胚葉のインナーレイヤーあるいは中胚葉細胞を切り出して球状に凝集させたものを BCR 断片上に置き、組織境界面における細胞動態を共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行った。mNeonGreen-CAAX (細胞膜局在型 mNeonGreen) を発現している外胚葉凝集体を、mCherry-CAAX (細胞膜局在型 mCherry) を発現している BCR 上に置いた場合、両組織は密接に接着し、明確な隙間は観察されなかった (図 13b)。また、これまでに報告されているように (Rohani *et al.* 2011)、中胚葉凝集体を BCR 上に置いた場合は、両組織は接着/乖離を繰り返した (図 13c)。riCAM1 と riCAM2 をそれぞれ BCR と中胚葉で独立に発現させた場合も、ラパログ非存在下ではギャップが観察された (図 13d)。しかし、riCAM1/2 発現組織にラパログを添加すると、riCAM1/2 は組織境界の接着面に集積し (図 13b', e')、細胞反発によって生じる組織間の隙間が大幅に減少した (図 13e)。より詳細に接着/乖離頻度を解析するため、中胚葉-BCR 間の接着面をタイムラプス観察し、1 時間に細胞間接着が解消される頻度を測定した。外胚葉-BCR 接着面では、乖離はほとんど観察されなかった (図 13f)。また、ラパログ非存在下では、riCAM1/2 の発現の有無に関わらず、中胚葉-BCR 接着面で高頻度の乖離が観察された一方、riCAM1/2 発現組織にラパログを添加すると、中胚葉-BCR 間の接着は保持され、乖離の頻度は大きく減少した (図 13f)。以上の結果から、中胚葉-BCR 間の接着を特異的に増強することで、両組織間の反発頻度が大幅に減少することが示された。

3. 考察

3.1 ラパログによる人工細胞間接着分子

本研究では、*Xenopus* 初期胚において中胚葉-BCR 間の接着を特異的に増強し、両組織間の接着頻度が中胚葉遊走に及ぼす影響を解析した。これまでも、本研究以外に細胞間接着を制御する様々な手法が開発されている。例えば、HEK293 細胞でのテトラサイクリン誘導によるカドヘリン 1/カドヘリン 3 の発現を介した接着制御がある (Cachat *et al.* 2016)。また、大腸菌では Jun/Fos、nano-body/antigen、光活性化タンパク質間の結合を利用した接着制御が報告されている (Veiga *et al.* 2003; Glass & Riedel-Kruse 2018; Chen & Wegner 2020)。さらに、タンパク質間の結合ではなく、DNA の相補結合や tetrazine/trans-cyclooctene のクリック反応を利用した例も存在する (Teramura *et al.* 2010; Koo *et al.* 2015)。しかしながら、*in vivo* において細胞間接着を制御した例は極めて少ない (Koo *et al.* 2015)。本研究では、FRB および FKBP (T2098L) を利用した人工細胞間接着分子 riCAM1/2 を用いて、ラパログ依存的に異なる組織間の接着を *in vivo* で特異的に誘起する新規実験系の開発を行った。ラパログはこれまでも、転写制御、細胞標識や細胞内シグナル伝達制御といった様々な分野で活用されてきた (Pollock *et al.* 2002; Isaacs *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2014)。しかし、ラパログを細胞間接着制御に利用した例は本研究が初めてである。

中胚葉-BCR 間の接着、乖離のように、細胞間接着の動的な制御は胚発生において重要な役割を果たしている。したがって、ラパログの添加/除去による可逆的な接着制御は、本実験手法をより有用なものとする。しかし、ラパログ依存的なクラスター形成は、ラパログ除去後 4 時間が経過しても、再解離しなかった(図 7a)。この結果と合致して、哺乳類細胞において、ラパログによる二量体形成が薬物を含まない培地に切り替えることで再解離する例は報告されていない。ラパログ依存的な細胞間接着を可逆的に制御する方法の一つに、FKBP に結合してラパマイシンと競合する FK506 を過剰量添加する手法がある。実際、過剰量の FK506 添加による可逆的な制御は複数の研究で報告されているが、二量体を解離させるには数時間を要することが知られている (Stankunas *et al.* 2003; Lee *et al.* 2011)。これ以外にも、FKBP/FRB (T2098L) を改変してラパログに対する結合親和性を低下させる、Cry2/CIB1、iLID や Magnets といった特定の波長により可逆的に二量体を形成する光活性化タンパク質を利用する方法が考

えられる (Krueger *et al.* 2019)。しかし、これらの方法で誘起される細胞間接着は、本手法に比べて接着力が弱く、強い接着擾乱を付与するには適さない可能性がある。

3.2 Ca²⁺とラパログによるクラスターサイズの違い

CMFM によって解離した細胞を再凝集させると、Ca²⁺添加に比べてラパログ依存的なクラスターは小さな凝集体を形成した (6b, f)。このようなクラスターサイズの違いが生じる原因として、以下に示す少なくとも2つの可能性が考えられる。第1に、カドヘリンを介した細胞間接着は全細胞間で等しく生じるが、ラパログによる接着は riCAM1—riCAM2 発現細胞間でのみ誘導される。さらに、分裂した娘細胞同士は同種の riCAM を発現するため、分裂後に解離する。したがって、ラパログを介した接着はカドヘリンと比較して大きな凝集体を形成しづらい可能性が高い。第2に、皮質張力への寄与の違いがある。カドヘリンによる接着は、アクチン収縮を介して細胞の皮質張力に影響を与えることが報告されている (Lecuit & Yap 2015; Winklbauer 2015)。例えば、カドヘリンを介した細胞—細胞接着面における皮質は、細胞-培地境界と比べて減少する (Fagotto 2014)。従って、細胞接着面の界面張力が低く、細胞-培地境界面での表面張力が高いことが、球状凝集体の形成を促している可能性がある。一方、riCAM1/2 はカドヘリンのようなアクチン骨格制御に関わる細胞内ドメインを有していないため、球状の大きな凝集体を形成できない可能性がある。細胞同士の接着パターンや皮質張力への影響の違いが、凝集体サイズの差異を生じさせると考えられる。

3.3 細胞間接着頻度による中胚葉の遊走制御

本研究では、riCAM1 を発現する BCR と riCAM2 を発現する中胚葉の接着頻度をラパログによって上昇させると、中胚葉の遊走が強く阻害されることを明らかにした (図 11、13)。これまでの研究から、両組織間の接着頻度に関与する Eph/ephrin や C-カドヘリンをノックダウンすると、原腸形成運動が阻害されることが知られている (Park *et al.* 2011; Rohani *et al.* 2011; Ninomiya *et al.* 2012)。しかしながら、これらの遺伝子は BCR と中胚葉の機能維持にも関与するため、原腸形成運動の阻害が両組織間の接着頻度の乱れに起因するか、あるいは両組織の機能異常に起因するか明らかではない。一方、我々が開発した方法は同種の riCAM を発現する細胞間では接着が誘起されない(図 8d、

e)。riCAM1 と riCAM2 は BCR と中胚葉で別々に発現していたため、ラパログは両組織内の細胞間接着にはほとんど影響を及ぼさない。また、riCAM1/2 はカドヘリンとは異なり、細胞内に機能ドメインを有さないため、細胞骨格・皮質張力に直接影響を与えることなく組織間の接着を増強することが可能である。したがって、本研究結果は中胚葉と BCR の接着頻度が中胚葉遊走を制御するというモデルをより強く直接的に支持するものである。

3.4 細胞間接着の増強と Brachet's cleft 形成

本研究では、中胚葉－BCR 間の接着亢進により中胚葉遊走が阻害されたが、Brachet's cleft の形成には異常が見られなかった。先行研究により、Eph/ephrin の反発シグナルの阻害は、Brachet's cleft の形成不全を引き起こすことが報告されている (Rohani *et al.* 2011)。また、Frizzled-7、PAPC や xANR5 といった組織分離に関わる遺伝子のノックダウンも、Brachet's cleft の形成を阻害する (Winklbaauer *et al.* 2001; Chung *et al.* 2007; Park *et al.* 2011; Rohani *et al.* 2011; Luu *et al.* 2015)。従って、ラパログによる中胚葉－BCR 間の接着増強が境界形成に影響を与えないことは興味深い (図 12a-c)。この原因の一つとして、両組織間の接着／乖離を介したネガティブフィードバック制御が考えられる。細胞間接着は接着面をより大きくする駆動力として働くが、同時に Eph/ephrin を介した反発シグナルを誘発する。反発シグナルの上昇は細胞間接着を阻害し、組織間にギャップを生じさせる。その結果、反発シグナルは低下し、細胞は再び接着が可能となる。Eph/ephrin を MO により抑制した場合、中胚葉細胞が BCR 内へ浸潤しても反発作用が適切に機能しなくなる。したがって、BCR-中胚葉間の細胞混合が生じ、境界は形成されなくなる。一方、ラパログによって組織間の接着を亢進させても、間接的に Eph/ephrin を介して反発作用も増強するため、中胚葉と BCR の細胞混合は生じないと考えられる。ラパログは BCR と中胚葉の接着頻度を増加させるが、中胚葉が BCR 内に浸潤するには、さらに反発シグナルの抑制が必要であることを示唆している。これらの結果は、Eph/ephrin のノックダウンと比べて、C-カドヘリンの過剰発現が Brachet's cleft の形成に及ぼす影響が軽微であることと一致する (Lee & Gumbiner 1995; Park *et al.* 2011; Rohani *et al.* 2011)。

3.5 結論と展望

本研究では、riCAM1 と riCAM2 を発現する組織間の接着を、両組織内の細胞間接着・皮質張力に影響を与えることなく、ラパログ依存的に増強する新規手法を開発した。さらに、アフリカツメガエル胚の BCR と中胚葉に本手法を適用することで、両組織間の接着頻度が中胚葉の遊走を制御していることを明らかにした。このような動的な細胞間接着は、シナプス形成、上皮間葉転換 (EMT)、細胞集団運動や収斂伸長運動など、様々な発生プロセスに関与することが知られている (Washbourne *et al.* 2004; Tada & Heisenberg 2012; Theveneau & Mayor 2012; Nieto *et al.* 2016)。未だ可逆制御など改良の余地は残されているが、本方法を用いた接着擾乱の付与が、発生過程における動的な接着制御の理解に貢献すると考えている。

