



# ショウジョウバエ胚の上皮組織安定性を維持する上皮成長因子受容体シグナルの研究

吉田, 健太郎

---

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2023-03-25

(Date of Publication)

2024-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8587号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482335>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



# 博士論文

ショウジョウバエ胚の上皮組織安定性を維持  
する上皮成長因子受容体シグナルの研究

令和5年1月

神戸大学大学院 理学研究科

吉田 健太郎

# 目次

要旨	3
第1章 序論	6
第2章 材料と方法	12
第3章 結果	18
第4章 考察	30
謝辞	39
参考文献	40
図表	49

## 要旨

動物の体表や器官の表面を覆う上皮組織は、外界からの有害な刺激や液体の侵入から物理的なバリアとして働き、個体の内部を保護している。この上皮組織のバリア機能は、細胞間接着によって上皮組織の完全性が維持されることで担保される。一方で、上皮組織の完全性は、細胞分裂や細胞死、形態形成のような発生現象によって生じる機械的なストレスや細胞間接着の再構成によって、不安定化する。これらの発生現象に対して、上皮組織の構造が安定して保たれる仕組みはわかっていない。本研究では、上皮成長因子受容体 (EGFR) シグナルの存在が、ショウジョウバエの胚表皮組織の安定性維持を保障する役割を検証した。

EGFR は、進化的に保存された膜貫通型の受容体チロシンキナーゼである。EGFR の活性化は、Ras-Raf-MEK の古典的 MAP キナーゼ経路を介して、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) の活性化を導く。活性化した ERK は転写因子や細胞骨格と相互作用することで、多様な細胞応答を引き起こす。例えば、EGFR や ERK の活性化は細胞死抑制や創傷治癒を促進し、上皮組織の恒常性を維持することが知られている。ショウジョウバエの胚発生では、EGFR 依存的な ERK の活性化は、*rhomboid* の発現によって遺伝的に制御されている。*rhomboid* が発現した領域では、EGFR のリガンドである Spitz が分泌される。この遺伝的に制御された EGFR 依存的な ERK 活性化は、胚表皮組織の細胞分化や形態形成に関与することが示唆されている。

本研究では、ERK 活性の FRET プローブを用いて、胚発生中の EGFR 依存的な ERK 活性パターンのダイナミクスを明らかにした。さらに、蛍光デキストランのインジェクションによって、ERK の活性化は、形態形成によって胚表皮組織とビテリン膜の機械的な接触が失われる領域で生じていることが明らかになった。このことから、EGFR シグナル、形態形成、そしてビテリン膜が胚表皮組織の安定性に影響している可能性を考えた。

そこで、EGFR シグナルの存在が胚表皮組織の安定性に与える影響を検証するため、EGFR 機能欠損変異体が、胚発生の段階で頭部構造が欠失するという特徴的な表現型に注目した。EGFR 機能欠損変異体では胚全体でアポトーシスが增加する。EGFR 機能欠損変異体で、アポトーシスを抑制した結果、頭部体節の組

組織崩壊が生じなかった。このことから、EGFR 機能欠損変異体の頭部体節で生じる組織崩壊には、アポトーシスが必要であることが明らかになった。

ショウジョウバエの上皮組織において、アポトーシス細胞は通常、上皮組織の基底側部に脱落する。一方、崩壊開始後の EGFR 機能欠損変異体の頭部体節では、大量のアポトーシス細胞を含んだ細胞クラスターが、形態形成によって陥入した胚表皮組織の apical 側にも局在していることを観察した。EGFR 機能欠損変異体の頭部体節において、細胞の apical extrusion が生じる過程をライブイメージングで観察した。その結果、細胞の apical extrusion が周辺の組織にも伝播し、大規模な組織崩壊が生じることを観察した。このことは、EGFR 機能欠損変異体で生じる細胞の apical extrusion が組織崩壊を導いている可能性を示唆した。

EGFR 機能欠損変異体で、細胞の apical extrusion や組織崩壊が生じる原因を探るため、apical extrusion の初期段階を探索した。その結果、唾腺陥入によってビテリン膜から離れた胚表皮組織で最初の apical extrusion や組織崩壊が生じることを観察した。さらに、EGFR 機能欠損変異体では陥入した上皮組織の周辺に E-cadherin の局在に、頻繁な破断が観察された。この結果は、EGFR 機能欠損変異体では形態形成に対して、E-cadherin による上皮組織の完全性が障害されやすくなっている可能性を示唆している。

唾腺陥入点における細胞の apical extrusion は胚表皮組織がビテリン膜から離れ領域で生じた。胚表皮組織とビテリン膜の機械的な接触が上皮組織の安定性に与える影響を探るため、ビテリン膜の外科的な除去を行った。その結果、ビテリン膜との機械的な接触を失った EGFR 機能欠損変異体の組織片は、急速な崩壊を生じた。さらに、EGFR 機能欠損変異体を創傷した結果、創傷の周辺の胚表皮組織が異所的にビテリン膜との機械的な接触を失い、apical extrusion と組織崩壊が生じた。これらの結果は、ビテリン膜と胚表皮組織の機械的な接触が失われることが、EGFR 機能欠損変異体における細胞の apical extrusion や組織崩壊を促している可能性を示唆している。

以上のことから、胚表皮組織で生じる形態形成で EGFR 依存的な ERK 活性化は、形態形成によってビテリン膜と胚表皮組織の機械的な接触が失われた上皮組織の安定性を高めることに関与している可能性が考えられる。本研究では、解剖によって、ビテリン膜との機械的な接触を失った胚表皮組織ではアポトーシスを誘導するカスパーゼを活性化した細胞が増加したことを観察した。このこ

とは、ビテリン膜が細胞外マトリックスとして存在することが胚表皮組織に生存シグナルを提供している可能性が考えられる。また胚組織片は湾曲した形を示すことから、ビテリン膜の存在は胚表皮組織の形状を保つことにも寄与している可能性が考えられる。

胚表皮組織で生じる ERK の活性化はミオシンを制御し、形態形成や創傷治癒において組織に内向きの力を発揮させる。この ERK の活性化による細胞の収縮力制御は、形態形成、細胞脱落、創傷治癒など上皮組織で生じる多くの現象で共通して生じる。EGFR の下流で生じる ERK の活性化がミオシンを制御することで、胚表皮組織に生じる不安定性を緩衝していると考えられた。一方で、EGFR シグナルが存在しない胚表皮組織では、上皮組織の不安定性に対する抵抗性が失われて、アポトーシスの増加、形態形成、創傷といった状況下で組織の完全性を維持出来ない。これらの結果から、EGFR シグナルは発生過程で生じる様々機械的ストレスや異常から、上皮組織の安定性を維持する必須因子であると考えられた。

## 第1章 序論

上皮組織は、細胞分裂や細胞死、形態形成のような発生現象によって頻繁に再構成される (Guillot & Lecuit, 2013)。例えば、組織の成長時に生じる細胞増殖は、しばしば組織に必要以上の細胞を作り出し、細胞死や細胞の脱落を誘導することが報告されている (Eisenhoffer et al., 2012; Levayer et al., 2016; Marinari et al., 2012)。また、形態形成に伴う組織の変形は組織内に異方性の機械的なストレスを生み出し、上皮細胞の変形 (Tomba et al., 2022) や再配置 (Blankenship et al., 2006; Paré & Zallen, 2020) を伴うことが知られている。一方で、これらの発生現象によって生じる上皮組織の不安定性に対して、どのような機構が上皮組織の頑強さを保証しているのかは明らかになっていない。

本研究では、ショウジョウバエの EGFR 機能欠損変異体が、胚発生に失敗し、頭部構造の喪失 (R. J. Clifford & Schupbach, 1989; Price et al., 1989) を生じるという特徴的な表現型に注目し、EGFR シグナルの存在が上皮組織の安定性に与える影響を検証した。

### 1.1 上皮組織の完全性と細胞脱落

動物の体表や器官の表面を覆う上皮組織は、外界からの有害な刺激や液体の侵入から物理的なバリアとして働き、個体の内部を保護している (Ganz, 2002; Macara et al., 2014)。この上皮組織のバリア機能は、細胞間接着によって上皮組織の完全性が維持されることで担保される (Sumigray & Lechler, 2015)。上皮組織における細胞間接着の異常は多様な疾患の原因となることが報告されている (Brooke et al., 2012)。上皮組織の完全性を維持する代表的な細胞間接着構造として、脊椎動物には細胞の頂端方向から順番に密着結合 (Tight Junction) や接着結合 (Adherens Junction) が存在する (Niessen, 2007)。一方、密着結合が存在しないショウジョウバエをはじめとする無脊椎動物では、接着結合より基底部側に隔壁結合 (Septate Junction) が存在し (図 1B)、上皮組織の完全性が担保されている (Behr et al., 2003; Tepass & Hartenstein, 1994)。

物理的もしくは化学的な刺激などによって失われた上皮組織の完全性は、創傷

治癒という機構によって修復される (Gurtner et al., 2008)。この創傷治癒の機構では、多くの動物の上皮組織において、傷口の周辺でアクトミオシンの細胞骨格の蓄積が生じることが報告されている (Bement et al., 1999; Brock et al., 1996; Rothenberg & Fernandez-Gonzalez, 2019; Wood et al., 2002)。これらのアクトミオシンの細胞骨格は、傷口の閉口に際して、内向きの収縮を発揮することが報告されている (Brugués et al., 2014)。一方で、傷口の閉口の失敗は、腸上皮組織などにおいて細菌やウイルスの感染や慢性炎症疾患の原因になることが報告されている (Leoni et al., 2015; Peterson & Artis, 2014)。そのため、個体の恒常性維持には、上皮組織の完全性が頑強に維持されることが極めて重要であると考えられる。

さらに、上皮組織は様々なダメージや分化の失敗などによって異常化した細胞を上皮組織の完全性を保ちながら取り除く必要がある (Ohsawa et al., 2018)。多くの動物の上皮組織において、異常化した細胞は組織への適応性が低下し、細胞競合という機構によって取り除かれることが知られている (Morata & Ripoll, 1975; Nagata & Igaki, 2018)。異常化した細胞は、周囲の健康な細胞からシグナルや機械的なストレスを受け取ることによって、アポトーシスを誘導するタンパク質であるカスパーゼが活性化することが報告されている (Bowling et al., 2019)。脊椎動物の上皮組織では、カスパーゼが活性化したアポトーティックな細胞は組織の頂端部方向に押し出される (Kato & Fujita, 2012)。一方で、ショウジョウバエの上皮組織では、腸上皮組織 (Buchon et al., 2010; Martin et al., 2018) など一部の例をのぞいて、殆どの場合、死にかけた細胞は基底部分方向に押し出されることが知られている (Gu & Rosenblatt, 2012; Levayer et al., 2016; Ninov et al., 2007)。

## 1.2 ショウジョウバエ胚の発生と形態形成

ショウジョウバエ胚は、受精後、二倍体の核が 13 回の同調した核分裂によって約 6000 個にまで増加する (V. E. Foe & Alberts, 1983)。卵の細胞質を共有した多核細胞である合胞体となった胚は、9 回目の核分裂後、核が受精卵の表面領域に移した多核性胞胚となり、細胞膜と細胞間接着の形成が始まる (Mazumdar



& Mazumdar, 2002; Müller & Wieschaus, 1996)。その後、1層の円柱型上皮細胞が内部の卵黄を覆った細胞性胞胚となる (V. E. Foe & Alberts, 1983)。細胞性胞胚となった後の上皮細胞の apical (頂端)側は、卵母細胞由来の細胞外マトリックスであるビテリン膜と機械的に接触している (図 1B) (D'Angelo et al., 2019)。ビテリン膜に穴を開けると、著しい胚組織の漏出が生じる(図 1C) ことから、ビテリン膜によって限局された空間に閉じ込められた胚には高い内圧が存在することが推測される。

ショウジョウバエの胚発生における形態形成はこの高い内圧に逆らって、上皮組織を胚の内部に侵入させる必要がある。これを実行するため、アクトミオシンの細胞骨格や adherens junction を形成する Cadherin-catenin 複合体の制御を通じた上皮細胞の apical 表面張力の増加が重要であると考えられている (Lecuit & Lenne, 2007)。例えば、ショウジョウバエの原腸胚における腹側溝の形成においては、原腸胚の腹側領域 (予定中胚葉)で発現する Fog によって、細胞の apical 側へのミオシンの移行と活性化が生じることが知られている (Dawes-Hoang et al., 2005)。さらに、Fog によるミオシンの活性化は adherens Junction との係留を介して、細胞の apical 表面のアクトミオシンの収縮力を増加させ apical 面積の収縮 (apical constriction) を促すことが示されている。ショウジョウバエ胚において、細胞の apical constriction は 腹側溝の陥入以外にも、気管プラコードの陥入 (Letizia et al., 2011; Nishimura et al., 2007a)、唾腺陥入 (Chung et al., 2017; Sanchez-Corrales et al., 2018)の際にも生じることがわかっている。また、初期胚における光遺伝学による apical constriction の導入は組織を胚内部へ陥入させることが報告されている (Izquierdo et al., 2018)。

### 1.3 EGFR-ERK シグナル経路

上皮成長因子受容体 (EGFR)は、多くの後生動物において構造と機能が進化的に保存されている膜貫通型の受容体チロシンキナーゼである (Barberán et al., 2016)。EGFR は、細胞外ドメインに EGF や TGF $\alpha$  といったような細胞外のリガンドが結合することで二量体化し、細胞内ドメインの自己リン酸化によって活性化する (Purba et al., 2017)。多くの動物において、EGFR の活性化

は、細胞増殖や細胞死抑制、細胞運動、分化など非常に多岐にわたる生命現象を生じさせる (Wells, 1999)。一方、EGFR シグナルの異常は、がん化や腫瘍形成の原因となることが報告されている (Normanno et al., 2006)。

EGFR の活性化の下流では、MAP キナーゼ経路や PI3K-Akt 経路をはじめとした様々な細胞内シグナル伝達経路の活性化が生じることが知られている (Wee & Wang, 2017)。その中でも、細胞内シグナル伝達の中心的な役割を果たすタンパク質として細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) の働きがよく研究されている。古典的 MAP キナーゼである ERK は進化的に保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、Ras-Raf-MEK のシグナル伝達経路を介した 2 重リン酸化によって活性化される (Lusk et al., 2017)。活性化した ERK は細胞質や核内で転写因子や細胞骨格、酵素など様々な基質とともに働き、多様な生命現象を出力として生じることが知られている (Ebisuya et al., 2005)。

ショウジョウバエ胚では、EGFR は胚発生を通して胚表皮組織にユビキタスに発現している (Revaitis et al., 2020)。EGFR 機能欠損変異体の表現型として胚全体でのアポトーシス細胞の増加や、腹部クチクラ構造の欠失、そして頭部構造の喪失が報告されている (R. Clifford & Schupbach, 1992; Crossman et al., 2018; Price et al., 1989)。一方で、胚表皮組織で生じる EGFR 依存的な ERK 活性化は、*rhomboid* の発現によって時空間的に限られた領域でのみ生じることが、活性化型 ERK (dpERK) 抗体を用いた研究で示されている (図 2A, 2B, 2G, 2H) (Gabay et al., 1997a, 1997b)。この限られた範囲での EGFR 依存的な ERK の活性化は、ゴルジ体の膜上に係留された EGFR の主要なリガンドである Spitz が Rhomboid によって切断され、細胞外に分泌されることで生じることが明らかになっている (Shilo, 2016)。これらの胚表皮組織で生じる EGFR 依存的な ERK の活性化は、細胞分化や形態形成に関与することが示唆されている (Hayashi & Ogura, 2020; Ogura et al., 2019)。

## 1.4 本研究の概要

本研究では、ERK 活性の FRET プローブを用いて、胚発生中の ERK 活性化の時空間パターンを生きた胚で観察した。Rhomboid 機能欠損変異体では ERK-

FRET 活性の大部分が著しく減衰したことから、これらの ERK-FRET の活性化パターンは *rhomboïd* の発現によって、遺伝的に制御された EGFR-ERK シグナル経路の活性化を反映していることを明らかにした。さらに、Rhomboïd 機能欠損変異体では体節溝の形態形成後に、胚表皮組織から細胞の apical extrusion が頻繁に生じることを観察した。そこで、形態形成によるビテリン膜と胚表皮組織の間隙の変化と ERK の活性化の同時観察を行った。その結果、ERK の活性化は、形態形成によって胚表皮組織とビテリン膜の機械的な接触が失われる領域に相関して生じていることが明らかになった。

次に、EGFR 機能欠損変異体の頭部体節で生じる組織崩壊が、アポトーシス依存的であることを明らかにした。EGFR の機能欠損に加えて、頭部体節で生じる集団的なアポトーシスを阻害した胚は、組織崩壊を起こさなかった。崩壊開始後の EGFR 機能欠損変異体の頭部体節では、アポトーシス細胞と非アポトーシス細胞を含んだ細胞クラスターが陥入した上皮組織の周辺で apical 側に局在していることを観察した。また、EGFR 機能欠損変異体の頭部体節をライブイメージングした結果、形態形成が生じる上皮組織の近傍で細胞の apical extrusion が伝播し、組織崩壊が生じることを観察した。さらに、EGFR 機能欠損変異体では陥入した上皮組織の周辺では E-cadherin の局在に破断が生じていることを明らかにした。

ビテリン膜を外科的に除去した組織片を観察した結果、EGFR 機能欠損変異体の組織片は急速な崩壊を生じた。さらに、EGFR 機能欠損変異体を創傷した結果、創傷の周辺の胚表皮組織が異所的にビテリン膜との機械的な接触を失い、apical extrusion と組織崩壊が生じた。

以上のことから、胚表皮組織で生じる形態形成で EGFR 依存的な ERK 活性化は、形態形成によってビテリン膜と胚表皮組織の機械的な接触が失われた上皮組織の安定性を高めることに関与している可能性があると考えられた。一方で、EGFR 機能欠損変異体の胚表皮組織では、アポトーシスの増加、形態形成、創傷といった上皮組織の不安定性に対する抵抗性が失われて、apical extrusion や組織崩壊が生じることが考えられた。

さらに、本研究では、ビテリン膜との機械的な接触を失った胚表皮組織ではアポトーシスを誘導するカスパーゼを活性化した細胞が増加したことを観察した。このことから、ビテリン膜が細胞外マトリックスとして存在することが胚表皮組織に生存シグナルや胚表皮組織の形状を保つことにも寄与している可能性が

あると推測している。

胚表皮組織で生じる ERK の活性化はミオシンを制御し、形態形成や創傷治癒において組織に内向きの力を発揮させる。この ERK の活性化による細胞の収縮力制御は、形態形成、細胞脱落、創傷治癒など上皮組織で生じる多くの現象で共通して生じる。このことから、EGFR の下流で生じる ERK の活性化によるミオシンの制御が胚表皮組織に生じる不安定性が緩衝している可能性があるかと推測している。これらの結果から EGFR シグナルは発生過程で生じる様々機械的ストレスや異常から、上皮組織の安定性を維持する必須因子であると考えられた。

## 第2章 材料と方法

### 2.1 実験動物:ショウジョウバエ

実験に用いたショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)の全ての系統は yeast-corn meal-agar 培地で通常 25°Cで飼育した。実験に用いたショウジョウバエの系統は表 1 にまとめた。本文中および図中で示したショウジョウバエ胚の発生ステージの判別は、以下の資料に記載されている形態学的な特徴と発生時間に基づいて行った (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997)。

### 2.2 試薬、抗体、器具、解析ソフトウェア

実験に用いた試薬、抗体、器具、解析ソフトウェアの一覧は表 2, 表 3 にまとめた。以下の記述はそれらを用いて、行なった。

### 2.3 胚の回収とコリオンの除去

産卵を促すため、水で練ったドライイーストを塗布したアップルジュースプレートを用意した。このアップルジュースプレートが入ったバイアルにショウジョウバエの成虫を入れて 17°Cに静置し、一晩インキュベートした。アップルジュースプレートを水道水で洗浄し、産卵された胚をメッシュで回収した。卵母細胞由来の卵殻組織であるコリオンの除去を行うため、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (花王)に2分間浸した。

### 2.4 胚の固定と抗体染色

2.3 の手法によって回収した胚を流水で洗浄後、ガラスバイアルを用いて、4 % paraformaldehyde/PBS 溶液と heptane を 1:1 (5 ml ずつ) で混合した溶液で 40 分間振盪させ、固定した。その後、下層の溶液 (4 % paraformaldehyde/PBS 溶液) を取り除き、等量 (5 ml) の methanol を加えて 20 秒間振盪し、vitelline membrane を取り除いた。上層の heptane を除いた後、2 ml の methanol で共洗いを行った。再度 methanol を除去後、Blocking Water /PBS [1 % Bovine serum albumin, 0.2 % TritonX-100, 0.2 % Tween20/PBS] (以後、BW) で洗った胚を、1.5 ml チューブに移し、胚が沈むのを待った後、BW を交換する作業を 2 回行った。更に BW を交換し、5 分間穏やかに振盪させながら洗浄を 3 回繰り返した。その後、交換した BW 中で 30 分間穏やかに振盪させながら、固定胚のブロッキングを行った。胚を 2 ml チューブに移して、BW 中で表 2 に記載した希釈率になるよう調整した量の 1 次抗体を加えて、4 °C overnight で反応させた。