4. 実験手法

4.1 採卵およびインジェクション

ピグメントあるいはアルビノのアフリカツメガエル *Xenopus laevis* の成熟メスにゴナトロピンを注射することで排卵を誘発し、1.3x Barth's medium (13 mM HEPES-NaOH/pH 7.4, 114.4 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 0.533 mM CaCl₂, 0.429 mM Ca(NO₃)₂, 1.066 mM MgSO₄, 3.12 mM NaHCO₃)で懸濁した精子と *in vitro* で受精させた。mRNA は mMESSAGE mMACHINE SP6 Kit (AM1340; Invitrogen)を使用して *in vitro* で合成した。mRNA、Alexa fluorescent dye およびラパログ ((635055; A/C Heterodimerizer (AP21967); Takara Bio Inc.)のインジェクションには needle puller (PC-10; Narishige)で成型したガラスキャピラリー (GC-1; Narishige)を使用した。

4.2 プラスミド合成

riCAM1/2 を構成するドメインは、隣接するドメインと重複する配列を含むプライマーを用い、PCR により増幅した。PCR 産物は pCS2+の BamHI サイトと XbaI サイト間に MUPAC (Multiple Site-Directed and Saturation Mutagenesis by the Patch Cloning Method) (Taniguchi & Murakami 2017)を用いて挿入した。FKBP と FRB (T2098L)の増幅のテンプレートには、それぞれ p-Het-Mem1 (635067; Takara Bio Inc.)と p-Het-1 (635067; Takara Bio Inc.)を使用した。シグナルペプチドはヒト Interleukin-6 遺伝子のシグナル配列、膜貫通ドメインはマウス CD28 遺伝子の膜貫通ドメインである。両コンストラクトの配列を図5に示す。

4.3 Dissociation and reaggregation assay

riCAM1/2 mRNA (150pg)を4細胞期の動物極側にインジェクションし、カドヘリンによる細胞間接着を阻害するため、CMFM (7.5 mM Tris-HCl/pH7.6, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃)中でステージ11まで発生させた。ステージの判断には通常メディウム (0.1x Barth's solution)で発生させた胚を使用した。riCAM を発現している細胞は、動物極側のビテリン膜をピンセットで破ることにより回収した。アガロースコートした4ウェルディッシュに0.1% bovine serum albumin (BSA)/CMFM、0.1%BSA/4 mM CaCl₂/CMFM、0.1%BSA/0.5μM ラパログ/CMFMを入れ、riCAM1

発現細胞と riCAM2 発現細胞を同量ずつ混合したのち、細胞の凝集を促進するためにシェイカーで回転させた (80rpm)。観察と撮影には実体顕微鏡 SZX16 (Olympus)、デジタルカメラ DP80 (Olympus)を使用した。

4.4 riCAM1/2 発現細胞の接着パターンの観察

riCAM1/2 mRNA (150pg) と Alexa Fluor 647/488-dextran (D22914/ D22910; Invitrogen) (2.5ng) を 4 細胞期の動物極側にインジェクションして Dissociation and reaggregation assay を行い、30 分後に蛍光実体顕微鏡 BZ-X710 (Keyence)、20× objective (S_PlanFluor_ELWD_ADM 20xC; Nikon) (図 8a-e) および共焦点顕微鏡 SP8 (Leica)、20× objective (HC PL APO CS2 20x/0.75 DRY; Leica) (図 8f、g) を用いて画像を取得した。接着パターンの画像解析には単一平面の共焦点画像を使用し、明らかに接着している 2 細胞が発現している riCAM の種類を判別した。接着パターンはヘテロタイプ的な接着 (異なる riCAM を発現している細胞同士の接着) とホモタイプ的な接着 (同じ riCAM を発現している細胞同士の接着) の 2 種類に分類した。

4.5 *in vitro* での riCAM1/2 の集積の観察

riCAM1/2 mRNA (60pg、150pg、240pg) と *mTurquoise2-CAAX* mRNA (150 pg) を 4 細胞期の動物極側にインジェクションして Dissociation and reaggregation assay を行い、30 分後に共焦点顕微鏡 SP8 (Leica)、20× objective (HC PL APO CS2 20x/0.75 DRY; Leica) を用いて画像を取得した。

4.6 *in vivo* での riCAM1/2 の集積の観察

riCAM1/2 mRNA (60pg、240pg) を 4 細胞期の異なる割球の動物極側にインジェクションした。ステージ 9 でラパログ (100 μ M/12nl) を胞胚腔にインジェクションし、ステージ 11 でのアニマルキャップの共焦点画像を共焦点顕微鏡 SP8 (Leica)、20× objective (HC PL APO CS2 20x/0.75 DRY; Leica) を用いて取得した。

4.7 中胚葉の遊走の観察と定量

8 細胞期において、*riCAM1* mRNA (150 pg) と Alexa Fluor 647-dextran (2.5 ng) を動

物極側の4割球に、*riCAM2* mRNA (150 pg) と Alexa Fluor 488-dextran (5 ng)を植物極側の4割球にインジェクションした。ステージ9でラパログ (100 μ M/6nl)を胞胚腔にインジェクションし、ステージ13まで0.1x Barth's solution で発生させた後、2% トリクロロ酢酸(TCA) と 9.25%ホルムアルデヒドを用いて室温で一晩固定した。メタノールで脱水と脱脂処理を行い、ベンジルアルコールと安息香酸ベンジルの混合液(BABB)で透明化した (Dent *et al.* 1989)。撮影には共焦点顕微鏡 SP8 (Leica)、10 \times objective (HC PL APO CS2 10x/0.40 DRY; Leica)を使用した。胚の直径および腹側中胚葉と背側中胚葉の先端間の円弧長は ImageJ を用いて計測した。統計処理には GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.)を使用した。

4.8 Brachet's cleft 形成の観察

8細胞期において、*riCAM1* mRNA (150 pg)と Alexa Fluor 647-dextran (2.5 ng)を動物極側の4割球に、*riCAM2* mRNA (150 pg) と Alexa Fluor 647-dextran (2.5 ng)を植物極側の4割球にインジェクションした。ステージ9でラパログ (100 μ M/6nl)を胞胚腔にインジェクションし、ステージ11まで0.1x Barth's solution で発生させた後、上記と同様に固定、脱水、脱脂、透明化を行った。撮影には共焦点顕微鏡 SP8 (Leica)、40 \times objective (HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL; Leica)を使用した。

4.9 Tissue separation assay

Rohani *et al.* 2011 を参考に行った。8細胞期において、*mCherry-CAAX*、*mNeonGreen-CAAX*、*riCAM1* あるいは *riCAM2* mRNA (150pg)を、中胚葉で発現させる場合には植物極側の4割球に、BCR で発現させる場合には動物極側の4割球にインジェクションした。ステージ11において、中胚葉あるいは BCR のインナーレイヤーを切り出し、BCR の断片上に置いた。BCR の巻き込みを防ぐため、サンプルはスライドガラスと BSA コートしたカバーガラスの間にマウントした。ガラスの間にシリコングリース (G-40L; Shin-Etsu Silicone)とマスキングテープを挟み、サンプルの厚さを一定にした。ラパログは 1.5 μ M で添加した。45分後から、5分間隔で1時間タイムラプス観察を行った。撮影には共焦点顕微鏡 SP8 (Leica)、40 \times objective (HC PL APO CS2 40x/1.10 WATER; Leica)を使用した。接着頻度の定量のため、観察開始時点で中胚葉あるいは BCR のイ

ンナーレイヤーと接着していた BCR 断片の細胞が乖離した回数を計測した。2 つの細胞が同時に BCR 細胞に接着していた場合、それぞれの乖離を独立に計測した。一度乖離した細胞が再び接着して乖離した場合もカウントした。観察中に分裂した細胞およびフォーカスが合わなくなった細胞は計測から除外している。

5. 謝辞

指導教官の猪股秀彦先生に深く感謝いたします。博士後期課程から研究室に所属し、右も左もわからなかった自分に、実験の組み立て、結果の解釈、プレゼンテーションに至るまで、一から根気強くご指導いただきました。

主査の西田宏記先生と副査の松野健治先生には、1年次からの研究報告会や予備審査において有意義な質問やコメントを数多く頂戴しました。大変感謝しております。

理化学研究所の体軸動態研究チームの皆様には大変お世話になりました。特に新實香緒里さん、金村節子さんには実験手法や顕微鏡の使い方について非常に丁寧にご指導いただいたおかげで、本研究のデータを得ることができました。梅垣陽子さんには日々のカエルのお世話をしていただき、大変助かりました。

同じく理化学研究所の森下喜弘先生には何度も研究の相談に乗っていただき、その度に非常に有益なコメントを頂戴しました。心より感謝しております。

最後に、4年間温かく見守ってくれた家族に感謝の意を表し、謝辞といたします。

6. 引用文献

1. Abraham, R.T. & Wiederrecht, G.J. (1996) Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* **14**, 483-510.
2. Amack, J.D. & Manning, M.L. (2012) Knowing the boundaries: extending the differential adhesion hypothesis in embryonic cell sorting. *Science* **338**, 212-215.
3. Banaszynski, L.A., Liu, C.W. & Wandless, T.J. (2005) Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *J Am Chem Soc* **127**, 4715-4721.
4. Bayle, J.H., Grimley, J.S., Stankunas, K., Gestwicki, J.E., Wandless, T.J. & Crabtree, G.R. (2006) Rapamycin analogs with differential binding specificity permit orthogonal control of protein activity. *Chem Biol* **13**, 99-107.
5. Brodland, G.W. (2002) The Differential Interfacial Tension Hypothesis (DITH): a comprehensive theory for the self-rearrangement of embryonic cells and tissues. *J Biomech Eng* **124**, 188-197.
6. Cachat, E., Liu, W., Martin, K.C., Yuan, X., Yin, H., Hohenstein, P. & Davies, J.A. (2016) 2- and 3-dimensional synthetic large-scale de novo patterning by mammalian cells through phase separation. *Sci Rep* **6**, 20664.
7. Cayuso, J., Xu, Q. & Wilkinson, D.G. (2015) Mechanisms of boundary formation by Eph receptor and ephrin signaling. *Dev Biol* **401**, 122-131.
8. Chen, F. & Wegner, S.V. (2020) Blue-Light-Switchable Bacterial Cell-Cell Adhesions Enable the Control of Multicellular Bacterial Communities. *ACS Synth Biol* **9**, 1169-1180.
9. Chung, H.A., Yamamoto, T.S. & Ueno, N. (2007) ANR5, an FGF target gene product, regulates gastrulation in *Xenopus*. *Curr Biol* **17**, 932-939.
10. Cooke, J.E., Kemp, H.A. & Moens, C.B. (2005) EphA4 is required for cell adhesion and rhombomere-boundary formation in the zebrafish. *Curr Biol* **15**, 536-542.
11. Cousin, H. (2017) Cadherins function during the collective cell migration of *Xenopus* Cranial Neural Crest cells: revisiting the role of E-cadherin. *Mech Dev* **148**, 79-88.
12. Damm, E.W. & Winklbauer, R. (2011) PDGF-A controls mesoderm cell orientation and radial intercalation during *Xenopus* gastrulation. *Development* **138**, 565-575.
13. Davidson, L.A., Hoffstrom, B.G., Keller, R. & DeSimone, D.W. (2002) Mesendoderm extension and mantle closure in *Xenopus laevis* gastrulation: combined roles for integrin alpha(5)beta(1), fibronectin, and tissue geometry. *Dev Biol* **242**, 109-129.
14. Dent, J.A., Polson, A.G. & Klymkowsky, M.W. (1989) A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. *Development* **105**, 61-74.
15. Durbin, L., Brennan, C., Shiomi, K., Cooke, J., Barrios, A., Shanmugalingam, S., Guthrie, B., Lindberg, R. & Holder, N. (1998) Eph signaling is required for segmentation and

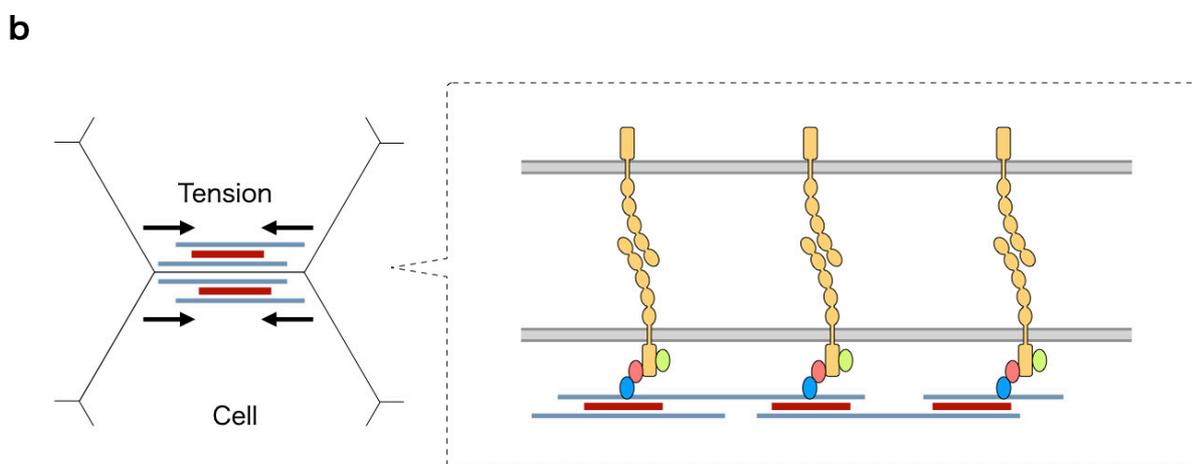
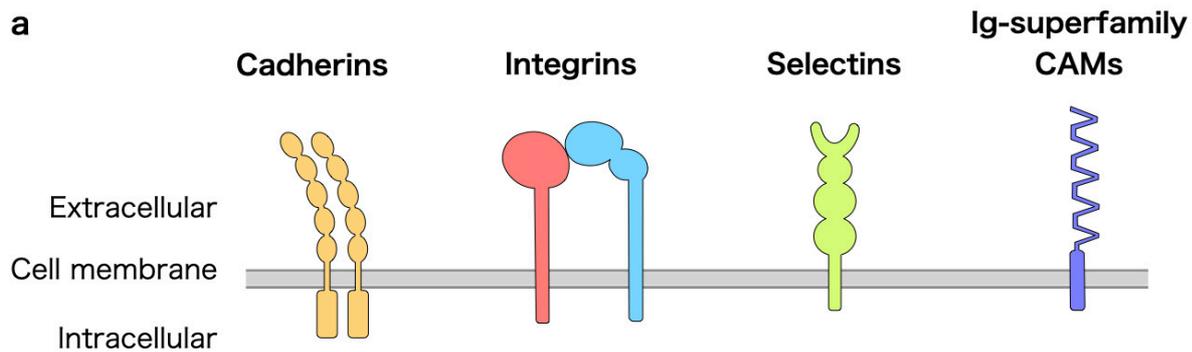
- differentiation of the somites. *Genes Dev* **12**, 3096-3109.
16. Evren, S., Wen, J.W., Luu, O., Damm, E.W., Nagel, M. & Winklbauer, R. (2014) EphA4-dependent Brachyury expression is required for dorsal mesoderm involution in the *Xenopus* gastrula. *Development* **141**, 3649-3661.
 17. Fagotto, F. (2014) The cellular basis of tissue separation. *Development* **141**, 3303-3318.
 18. Fagotto, F., Rohani, N., Touret, A.S. & Li, R. (2013) A molecular base for cell sorting at embryonic boundaries: contact inhibition of cadherin adhesion by ephrin/ Eph-dependent contractility. *Dev Cell* **27**, 72-87.
 19. Fukui, A., Goto, T., Kitamoto, J., Homma, M. & Asashima, M. (2007) SDF-1 alpha regulates mesendodermal cell migration during frog gastrulation. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 472-477.
 20. Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. & Morata, G. (1973) Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* **245**, 251-253.
 21. Glass, D.S. & Riedel-Kruse, I.H. (2018) A Synthetic Bacterial Cell-Cell Adhesion Toolbox for Programming Multicellular Morphologies and Patterns. *Cell* **174**, 649-658.e616.
 22. Gorny, A.K. & Steinbeisser, H. (2012) Brachet's cleft: a model for the analysis of tissue separation in *Xenopus*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**, 294-300.
 23. Hara, Y., Nagayama, K., Yamamoto, T.S., Matsumoto, T., Suzuki, M. & Ueno, N. (2013) Directional migration of leading-edge mesoderm generates physical forces: Implication in *Xenopus* notochord formation during gastrulation. *Dev Biol* **382**, 482-495.
 24. Huang, Y. & Winklbauer, R. (2018) Cell migration in the *Xenopus* gastrula. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **7**, e325.
 25. Isaacs, H.V., Deconinck, A.E. & Pownall, M.E. (2007) FGF4 regulates blood and muscle specification in *Xenopus laevis*. *Biol Cell* **99**, 165-173.
 26. Janiszewska, M., Primi, M.C. & Izzard, T. (2020) Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem* **295**, 2495-2505.
 27. Kolos, J.M., Voll, A.M., Bauder, M. & Hausch, F. (2018) FKBP Ligands-Where We Are and Where to Go? *Front Pharmacol* **9**, 1425.
 28. Koo, H., Choi, M., Kim, E., Hahn, S.K., Weissleder, R. & Yun, S.H. (2015) Bioorthogonal Click Chemistry-Based Synthetic Cell Glue. *Small* **11**, 6458-6466.
 29. Krueger, D., Izquierdo, E., Viswanathan, R., Hartmann, J., Pallares Cartes, C. & De Renzis, S. (2019) Principles and applications of optogenetics in developmental biology. *Development* **146**.
 30. Lecuit, T. & Yap, A.S. (2015) E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nat Cell Biol* **17**, 533-539.
 31. Lee, C.H. & Gumbiner, B.M. (1995) Disruption of gastrulation movements in *Xenopus* by a