続いて、1 次抗体を含んだ BW を除去した後、胚を 1.5 ml チューブに移し、BW で洗浄を 5 分間穏やかに振盪させながら洗浄を 5 回繰り返した。胚を 2 ml チューブに移した後、表 2 に記載した希釈率になるように調整した量の 2 次抗体と、室温 (25 °C) 2 時間、もしくは 4 °C overnight の条件において、遮光した状態で反応させた。

その後、2 次抗体を含んだ BW を除去した後、胚を 1.5 ml チューブに移し、BW で洗浄を 5 分間穏やかに振盪させながら洗浄を 5 回繰り返した。BW を除去、胚に DAPI を含む vectashield を滴下し、4°C で静置した。染色した固定胚の観察は、プレパラートにマウント後、共焦点顕微鏡 (Olympus FV1000) を用いて行った。レンズは UPlanSApo 20x NA0.75 (胚全体の撮影)、および UPlanSApO 60 x water NA 1.2 を撮影に用いた。各撮影データは x-y-z の 3 次元 stack image として撮影し、各 x-y 画像 slice は 800 pixel (X) x 600 pixel (Y) の設定で取得した。撮影時の Z 方向の x-y slice 数、間隔は撮影の対象によって、適切な条件を採用した。

## 2.5 胚のライブイメージング

heptane に透明両面テープ (Scotch) を浸して、粘着成分を溶出させた溶液

(heptane glue)を、35 mm ガラス底シャーレ (IWAKI)に塗布し、その上に洗浄した 2.3 の方法により、回収した胚をシャーレ上にマウントした。胚の乾燥防止のため、シャーレに十分な量の蒸留水を加えた。マウントした胚の観察は共焦点顕微鏡 (Olympus FV1000)を用いて行った。レンズは、UPlanApo N 60 x NA1.42 Oil (通常の撮影), UPlanSApo 60 x NA1.30 Silicon lens (蛍光デキストランのインジェクションを行った胚の撮影), UPlanSApo 30 x NA1.05 Silicon lens (胚全体の撮影)、および PlanApo 60 x NA1.40 oil IR lens (IR による創傷実験)を撮影に用いた。各撮影データは、x-y-z の 3次元 stack image として撮影し、各 x-y 画像 slice は 640 pixel (X) x 480 pixel (Y)の設定で取得した。撮影時の Z 方向の x-y slice 数、間隔は撮影の対象によって、適切な条件を採用した。またこれらの 3次元 stack image をタイムラプスで 3分おき、もしくは5分おきに撮影し、x-y-z-t のライブイメージング画像シリーズを取得した。

## 2.6 蛍光デキストランのインジェクション

2.3 の手法によって回収した胚から stage 11-12 の間の胚を選別し、heptane glue を塗布したカバーガラス (Matsunami)上にマウントした。胚の乾燥を防止するためシリコンオイル (Shinetsu silicone)で胚を覆った。蛍光デキストラン (Tetramethyl rhodamine-conjugated dextran, 3,000 MW) (Thermo Fischer/Molecular Probes) の粉末を 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  になるように超純水で調整した後、PBS で 10 倍に希釈した蛍光 dextran 溶液を、ガラス針を用いて、胚のビテリン膜間隙 (perivitelline space)にインジェクションした。インジェクションに用いたガラス針は、熱したガラス細管を Micropipette puller (Sutter)を用いて、両側から牽引したものを使用した。

## 2.7 胚の解剖と胚組織片の培養

2.3 の手法によって回収した胚から stage 11-12 の間の胚を選別し、ポリスチレ

ン性の組織培養シャーレ (IWAKI)に静置し、10 % fetal bovine serum と抗生物質 (penicillin, streptomycin)を添加した Schneider's Drosophila medium に浸した。実体顕微鏡 (Olympus SZX16)を用いて、胚をステンレス針 (Shiga Konchu, LTD)で押し刺し、ビテリン膜と胚組織片を分離した。1 回の実験に際して、最低 10 個以上の胚から胚組織片を回収し、poly L-Lysin でコートされたガラス底シャーレ (Matsunami)に移し、共焦点顕微鏡 (Olympus FV1000)で観察を行った。観察を行う胚組織片は、明視野観察における胚組織片の形状や細胞の状態をもとに、上皮組織の頂端側をガラス面に向けているものを目視で選別した。胚の解剖から撮影開始までの作業は 1 時間以内に行った。

## 2.8 赤外線(IR)レーザーを用いた創傷と撮影

ビテリン膜に穴を開けずに局所的な創傷を引き起こすため、高出力で赤外線 (IR)レーザーを照射することで、胚組織の創傷を行った。創傷および観察には、IR-LEGO システム (IR-LEGO-1000, Sigma-Koki Co., Ltd., Saitama, Japan) (Kamei et al., 2008)を共焦点顕微鏡 (Olympus FV1000)に取り付けたものを使用した。組織に傷を与えるために十分な出力 (Miao & Hayashi, 2015)を得るため、100 mW~150 mW の出力に調節した I R レーザーを照射した。胚に創傷を与えるまでの準備および観察は 2.5 の手法を用いて行った。傷を与える前の胚の状態を撮影し、レーザーの照射領域を手動で決定後、上記のシステムを用いて創傷を行った。創傷を行った後、5 分以内にタイムラプス撮影を開始した。

## 2.9 画像処理と FRET による ERK 活性のライブイメージング

上記の各項にて得られた共焦点顕微鏡による撮影データは、ImageJ-Fiji ソフトウェアを用いて解析や適切な画像処理を行い、図に用いた。

特に、ERK の FRET プローブ (EKAREV) (Aoki et al., 2013; Komatsu et al., 2011)を用いて得られた FRET 撮影データの FRET ratio の可視化は、先行研究



に従い、以下に記載した方法で行った (Ogura et al., 2018)。Ubi プロモーターを用いて、ERK 活性の FRET プローブである EKAREV を発現させた胚に対して、440 nm のレーザーを用いて励起させた FRET プローブの CFP の蛍光を取得すると同時に、CFP の励起によって FRET を起こし励起した YFP の蛍光を取得した。撮影した x-y-z の 3 次元 stack image を元に、customed imageJ plugin (FRETRatioFx) による画像処理を行い、FRET/CFP ratio の比率を Intensity-modulated display (IMD) による色付けによって、ERK の活性化 (FRET ratio) を可視化した。タイムラプス撮影を行った胚では各 time point の 3 次元 stack image に対して、同様の画像処理を行うことで、ERK 活性の x-y-x-t のライブイメージング画像シリーズを取得した。

## 2.10 apical cell extrusion 頻度の定量的な比較法

Rhomboid 機能欠損変異アリルをホモ接合で持つ変異体の胚 ( $rho^{del}/rho^{del}$ ) と、ヘテロ接合で持つ Control 胚 ( $rho^{del}/+$ ) の apical cell extrusion の頻度を比較するため、以下の方法で apical signal rate の定義と計算を行なった。

ショウジョウバエの  $w, rho^{del}, pUbi-EKANES[attp2]/TM6B, Tb, Sb[1], Dfd-YFP$  系統の子孫の stage12 以降の胚を 2.3 および 2.5 の方法でライブイメージングを行った後、撮影開始から 12 時間以上経過した胚を実体顕微鏡 (Olympus SZX16) で観察した。Dfd-YFP の発現の有無で撮影した胚の genotype を判断した。またこの際に、Dfd-YFP が発現しているにも関わらず発生が完了せず異常な形態を示しているものは、発生異常として、以下の比較からは除いた。これにより control 胚から 23 個体、mutant 胚から 14 個体、x-y-x-t のライブイメージング画像シリーズを撮影し、apical cell extrusion 頻度の定量的な比較に用いた。

各胚において撮影した画像シリーズの中から、それぞれ stage13, stage14, stage15 に相当する time point の x-y-z の 3 次元 image stack を選出した。選出した x-y-z の image stack の各 x-y slice (pixel size; 0.75  $\mu$ m (X) x 0.75  $\mu$ m (Y)) を imageJ-Fiji で画像処理を行い、x-z slice の作成を行った。Y 軸方向に 0.75  $\mu$ m に x-z slice の作成を行うことで、元の 3 次元 image stack に対して、Y 軸方向の pixel 数 (640 pixel) と x-z slice の数 (640 slices) を一致させた。640 枚の x-z slice

の中から、胚のシグナルが含まれる slice 数をカウントし、総シグナル slice 数 (N) と定義した。その後 N 枚の x-z slice のうち、少なくとも 1 つ以上の extruded cell が、胚上皮組織とビテリン膜の間 (perivitelline space) に観測できるものをカウントし、apically extruded slice 数 (a) と定義した。総シグナル slice 数 (N) に対して、apical extruded slice 数 (a) の頻度を apical signal rate として定義し、各胚の各ステージの 3 次元 image stack において算出した。

算出した apical signal rate は Prism 9 ソフトウェア (GraphPad) を用いて解析を行い、マンホイットニーの U 検定によって、Control 胚と *rho<sup>del1</sup>* 胚との間で、統計的有意性を確認した。

## 2.11 腹側胚表皮組織の面積比率の計算

EGFR 機能欠損変異アリルをホモ接合で持つ mutant 胚 (*egfr<sup>f24</sup>/ egfr<sup>f24</sup>*) と control 胚 (+/+) で腹側胚表皮組織の退縮の挙動を比較するため、腹側胚表皮組織の面積比率を以下の方法で計算し、グラフにプロットした。

ショウジョウバエの *par6<sup>delta226</sup>, par6-GFP; egfr<sup>f24</sup>, His2Av-mRFP/CyO* 系統の子孫の胚を腹部方向側から 2.3 および 2.5 の方法で、ライブイメージングを行った後、stage11 以降の組織崩壊の様子から胚の genotype を判断し、mutant 胚 (*egfr<sup>f24</sup>/ egfr<sup>f24</sup>*) の撮影データを 4 つ得た。また比較する control 胚には同様に腹側からライブイメージングを行った *par6<sup>delta226</sup>, par6-GFP; His2Av-mRFP* 系統の子孫の撮影データを 4 つ使用した。

胚の発生のタイミングを統一するため、唾腺陥入が始まるタイミングを比較開始点とし、その後 1 時間ごとの x-y-z 3 次元 stack image を選出し、胚表皮組織の状態を観察した。胚の個体差や、ガラス面への設置角度によって、胚表皮面積の絶対量では比較することが困難であった。そのため、観察して得られた胚の腹部側の全体面積 (ビテリン膜の境界で判断) のうち、胚表皮組織が維持されている面積の比率を計算した。胚表皮組織の面積、また上皮組織の構造が維持されていることの判断は Par6-GFP のシグナルを元に、観察し、計算を行った。

## 第3章 結果

### 3.1 EGFR 依存的な ERK 活性化と上皮組織の形態形成

#### (i) FRET プローブを用いた胚発生中の ERK 活性パターンの観察

ショウジョウバエの胚発生における ERK 活性の時空間的なパターンは、活性化型 ERK (dpERK) 抗体を用いて、固定胚での局在を分類した研究で示されている (Gabay et al., 1997a, 1997b)。これらの dpERK の局在パターンは、対応する受容体チロシンキナーゼの活性化を反映する。特に、EGFR 依存的な ERK 活性のパターンは原腸陥入周辺の腹側外胚葉 (図 2A, VE)、背側溝 (図 2B, DF)、頭部溝 (図 2B, CF)、気管陥入点 (図 2G, T.Pla)、体節境界 (図 2H, Seg) など、発生を通して上皮組織の分化や形態形成と関連する領域で生じることが報告されている。

これらの EGFR 依存的な ERK 活性のダイナミクスを生きた胚で観察するために、ERK 活性の FRET プローブ (EKAREV) (Aoki et al., 2013; Komatsu et al., 2011) を用いた。この EKAREV をショウジョウバエ胚全体で発現させた先行研究では、気管陥入点における ERK 活性のダイナミクスが適切な形態形成を促進することが報告されている (Ogura et al., 2018)。本研究では、EKAREV を発現した胚を用いて、発生初期から発生後期に至るまでの ERK FRET 活性を観察した。その結果、dpERK 抗体を用いた固定胚の先行研究と対応して、ERK FRET の活性パターンは発生の様々なステージで EGFR 依存的な ERK の活性化を反映していることが示された (図 2C, 2D, 2I, 2J)。

#### (ii) Rhomboid 機能欠損変異体における細胞の apical extrusion 頻度の増加

ショウジョウバエの胚発生において、EGFR 依存的な ERK 活性化は *rhomboid* の発現によって制御される。Rhomboid はプロテアーゼタンパク質として働き、EGFR のリガンドである Spitz を切り出し、EGFR 依存的な ERK の活性化を引き起こす (Shilo, 2016)。胚表皮組織でみられた EGFR 依存的な ERK FRET の特徴的なパターンは、Rhomboid 機能欠損変異体では大部分が減衰することが観

察された (図 2E, 2F, 2K, 2L)。一方で、Rhomboid 機能欠損変異体においても分裂期の細胞で ERK FRET 活性の上昇が生じていた (図 2F, アスタリスク)。これらの ERK FRET の活性化は CDK1 の活性化によるもので、EGFR シグナル非依存的な活性化であることが示唆されている (Aoki et al., 2013; Ogura et al., 2018)。

ERK 活性の FRET プローブ (EKAREV) を発現した Control 胚では、体節溝の形態形成後の発生ステージ (Stage 13 以降) において、ERK FRET 活性が低い細胞が胚表皮組織の基底側で観察された (図 3A, 3B, 3E; 空矢頭)。加えて、一部の細胞は apical 側へ脱落 (apical extrusion) し、胚表皮組織とビテリン膜の間隙に局在していることを観察した (図 3A; 白矢頭)。ERK の FRET 活性が低い細胞の apical extrusion は、Rhomboid 機能欠損変異体でより顕著に生じていた (図 3C, 3D, 3F; 白矢頭)。

そこで、胚発生中の胚表皮組織における EGFR 依存的な ERK 活性の消失が、上皮細胞の apical extrusion に与える影響を調べるため、Control 胚と Rhomboid 機能欠損変異体で apical extrusion の頻度の比較を試みた。apical extrusion された細胞は、胚上皮組織とビテリン膜の間隙で頻繁に流動する。そのため、計測時に撮影範囲内でみられる apical extrusion の細胞数そのものを比較しても、各個体の撮影条件の違いによる影響を排除できない。この問題を回避するため、apical extrusion の頻度が高いほど、多くの細胞がビテリン膜の間隙の広い範囲に分布していると仮定し、「胚全体の横断面のスライス数に対して、少なくとも 1 つ以上の apical extrusion のシグナルを含むスライス数の割合」(apical signal rate) を比較した。その結果、Rhomboid 機能欠損変異体では、apical signal rate が Control 胚に対して、常に有意に高いことがわかった (図 3G)。この結果は、Rhomboid 機能欠損変異体では細胞の apical extrusion が生じる頻度が増加していることを示唆した。

### (iii) 胚表皮組織とビテリン膜の間隙と ERK の活性化の観察

細胞の apical extrusion は、体節溝の形態形成後の発生ステージ (Stage 13 以降) で顕著に見られ、体節境界に生じる ERK 活性化が減衰した Rhomboid 機能欠損変異体では apical extrusion の頻度が増加していた (図 3C, 3D, 3G)。さらに

発生が進行すると、Control 胚がビテリン膜との機械的な接触を保っているのに対して、Rhomboid 機能欠損変異体の胚表皮組織はビテリン膜から異所的に剥離し、apical extrusion を生じることを観察した (図 3E, 3F)。

そこで、胚表皮組織とビテリン膜の間に生じる間隙に蛍光デキストランのインジェクション (図 4A) を行い、ERK FRET 活性との対応関係を調べた。その結果、口腔 (stomodeum) や、頭部体節と胸部体節の境界、気管陥入点、腹側正中線で蛍光デキストランのシグナルの蓄積が見られた (図 4B)。この結果は、これらの領域で胚表皮組織とビテリン膜の間隙が生じていることを示唆した。さらに、この領域では ERK FRET 活性が上昇していることを観察した (図 4C)。

次に、胚表皮組織において、形態形成の過程で生じるビテリン膜の間隙と ERK の活性化の関係性を調べるため、蛍光デキストランのシグナルと ERK FRET の活性化の変化を経時的に観察した。その結果、形態形成によってビテリン膜から離れる胚表皮組織において、ERK の活性化が生じることを観察した (図 4D-4F)。

### 3.2 EGFR 機能欠損変異体の組織崩壊におけるアポトーシスと apical extrusion

#### (i) EGFR 機能欠損変異体における頭部体節の崩壊

*rhomboid* の発現によって遺伝的に制御された EGFR 依存的な ERK 活性が低下した胚表皮組織では、気管陥入の形態形成 (Llimargas & Casanova, 1999; Nishimura et al., 2007) や、腹側のクチクラ構造の配列パターン (Mayer & Nüsslein-Volhard, 1988; Wiellette & McGinnis, 1999) に異常が生じることが報告されている。一方で、受容体そのものが機能しない EGFR 機能欠損変異体の表現型は、腹側のクチクラ構造や頭部構造を著しく欠失を示すことが報告されている (R. J. Clifford & Schupbach, 1989; Price et al., 1989)。腹側のクチクラ構造の異常は、EGFR 活性の消失によって、上皮細胞がアポトーシスで失われることで生じると考えられている (Urban et al., 2004)。さらに、クチクラの形成が進行する Stage13 の EGFR 機能欠損変異体の胚表皮組織では、Rhomboid 機能欠損変異体と比較して、アポトーシスが著しく増加していることが報告されてい

る (Crossman et al., 2018)。

EGFR 機能欠損変異体で上皮細胞と頭部構造が失われる過程を理解するため、胚全体を腹側から低倍率で撮影し、Control 胚と EGFR 機能欠損変異体 (*egfr<sup>Δ24</sup>*) 胚における腹側胚表皮組織を長時間観察した (図 5A, 5B)。その結果、Control 胚、*egfr<sup>Δ24</sup>* 胚のどちらにおいても、唾腺陥入が生じる Stage 11 までは、上皮細胞極性を示す Par-6 の細胞膜に沿った腹側胚表皮組織全体で維持されていた (図 5A, 5B; t=0 時間)。このことは、この発生ステージまでは EGFR 機能欠損変異体においても、上皮組織の構造が維持されていることを示している。さらに、陥入に伴う上皮細胞の Apical constriction によって唾腺プラコードでは Par-6 のシグナルの凝縮が生じていた (図 5A, 5B; オレンジ矢印)。

その後、Control 胚では細胞膜における Par-6 の局在が腹側胚表皮組織全体で保たれたまま、体節溝の形成 (図 5A; t=2 時間) や、頭部陥入 (図 5A; t=4 時間) が生じた。一方で、*egfr<sup>Δ24</sup>* 胚の腹側胚表皮組織は、唾腺陥入後に、胚の先端付近で Par-6 のシグナルが見られない領域が出現した (図 5B; t=2 時間 白矢印)。さらに、これらの Par-6 のシグナルが見られない領域は時間経過とともに、より後方に広がることを観察した (図 5B; t=4 時間)。またこれらの領域では、異常な Par-6 のシグナルの局在を持った細胞塊 (図 5B; 白矢頭) が観察された。

腹部胚表皮組織における上皮組織の消失を Control 胚と *egfr<sup>Δ24</sup>* 胚で比較するため、ビテリン膜によって囲われた「腹部全体の面積」に対して、Par-6 の細胞膜への局在パターンが維持されている「胚表皮組織の面積」の割合を計測し、唾腺陥入の形態形成を起点として経時変化を確かめた。その結果、Control 胚では長時間に渡って、Par-6 の局在パターンを維持した胚表皮組織が腹部面積のほぼ全体を覆っているのに対して、*egfr<sup>Δ24</sup>* 胚では胚表皮面積の割合が、唾腺陥入後から著しく減少し、4 時間後には観察視野内の約 30% にまで低下したことを確かめた (図 5C)。

次に胚の側面方向からライブイメージングを行い、頭部体節で生じる著しい組織崩壊をより詳細に観察した。気管陥入が開始する Stage 11 の途中までは、Control 胚 (図 5D; t=-30 分)、*egfr<sup>Δ24</sup>* 胚 (図 5E; t=-30 分) のどちらにおいても頭部体節の胚表皮組織における Par-6 の局在パターンが保たれていた。一方で、*egfr<sup>Δ24</sup>* 胚では胚表皮組織と結合している胚外の上皮組織である amnioserosa における Par-6 の局在が失われていた (図 5E; t=-30 分)。これは、amnioserosa が EGFR の活性低下によって細胞死を生じたためだと考えられる (Shen et al., 2013)。

Stage11以降、Control胚では胸部体節で気管陥入 (図 5E; t= 0分)や体節溝形成 (図 5E; t= 60分)が進行し、頭部体節、胸部体節のどちらにおいても Par-6 の局在パターンと胚表皮組織の構造が保たれていた。一方、*egfr<sup>f24</sup>*胚では、胸部体節で気管陥入が生じるタイミング (図 5E;t=0分)において、頭部体節では Par-6 の細胞膜への局在パターンを失い、丸くなった細胞が見られはじめた (図 5E;t=30分 白矢頭)。その後、頭部体節の胚表皮組織全体で、このような Par-6 の局在パターンを失った細胞が顕著になり、頭部体節が崩壊した (図 5E;t= 30分、60分 白矢印)。一方で、胸部体節では Par-6 の細胞膜への局在パターンは維持されており、上皮組織の構造が保たれていることが示唆された (図 5E;t=60分 空き矢印)。

(ii) EGFR 機能欠損変異体の組織崩壊にはアポトーシスが必要

次に、EGFR 機能欠損変異体の組織崩壊に対するアポトーシスの関与を検証するため、頭部体節のアポトーシス細胞の分布をショウジョウバエの活性化カスパーゼ抗体 (cDcp1)を用いて観察した。*egfr<sup>f24</sup>*胚の頭部体節で組織崩壊が進行する Stage12 において、ショウジョウバエの頭部体節では、Hox 遺伝子の *deformed (dfd)* の制御下の元、*reaper* の発現によって集団的なアポトーシスが生じることが知られている (Lohmann et al., 2002; Nassif et al., 1998)。Control胚において、cDcp1 陽性細胞は複数のクラスターを作って、頭部の Ocular segment と呼ばれる領域に分布していることを観察した (図 6A)。これらの cDcp1 陽性細胞のクラスターは、胚表皮組織の内部もしくは基底部に存在していた (図 6A; 空き矢頭)。一方、アポトーシスを制御する主要な4つの遺伝子 (*grim, hid, reaper, sickle*)を欠失した変異体である *Df(3L)H99*胚 (White et al., 1994)では、頭部体節における cDcp1 陽性細胞は著しく減少することを観察した (図 6B)。

組織崩壊が生じた *egfr<sup>f24</sup>*胚の頭部体節においては、cDcp1 陽性細胞は胚表皮組織の広範囲に分布していた (図 6C)。さらに、大量の cDcp1 陽性細胞を含んだ細胞クラスターが、胚表皮組織の apical 側の表面に局在していた。これらの apical 側に局在する細胞のクラスターは、口腔 (Stomodaeum)や唾腺プラコード (Sg)など、陥入した胚表皮組織の周辺で特に顕著で見られた (図 6C;白矢頭)。一方で、*egfr<sup>f24</sup>*と *Df(3L)H99*の二重変異体では、cDcp1 陽性細胞はほとんど観

察されず、頭部体節の組織崩壊も生じていなかった (図 6D)。この結果は、頭部体節で生じるアポトーシスが EGFR 機能欠損変異体の組織崩壊に必要であることを示唆した。

### (iii) 胚表皮組織の崩壊に先立って生じる細胞の apical extrusion

Stomodeum は Stage 10 において、Ocular segment に隣接する Stomodeal plate と呼ばれる領域が、陥入することで形成される (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997)。Stomodeal plate の陥入が浅い Stage 10 の *egfr<sup>f24</sup>* 胚においては、cDcp1 陽性細胞が、胚表皮組織の apical 側の表面に散発的に局在していることを観察した (図 7A; 白矢頭)。一方で、Stomodeum の陥入が進行した Stage 11 の *egfr<sup>f24</sup>* 胚においては、胚表皮組織の apical 側に大量の cDcp1 陽性細胞を含んだ細胞のクラスターが局在をしていた (図 7A; 白色矢頭)。興味深いことに、この apical に局在する細胞クラスターには cDcp1 陰性細胞も含まれていた (図 7B; 黄色矢頭)。このことは、陥入を生じた EGFR 機能欠損変異体では、胚表皮組織の apical 表面にアポトーシスを生じた細胞以外にも脱落する可能性を示唆した。

次に、細胞の apical extrusion が EGFR 機能欠損変異体の組織崩壊に与える影響を明らかにするため、*egfr<sup>f24</sup>* 胚の頭部体節で生じる細胞の apical extrusion をライブイメージングした。細胞の apical extrusion が観察される前の胚表皮組織は Par-6 の細胞膜への局在パターンを維持し、細胞の apical 表面はビテリン膜に接していた (図 7C)。その後、異常な核の形態を示した細胞が胚表皮組織から apical extrusion されることを観察した (図 7D; アスタリスク)。さらに、一度 apical extrusion が生じると周辺の細胞も続いて apical extrusion される様子が観察され (図 7E)、最終的には頭部体節の胚表皮組織の崩壊が生じた (図 7F-7H)。またこれらの apical extrusion された細胞では、細胞膜への Par-6 の局在パターンが失われていた。このことは、細胞の apical extrusion が EGFR 機能欠損変異体の組織崩壊を促進していることを示唆した。

### (iv) 細胞分裂が胚表皮組織に与える影響の検討



頭部体節の胚表皮組織では集団的なアポトーシスに加えて、mitotic domain と呼ばれる集団的な細胞分裂が生じている (Victoria E Foe, 1989)。分裂期の細胞では上皮組織の完全性の維持に必要な接着結合による細胞間接着が再構成されることが報告されている (Aguilar-Aragon et al., 2020)。蛍光デキストランをインジェクションした胚表皮組織では、分裂期の細胞の周辺で蛍光デキストランの蓄積が見られた (図 8A)。このことは、細胞分裂によって上皮細胞とビテリン膜との間隙が広がったことを示唆した。

頭部体節の胚表皮組織における細胞分裂が、*egfr<sup>f24</sup>* 胚における細胞の apical extrusion に与える影響を調べるため、分裂期細胞のマーカーである p-histone H3 (pH3)抗体で、分裂期細胞の分布を調べた。その結果、Stage 12 の頭部体節では Control 胚、*egfr<sup>f24</sup>* 胚ともに多数の分裂期の細胞が存在していることを観察した (図 8B, 8C)。また、*egfr<sup>f24</sup>* 胚において apical extrusion された細胞クラスターには pH3 のシグナルを持つ細胞は含まれていなかった (図 8C; 白矢頭)。

### 3.3 ビテリン膜と胚表皮組織の機械的な接触の喪失による組織崩壊

#### (i) 唾腺陥入で生じるビテリン膜の間隙と apical extrusion

ここまでの結果から、EGFR 機能欠損変異体における組織崩壊は、アポトーシス細胞の増加と、細胞の apical extrusion によって促進されることが示唆された。一方で、EGFR 機能欠損変異体におけるアポトーシス細胞の増加は、Control 胚に比べて胚全体で生じたにも関わらず (図 9A, 図 9B) (Crossman et al., 2018)、組織崩壊は必ず頭部体節から始まった (図 5)。そこで、EGFR 機能欠損変異体の胚表皮組織における頭部体節と胸腹部体節の違いを検討するため、*egfr<sup>f24</sup>* 胚のアポトーシス細胞の局在を観察した。*egfr<sup>f24</sup>* 胚の腹側胚表皮組織では、アポトーシス細胞の多くは、頭部体節、胸部体節のどちらにおいても、胚表皮組織の内部や基底部に留まっていた (図 9C; 空き矢頭)。一方で、頭部体節における上皮組織の形態形成である唾腺陥入が生じた周辺においては、アポトーシス細胞のクラスターは胚表皮組織の apical 側に局在していた (図 9C; 白矢頭)。次に、腹側胚表皮組織における唾腺陥入点周辺で生じる apical extrusion の様子をライブイメ

ージングで観察した。その結果、唾腺陥入点における細胞の apical extrusion は、形態形成の進行によって、胚表皮組織の apical 表面にビテリン膜の間隙が生じた領域から生じることを観察した (図 10A)。Stomodeum の周辺で見られた apical extrusion と同様に、一度 apical extrusion が生じると周辺の細胞も続けて apical extrusion され、細胞のクラスターが形成された (図 10A;t=27 分)。一方で、胚表皮組織が陥入せず、ビテリン膜との機械的な接触が保たれている胸部体節の領域では、apical extrusion は観察されなかった (図 10B)。

#### (ii) 唾腺陥入点周辺の胚表皮組織における adherens junction の不安定化

上皮組織の形態形成による機械的なストレスは E-cadherin をはじめとする adherens junction を構成するタンパク質の局在を再構成する (Pinheiro & Bellaïche, 2018)。形態形成による上皮組織の adherens junction への影響を調べるため、唾腺陥入を生じた胚表皮組織における E-cadherin の局在を観察した。その結果、Control 胚では E-cadherin によって標識された細胞は陥入点の方向に向かって伸長した形状を示していた (図 11A)。一方で、*egfr<sup>t24</sup>* 胚では、E-cadherin の局在に破断が頻繁に生じていることを観察した (図 11B)。

#### (iii) 胚の解剖によるビテリン膜の除去と胚組織片の観察

発生中のショウジョウバエ胚における高い ERK 活性は、形態形成によって胚表皮組織とビテリン膜との間隙が広がった領域で頻繁に観察された (図 4D-図 4F)。一方で、胚表皮組織における大部分の ERK 活性が減衰した Rhomboid 機能欠損変異体では apical extrusion の頻度の増加が示唆された (図 3G)。加えて、*egfr<sup>t24</sup>* 胚の腹側胚表皮組織における apical extrusion は唾腺陥入の形態形成の進行によって、胚表皮組織の apical 面がビテリン膜から離れた領域で生じた (図 10A, 10B)。これらの観察結果から、崩壊を生じない EGFR 機能欠損変異体の胸腹部の体節ではビテリン膜と胚表皮組織の機械的な接触の維持が apical extrusion や組織崩壊を抑制している可能性を考えた。

この可能性を検討するため、ショウジョウバエ胚を解剖し、ビテリン膜との機

機械的な接触を失った胚組織片における胚表皮組織の観察を試みた (図 12A)。その結果、培養された胚組織片は徐々に収縮しながら湾曲することを観察した (図 12B-図 12D)。さらに、湾曲した胚組織片では、細胞の apical extrusion が観察された (図 12D; 白矢頭)。

#### (iv) 胚組織片における ERK 活性とカスパーゼ活性

次に、胚の解剖によるビテリン膜との胚表皮組織の機械的な接触の喪失が、胚表皮組織における ERK 活性やアポトーシスに与える影響を確かめた。

ERK FRET プローブを発現した胚組織片では、観察開始から 1 時間ほどは *rhomboid* の発現によって遺伝的に制御された気管プラコードにおける ERK 活性パターンが観察できた (図 13A: t=0~1 時間)。この結果は、ビテリン膜の機械的な接触の喪失そのものは、胚表皮組織の ERK 活性の上昇を誘導しないことを示唆した。その後、胚組織片では ERK FRET の活性化が胚全体で徐々に減少していくことを観察した (図 13A: t=3~5 時間)。

解剖によって、ビテリン膜が除去された胚表皮組織におけるアポトーシスの変化を調べるため、カスパーゼ活性のレポーターである Apoliner (Bardet et al., 2008) を用いた。Apoliner はカスパーゼ活性によって、GFP のシグナルが細胞質から核内に移行する (図 13B)。この Apoliner を発現した胚組織片を観察した結果、時間経過とともに細胞質の GFP シグナルを失った細胞が増加することを観察した (図 13C-13E)。この結果は、解剖によってビテリン膜との機械的な接触を失った胚表皮組織では、カスパーゼの活性化が生じることを示唆した。しかし、カスパーゼの活性化が生じて、胚組織片は崩壊を起こさず、長時間にわたって組織構造が維持され続けていた (図 13E)。

#### (v) EGFR 機能欠損変異体の胚組織片が示す急激な組織崩壊

次に EGFR シグナルの活性が存在しない状態で、ビテリン膜との機械的な接触の喪失が、胚表皮組織に与える影響を調べるため、同様の操作を *egfr<sup>Δ24</sup>* 胚に対して行った。その結果、*egfr<sup>Δ24</sup>* 胚では胚組織片全体が、観察開始後 5 時間以内に、

激しく崩壊することを観察した(図 14A)。崩壊途中の胚組織片を観察した結果、胚組織片は時間の経過とともに徐々に湾曲し、細胞が apical extrusion されることを観察した (図 14D-14G;白矢頭)。

### 3.4 胚表皮組織に生じた創傷に対する EGFR シグナルの役割

次に、EGFR シグナルの存在が、どのようにして上皮組織で生じる不安定性に対して、安定な状態を維持もしくは回復させ、組織崩壊を防いでいるのかを検討した。ショウジョウバエの蛹上皮組織では、アポトーシス細胞の脱落に対して、EGFR 依存的な ERK の活性化と創傷治癒機構が上皮組織の完全性の回復を促すことが示唆されている (Valon et al., 2021)。さらに、EGFR や ERK は、胚表皮組織における創傷治癒の促進に関与していることが報告されている (Geiger et al., 2011)。そこで、創傷治癒機構における EGFR シグナルの役割に注目した。

#### (i) 赤外線レーザーを用いた胚表皮組織の創傷

まず、ビテリン膜に傷を与えない条件で胚表皮組織に創傷を与えるシステムを検討した。従来の紫外線レーザーによる創傷は周辺の組織への侵襲度が高く、ビテリン膜に穴を開けるため、使用することができなかった。そこで、本研究では赤外線レーザーを使用した遺伝子発現誘導システム (IR-LEGO; infrared laser-evoked gene operator)を胚表皮組織の創傷に用いた。

適当な出力に調整された赤外線レーザーによる刺激は、組織の特定の細胞や領域を温めてヒートショック反応を引き起こし、ヒートショック応答プロモーターを付与された標的遺伝子を発現させる (Kamei et al., 2008)。一方で、高出力の赤外線レーザーを照射すると、過度に温められた細胞の構造が破壊されることが報告されている (Miao & Hayashi, 2015)。この性質に注目し、高出力の赤外線レーザーの照射による胚表皮組織 (HS-GFP, his-RFP 発現胚)の創傷を試みた。その結果、高出力の赤外線レーザーを照射された領域の細胞は、胚表皮組織上で固定されることを観察した(図 15A, 15B;X 印)。この操作によるビテリン膜の破壊は見られなかった。加えて、赤外線レーザーの照射によって固定された領

域の周囲の細胞では、ヒートショックにより GFP を発現させていることが観察された (図 15B)。このことから、固定された領域以外の細胞は生存していると考えられる。さらに、赤外線レーザーが照射によって固定された領域周辺の胚表皮組織は、異所的にピテリン膜から離れることを観察した (図 15A, 15B)

(ii) 赤外線レーザーの照射による創傷で生じる ERK 活性化とミオシンの蓄積

次に、赤外線レーザーの照射による胚表皮組織の創傷で、創傷治癒機構が働くかを確認した。多くの上皮組織の創傷治癒機構では、傷の周辺で ERK の活性化が生じ、ミオシンの蓄積を促進させることが報告されている (Geiger et al., 2011; Hiratsuka et al., 2015; Li et al., 2013; Mace et al., 2005; Matsubayashi et al., 2004; Wang et al., 2009)。

そこでまず、赤外線レーザーの照射による創傷で生じる ERK 活性化ダイナミクスを観察するため、ERK 活性の FRET プローブ (EKAREV) を発現した胚に創傷を与えて観察を行った。創傷を与えられた直後の胚表皮組織では、傷の周辺から広範囲に及ぶ勾配的な ERK FRET 活性が生じることを観察した (図 16B)。その後、この広範囲で生じた ERK FRET の活性は減衰し、傷の近傍の限られた範囲に ERK FRET 活性化が見られた (図 16C)。次に、赤外線レーザーの照射を行った胚を 30 分以内に固定し、活性化型 ERK 抗体 (dpERK) で染色した。その結果、赤外線レーザーが照射された領域から 1~2 細胞の限局された範囲の胚表皮組織に、dpERK 抗体の局在が生じていた (図 16D)。

次にこれらの赤外線レーザーの照射で生じる ERK 活性化に、ミオシンの蓄積が相関するかを観察した。赤外線レーザーを照射した直後の広範囲な ERK 活性が生じたタイミングでは、傷の周辺にミオシンの蓄積は見られなかった (図 16E; t=0 分、5 分)。一方で、傷の周辺に限局された ERK 活性が生じると、傷周辺にミオシンの蓄積が生じることを観察した (図 16; t=10 分、15 分)。これらの結果は、赤外線レーザーの照射による胚表皮組織の創傷に対して、創傷治癒機構が働いていることを示唆した。

(iii) EGFR 機能欠損変異体の創傷による異所的な apical extrusion

次に、赤外線レーザーの照射による創傷が、EGFR 機能欠損変異体の胚表皮組織に与える影響を調べた。EGFR 機能欠損変異体において、組織崩壊が生じていない Stage 11 の胸部体節に、Control 胚と *egfr*<sup>24</sup> 胚の腹側胚表皮組織に対して、赤外線レーザーを照射し、創傷を与えた。

その結果、腹側胚表皮組織における創傷のダメージは、Control 胚においては、赤外線レーザーを照射された近傍の領域に留まっていた (図 17C)。一方で、*egfr*<sup>24</sup> 胚の腹側胚表皮組織においては、胚表皮組織で生じた創傷のダメージは、時間経過とともに赤外線レーザーを照射された領域以外にも広がった (図 17D; t= 45 分)。加えて、頭部体節における細胞の apical extrusion とは独立して、傷が生じた片側の胸部体節においても異所的な apical extrusion が観察された (図 17D; 白矢頭)。その後、apical extrusion を生じた胸部体節の腹側胚表皮組織は頭部体節の組織崩壊と合流し、胸部体節においても組織崩壊を示した (図 17D; t=1 時間 30 分)。一方で、創傷が生じていない片側の胸部体節では apical extrusion や組織崩壊は見られなかった。

## 第4章 考察

本研究では、ショウジョウバエ胚の EGFR 機能欠損変異体が示す頭部構造の喪失 (R. J. Clifford & Schupbach, 1989; Price et al., 1989) という特徴的な表現型に注目し、EGFR シグナルが、様々な発生現象が生じる胚表皮組織の上皮安定性の維持に対する役割を明らかにすることを目指した。本研究では、ERK 活性の FRET プローブを用いた観察を行い、ショウジョウバエの胚発生では、胚表皮組織と apical 側の細胞外マトリックスであるビテリン膜の間隙が広がった領域に相関して、EGFR 依存的な ERK 活性化が生じていることが明らかにした (図 2, 図 4B, 図 4C)。さらに、この ERK FRET 活性とビテリン膜間隙の対応関係は、胚表皮組織の形態形成が生じる特に顕著に見られた (図 4D-4F)。一方で、*rhomboid* の発現によって遺伝的に制御された EGFR シグナルの活性化が生じない胚では、脱落した細胞がビテリン膜と胚表皮組織の間隙に頻繁に見られた (図 3)。これらの結果から、ショウジョウバエの胚発生で生じる EGFR シグナルの活性化は、形態形成によって、ビテリン膜との機械的な接触を失った胚表皮組織の安定性を保証することに関与していると考えられた。そのため、EGFR シグナルは、発生過程で生じる様々な機械的ストレスや異常から、上皮組織の安定性を維持する必須因子であると考えている。

本章では、EGFR 機能欠損変異体が組織崩壊を生じる過程で見られた現象から、EGFR の活性を失った上皮組織では様々な発生現象に対する抵抗性が低下していることを考察する。さらに、様々な発生現象を生じるショウジョウバエ胚の上皮組織の安定性維持における EGFR シグナルとビテリン膜の役割を考察する。また、最後に今回の研究成果から考えられる今後の展望を議論する。

### 4.1 EGFR 機能欠損変異体における発生現象に対する抵抗性の低下と組織崩壊

EGFR 機能欠損変異体 (*egfr<sup>24</sup>*) の胚発生を観察した結果、頭部体節の組織崩壊は Stage 11 以降に始まることを観察した (図 5)。さらに、EGFR 機能欠損変異に加えてアポトーシスの阻害を行った結果、頭部体節の組織崩壊が生じないこ

とが明らかになった (図 6D)。この結果は、EGFR 機能欠損変異体が示す組織崩壊にはアポトーシスが生じることが必要であることを示唆している。一方で、EGFR 機能欠損変異体の胚では頭部体節以外でも、アポトーシスの増加が生じる (図 9B) (Crossman et al., 2018)。このことは、EGFR 機能欠損変異体が示す組織崩壊には、アポトーシスに加えて頭部体節で生じる要素が EGFR 機能欠損変異体の組織崩壊に関与していると考えられる。

頭部体節で組織崩壊を促進させる要素として、細胞の apical extrusion が重要であると考えている。しかし、細胞が extrusion される方向が、どのようにして決定されるのかは明らかになっていない。ショウジョウバエの蛹上皮組織ではカスパーゼが活性化したアポトーティックな細胞は、apical 表面の面積を減少させ、組織の基底部側に脱落することが報告されている (Levayer et al., 2016; Villars et al., 2022)。カスパーゼの活性化のよって、周囲の細胞に比べて、組織への適応度を失った細胞の apical 面積の減少が促されることで、基底部方向への一律な細胞脱落を可能にしているのかもしれない。Control 胚の胚表皮組織においても、Stage 12 の頭部体節で生じたアポトーシス細胞は胚表皮組織の内部もしくは基底部側に局在をしていることを観察した (図 6A)。

一方で、組織崩壊を生じた *egfr<sup>t24</sup>* 胚の頭部体節では大量のアポトーシス細胞が、陥入を生じた胚表皮組織の apical 表面に局在していることを観察した (図 6C; 白矢頭, 図 7B, 図 9C)。さらに、頭部体節で生じた細胞の apical extrusion が、周囲の細胞にも広がることで、組織崩壊につながることを観察した (図 7C-図 7H)。これらの結果から、EGFR 機能欠損変異体の組織崩壊は、アポトーシス細胞の増加による細胞の apical extrusion が引き金となる可能性が示唆された。