- dominant-negative mutant for C-cadherin. *Dev Biol* **171**, 363-373.
32. Lee, H.S., Nishanian, T.G., Mood, K., Bong, Y.S. & Daar, I.O. (2008) EphrinB1 controls cell-cell junctions through the Par polarity complex. *Nat Cell Biol* **10**, 979-986.
 33. Lee, K.B., Hwang, J.M., Choi, I.S., Rho, J., Choi, J.S., Kim, G.H., Kim, S.I., Kim, S. & Lee, Z.W. (2011) Direct monitoring of the inhibition of protein-protein interactions in cells by translocation of PKC δ fusion proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 1314-1317.
 34. Leptin, M. (2005) Gastrulation movements: the logic and the nuts and bolts. *Dev Cell* **8**, 305-320.
 35. Luu, O., Damm, E.W., Parent, S.E., Barua, D., Smith, T.H., Wen, J.W., Lepage, S.E., Nagel, M., Ibrahim-Gawel, H., Huang, Y., Bruce, A.E. & Winklbauer, R. (2015) PAPC mediates self/non-self-distinction during Snail1-dependent tissue separation. *J Cell Biol* **208**, 839-856.
 36. Montero, J.A. & Heisenberg, C.P. (2004) Gastrulation dynamics: cells move into focus. *Trends Cell Biol* **14**, 620-627.
 37. Nagel, M., Tahinci, E., Symes, K. & Winklbauer, R. (2004) Guidance of mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula requires PDGF signaling. *Development* **131**, 2727-2736.
 38. Nava, P., Kamekura, R. & Nusrat, A. (2013) Cleavage of transmembrane junction proteins and their role in regulating epithelial homeostasis. *Tissue Barriers* **1**, e24783.
 39. Niessen, C.M., Leckband, D. & Yap, A.S. (2011) Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev* **91**, 691-731.
 40. Nieto, M.A., Huang, R.Y., Jackson, R.A. & Thiery, J.P. (2016) EMT: 2016. *Cell* **166**, 21-45.
 41. Ninomiya, H., David, R., Damm, E.W., Fagotto, F., Niessen, C.M. & Winklbauer, R. (2012) Cadherin-dependent differential cell adhesion in *Xenopus* causes cell sorting in vitro but not in the embryo. *J Cell Sci* **125**, 1877-1883.
 42. Park, E.C., Cho, G.S., Kim, G.H., Choi, S.C. & Han, J.K. (2011) The involvement of Eph-Ephrin signaling in tissue separation and convergence during *Xenopus* gastrulation movements. *Dev Biol* **350**, 441-450.
 43. Pollock, R., Giel, M., Linher, K. & Clackson, T. (2002) Regulation of endogenous gene expression with a small-molecule dimerizer. *Nat Biotechnol* **20**, 729-733.
 44. Putyrski, M. & Schultz, C. (2012) Protein translocation as a tool: The current rapamycin story. *FEBS Lett* **586**, 2097-2105.
 45. Reintsch, W.E., Habring-Mueller, A., Wang, R.W., Schohl, A. & Fagotto, F. (2005) beta-Catenin controls cell sorting at the notochord-somite boundary independently of cadherin-mediated adhesion. *J Cell Biol* **170**, 675-686.
 46. Rohani, N., Canty, L., Luu, O., Fagotto, F. & Winklbauer, R. (2011) EphrinB/EphB signaling controls embryonic germ layer separation by contact-induced cell detachment. *PLoS Biol* **9**,

- e1000597.
47. Rohani, N., Parmeggiani, A., Winklbauer, R. & Fagotto, F. (2014) Variable combinations of specific ephrin ligand/Eph receptor pairs control embryonic tissue separation. *PLoS Biol* **12**, e1001955.
 48. Shindo, A. (2018) Models of convergent extension during morphogenesis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **7**.
 49. Sive, H.L., Grainger, R.M. & Harland, R.M. (2000) Fate Mapping and Lineage Labeling. In: *Early Development of Xenopus laevis A Laboratory Manual* (pp. 143-162. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 50. Stankunas, K., Bayle, J.H., Gestwicki, J.E., Lin, Y.M., Wandless, T.J. & Crabtree, G.R. (2003) Conditional protein alleles using knockin mice and a chemical inducer of dimerization. *Mol Cell* **12**, 1615-1624.
 51. Steinberg, M.S. (2007) Differential adhesion in morphogenesis: a modern view. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 281-286.
 52. Tada, M. & Heisenberg, C.P. (2012) Convergent extension: using collective cell migration and cell intercalation to shape embryos. *Development* **139**, 3897-3904.
 53. Takeichi, M. (1988) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* **102**, 639-655.
 54. Taniguchi, N. & Murakami, H. (2017) Multiple Site-Directed and Saturation Mutagenesis by the Patch Cloning Method. *Methods Mol Biol* **1498**, 339-347.
 55. Teramura, Y., Chen, H., Kawamoto, T. & Iwata, H. (2010) Control of cell attachment through polyDNA hybridization. *Biomaterials* **31**, 2229-2235.
 56. Theveneau, E. & Mayor, R. (2012) Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol* **366**, 34-54.
 57. Veiga, E., de Lorenzo, V. & Fernández, L.A. (2003) Autotransporters as scaffolds for novel bacterial adhesins: surface properties of Escherichia coli cells displaying Jun/Fos dimerization domains. *J Bacteriol* **185**, 5585-5590.
 58. Wallingford, J.B., Sater, A.K., Uzman, J.A. & Danilchik, M.V. (1997) Inhibition of morphogenetic movement during Xenopus gastrulation by injected sulfatase: implications for anteroposterior and dorsoventral axis formation. *Dev Biol* **187**, 224-235.
 59. Washbourne, P., Dityatev, A., Scheiffele, P., Biederer, T., Weiner, J.A., Christopherson, K.S. & El-Husseini, A. (2004) Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci* **24**, 9244-9249.
 60. Winklbauer, R. (2015) Cell adhesion strength from cortical tension - an integration of concepts. *J Cell Sci* **128**, 3687-3693.
 61. Winklbauer, R. & Keller, R.E. (1996) Fibronectin, mesoderm migration, and gastrulation in

Xenopus. *Dev Biol* **177**, 413-426.

62. Winklbauer, R., Medina, A., Swain, R.K. & Steinbeisser, H. (2001) Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature* **413**, 856-860.
63. Yamada, S. & Nelson, W.J. (2007) Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **178**, 517-527.
64. Zhang, X., Deng, Y., Chang, H., Ji, C., Zhang, M., Peng, J., Xu, T. & Xu, P. (2014) The specific and rapid labeling of cell surface proteins with recombinant FKBP-fused fluorescent proteins. *Protein Cell* **5**, 800-803.



- p120-Catenin
- β -Catenin
- α -Catenin
- F-actin
- Myosin- II minifilaments

図1. 細胞間接着分子

(a) カドヘリン、インテグリン、セレクチン、免疫グロブリンの模式図。(b) カドヘリンは複数のカテニンタンパク質を介してアクチンフィラメントと結合し、細胞の張力に影響する。

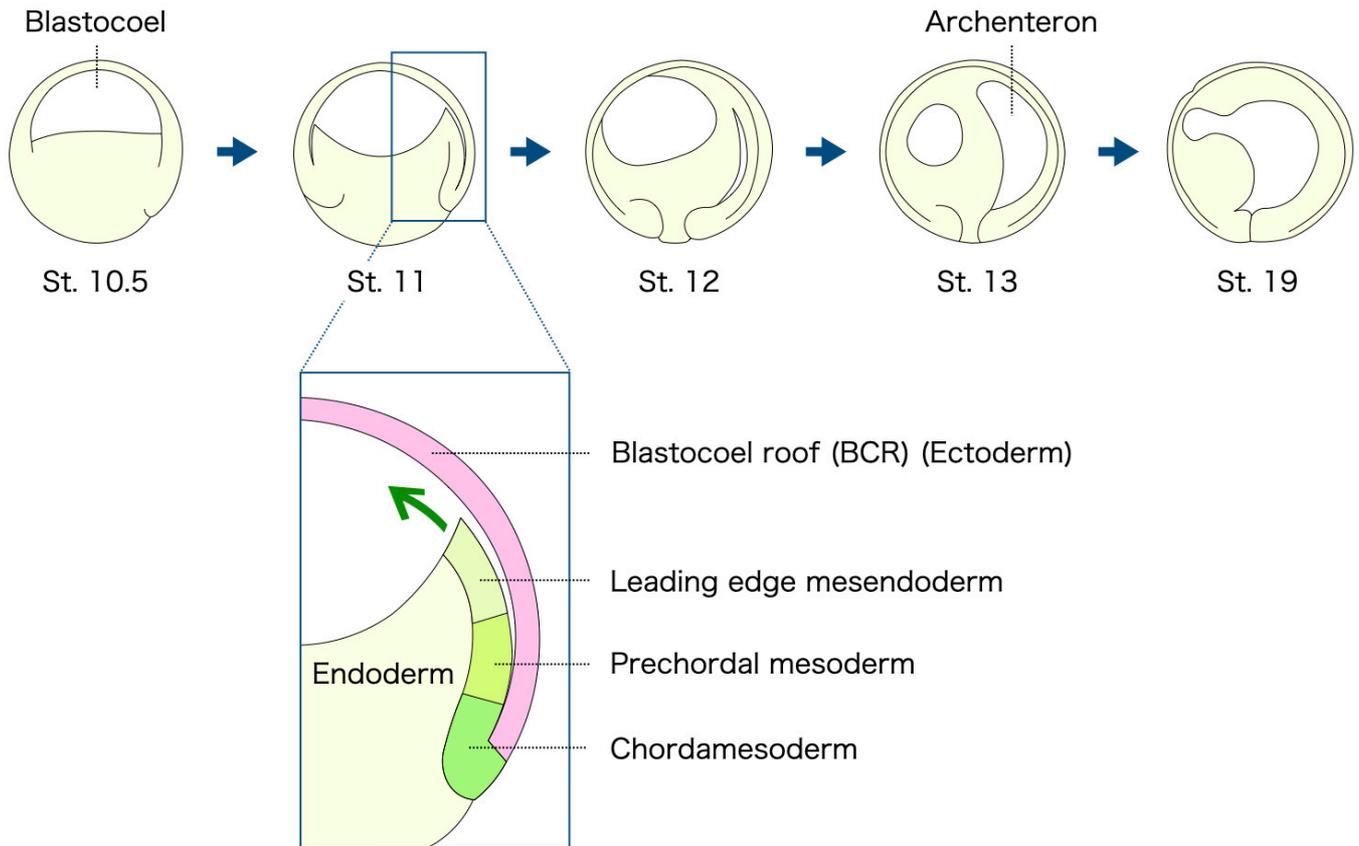


図2. アフリカツメガエル胚の原腸形成過程

原腸形成過程において、leading edge mesendoderm、prechordal mesoderm、chordamesodermはblastocoel roof (BCR)上を動物極方向へ遊走する。