しかし、*egfr<sup>t24</sup>* 胚においても、Control 胚と同様に胚表皮組織の内部や基底部にもアポトーシス細胞が局在していた (図 6C; 空矢頭)。そのため、EGFR 機能欠損変異体で生じる細胞の apical extrusion には EGFR シグナルの欠損だけでは十分ではない可能性が考えられる。興味深いことに、*egfr<sup>t24</sup>* 胚の組織崩壊は必ず頭部体節から始まり、胸腹部体節の組織は発生後期まで部分的に維持されていた (図 5B, 図 5C)。このことから、頭部体節における何かしらの特徴が細胞の apical extrusion を促していると考えている。そこで、頭部体節と胸腹部体節の違いを検討するため、腹側胚表皮組織を観察し、アポトーシス細胞の局在を比較した。その結果、頭部体節では、唾腺陥入点の周辺でアポトーシス細胞のクラスターが腹側胚表皮組織の apical 側に局在をしていた (図 9C)。さらに、細胞の



apical extrusion は唾腺陥入に伴って、胚表皮組織とビテリン膜の機械的な接触が失われた領域で生じた (図 10A)。このことから、頭部体節で生じる apical extrusion には、形態形成によって胚表皮組織が陥入することが関与していると考えられた。

さらに、胚の解剖 (図 13A)によって、ビテリン膜との機械的な接触を失った *egfr<sup>24</sup>*胚の胚表皮組織では異所的な apical extrusion と組織崩壊が生じた (図 14)。また、*egfr<sup>24</sup>*胚を赤外線レーザー照射して創傷した結果、創傷された胚表皮組織の周辺から、異所的な apical extrusion や組織崩壊が生じた (図 17)。さらに、赤外線レーザーの照射による創傷の周辺では、ビテリン膜と胚表皮組織の機械的な接触が失われることを観察した (図 16)。これらの結果から、ビテリン膜と胚表皮組織の機械的な接触が形態形成によって失われることが、EGFR 機能欠損変異体における細胞の apical extrusion や組織崩壊の促進に関与していると考えている。

上皮組織の形態形成の過程では、アクトミオシンの細胞骨格によって上皮細胞内に異方性の収縮力が生じる (Chung et al., 2017; Letizia et al., 2011; Nishimura et al., 2007b; Sanchez-Corrales et al., 2018)。この収縮力は adherens junction に機械的なストレスを与える (Pinheiro & Bellaïche, 2018)。唾腺陥入点の周辺において、adherens junction を構成する E-cadherin の局在を観察した結果、Control 胚では E-cadherin の局在シグナルは細胞間に隙間なく維持され、周囲の細胞は apical constriction を生じた唾腺陥入点に向かって伸長した形状を示していた (図 11A)。一方で、*egfr<sup>24</sup>*胚では、E-cadherin の局在シグナルに頻繁な破断が生じていた (図 11B;黄色ドット)。このことから、EGFR 機能欠損変異体では、形態形成で生じる機械的なストレスによって、adherens junction の破断が生じている可能性が考えられる。

これらのことから、EGFR 機能欠損変異体の胚表皮組織では、アポトーシス細胞の増加、形態形成、創傷に対する抵抗力が低下し、ビテリン膜との機械的な接触の喪失や adherens junction の不安定化を伴って、細胞の apical extrusion や組織崩壊を生じると推測している。

## 4.2 EGFR-ERK シグナルによる細胞の収縮力制御の役割

多様な役割を持つ EGFR の活性化は、Ras-Raf-MEK の細胞内シグナル伝達経路を介して、ERK の活性化を引き起こす (Lusk et al., 2017)。哺乳類培養細胞の上皮組織を用いた実験系における研究では、ERK 活性化が細胞集団内を伝播する現象が報告されている (Aikin et al., 2020; Aoki et al., 2013)。またマウスにおいても、伝播性の ERK 活性化が耳の表皮組織で生じる (Hiratsuka et al., 2015)。近年、上皮組織で生じるこの伝播性の ERK 活性化の進行方向に逆らって、集団的な細胞運動が進行することが報告された (Aoki et al., 2017; Ishii et al., 2021)。さらにこの伝播性の ERK 活性は、アクトミオシン細胞骨格を制御することが示唆されている (Aoki et al., 2017)。一方で、細胞間接着を介して細胞や組織に発揮される機械的なストレスが、ERK の活性化を導くことも報告されている (Hino et al., 2020; Kinoshita et al., 2020)。ショウジョウバエの蛹の胸板上皮細胞でも、機械的ストレスによって生じる細胞の変形には、ERK 活性化が伴うことが報告されている (Moreno et al., 2019)。さらに、光遺伝学によって、胚全体で ERK を活性化させたショウジョウバエ胚では、ミオシンの局在レベルの上昇し、胚が収縮することが報告されている (Johnson & Toettcher Correspondence, 2019)。これらの報告から、上皮組織における ERK 活性化とアクトミオシンの細胞骨格の制御は相互的に制御されている可能性が考えられる。

多くの動物組織の創傷治癒機構において、傷周辺では ERK 活性が生じ、ミオシンの蓄積を促進することが明らかになっている (Geiger et al., 2011; Hiratsuka et al., 2015; Li et al., 2013; Mace et al., 2005; Matsubayashi et al., 2004; Wang et al., 2009)。本研究において、赤外線レーザーの照射によって胚表皮組織を創傷した結果、創傷された組織の周辺では、広範囲におよぶ一過的な ERK の活性化 (2 体節以上、5 分以内に消失 (図 16B)) と、傷の周辺に限局された範囲で維持される ERK の活性化 (1、2 細胞、30 分維持) (図 16C-16E) が観察された。そのうち、限局された範囲での ERK 活性の周辺ではミオシン蓄積が観察された (図 16E)。創傷治癒機構において、傷の周辺に蓄積したミオシンは組織に対して、内向きの力を発揮し速やかな傷の修復を促すことがわかっている (Abreu-Blanco et al., 2012)。ショウジョウバエ胚の気管陥入では、気管プラコードに EGFR 依存的な ERK 活性化が生じる (図 2G, 図 2I, 図 4E) (Gabay et al., 1997b)。ERK FRRT を用いた観察によって、気管プラコード内で中心から外側に向かって ERK の活性化が生じることが明らかになっている (Ogura et al.,

2018)。さらに気管プラコードでは、ERK 活性が生じた上皮組織の境界にミオシンの蓄積が生じる (Nishimura et al., 2007; Ogura et al., 2018)。ERK 活性領域の境界に環状に蓄積したミオシンの存在は、上皮組織に内向きの力を発揮させて、適正な気管陥入を導くことが示唆されている。

ERK 活性化によるミオシンの制御によって、組織に内向きの力を発揮させる機構は、創傷治癒や形態形成の過程で共通している。このことから、EGFR シグナルの下流で生じる ERK の活性化が、アクトミオシンの細胞骨格の相互的な制御を介して、様々な機械的なストレスに対する影響を緩衝し、上皮組織の安定性維持を促進していると推測している。

#### 4.3 ビテリン膜と胚表皮組織の機械的な接触の役割

ショウジョウバエの胚発生は約 22 時間で進行し、ゼブラフィッシュ (約 72 時間)、マウス (約 3 週間) といった他の生物と比較して極めて短期間である。そのため、胚内部には非常に高い内圧が存在し、ビテリン膜に穴を開けるとショウジョウバエ胚は破碎され、胚の構造を維持することができない (図 1)。そのため、ビテリン膜が細胞外マトリックスとして胚表皮組織と機械的に接触していることは、ショウジョウバエの胚発生に必要な因子の 1 つであると考えられる。さらに、後腸侵入部位に隣接する胚表皮組織の一部は、インテグリンによる接着を介してビテリン膜と接着していることが示されている (Münster et al., 2019)。このインテグリンを介した接着の存在は、ビテリン膜が胚表皮組織との機械的な接触をより強固にしている可能性がある。

細胞と細胞外マトリックスとの接着は、多くの動物の上皮組織において、細胞の生存シグナルとなることが知られている (Meredith et al., 2017; Vachon, 2011)。一方で、細胞-細胞外接着の主要な因子であるインテグリンの阻害は、細胞の基底部分と細胞外マトリックスとの接着を廃止し、カスパーゼの活性化による細胞死を導く (Frisch & Ruoslahti, 1997; Taddei et al., 2012)。興味深いことに、EGFR シグナルの活性化は、細胞外マトリックスとの接着を失ったショウジョウバエ成虫原基におけるカスパーゼ活性を抑制することが報告されている (Valencia-Expósito et al., 2022)。

ショウジョウバエ胚では、ラミニンやコラーゲンのような細胞外マトリックスの主成分の分泌による基底膜の形成は発生後期 (Stage 16 以降)まで完了しない (Matsubayashi et al., 2017, 2020)。さらに、本研究において、解剖によってビテリン膜との機械的な接触を失った胚組織片では、カスパーゼを活性化した細胞が経時的に増加していくことを観察した (図 11)。このことは、基底膜が十分に発達をしていない発生段階の胚では、apical 側の細胞外マトリックスであるビテリン膜が、胚表皮組織に生存シグナルを提供している可能性を示唆している。さらに、ショウジョウバエ胚における EGFR 依存的な ERK の活性化は、胚表皮組織とビテリン膜の間隙が生じる領域と相関が見られる (図 4)。一方で、EGFR 依存的な ERK の活性化が生じない Rhomboid 機能欠損変異体では、体節溝形成後に細胞の apical extrusion が頻繁に生じていた (図 3G)。このことから、*rhomboid* の発現による遺伝的に制御された EGFR-ERK シグナルの活性化は、形態形成によってビテリン膜との機械的な接触を失った胚表皮組織における細胞死や apical extrusion を抑制し、形態形成を生じる上皮組織の安定性を保証していると推測している。

ショウジョウバエの胚表皮組織では、basal extrusion されたアポトーシス細胞は、マクロファージによって貪食される (Abrams et al., 1993)。外部からの栄養の出入りがないショウジョウバエ胚においては、分解された細胞の成分を再利用することが望ましいと考えられる。一方、*egfr<sup>f24</sup>* 胚では、アポトーシス細胞が胚表皮組織の内部や基底部側だけでなく、apical 側の表面にも局在していることを観察した (図 6C, 図 7A, 図 7B, 図 9)。さらに、*egfr<sup>f24</sup>* 胚における細胞の apical extrusion は、形態形成によって胚表皮組織とビテリン膜の間隙が生じた領域で生じた (図 10)。さらに、胚の解剖によって、ビテリン膜を失った Control 胚の組織片でも散発的な細胞の apical extrusion が観察された (図 11)。これらのことから、ビテリン膜が apical 側の細胞外マトリックスとして存在することが、apical extrusion を防ぐ物理的なバリアとして作用している可能性がある。

#### 4.4 今後の展望

(i) EGFR 機能欠損変異体の頭部体節で崩壊を促進させる要素

本研究によって、EGFR 機能欠損変異体の頭部体節で生じる組織崩壊は、形態形成によって胚表皮組織とビテリン膜の機械的な接触が失われることで生じることが示唆された (図 10)。一方で、EGFR 機能欠損変異体の頭部体節で組織崩壊が生じる Stage 11 では、*egfr<sup>f24</sup>* 胚においても胸腹部体節で気管陥入が生じている (図 5E) (Nishimura et al., 2007)。そのため、EGFR 機能欠損変異体で見られる組織崩壊には、頭部体節が胸腹部の体節に比べて形態形成に対する組織の抵抗性を低下させている別の要素がさらに存在する可能性や、頭部体節で生じる Stomodeum や唾腺プラコードの陥入が、気管陥入に比べて胚表皮組織に与える影響が強い可能性が考えられる。

細胞分裂は周辺の上皮組織に機械的ストレスを發揮することが報告されている (Gupta et al., 2021)。ショウジョウバエ胚では、13 回の胚全体で同調した細胞分裂を行った後、mitotic domain として報告されている領域ごとに、集団的な細胞分裂を生じる (Victoria E Foe, 1989)。EGFR 機能欠損変異体で崩壊が進行する Stage 12 の頭部体節では、Control 胚、*egfr<sup>f24</sup>* 胚のどちらにおいても集団的な細胞分裂を生じていた (図 8B, 図 8C)。一方で、*egfr<sup>f24</sup>* 胚で見られた apical 表面に局在する細胞クラスターには分裂期の細胞は含まれていなかった (図 8C ; 白矢頭)。このことから、分裂期の細胞自体は apical extrusion を生じないことが示唆された。一方で、EGFR 機能欠損変異体において、集団的な細胞分裂が周辺組織で細胞の apical extrusion に関与しているのかは不明である。興味深いことに、ERK 活性の FRET プローブ (EKAREV) を発現した胚において、CDK1 が活性化した分裂期細胞の周辺で蛍光デキストランの蓄積が見られることを観察した (図 8A)。この結果は、胚表皮組織とビテリン膜の機械的な接触の喪失が、細胞分裂によっても生じていることを示唆している。さらに、ショウジョウバエでは、Par-6 とともに上皮組織の極性を司るタンパク質である aPKC 活性が低下した濾胞上皮組織では、細胞分裂の近辺で上皮組織が破裂することが報告されている (Osswald et al., 2022)。EGFR 機能欠損変異体における aPKC 活性の変化や細胞分裂の影響を検証は、今後の課題である。

Stage 11 の胚では、蛍光デキストランのシグナルの強度は、胸腹部体節の気管陥入点よりも頭部体節の Stomodeum でより顕著であった (図 4A)。このことは、Stomodeum の陥入で生じるビテリン膜と胚表皮組織の間隙は、気管陥入点より広いことを示唆している。これらの結果から、EGFR 機能欠損変異体では、形態

形成で生じる胚表皮組織とビテリン膜との間隙の広さの違いが、頭部体節の組織崩壊に影響を与えている可能性があると考えている。さらに、ビテリン膜を除去によって湾曲した *egfr<sup>24</sup>* 胚の胚組織片では、組織片全体で apical extrusion と組織崩壊が生じた (図 14)。このことから、形態形成による組織の変形や曲率の増加が、組織の不安定化させる可能性も考えられる。実際に、上皮組織の曲率や収縮力が、細胞脱落の頻度に影響を与えることが培養上皮組織を用いた研究で報告されている (Maechler et al., 2019)。

#### (ii) adherens junction の不安定化が生じる機構

*egfr<sup>24</sup>* 胚の唾腺陥入点では陥入点の周囲で E-cadherin の局在に頻繁な断線が生じていた (図 11B)。上皮組織に働くアクトミオシンの細胞骨格の収縮力は adherens junction を介して発揮される (Munjal & Lecuit, 2014)。またアクトミオシンが発揮した機械的なストレスは adherens junction の再構成を促す (Pinheiro & Bellaïche, 2018)。そのため、EGFR 機能欠損変異体の組織崩壊には、adherens junction の不安定化が重要であると考えられる。adherens junction の不安定化が生じる原因として、EGFR シグナルの低下が直接 adherens junction を不安定化させる可能性や、発生現象によって生じる機械的なストレスで不安定化する adherens junction を、EGFR シグナルの低下によって修復することができなくなっている可能性が考えられる。

ショウジョウバエ胚において、カスパーゼの活性化は adherens junction のタンパク質である Armadillo/beta-catenin の分解を引き起こすことが報告されている (Kessler & Müller, 2009)。EGFR 機能欠損変異体では、カスパーゼを活性化する *hid* の発現が胚全体で生じることが報告されている (Crossman et al., 2018)。このことから、EGFR 機能欠損変異体では、EGFR シグナルの低下によるカスパーゼの活性化が生じて、adherens junction の不安定化が生じている可能性が考えられる。一方で、EGFR シグナルの活性化によって、E-cadherin の発現低下や細胞膜からのエンドサイトーシスが生じることが報告されている (Ramírez Moreno & Bulgakova, 2022)。そのため、EGFR 機能欠損変異体における EGFR シグナルの低下と adherens junction の不安定化の関係性を検証するには、上皮細胞の E-cadherin の局在や発現レベルを調べる必要がある。

ショウジョウバエ蛹の胸板上皮組織において、EGFR-ERK シグナルの活性化

は、集団的な細胞脱落が生じるのを防いでいることが示唆されている (Valon et al., 2021)。一方で、光遺伝学でアポトーシスを生じた細胞の集団的な脱落は、E-cadherin による上皮組織の完全性を一過的に障害し、創傷治癒機構を働かせることが観察されている (Valon et al., 2021)。このことから、EGFR 機能欠損変異体の胚表皮組織では、アポトーシスの増加や EGFR シグナルの低下によって、上皮組織の完全性は障害されやすくなっている可能性が考えられる。さらに EGFR-ERK 活性は創傷治癒の過程でも生じる (図 16)。今後、EGFR 機能欠損変異体の胚表皮組織において生じる集団的なアポトーシスで生じる E-cadherin シグナルの影響を、ライブイメージングによって明らかにする必要がある。

## 謝辞

まず何よりも突然流れてきた人間を、形態形成シグナル研究チームの一員として受け入れてくださったこと、そして幾度も精神的な挫折で研究を諦めそうになったにも関わらず再び挑戦ができるようになるまで温かく熱意を持って、研究をご指導いただきました林茂生先生に、本当に心より深く感謝を申し上げます。ずっと憧れであった神戸の理化学研究所で研究をすることに対して、自分自身の理想と不甲斐なさの狭間でもがくことに長く時間を要しながらも、博士課程を辞めずに研究をまとめあげるという目標に挑戦をすることができたのは、林茂生先生が強力なサポートと、研究に限らない相談に大量の時間を費やしてくださったおかげです。改めて、心からの深い感謝を申し上げます。

本研究を始めるにあたって研究のご指導や助言、使用したショウジョウバエ系統の大半を作成いただいた小椋陽介博士と、日々の実験の相談に乗っていただきました和田宝成さんに心より感謝を申し上げます。

また日々暖かく見守ってくださった形態形成シグナル研究チームの皆様、プログレス発表での議論等にご協力をいただいた生命機能科学研究センターのショウジョウバエ研究に携わる皆様、そして神戸大学 理学研究科生物学専攻の教職員の皆様に感謝を申し上げます。また、荒木亮子さん、林茂生先生、井上邦夫先生には、本学位論文の提出に際して、大変ご尽力をいただきました。

また、博士課程の修学に際して大学院リサーチアソシエイトとして経済的な支援をいただいた理化学研究所のとても素敵な制度に感謝いたします。今後も多くの後進たちが経済的な理由で、貴重な機会や選択肢が狭まるようなことが少なくなっていくことを心より願っています。

最後に、ここまでの人生に当たって家族や友人たちを含めた様々な人々との出会いを通して積み重なった素敵な縁によって、現在の自分の存在が支えられていることに深く感謝いたします。



## 参考文献

- Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I., & Steller, H. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, *117*(1), 29–43. <https://doi.org/10.1242/DEV.117.1.29>
- Abreu-Blanco, M. T., Watts, J. J., Verboon, J. M., & Parkhurst, S. M. (2012). Cytoskeleton responses in wound repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(15), 2469–2483. <https://doi.org/10.1007/S00018-012-0928-2/FIGURES/9>
- Aguilar-Aragon, M., Bonello, T. T., Bell, G. P., Fletcher, G. C., & Thompson, B. J. (2020). Adherens junction remodelling during mitotic rounding of pseudostratified epithelial cells. *EMBO Reports*, *21*(4), e49700. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201949700>
- Aikin, T. J., Peterson, A. F., Pokrass, M. J., Clark, H. R., & Regot, S. (2020). MAPK activity dynamics regulate non-cell autonomous effects of oncogene expression. *ELife*, *9*, 1–24. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.60541>
- Aoki, K., Kondo, Y., Naoki, H., Hiratsuka, T., Itoh, R. E., & Matsuda, M. (2017). Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration. *Developmental Cell*, *43*(3), 305–317.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.10.016>
- Aoki, K., Kumagai, Y., Sakurai, A., Komatsu, N., Fujita, Y., Shionyu, C., & Matsuda, M. (2013). Stochastic ERK Activation Induced by Noise and Cell-to-Cell Propagation Regulates Cell Density-Dependent Proliferation. *Molecular Cell*, *52*(4), 529–540. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2013.09.015>
- Barberán, S., Martín-Durán, J. M., & Cebrià, F. (2016). Evolution of the EGFR pathway in Metazoa and its diversification in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Scientific Reports* *2016 6:1*, *6*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep28071>
- Bardet, P. L., Kolahgar, G., Mynett, A., Miguel-Aliaga, I., Briscoe, J., Meier, P., & Vincent, J. P. (2008). A fluorescent reporter of caspase activity for live imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(37), 13901–13905. [https://doi.org/10.1073/PNAS.0806983105/SUPPL\\_FILE/SM1.MOV](https://doi.org/10.1073/PNAS.0806983105/SUPPL_FILE/SM1.MOV)
- Behr, M., Riedel, D., & Schuh, R. (2003). The Claudin-like Megatrachea is essential in septate junctions for the epithelial barrier function in *Drosophila*. *Developmental Cell*, *5*(4), 611–620. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00275-2)
- Bement, W. M., Mandato, C. A., & Kirsch, M. N. (1999). Wound-induced assembly and closure of an actomyosin purse string in *Xenopus* oocytes. *Current Biology*, *9*(11), 579–587. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80261-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80261-9)
- Bier, E., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1990). rhomboid, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development*, *4*(2), 190–203. <https://doi.org/10.1101/GAD.4.2.190>
- Blankenship, J. T., Backovic, S. T., Sanny, J. S. S. P., Weitz, O., & Zallen, J. A. (2006). Multicellular Rosette Formation Links Planar Cell Polarity to Tissue Morphogenesis. *Developmental Cell*, *11*(4), 459–470. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.007>
- Bowling, S., Lawlor, K., & Rodríguez, T. A. (2019). Cell competition: The winners and losers of

- fitness selection. *Development (Cambridge)*, 146(13).  
<https://doi.org/10.1242/DEV.167486/19785>
- Brock, J., Midwinter, K., Lewis, J., & Martin, P.** (1996). Healing of incisional wounds in the embryonic chick wing bud: characterization of the actin purse-string and demonstration of a requirement for Rho activation. *Journal of Cell Biology*, 135(4), 1097–1107.  
<https://doi.org/10.1083/JCB.135.4.1097>
- Brooke, M. A., Nitoiu, D., & Kelsell, D. P.** (2012). Cell–cell connectivity: desmosomes and disease. *The Journal of Pathology*, 226(2), 158–171. <https://doi.org/10.1002/PATH.3027>
- Brugués, A., Anon, E., Conte, V., Veldhuis, J. H., Gupta, M., Colombelli, J., Muñoz, J. J., Brodland, G. W., Ladoux, B., & Trepats, X.** (2014). Forces driving epithelial wound healing. *Nature Physics* 2014 10:9, 10(9), 683–690. <https://doi.org/10.1038/nphys3040>
- Brody, T.** (1999). The Interactive Fly: gene networks, development and the Internet. *Trends in Genetics : TIG*, 15(8), 333–334. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01775-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01775-8)
- Buchon, N., Broderick, N. A., Kuraishi, T., & Lemaitre, B.** (2010). Drosophila EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biology*, 8(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-152/FIGURES/8>
- Campos-Ortega, J. A., & Hartenstein, V.** (1997). The Embryonic Development of Drosophila melanogaster. *The Embryonic Development of Drosophila Melanogaster*.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-22489-2>
- Chung, S., Kim, S., & Andrew, D. J.** (2017). Uncoupling apical constriction from tissue invagination. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.22235>
- Clifford, R. J., & Schupbach, T.** (1989). *Coordinately and Differentially Mutable Activities of torpedo, the Drosophila melanogaster Homolog of the Vertebrate EGF Receptor Gene*.
- Clifford, R., & Schupbach, T.** (1992). The torpedo (DER) receptor tyrosine kinase is required at multiple times during Drosophila embryogenesis. *Development*, 115(3), 853–872.  
<https://doi.org/10.1242/DEV.115.3.853>
- Crossman, S. H., Streichan, S. J., & Vincent, J.-P.** (2018). EGFR signaling coordinates patterning with cell survival during Drosophila epidermal development. *PLOS Biology*, 16(10), e3000027. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000027>
- D'Angelo, A., Dierkes, K., Carolis, C., Salbreux, G., & Solon, J.** (2019). In Vivo Force Application Reveals a Fast Tissue Softening and External Friction Increase during Early Embryogenesis. *Current Biology*, 29(9), 1564–1571.e6.  
<https://doi.org/10.1016/J.CUB.2019.04.010>
- Dawes-Hoang, R. E., Parmar, K. M., Christiansen, A. E., Phelps, C. B., Brand, A. H., & Wieschaus, E. F.** (2005). folded gastrulation, cell shape change and the control of myosin localization. *Development*, 132(18), 4165–4178. <https://doi.org/10.1242/DEV.01938>
- Ebisuya, M., Kondoh, K., & Nishida, E.** (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of Cell Science*, 118(14), 2997–3002.  
<https://doi.org/10.1242/JCS.02505>

- Eisenhoffer, G. T., Loftus, P. D., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C. Bin, Morcos, P. A., & Rosenblatt, J.** (2012). Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature* 2012 484:7395, 484(7395), 546–549. <https://doi.org/10.1038/nature10999>
- Foe, V. E., & Alberts, B. M.** (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Cell Science*, 61(1), 31–70. <https://doi.org/10.1242/JCS.61.1.31>
- Foe, Victoria E.** (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development*, 107, 1–22.
- Frisch, S. M., & Ruoslahti, E.** (1997). Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(5), 701–706. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80124-X](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80124-X)
- Gabay, L., Seger, R., & Shilo, B. Z.** (1997a). In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development. *Science*, 277(5329), 1103–1106. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.277.5329.1103/ASSET/884232EC-D0E9-4BAF-9AB4-BAA30F6C3C9F/ASSETS/GRAPHIC/SE3375594004.JPEG>
- Gabay, L., Seger, R., & Shilo, B. Z.** (1997b). MAP kinase in situ activation atlas during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, 124(18), 3535–3541. <https://doi.org/10.1242/DEV.124.18.3535>
- Ganz, T.** (2002). Epithelia: Not just physical barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3357–3358. <https://doi.org/10.1073/PNAS.072073199/ASSET/B08399C1-B1DB-4E13-9514-B99A35B7F4A7/ASSETS/GRAPHIC/PQ0720731001.JPEG>
- Geiger, J. A., Carvalho, L., Campos, I., Santos, A. C., & Jacinto, A.** (2011). Hole-in-One Mutant Phenotypes Link EGFR/ERK Signaling to Epithelial Tissue Repair in *Drosophila*. *PLOS ONE*, 6(11), e28349. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0028349>
- Gu, Y., & Rosenblatt, J.** (2012). New emerging roles for epithelial cell extrusion. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(6), 865–870. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2012.09.003>
- Guillot, C., & Lecuit, T.** (2013). Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science*, 340(6137), 1185–1189. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1235249/SUPPL\\_FILE/GUILLOT.SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1235249/SUPPL_FILE/GUILLOT.SM.PDF)
- Gupta, V. K., Nam, S., Yim, D., Camuglia, J., Martin, J. L., Sanders, E. N., O'Brien, L. E., Martin, A. C., Kim, T., & Chaudhuri, O.** (2021). The nature of cell division forces in epithelial monolayers. *Journal of Cell Biology*, 220(8). <https://doi.org/10.1083/JCB.202011106/212389>
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T.** (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 2008 453:7193, 453(7193), 314–321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>
- Hayashi, S., & Ogura, Y.** (2020). ERK signaling dynamics in the morphogenesis and homeostasis of *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 63, 9–15. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2020.01.004>
- Hino, N., Rossetti, L., Marín-Llauradó, A., Aoki, K., Trepát, X., Matsuda, M., & Hirashima, T.**

- (2020). ERK-Mediated Mechanochemical Waves Direct Collective Cell Polarization. *Developmental Cell*, 53(6), 646-660.e8. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2020.05.011>
- Hiratsuka, T., Fujita, Y., Naoki, H., Aoki, K., Kamioka, Y., & Matsuda, M.** (2015). Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse skin. *ELife*, 2015(4). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.05178>
- Ishii, M., Tateya, T., Matsuda, M., & Hirashima, T.** (2021). Retrograde erk activation waves drive base-to-apex multicellular flow in murine cochlear duct morphogenesis. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.61092>
- Izquierdo, E., Quinkler, T., & De Renzis, S.** (2018). Guided morphogenesis through optogenetic activation of Rho signalling during early Drosophila embryogenesis. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04754-z>
- Johnson, H. E., & Toettcher Correspondence, J. E.** (2019). Signaling Dynamics Control Cell Fate in the Early Drosophila Embryo. *Developmental Cell*, 48, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.01.009>
- Kamei, Y., Suzuki, M., Watanabe, K., Fujimori, K., Kawasaki, T., Deguchi, T., Yoneda, Y., Todo, T., Takagi, S., Funatsu, T., & Yuba, S.** (2008). Infrared laser-mediated gene induction in targeted single cells in vivo. *Nature Methods* 2008 6:1, 6(1), 79–81. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1278>
- Katoh, H., & Fujita, Y.** (2012). Epithelial Homeostasis: Elimination by Live Cell Extrusion. *Current Biology*, 22(11), R453–R455. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.04.036>
- Kessler, T., & Müller, H. A. J.** (2009). Cleavage of armadillo/beta-catenin by the caspase DrICE in drosophila apoptotic epithelial cells. *BMC Developmental Biology*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-15/FIGURES/7>
- Kinoshita, N., Hashimoto, Y., Yasue, N., Suzuki, M., Cristea, I. M., & Ueno, N.** (2020). Mechanical Stress Regulates Epithelial Tissue Integrity and Stiffness through the FGFR/Erk2 Signaling Pathway during Embryogenesis. *Cell Reports*, 30(11), 3875-3888.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.02.074>
- Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., & Matsuda, M.** (2011). Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Molecular Biology of the Cell*, 22(23), 4647–4656. <https://doi.org/10.1091/MBC.E11-01-0072/ASSET/IMAGES/LARGE/4647FIG7.JPEG>
- Kondo, T., & Hayashi, S.** (2013). Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination. *Nature* 2013 494:7435, 494(7435), 125–129. <https://doi.org/10.1038/nature11792>
- Lecuit, T., & Lenne, P. F.** (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:8, 8(8), 633–644. <https://doi.org/10.1038/nrm2222>
- Leoni, G., Neumann, P. A., Sumagin, R., Denning, T. L., & Nusrat, A.** (2015). Wound repair: role of immune–epithelial interactions. *Mucosal Immunology* 2015 8:5, 8(5), 959–968. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.63>
- Letizia, A., Sotillos, S., Campuzano, S., & Llimargas, M.** (2011). Regulated Crb accumulation

- controls apical constriction and invagination in *Drosophila* tracheal cells. *Journal of Cell Science*, *124*(2), 240–251. <https://doi.org/10.1242/JCS.073601>
- Levayer, R., Dupont, C., & Moreno, E.** (2016). Tissue Crowding Induces Caspase-Dependent Competition for Space. *Current Biology*, *26*(5), 670–677. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.12.072>
- Li, J., Zhang, S., Soto, X., Woolner, S., & Amaya, E.** (2013). ERK and phosphoinositide 3-kinase temporally coordinate different modes of actin-based motility during embryonic wound healing. *Journal of Cell Science*, *126*(21), 5005–5017. <https://doi.org/10.1242/JCS.133421/VIDEO-11>
- Llimargas, M., & Casanova, J.** (1999). EGF signalling regulates cell invagination as well as cell migration during formation of tracheal system in *Drosophila*. *Development Genes and Evolution*, *209*(3), 174–179. <https://doi.org/10.1007/S004270050241/METRICS>
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M., & McGinnis, W.** (2002). The *Drosophila* Hox gene *Deformed* sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell*, *110*(4), 457–466. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00871-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00871-1)
- Lusk, J. B., Lam, V. Y. M., & Tolwinski, N. S.** (2017). Epidermal Growth Factor Pathway Signaling in *Drosophila* Embryogenesis: Tools for Understanding Cancer. *Cancers 2017*, *Vol. 9*, Page 16, *9*(2), 16. <https://doi.org/10.3390/CANCERS9020016>
- Macara, I. G., Guyer, R., Richardson, G., Huo, Y., & Ahmed, S. M.** (2014). Epithelial Homeostasis. *Current Biology*, *24*(17), R815–R825. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2014.06.068>
- Mace, K. A., Pearson, J. C., & McGinnis, W.** (2005). An epidermal barrier wound repair pathway in *Drosophila* is mediated by grainy head. *Science*, *308*(5720), 381–385. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1107573/SUPPL\\_FILE/MACE.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1107573/SUPPL_FILE/MACE.SOM.PDF)
- Maechler, F. A., Allier, C., Roux, A., & Tomba, C.** (2019). Curvature-dependent constraints drive remodeling of epithelia. *Journal of Cell Science*, *132*(4). <https://doi.org/10.1242/jcs.222372>
- Marinari, E., Mehonic, A., Curran, S., Gale, J., Duke, T., & Baum, B.** (2012). Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature 2012* *484*:7395, *484*(7395), 542–545. <https://doi.org/10.1038/nature10984>
- Martin, J. L., Sanders, E. N., Moreno-Roman, P., Koyama, L. A. J., Balachandra, S., Du, X., & O'brien, L. E.** (2018). Long-term live imaging of the *drosophila* adult midgut reveals real-time dynamics of division, differentiation and loss. *ELife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.36248>
- Matsubayashi, Y., Ebisuya, M., Honjoh, S., & Nishida, E.** (2004). ERK Activation Propagates in Epithelial Cell Sheets and Regulates Their Migration during Wound Healing. *Current Biology*, *14*(8), 731–735. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2004.03.060>
- Matsubayashi, Y., Louani, A., Dragu, A., Sánchez-Sánchez, B. J., Serna-Morales, E., Yolland, L., Gyorgy, A., Vizcay, G., Fleck, R. A., Heddleston, J. M., Chew, T. L., Siekhaus, D. E., & Stramer, B. M.** (2017). A Moving Source of Matrix Components Is Essential for De Novo Basement Membrane Formation. *Current Biology*, *27*(22), 3526–3534.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.001>

- Matsubayashi, Y., Sánchez-Sánchez, B. J., Marcotti, S., Serna-Morales, E., Dragu, A., Díaz-de-la-Loza, M. del C., Vizcay-Barrena, G., Fleck, R. A., & Stramer, B. M.** (2020). Rapid Homeostatic Turnover of Embryonic ECM during Tissue Morphogenesis. *Developmental Cell*, *54*(1), 33-42.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.005>
- Mayer, U., & Nüsslein-Volhard, C.** (1988). A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the Drosophila embryo. *Genes & Development*, *2*(11), 1496–1511. <https://doi.org/10.1101/GAD.2.11.1496>
- Mazumdar, A., & Mazumdar, M.** (2002). How one becomes many: Blastoderm cellularization in Drosophila melanogaster. *BioEssays*, *24*(11), 1012–1022. <https://doi.org/10.1002/BIES.10184>
- Meredith, J. E., Fazeli, B., & Schwartz, M. A.** (2017). The extracellular matrix as a cell survival factor. <https://doi.org/10.1091/mbc.4.9.953>, *4*(9), 953–961. <https://doi.org/10.1091/MBC.4.9.953>
- Miao, G., & Hayashi, S.** (2015). Manipulation of gene expression by infrared laser heat shock and its application to the study of tracheal development in Drosophila. *Developmental Dynamics*, *244*(3), 479–487. <https://doi.org/10.1002/DVDY.24192>
- Morata, G., & Ripoll, P.** (1975). Minutes: Mutants of Drosophila autonomously affecting cell division rate. *Developmental Biology*, *42*(2), 211–221. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90330-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90330-9)
- Moreno, E., Valon, L., Levillayer, F., & Levayer, R.** (2019). Competition for Space Induces Cell Elimination through Compaction-Driven ERK Downregulation. *Current Biology*, *29*(1), 23-34.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2018.11.007>
- Müller, H. A. J., & 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. *Journal of Cell Biology*, *134*(1), 149–163. <https://doi.org/10.1083/JCB.134.1.149>
- Munjal, A., & Lecuit, T.** (2014). Actomyosin networks and tissue morphogenesis. *Development*, *141*(9), 1789–1793. <https://doi.org/10.1242/DEV.091645>
- Münster, S., Jain, A., Mietke, A., Pavlopoulos, A., Grill, S. W., & Tomancak, P.** (2019). Attachment of the blastoderm to the vitelline envelope affects gastrulation of insects. *Nature*, *568*(7752), 395–399. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1044-3>
- Nagata, R., & Igaki, T.** (2018). Cell competition: Emerging mechanisms to eliminate neighbors. *Development, Growth & Differentiation*, *60*(9), 522–530. <https://doi.org/10.1111/DGD.12575>
- Nassif, C., Daniel, A., Lengyel, J. A., & Hartenstein, V.** (1998). The role of morphogenetic cell death during Drosophila embryonic head development. *Developmental Biology*, *197*(2), 170–186. <https://doi.org/10.1006/DBIO.1998.8875>
- Niessen, C. M.** (2007). Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*, *127*(11), 2525–2532. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700865>
- Ninov, N., Chiarelli, D. A., & Martín-Blanco, E.** (2007). Extrinsic and intrinsic mechanisms

- directing epithelial cell sheet replacement during *Drosophila* metamorphosis. *Development*, *134*(2), 367–379. <https://doi.org/10.1242/DEV.02728>
- Nishimura, M., Inoue, Y., & Hayashi, S.** (2007). A wave of EGFR signaling determines cell alignment and intercalation in the *Drosophila* tracheal placode. *Development*, *134*(23), 4273–4282. <https://doi.org/10.1242/DEV.010397>
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., & Salomon, D. S.** (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, *366*(1), 2–16. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2005.10.018>
- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y., & Takeichi, M.** (1994). A *Drosophila* Homolog of Cadherin Associated with Armadillo and Essential for Embryonic Cell-Cell Adhesion. *Developmental Biology*, *165*(2), 716–726. <https://doi.org/10.1006/DBIO.1994.1287>
- Ogura, Y., Sami, M. M., Wada, H., & Hayashi, S.** (2019). Automated FRET quantification shows distinct subcellular ERK activation kinetics in response to graded EGFR signaling in *Drosophila*. *Genes to Cells*, *24*(4), 297–306. <https://doi.org/10.1111/GTC.12679>
- Ogura, Y., Wen, F. L., Sami, M. M., Shibata, T., & Hayashi, S.** (2018). A Switch-like Activation Relay of EGFR-ERK Signaling Regulates a Wave of Cellular Contractility for Epithelial Invagination. *Developmental Cell*, *46*(2), 162–172.e5. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2018.06.004>
- Ohsawa, S., Vaughen, J., & Igaki, T.** (2018). Cell Extrusion: A Stress-Responsive Force for Good or Evil in Epithelial Homeostasis. *Developmental Cell*, *44*(3), 284–296. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2018.01.009>
- Osswald, M., Barros-Carvalho, A., Carmo, A. M., Loyer, N., Gracio, P. C., Sunkel, C. E., Homem, C. C. F., Januschke, J., & Morais-de-Sá, E.** (2022). aPKC regulates apical constriction to prevent tissue rupture in the *Drosophila* follicular epithelium. *Current Biology*, *32*(20), 4411–4427.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2022.08.063/ATTACHMENT/C4CDC24B-2219-4A30-B361-23B93DD25DF7/MMC6.MP4>
- Paré, A. C., & Zallen, J. A.** (2020). Cellular, molecular, and biophysical control of epithelial cell intercalation. *Current Topics in Developmental Biology*, *136*, 167. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2019.11.014>
- Peterson, L. W., & Artis, D.** (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology* *2014* *14*:3, *14*(3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Pinheiro, D., & Bellaïche, Y.** (2018). Mechanical Force-Driven Adherens Junction Remodeling and Epithelial Dynamics. *Developmental Cell*, *47*(1), 3–19. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2018.09.014>
- Price, J. V., Clifford, R. J., & Schüpbach, T.** (1989). The maternal ventralizing locus *torpedo* is allelic to *faint little ball*, an embryonic lethal, and encodes the *Drosophila* EGF receptor homolog. *Cell*, *56*(6), 1085–1092. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90641-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90641-7)
- Purba, E. R., Saita, E. I., & Maruyama, I. N.** (2017). Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The “Rotation Model.” *Cells* *2017*, Vol. 6, Page 13,

6(2), 13. <https://doi.org/10.3390/CELLS6020013>

- Ramírez Moreno, M., & Bulgakova, N. A.** (2022). The Cross-Talk Between EGFR and E-Cadherin. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 3968. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.828673/BIBTEX>
- Revaitis, N. T., Niepielko, M. G., Marmion, R. A., Klein, E. A., Piccoli, B., & Yakoby, N.** (2020). Quantitative analyses of EGFR localization and trafficking dynamics in the follicular epithelium. *Development (Cambridge, England)*, *147*(15). <https://doi.org/10.1242/DEV.183210/266979/AM/QUANTITATIVE-ANALYSES-OF-EGFR-LOCALIZATION-AND>
- Rothenberg, K. E., & Fernandez-Gonzalez, R.** (2019). Forceful closure: Cytoskeletal networks in embryonic wound repair. *Molecular Biology of the Cell*, *30*(12), 1353–1358. <https://doi.org/10.1091/MBC.E18-04-0248/ASSET/IMAGES/LARGE/MBC-30-1353-G003.JPEG>
- Sanchez-Corrales, Y. E., Blanchard, G. B., & Röper, K.** (2018). Radially patterned cell behaviours during tube budding from an epithelium. *ELife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.35717>
- Shen, W., Chen, X., Cormier, O., Cheng, D. C.-P., Reed, B., & Harden, N.** (2013). Modulation of Morphogenesis by Egfr during Dorsal Closure in Drosophila. *PLoS ONE*, *8*(4), e60180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060180>
- Shilo, B. Z.** (2016). Developmental roles of Rhomboid proteases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *60*, 5–9. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2016.07.014>
- Sumigray, K. D., & Lechler, T.** (2015). Cell Adhesion in Epidermal Development and Barrier Formation. *Current Topics in Developmental Biology*, *112*, 383. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2014.11.027>
- Taddei, M. L., Giannoni, E., Fiaschi, T., & Chiarugi, P.** (2012). Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of Pathology*, *226*(2), 380–393. <https://doi.org/10.1002/PATH.3000>
- Tepass, U., & Hartenstein, V.** (1994). The Development of Cellular Junctions in the Drosophila Embryo. *Developmental Biology*, *161*(2), 563–596. <https://doi.org/10.1006/DBIO.1994.1054>
- Tomba, C., Luchnikov, V., Barberi, L., Blanch-Mercader, C., & Roux, A.** (2022). Epithelial cells adapt to curvature induction via transient active osmotic swelling. *Developmental Cell*, *57*(10), 1257–1270.e5. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2022.04.017>
- Urban, S., Brown, G., & Freeman, M.** (2004). EGF receptor signalling protects smooth-cuticle cells from apoptosis during Drosophila ventral epidermis development. *Development (Cambridge, England)*, *131*(8), 1835–1845. <https://doi.org/10.1242/DEV.01058>
- Vachon, P. H.** (2011). Integrin Signaling, Cell Survival, and Anoikis: Distinctions, Differences, and Differentiation. *Journal of Signal Transduction*, *2011*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2011/738137>
- Valencia-Expósito, A., Gómez-Lamarca, M. J., Widmann, T. J., & Martín-Bermudo, M. D.** (2022). Integrins Cooperate With the EGFR/Ras Pathway to Preserve Epithelia Survival



and Architecture in Development and Oncogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 1149. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.892691/BIBTEX>