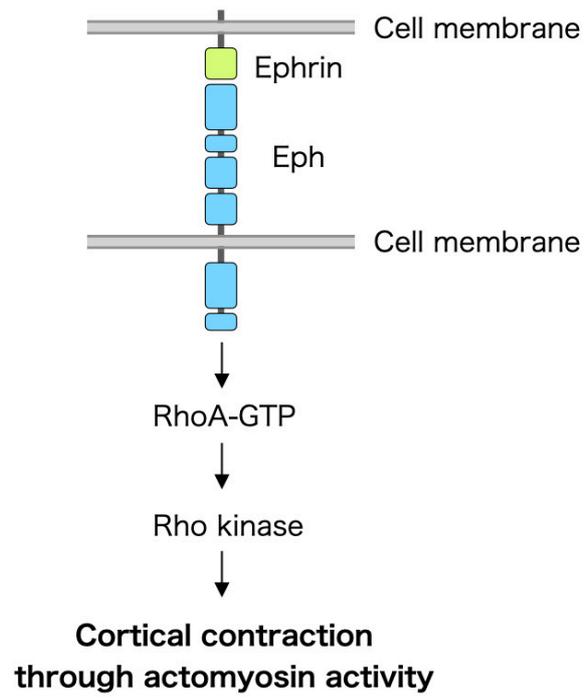


図3. Eph/Ephrinシグナルを介した皮質収縮

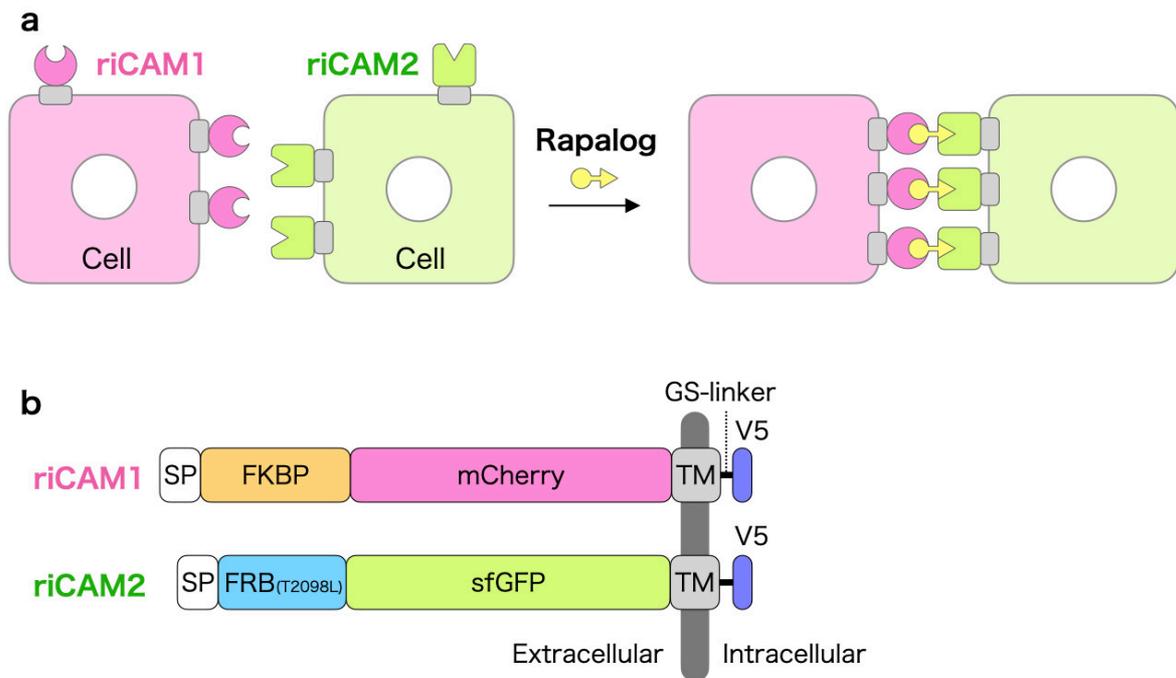


図4. riCAM; rapalog-induced cell adhesion molecule

(a) ラパログによる細胞間接着誘導の模式図。ラパログによって誘導されたriCAM1/2の二量体化により細胞が接着する。(b) riCAM1およびriCAM2の構造。SPはシグナルペプチド、TMは膜貫通ドメイン、V5はV5タグ。

riCAM1

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGCCTGCTCCTGGTGTTCCTG
 CTGCCCTCCCTGCCCAAGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCAAGCG
 CGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAATTTGATTCTCCCGGGAC
 AGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCC
 AGATGAGTGTGGGTGAGAGGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCC
 AGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACCTGGAAATGGTGAGCAAG
 GCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGA
 ACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCAGACCGCCAAGCT
 GAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCCTGGGACATCCTGTCCCTCAGTTCATGTACGGCTCC
 AAGGCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGT
 GGGAGCGCTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCCCTGCAGGACGG
 CGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAG
 ACCATGGGTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGC
 AGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCC
 CGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACC
 ATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAGC
 TGTTTTGGGCACTGGTTCGTGGTTGCTGGAGTCTGTTTTGTTATGGCTTGCTAGTGACAGTGGCTCTTTG
 TGTATCTGGACAAATAGTAGAAGGAACAGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGGTGGAGGTTTCGTCC
 GGAGGC

riCAM2

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGCCTGCTCCTGGTGTTCCTG
 CTGCCCTCCCTGCCCAATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTGTA
 CTTTGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCCTTCATGCTATGATGGAACGGGGC
 CCCAGACTCTGAAGGAAACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCAAGAGTGGT
 GCAGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCAAGGACCTCTCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTT
 CCGACGAATCTCAAAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAG
 CTGGACGGCGAGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGCCTGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCAACGGCA
 AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGACCCACCGCAAGCTGCCCGTCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCT
 GACCTACCGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGTCCGCC
 ATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTCTTTCAAGGACGACGGCACCTACAAGACCCGCGCCG
 AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGG
 CAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTTTAACAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAG
 AAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACGTTGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACC
 ACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCCTACCTGAGCACCCA
 GTCCGTCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
 GGGATCACTCATGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAGCTGTTTTGGGCACTGGTTCGTGGTTGCTGGAGTCC
 TGTTTTGTATGGCTTGCTAGTGACAGTGGCTCTTTGTGTTATCTGGACAAATAGTAGAAGGAACAGAGG
 TGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGGTGGAGGTTTCGTCCGGAGGC

- | | |
|---|--|
|  Signal peptide of human Interleukin-6 |  V5 |
|  FKBP |  FRB |
|  mCherry |  T2098L |
|  Transmembrane domain of mouse CD28 |  sfGFP |
|  GS-linker | (a valine codon was inserted after the start codon) |

図5. riCAM1、riCAM2の遺伝子配列

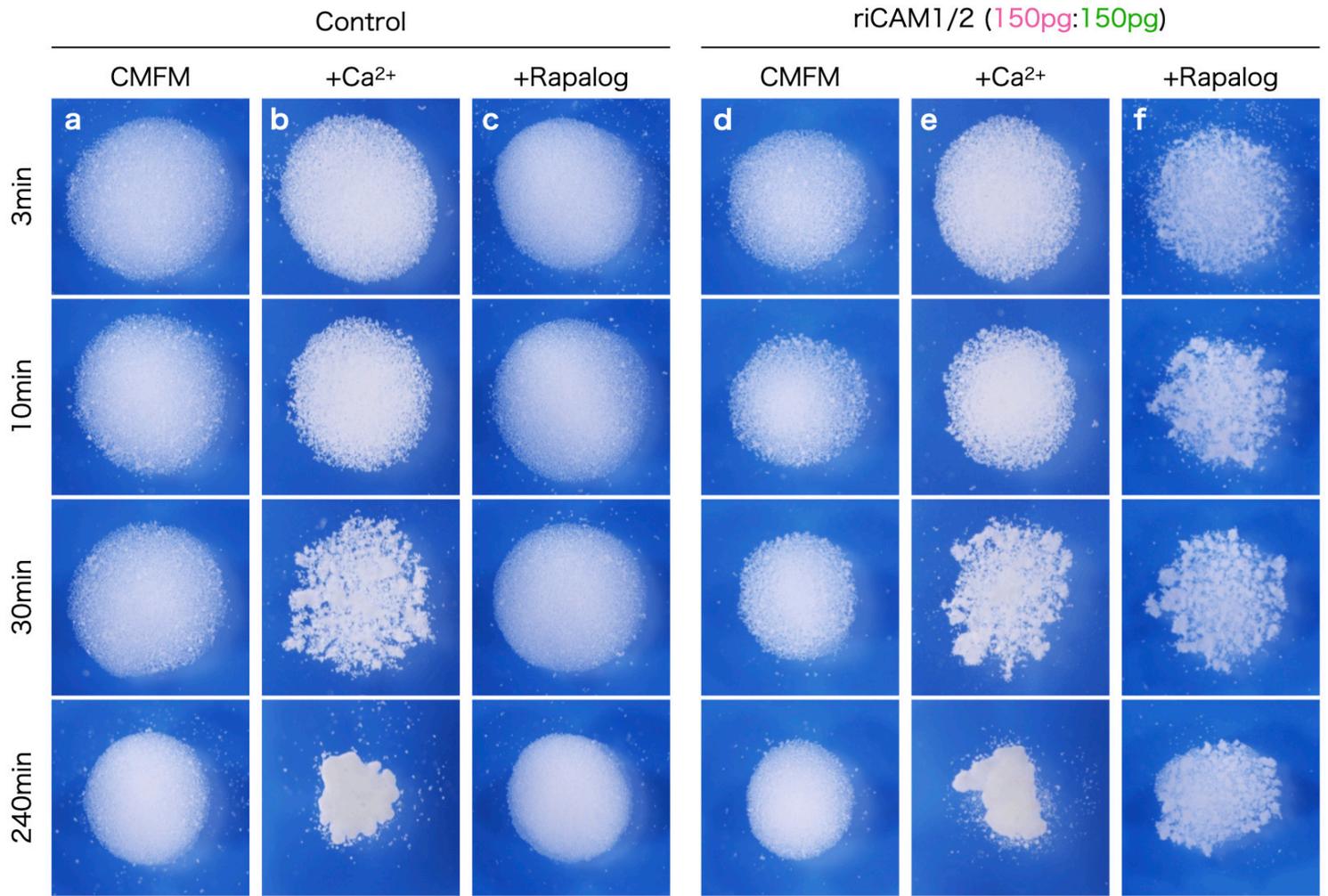


図6. Dissociation and reaggregation assay

riCAM1/2 mRNA (150pg)を4細胞期の動物極側にインジェクションし、回収した細胞をCMFM (Ca²⁺/Mg²⁺-free medium) (a、d)、4mM CaCl₂を含むCMFM (b、e)、0.5μM ラパログを含むCMFM (c、f)中で培養した。