**Valon, L., Davidović, A., Levillayer, F., Villars, A., Chouly, M., Cerqueira-Campos, F., & Levayer, R.** (2021). Robustness of epithelial sealing is an emerging property of local ERK feedback driven by cell elimination. *Developmental Cell*, 56(12), 1700–1711.e8. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2021.05.006>

**Villars, A., Matamoro-Vidal, A., Levillayer, F., & Levayer, R.** (2022). Microtubule disassembly by caspases is an important rate-limiting step of cell extrusion. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31266-8>

**Wang, S., Tsarouhas, V., Xylourgidis, N., Sabri, N., Tiklová, K., Nautiyal, N., Gallio, M., & Samakovlis, C.** (2009). The tyrosine kinase Stitcher activates Grainy head and epidermal wound healing in *Drosophila*. *Nature Cell Biology* 2009 11:7, 11(7), 890–895. <https://doi.org/10.1038/ncb1898>

**Wee, P., & Wang, Z.** (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* 2017, Vol. 9, Page 52, 9(5), 52. <https://doi.org/10.3390/CANCERS9050052>

**Wells, A.** (1999). EGF receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(6), 637–643. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00015-1)

**White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K., & Steller, H.** (1994). Genetic Control of Programmed Cell Death in *Drosophila*. *Science*, 264(5159), 677–683. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8171319>

**Wiellette, E. L., & McGinnis, W.** (1999). Hox genes differentially regulate Serrate to generate segment-specific structures. *Development*, 126(9), 1985–1995. <https://doi.org/10.1242/DEV.126.9.1985>

**Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T., & Knoblich, J. A.** (2008). Linking Cell Cycle to Asymmetric Division: Aurora-A Phosphorylates the Par Complex to Regulate Numb Localization. *Cell*, 135(1), 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.049>

**Wood, W., Jacinto, A., Grose, R., Woolner, S., Gale, J., Wilson, C., & Martin, P.** (2002). Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos. *Nature Cell Biology* 2002 4:11, 4(11), 907–912. <https://doi.org/10.1038/ncb875>

## 図表

表 1 本研究で使用したショウジョウバエ系統の一覧

ショウジョウバエの系統名	出典	識別 ID
<i>y w</i>	A. Nakamura	N/A
<i>w;sqh-GFP[40],pSqh-p120ctnTagRFP[86Fa]</i>	Ogura et al., 2018	N/A
<i>ubi-DE-Cadherin-GFP,sqh-mCherry[B1]</i>	Kondo & Hayashi, 2013	N/A
<i>egfr<sup>f24</sup></i>	R. J. Clifford & Schupbach, 1989	RRID:BDSC_6500
<i>rho<sup>del1</sup></i>	Bier et al., 1990	N/A
<i>Df(3L)H99 kn<sup>i-1</sup> p<sup>o</sup></i>	BDSC_1576 (White et al., 1994)	RRID:DGGR_106395
<i>par6<sup>delta226</sup>, par6-GFP;</i>	Wirtz-Peitz et al., 2008	N/A
<i>par6<sup>delta226</sup>, par6-GFP; His2Av-mRFP</i>	Kondo & Hayashi, 2013	N/A
<i>par6<sup>delta226</sup>, par6-GFP; egfr<sup>f24</sup>, His2Av-mRFP/CyO</i>	Ogura et al., 2018	N/A
<i>y w; egfr<sup>f24</sup> /CyO, ftz-lacZ;Df(3L)H99 kn<sup>i-1</sup> p<sup>o</sup> /TM6B, Tb Hu AbdA-lacZ</i>	本研究で作製	N/A
<i>w[*]; P{w[+mC]=UAS-Apoliner}5</i>	Bardet 2018	RRID:BDSC 32122
<i>y,w;UAS-Apoliner-5, act-Gal4[25]/CyO, Dfd-YFP</i>	本研究で作製	N/A
<i>pUbi-EKANES[58A]</i>	Ogura et al., 2018	N/A
<i>y[1 ]w[*]; M{w[+mC]=Ubi-EKAREV-NES}ZH-58A,P{w[+mC]=sqh-mCherry.M}B1</i>	Ogura et al., 2018	RRID: DGGR_118527
<i>w; rho[del1].pUb-iEKANES[attp2]/TM6B, Tb, Sb[1], Dfd-YFP</i>	Ogura et al., 2018	N/A
<i>HS-eGFP;His2Av-mRFP</i>	Miao & Hayashi, 2015	N/A

表 2 本研究で使用した抗体と試薬の一覧

抗体 [希釈率]	出典	識別 ID
Rabbit polyclonal anti-dpERK [1:200]	Stressgen	Cat# KAP-MA021E, RRID: AB_2139976
Rabbit [pThr185/pTyr187] ERK1/2 polyclonal antibody [1:100]	ENZO Life Sciences	Cat# BML-SA275-0100, RRID: AB_11180786
Rabbit anti-phospho-Histone H3 (ser10) [1:100]	Sigma	Cat# H0412, RRID: AB_477043
Rabbit polyclonal anti-Cleaved <i>Drosophila</i> Dcp-1 (Asp215) [1:100]	Cell signaling Technology	Cat#9578, RRID: AB_2721060
Mouse monoclonal anti-disc large (4F3) [1:10]	DSHB	Cat# 4F3 anti-discs large, RRID: AB_528203
Rat monoclonal anti-DE-Cadherin (DCAD2) [1:20]	Oda et al., 1994	DSHB Cat# DCAD2 RRID: AB_528120
Chicken polyclonal anti-beta galactosidase [1:400]	Abcam	Cat# ab9361, RRID: AB_307210
Goat anti-rabbit IgG Alexa 488 [1:400]	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11034, RRID:AB_2576217
Goat anti-rabbit IgG Alexa 555 [1:400]	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-21429, RRID: AB_141761
Goat anti-mouse IgG Alexa 633 [1:400]	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-21052, RRID: AB_2535719
Goat anti-Chicken IgY Dylight 550 [1:400]	Thermo Fisher Scientific	Cat# SA5-10071, RRID: AB_2556651
Goat anti-rat IgG DyLight 650 [1:400]	Abcam	Cat# ab98423, RRID: AB_10676080
試薬	出典	識別 ID
Paraformaldehyde	TAAB	Cat# P001
10×PBS	ナカライテスク	Cat# 27575-31
Heptane	ナカライテスク	Cat# 17523-53
Methanol	富士フィルム和光純薬	Cat# 137-01823
Bovine serum albumin	Sigma	Cat# A2153-50G
TritonX-100	Sigma	Cat# T9284-500ML
Tween 20 (Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate)	富士フィルム和光純薬	Cat# 167-11515

次亜塩素酸ナトリウム	花王	Cat# 17321
Non-reactive silicone fluids	信越シリコーン	Cat# FL-100-1,000CS
Vectashield with DAPI	VECTOR LABORATORIES, INC.	Car# H1200
Schneider's Drosophila Medium	Thermo Fischer/Gibco	Cat#: 21720024
Penicillin-Streptomycin solution	Thermo Fischer/Gibco	Cat#: 15070063
Fetal bovine serum	Thermo Fischer/Gibco	Cat# 10437
Tetramethylrodamine conjugated dextran, 3,000 MW, anionic	Thermo Fischer/Molecular Probes	Cat#: D3307

表 3 本研究で用いた器具及び解析ソフトウェア

器具・解析ソフトウェア	出典	識別 ID
Stainless-steel needle	Shiga Konchu, Ltd	Cat#: Insect pin #0
Scotch® 透明両面テープ	3M	Cat# W-18
35 mm glass based dish	IWAKI	Cat#: 3910-035
35 mm Tissue culture dish	IWAKI	Cat#: 3000-035
<i>Poly</i> L-Lysin-coated multi-well Glass Bottom Dish	Matsunami	Cat#: D141410
Neo カバーガラス	Matsunami	Cat# C024641
Olympus FV1000	Olympus	N/A
Olympus SZX16	Olympus	N/A
IR-LEGO-1000	Sigma-Koki Co., Ltd	N/A
Micropipette puller (P-97)	Sutter	N/A
ImageJ-Fiji	LOCI	<a href="https://fiji.sc">https://fiji.sc</a>
FRETratioFx	Ogura et al., 2019	GitHub: <a href="https://github.com/Wada-H/FRETratioFx">https://github.com/Wada-H/FRETratioFx</a>
Prism 9 software package	GraphPad	<a href="https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/">https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/</a>

図 1

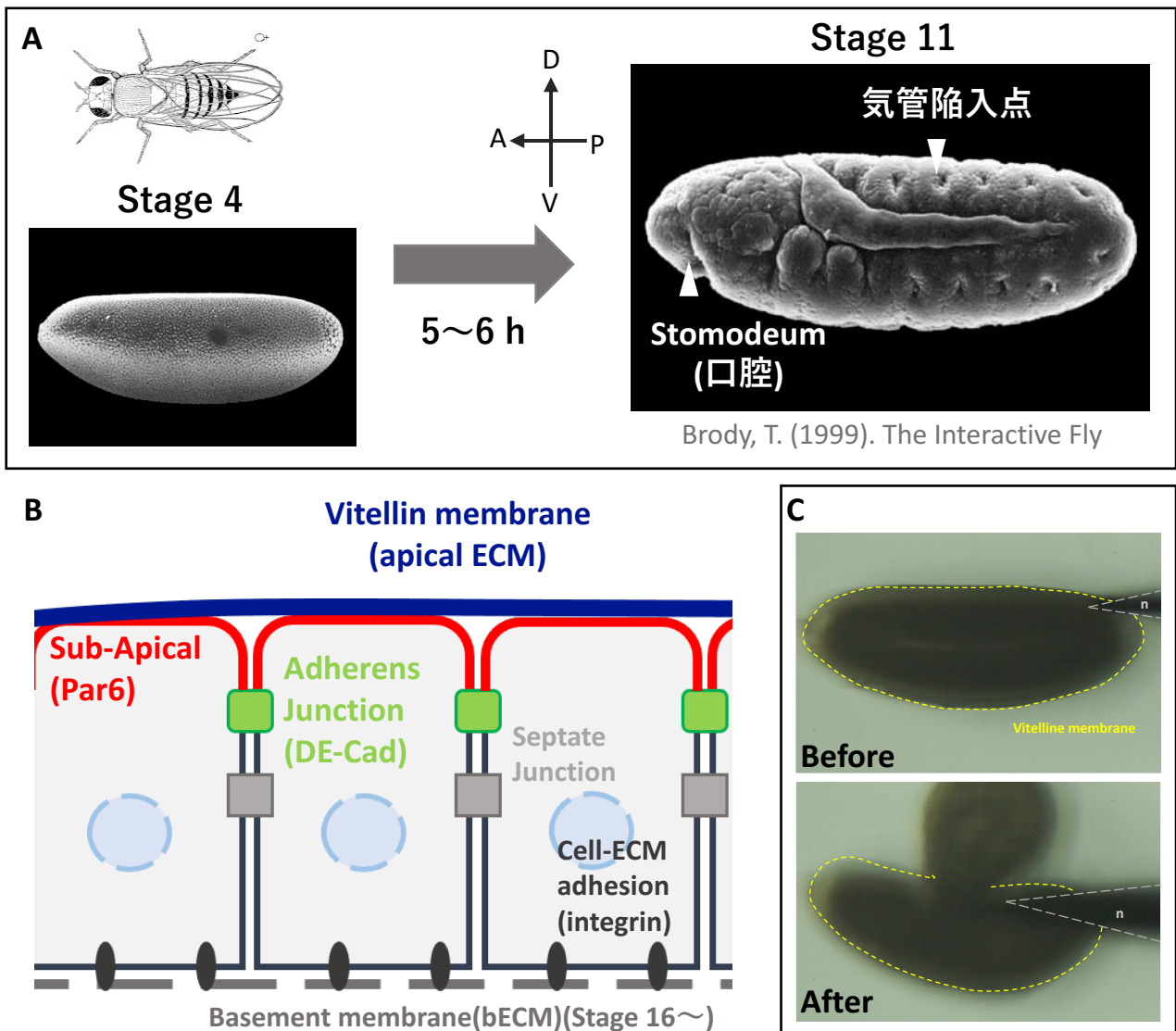
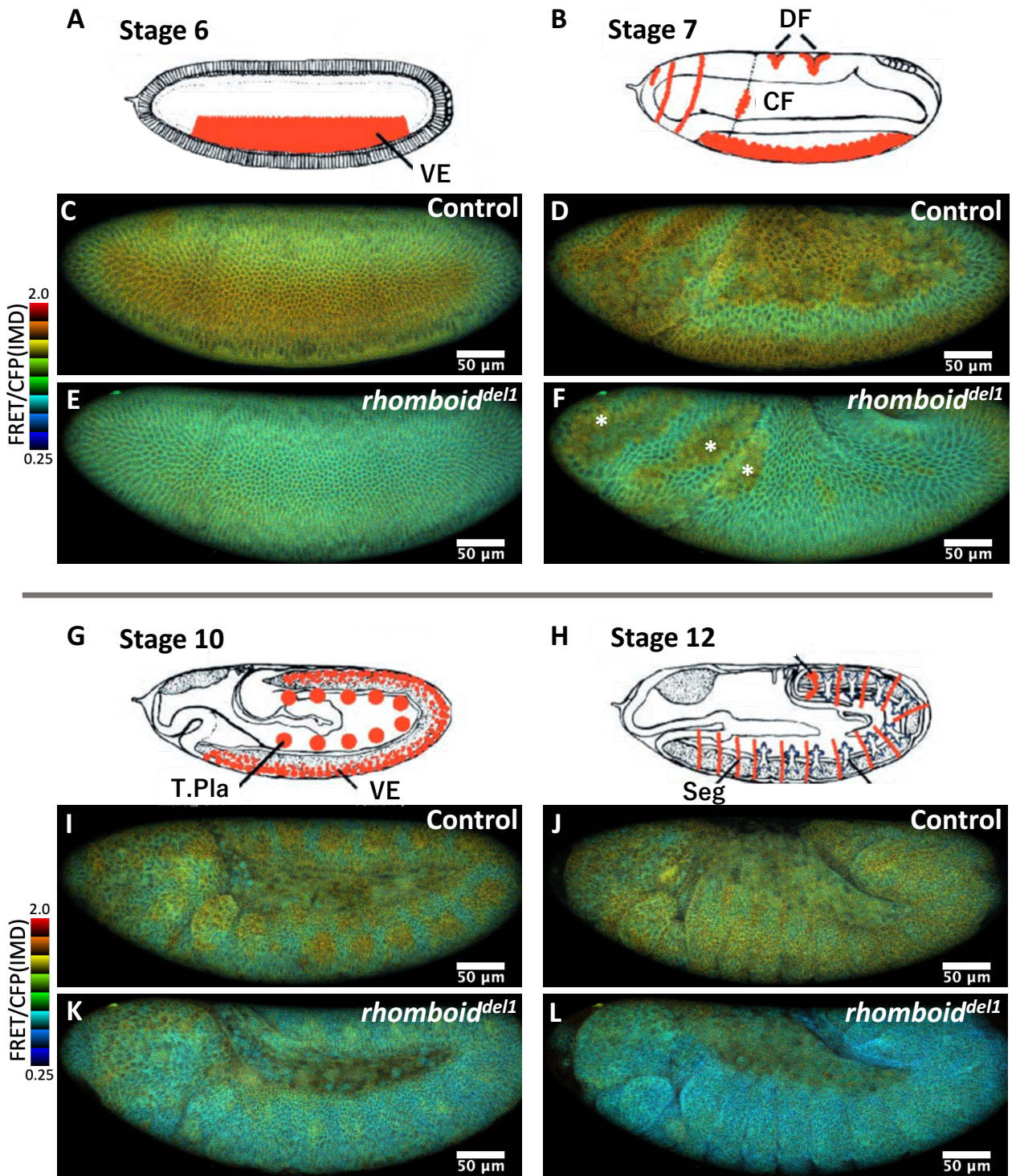


図 1 ショウジョウバエ胚の胚表皮組織とビテリン膜

(A) ショウジョウバエの胚発生。胚 (Stage4)は細胞分裂や形態形成を繰り返す、様々な特徴的な形態を示す (Stage 11)。本学位論文における以降の図では、一般に左側が頭部、右側が尾部、上側が背側、下側は腹側として記載する。(Brody, 1999)を一部改変し引用。(B) ショウジョウバエ胚の胚表皮組織の模式図。ショウジョウバエの胚表皮組織は一層の円柱型上皮細胞から構成される。細胞間接着は apical 側に E-cadherin (DE-Cad)が構成する接着結合 (adherens junction)が存在する。側面-基底部の間には密着結合 (septate junction)が存在し、上皮組織の完全性を保っている。さらに、上皮細胞の基底部分は発生後期に形成される基底膜(basement membrane)とインテグリンを介して接着する (Cell-ECM adhesion)。上皮極性を司る Par-6 が局在する上皮細胞の頂端部 (Sub-Apical)は胚全体を取り囲むビテリン膜(vitelline membrane)と機械的に接触している。(C)ビテリン膜(黄色破線)に針 (n)で穴を開けると、内圧が解放され、組織が急激に流出する。

Figure 2





## 図2 ERK FRET プローブを用いた胚発生における EGFR シグナル依存的な ERK 活性の観察

(A, B, G, H) 固定胚における EGFR シグナル依存的な活性型 ERK (dpERK) の局在の概略図。VE: Ventral ectoderm (腹側外胚葉)。DF: Dorsal Furrow (背側溝)。CF: Cephalic furrow (頭部溝)。T.Pla: Tracheal placode (気管原基)。Seg: Segment boundary (体節境界)。各図は(Gabay et al., 1997b)から引用・改変し、記載した。(C, D, I, J) Control 胚における ERK FRET の活性パターン。(E, F, K, L) Rhomboid 機能欠損変異体 (*rhomboid<sup>del1</sup>*) における ERK FRET の活性パターン。以下の図において、ERK FRET プローブの活性による FRET ratio (FRET/CFP 比) は、IMD (Intensity modulated display) 表示によって示す。\*: ERK FRET が感作する CDK1 の活性による分裂期の細胞。ERK FRET プローブは EGFR 依存的な ERK の活性とは独立して、CDK1 の活性によっても FRET を起こし、高い FRET ratio を示す (Aoki et al., 2013; Ogura et al., 2018)。

図 3

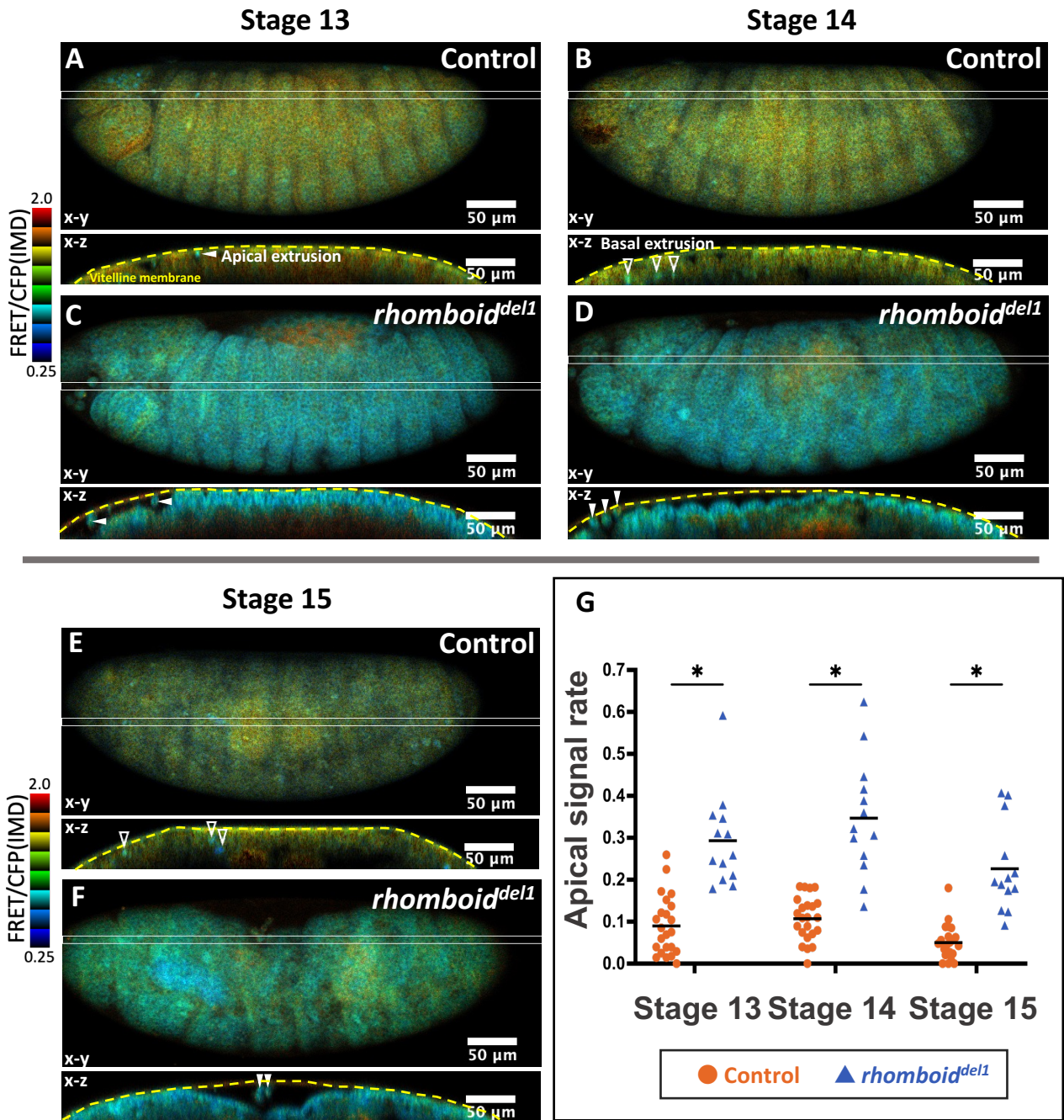


図 3 Rhomboid 機能欠損変異体における細胞の apical extrusion の増加

(A, B, E) Control 胚における ERK FRET 活性と横断面図 (白線内)。(C, D, F) Rhomboid 機能欠損変異体 (*rhomboid<sup>del1</sup>*)の胚における ERK FRET 活性と横断面図 (白線内)。白矢頭:頂端方向に細胞脱落 (apical extrusion)した細胞。空き矢頭:基底部方向に細胞脱落 (basal extrusion)した細胞。黄色破線:ビテリン膜。(G) Stage13, 14, 15 の各ステージの Control 胚 (N=23), *rhomboid<sup>del1</sup>* 胚 (N=14)における apical signal rate の比較。\*: $P < 10^{-5}$  (マンホイットニーの U 検定)。

図 4

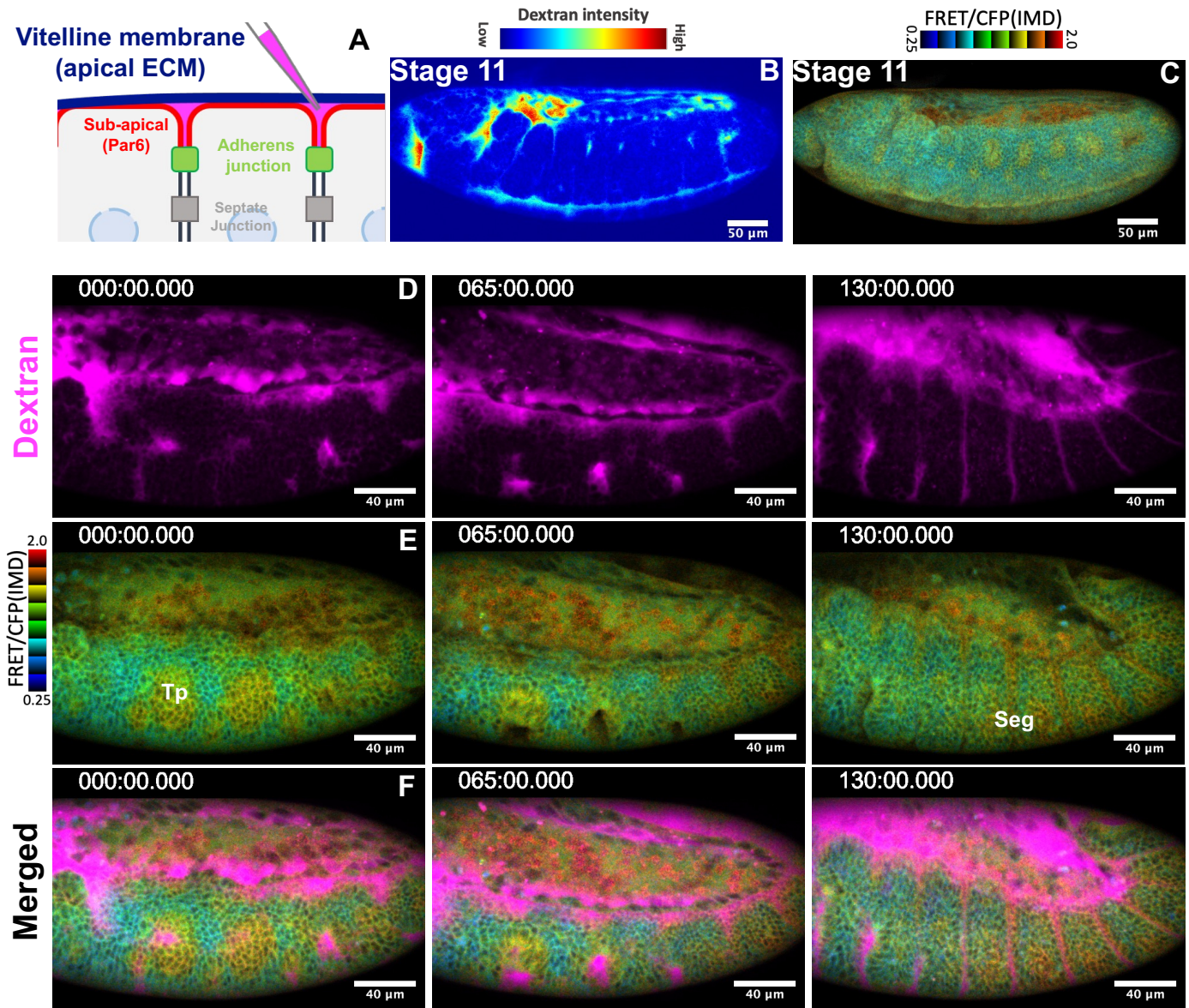


図 4 ビテリン膜間隙への蛍光デキストランのインジェクションと ERK FRET 活性の観察  
 (A) ビテリン膜と胚表皮組織との間隙への蛍光デキストランのインジェクションの模式図。  
 (B,C)EKAREV を発現した胚における蛍光デキスラン局在のシグナル強度(B)と ERK FRET 活性(C)。(D,E,F) 形態形成における蛍光デキストラン局在のシグナルと ERK FRET 活性の経時変化。デキストラン局在のシグナル(D) ERK FRET 活性(E)。D と E の重ね合わせ (F)。Tp: Tracheal placode (気管原基)。Seg: Segment boundary (体節境界)。時間表示は T1 体節の気管陥入の開始を 0 min とした。

图 5

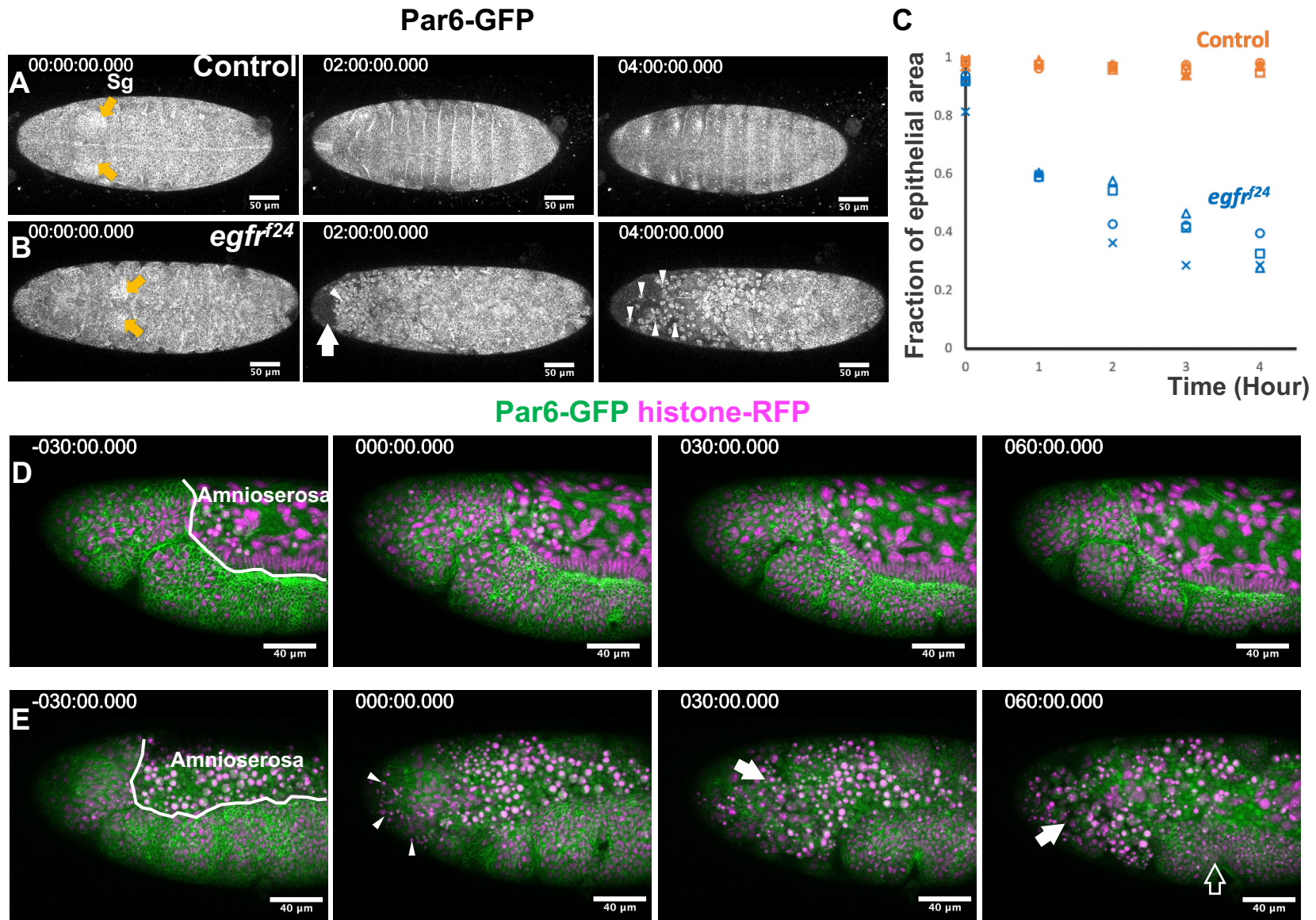


図 5 EGFR 機能欠損変異体の頭部体節における組織崩壊

(A, B, C) Stage 11 以降の腹側胚表皮組織の観察。

Control 胚(A)。EGFR 機能欠損変異体 (*egfr<sup>l24</sup>*)胚(B)。胚の腹側全体面積に対する胚表皮面積の割合の経時変化(C)。Control 胚 (N=4)。 *egfr<sup>l24</sup>* 胚 (N=4)。発生のタイミングの基準は唾腺プラコード (オレンジ矢印)の陥入開始を 0 とした。Sg: Salivary gland (唾腺プラコード)。白矢頭:Par-6 の細胞膜に沿った局在パターンが失われた細胞。白矢印:上皮組織の極性シグナル (Par-6)が失われた領域。

(D, E) Stage 11 以降の頭部体節の崩壊の様子。

Control 胚(D)。 *egfr<sup>l24</sup>* 胚(E)。発生のタイミングの基準は気管陥入点の出現を 0 とした。

白矢頭:Par-6 の細胞輪郭への局在が失われた細胞。白矢印:上皮組織の極性シグナル(Par-6)が失われた領域。空き矢印:Par-6 の細胞輪郭への局在が維持されている胸部体節。

6

DAPI cDcp1 (Apoptosis) Dlg (Cell membrane)

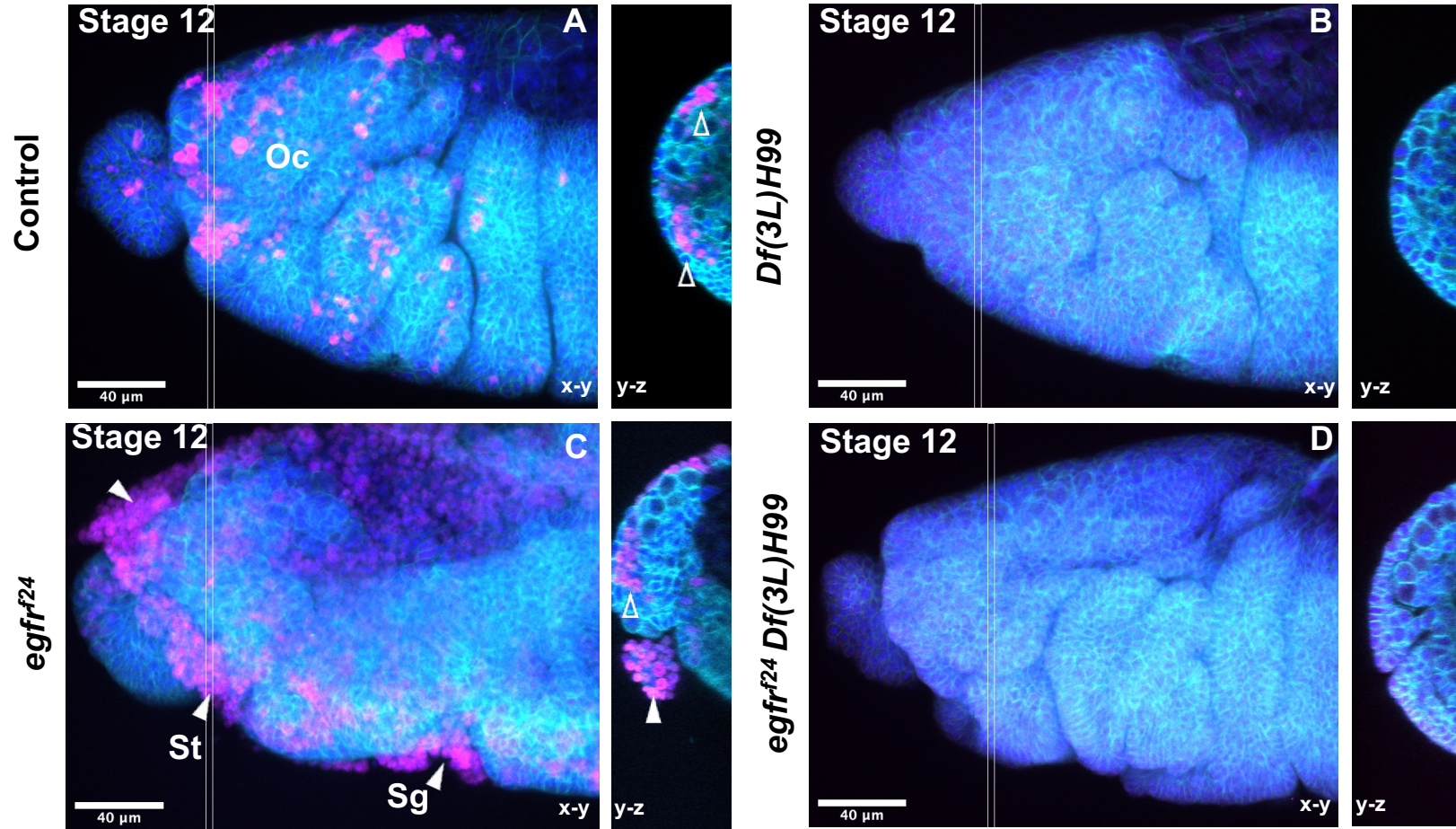


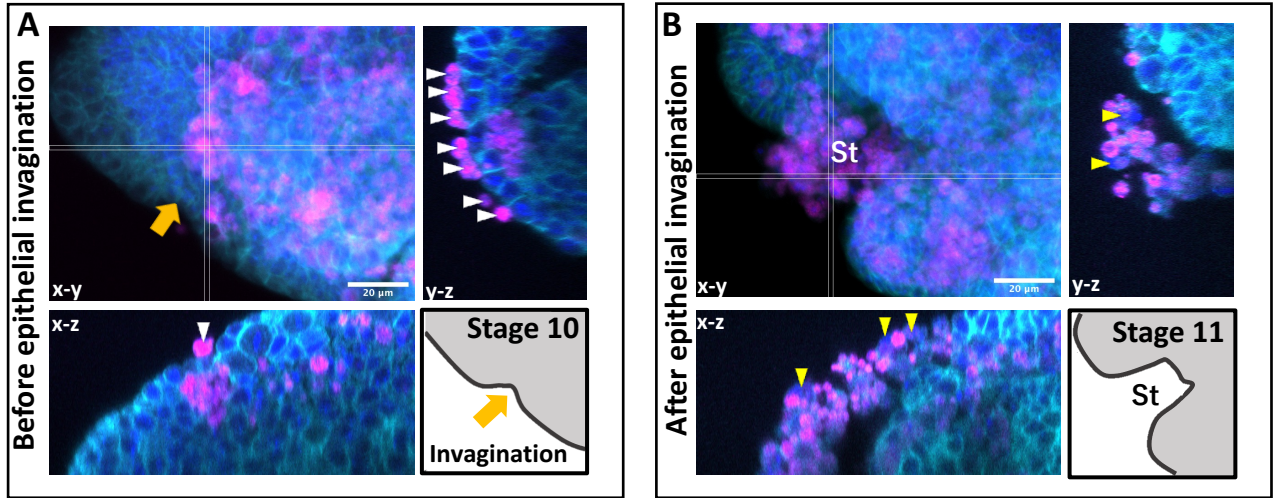
図 6 Stage12 の 頭部体節におけるアポトーシス細胞 (cDcp1 陽性細胞) の観察

(A) Control 胚。 (B) アポトーシス欠損変異体 (*Df(3L)H99*) 胚。 (C) *egfr<sup>24</sup>* 胚。 (D) *egfr<sup>24</sup>* および *Df(3L)H99* の 2 重変異体胚。

縦断面図は白線内。白矢頭: 胚表皮組織の apical 表面側に局在する cDcp1 陽性細胞。空き矢頭: 胚表皮組織の内部もしくは基部側に局在する cDcp1 陽性細胞。Oc: Ocular segment (頭部体節の一部)。St: Stomodeum (口腔)。Sg: Salivary gland (唾腺プラコードの陥入点)。

图7

DAPI cDcp1 (Apoptosis) Dlg (Cell membrane) (*egfr<sup>f24</sup>*)



Par6-GFP histone-RFP (*egfr<sup>f24</sup>*)