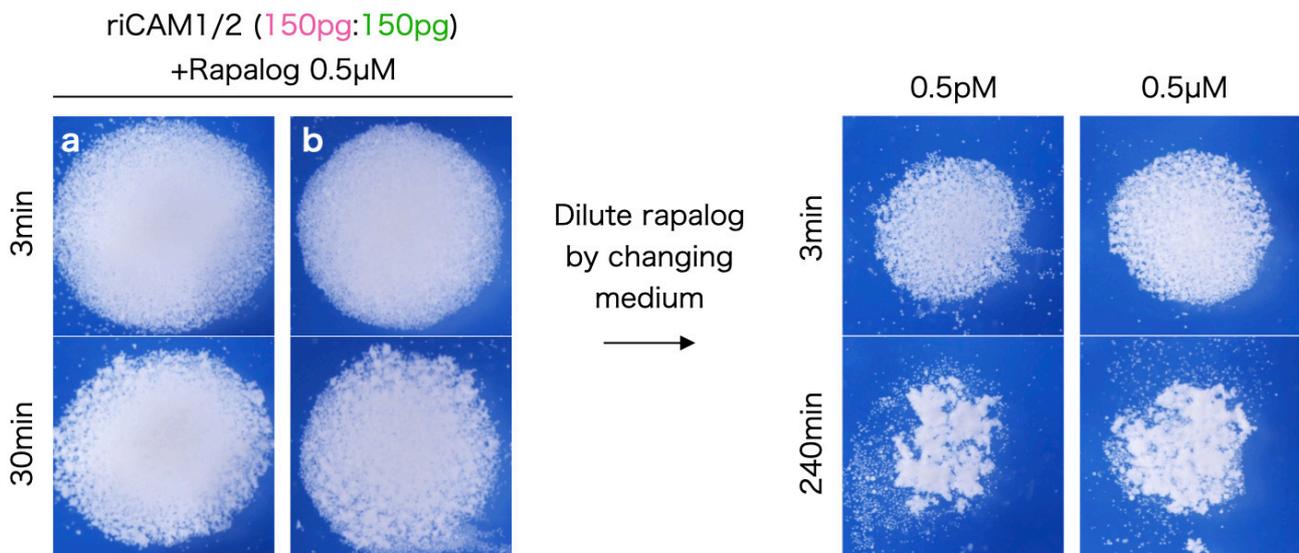


図7. メディウムからラパログを除去しても細胞は解離しない

riCAM1/2を発現した細胞を0.5μM ラパログを含むCMFM中で培養した後、0.5pM (a)あるいは0.5μM (b)ラパログになるようメディウムを交換して培養した。

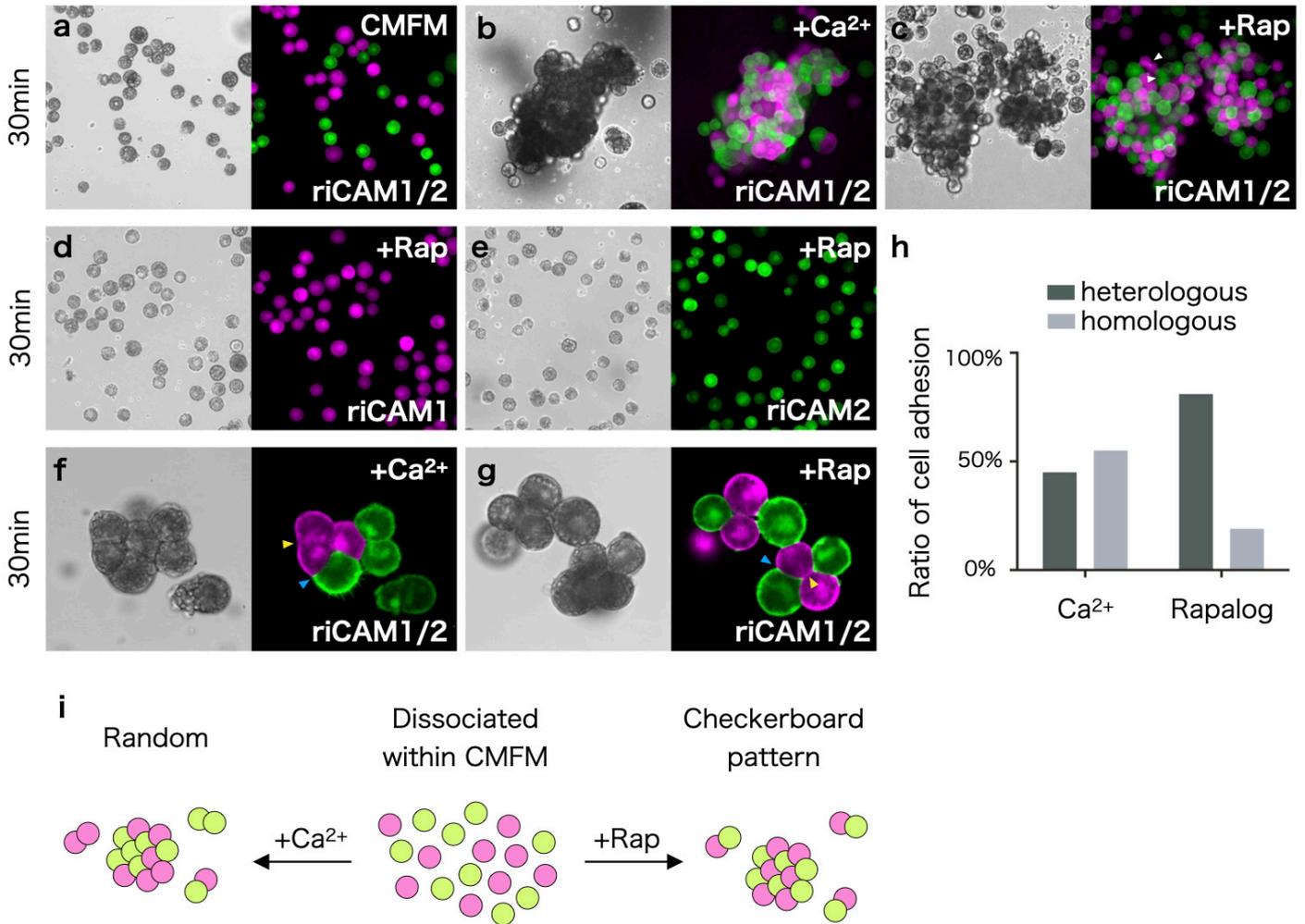


図8. ラパログによる細胞間接着はチェッカーボードパターンになる

(a-e) ラパログおよびCa²⁺により誘導された細胞間接着パターンの違い。 *riCAM1* mRNA (150 pg) と Alexa Fluor 647-dextran (2.5 ng)あるいは *riCAM2* mRNA (150 pg) と Alexa Fluor 488-dextran (2.5 ng)を4細胞期の動物極側に共インジェクションした。CMFMにより解離した細胞(a)にCa²⁺(b)あるいはラパログ(c-e)を添加して再び凝集させた。cの矢頭は同じriCAMを発現する隣接した細胞を示す。(f、g) 接着パターンの解析に使用した代表的な共焦点顕微鏡画像。青矢印はヘテロタイプ的な接着(異なるriCAMを発現している細胞同士の接着)、黄矢印はホモタイプ的な接着(同じriCAMを発現している細胞同士の接着)を示す。(h) (f)と(g)の接着パターンの定量データ。Ca²⁺による凝集体は296接着面(21凝集体)、ラパログによる凝集体は273接着面(61凝集体)を計測対象とした。(i) Ca²⁺およびラパログによって誘導される接着パターンの模式図。

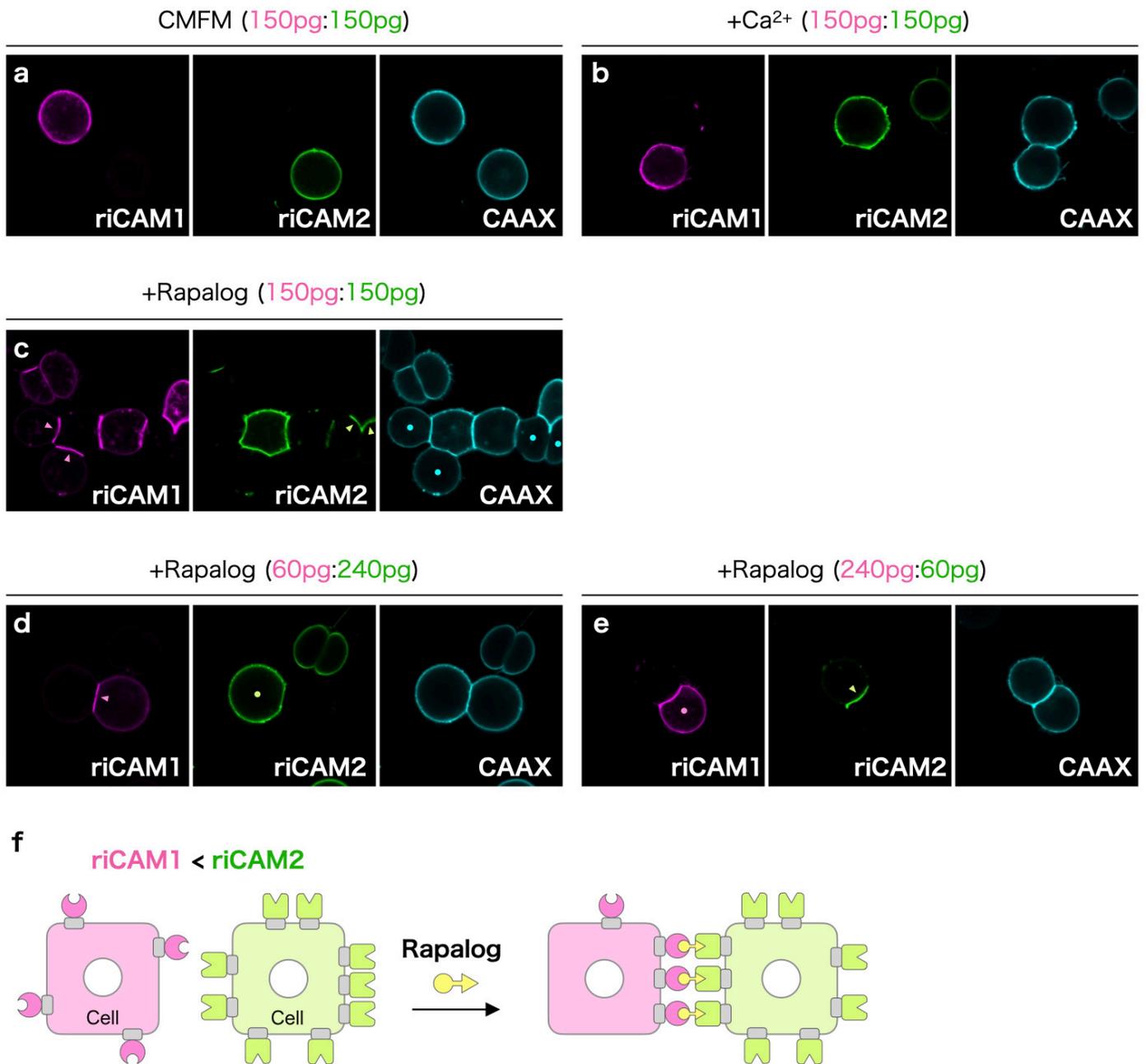


図9. riCAM1/2は細胞接着面に集積する

(a-e) Ca^{2+} あるいはラパログにより誘導された凝集体の代表的な共焦点顕微鏡画像。様々な濃度の *riCAM1* mRNAあるいは*riCAM2* mRNAと *mTurquoise2-CAAX* mRNA (150 pg) を4細胞期の動物極側に共インジェクションした。(c) 矢印はriCAMが集積している細胞接着面。青丸はmTurquoise2-CAAXのシグナルが他よりも弱い細胞。(d, e) 矢印はriCAMの細胞接着面への集積を示す。丸はriCAMが細胞膜上に一様に分布している細胞。(f) 発現量の少ないriCAMが細胞接着面に集積することを示すモデル。

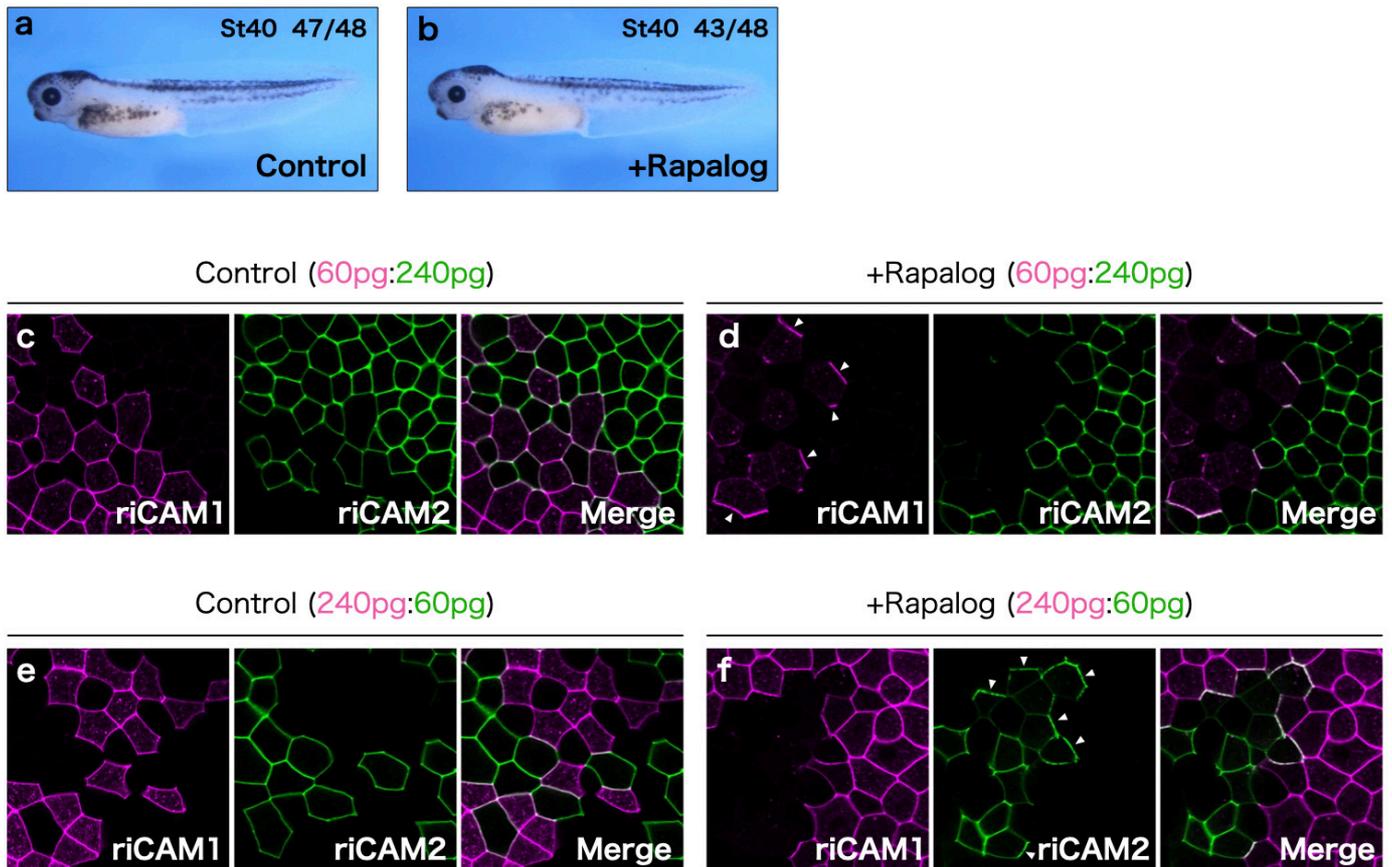


図10. ラパログは *in vivo*でもriCAM1/2の集積を引き起こす

(a-b) 胞胚腔へのラパログのインジェクション (100 μ M/12nl)はステージ40までの発生に影響を与えなかった。(c-f) riCAMの接着面への集積。riCAM1とriCAM2を独立に発現している胚の、ステージ11におけるアニマルキャップ細胞の共焦点顕微鏡画像。複数の濃度のriCAM1 mRNAとriCAM2 mRNAを4細胞期の動物極側に独立にインジェクションした。ラパログはステージ9で胞胚腔にインジェクション (100 μ M/12nl)した。矢頭はriCAMの集積を示す。

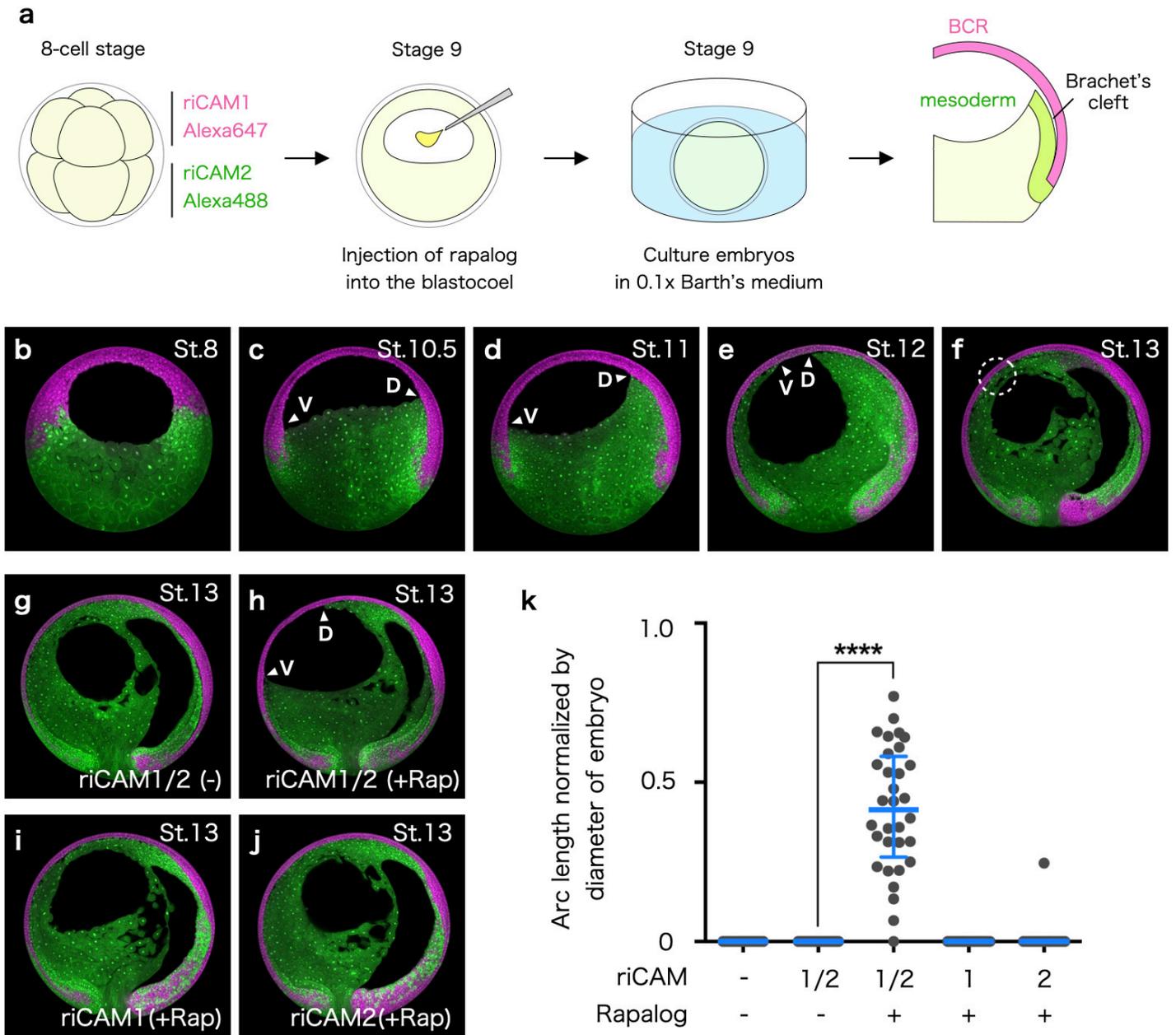


図11. ラパログは中胚葉の遊走を阻害する

(a) ラパログによって中胚葉とBCR間の接着を亢進させる実験手法の模式図。8細胞期において、*riCAM1* mRNA (150pg)と Alexa Fluor 647-dextran (2.5 ng)を動物極側の4割球に、*riCAM2* mRNA (150 pg) と Alexa Fluor 488-dextran (5 ng)を植物極側の4割球に共インジェクションしたのち、ステージ9でラパログ (100 μ M/6nL)を胞胚腔にインジェクションして発生させた。(b-f) (a)で示した方法で蛍光色素をインジェクションすると、BCRと中胚葉はそれぞれ異なる色素で標識された。緑で標識された腹側(D: 矢頭)と背側(V: 矢頭)の中胚葉は、マゼンタで標識されたBCR上を動物極方向に遊走する。ステージ13において、背側中胚葉に隣接した内胚葉と腹側中胚葉は胚の前方で接触する(f、波線円)。(g-j) *riCAM1/2*を発現している胚において、ラパログは中胚葉の遊走を強く阻害する。*riCAM1/2*を発現している胚(g); *riCAM1/2*を発現し、ラパログをインジェクションした胚(h); *riCAM1*を発現し、ラパログをインジェクションした胚(i); *riCAM2*を発現し、ラパログをインジェクションした胚(j)。(k) 胚の直径でノーマライズした、BCR上に残存した隙間の円弧長。Kruskal-Wallis test およびDunn's multiple comparisons test; **** $P < 0.0001$ 。

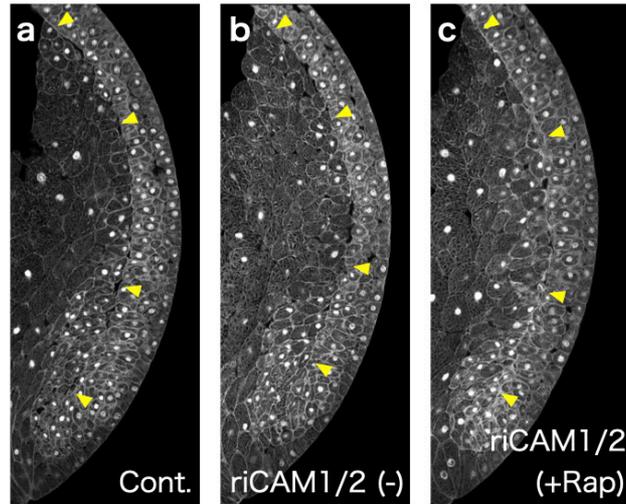


図12. ラパログはBrachet's cleftの形成に影響しない

(a-c) BABBによって透明化したステージ11の胚における、Brachet's cleftの代表的な共焦点顕微鏡画像。8細胞期において*riCAM1* (150pg)と*riCAM2* (150pg)mRNAをAlexa Fluor 647-dextran (2.5 ng)と共インジェクションしたのち、ステージ9でラパログ (100μM/6nL)を胞胚腔にインジェクションした。蛍光色素をインジェクションした胚 ($n = 11$) (a); *riCAM1/2* mRNAと蛍光色素をインジェクションした胚 ($n = 17$) (b); *riCAM1/2* mRNA、蛍光色素とラパログをインジェクションした胚 ($n = 22$) (c)。矢頭は中胚葉とBCRの境界面を示す。

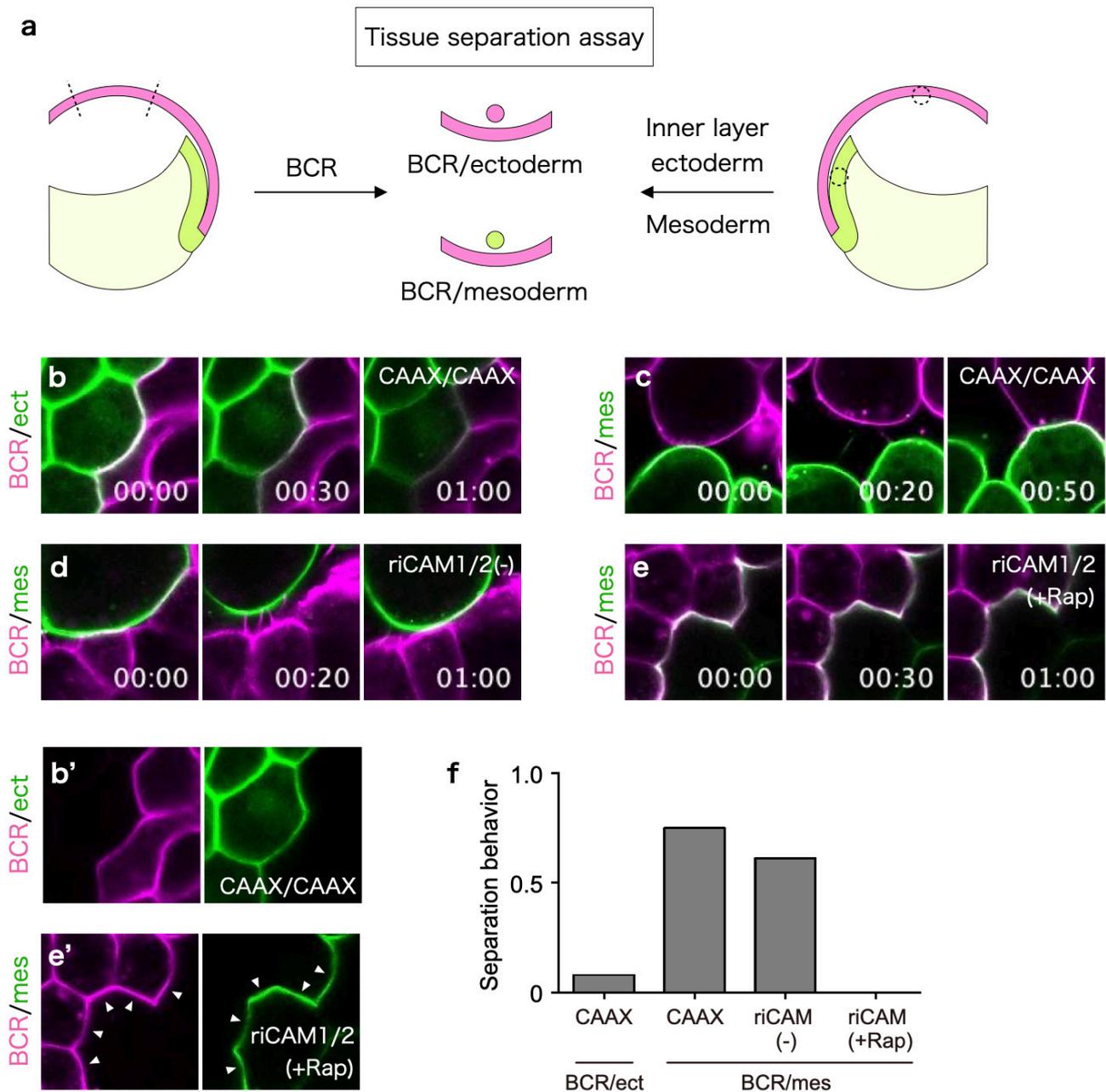


図13. ラパログにより中胚葉とBCRの接着頻度が上昇する

(a) tissue separation assayの模式図。中胚葉あるいはinner-layer ectodermの細胞塊をBCR断片上にマウントし、組織間の接着動態をライブイメージングによって観察した。(b-e) 組織間の接着動態を観察したライブイメージングの代表的なスナップショット。mCherry-CAAXを発現しているBCRとmNeonGreen-CAAXを発現しているinner-layer ectoderm (b); mCherry-CAAXを発現しているBCRとmNeonGreen-CAAXを発現している中胚葉 (c); riCAM1を発現しているBCRとriCAM2を発現している中胚葉にラパログを添加したサンプル (e); 添加していないサンプル (d)。BCRと中胚葉の接着および解離は(c)と(d)において観察された。(b'、e') (b)および(e)の単色画像。矢頭はBCRと中胚葉の接着部位に集積したriCAM1、特にriCAM2を示す。CAAXの集積は観察されなかった。(f) tissue separation assayの定量結果。1時間の観察中にBCRの細胞がinner-layer ectodermおよび中胚葉から乖離した回数を示す。n = 50 (b); n = 32 (c); n = 31 (d); n = 38 (e)。