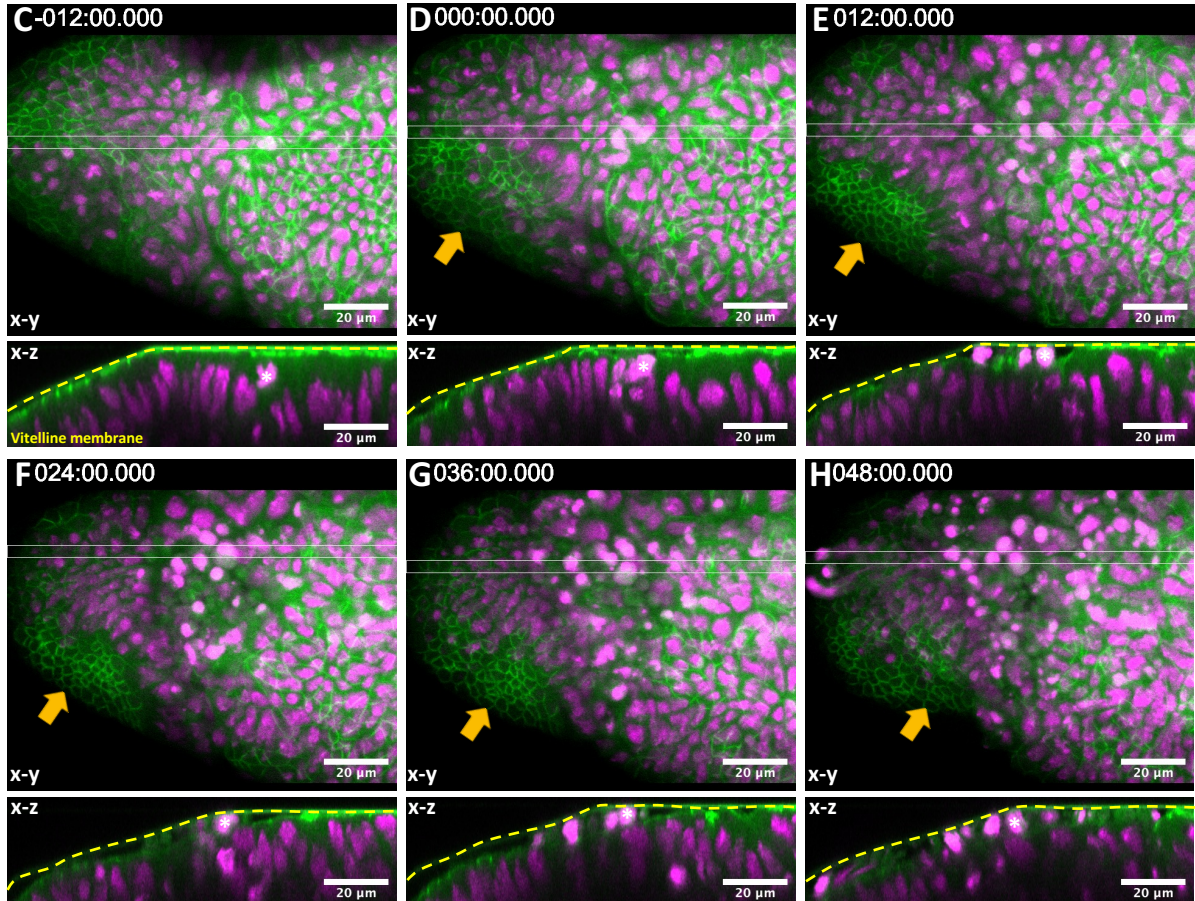
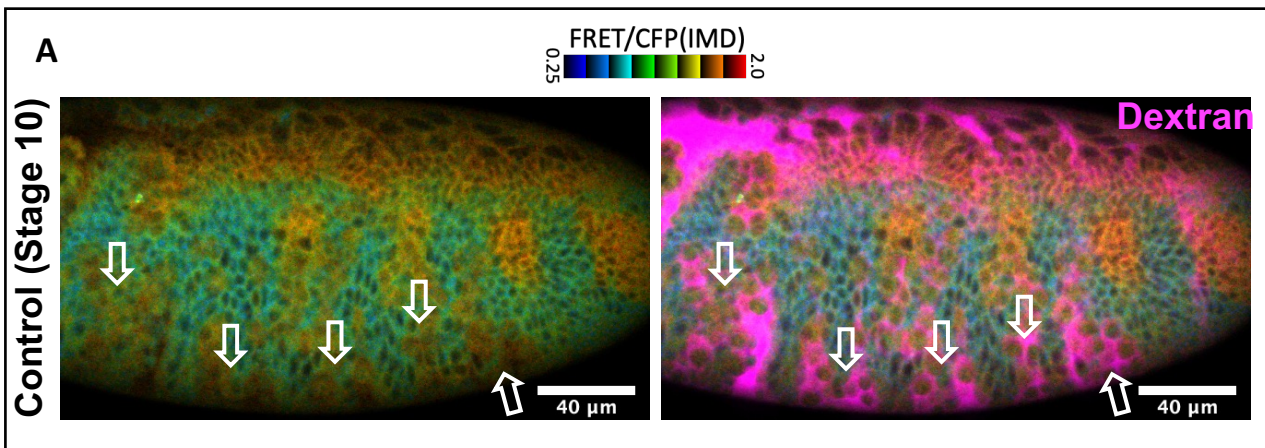




図 7 EGFR 機能欠損変異体の形態形成(Stomodeal invagination)と細胞の apical extrusion

(A) Stomodeal invagination 初期 (Stage 10)における cDcp1 陽性細胞の局在。(B) Stomodeal invagination 後 (Stage 11)における cDcp1 陽性細胞の局在。各断面図は白線内。白矢頭:胚表皮組織の apical 側に局在する cDcp1 陽性細胞。黄色矢頭:胚表皮組織の apical 側に局在する cDcp1 陰性細胞。  
(C-H) apical extrusion と形態形成のタイムラプス画像。\*:クロマチン (histone-RFP)が凝集し異常な形態を示した核。この核が apical extrusion されたタイミングを 0 とした。黄色波線:ビテリン膜。横断面図は白線内。オレンジ矢印:胚表皮組織が陥入する領域。

図8



DAPI pHiston-H3 (Mitosis) Dlg ( Cell membrane)

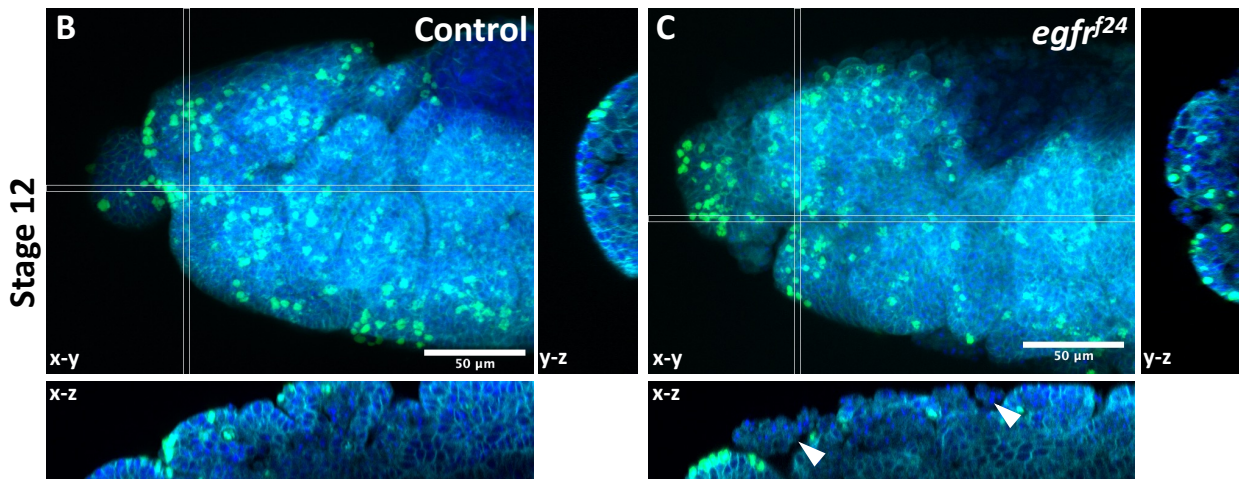


図8 細胞分裂が胚表皮組織に与える影響の観察

(A) ERK FRET プローブの活性化 (CDK1 の活性化)が生じた分裂期細胞の周囲で生じる蛍光デキストランの蓄積。分裂期の細胞における ERK FRET プローブの活性化(左図、空矢印)。これらの細胞の周囲では蛍光デキストラン局在のシグナルの増加が見られた (右図)。(B, C) Stage 12 の頭部体節における分裂期細胞 (pHistone-H3 陽性細胞)の分布。Control 胚(B)。 *egfr<sup>24</sup>* 胚(C)。各断面図は白線内。白矢頭:apical extrusion された細胞のクラスター。

図9

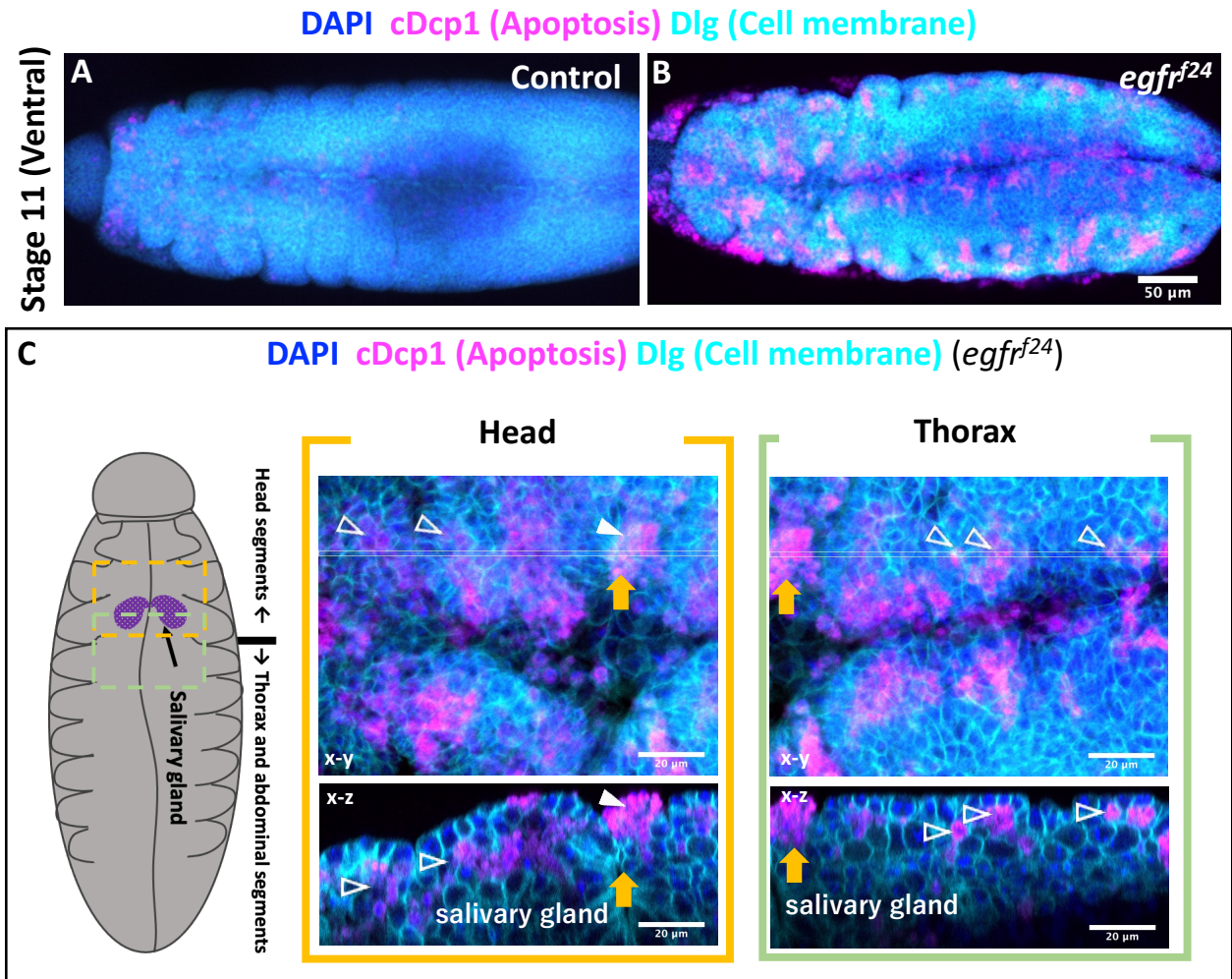


図9 頭部体節と胸部体節におけるアポトーシス細胞の分布の比較

(A, B) Stage 11 の腹側胚表皮組織における cDcp1 陽性細胞の分布。Control 胚(A)。 *egfr<sup>f24</sup>* 胚(B)。(C) Stage11 における腹側表皮組織の模式図 (左図)。Salivary gland よりも前方の腹側胚表皮組織 (中央図;頭部体節)。Salivary gland よりも後方の腹側胚表皮組織 (右図;胸部体節)。胚は(B)と同一。白矢頭;胚表皮組織の apical 表面に局在する cDcp1 陽性細胞のクラスター。空き矢頭;胚表皮組織の内部もしくは基底部に局在する cDcp1 陽性細胞。オレンジ矢印;唾腺陥入点。

図10

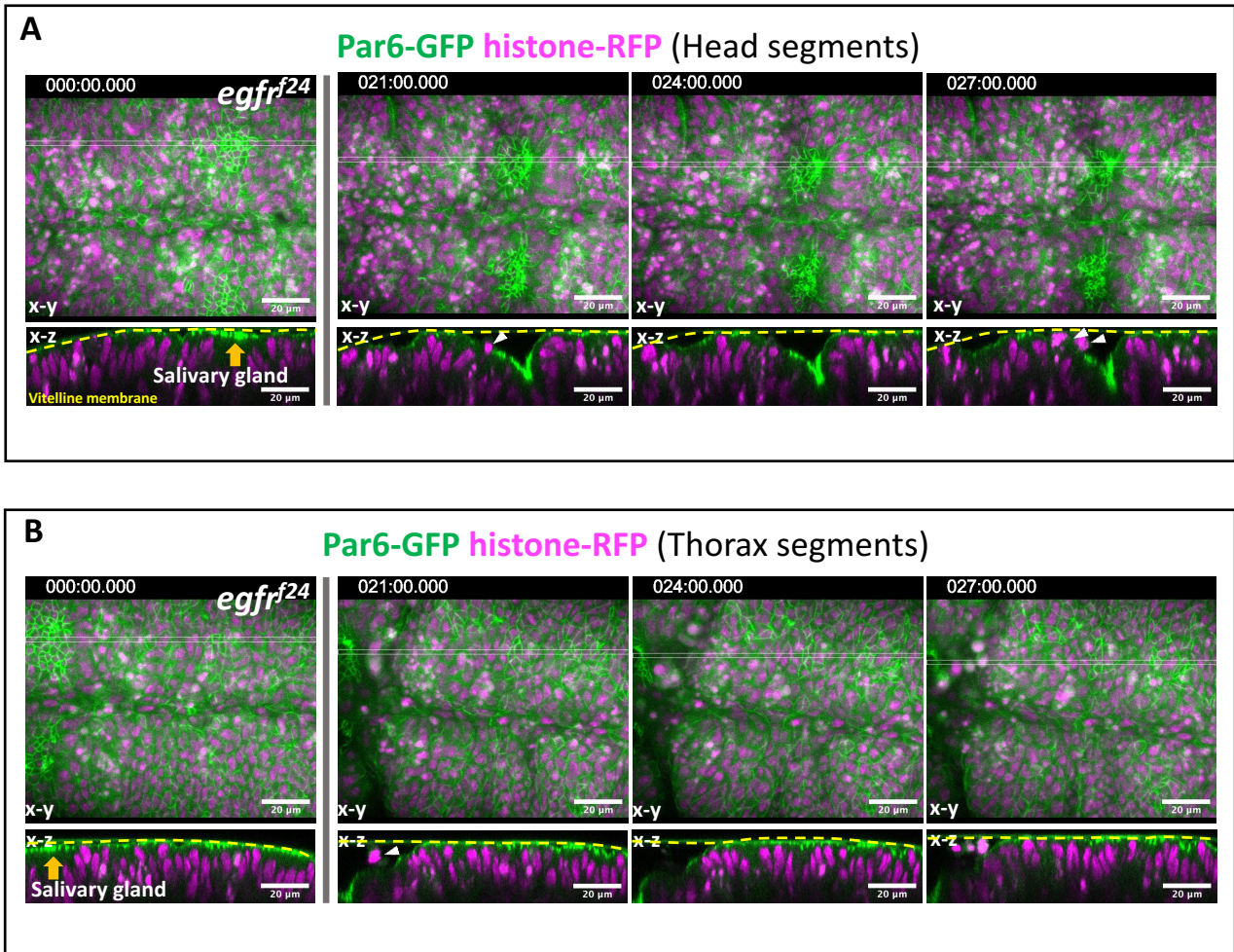


図 10 タイムラプス撮影による EGFR 機能欠損変異体の頭部体節と胸部体節の比較

(A) 唾腺陥入 (0 min)後の頭部体節の腹部胚表皮組織のタイムラプス画像。(B) 唾腺陥入 (0 min)後の胸部体節の腹部胚表皮組織のタイムラプス画像。横断面図は白線内。黄色破線;ビテリン膜。白矢頭;apical extrusion された細胞。オレンジ矢印;唾腺陥入点 (Salivary gland)。

図11  
DE-Cadherin

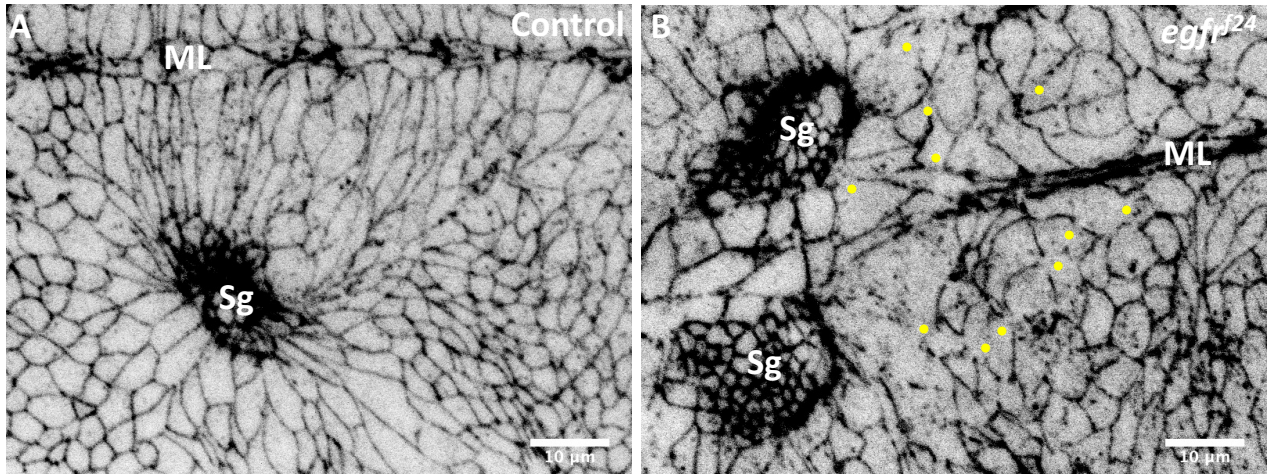


図 11 EGFR 機能欠損変異体における E-cadherin 局在の破断

(A, B) 唾腺陥入後(Stage 12)の胚における唾腺陥入点周辺の E-Cadherin シグナルの局在。Control 胚 (A)。 *egfr<sup>f24</sup>* 胚(B)。黄色ドット:E-cadherin 局在の破断。Sg; Salivary gland(唾腺プラコードの陥入点)。ML:Ventral midline(腹側正中線)。

図12

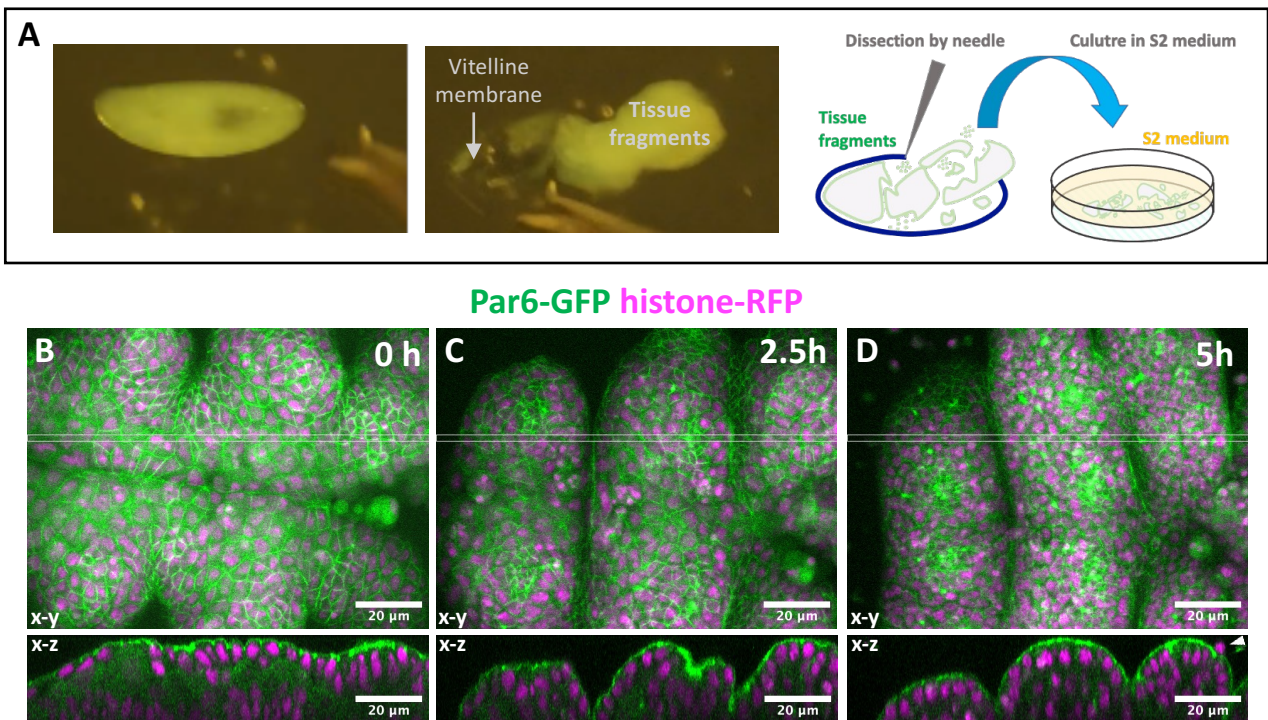


図 12 胚の解剖によるビテリン膜の除去と胚組織片の観察

(A)胚の解剖と胚組織片培養の模式図。Stage 11~Stage12 の胚を針で解剖し、ビテリン膜を除去する(左図、中央図)。ビテリン膜を除去した胚組織片をガラスシャーレで、ショウジョウバエ細胞の培地内で培養し、1時間以内に観察を開始した。(B-D) 胚組織片観察開始後の変化。横断面図は白線内。白矢頭:apical extrusion を起こした細胞。

図13

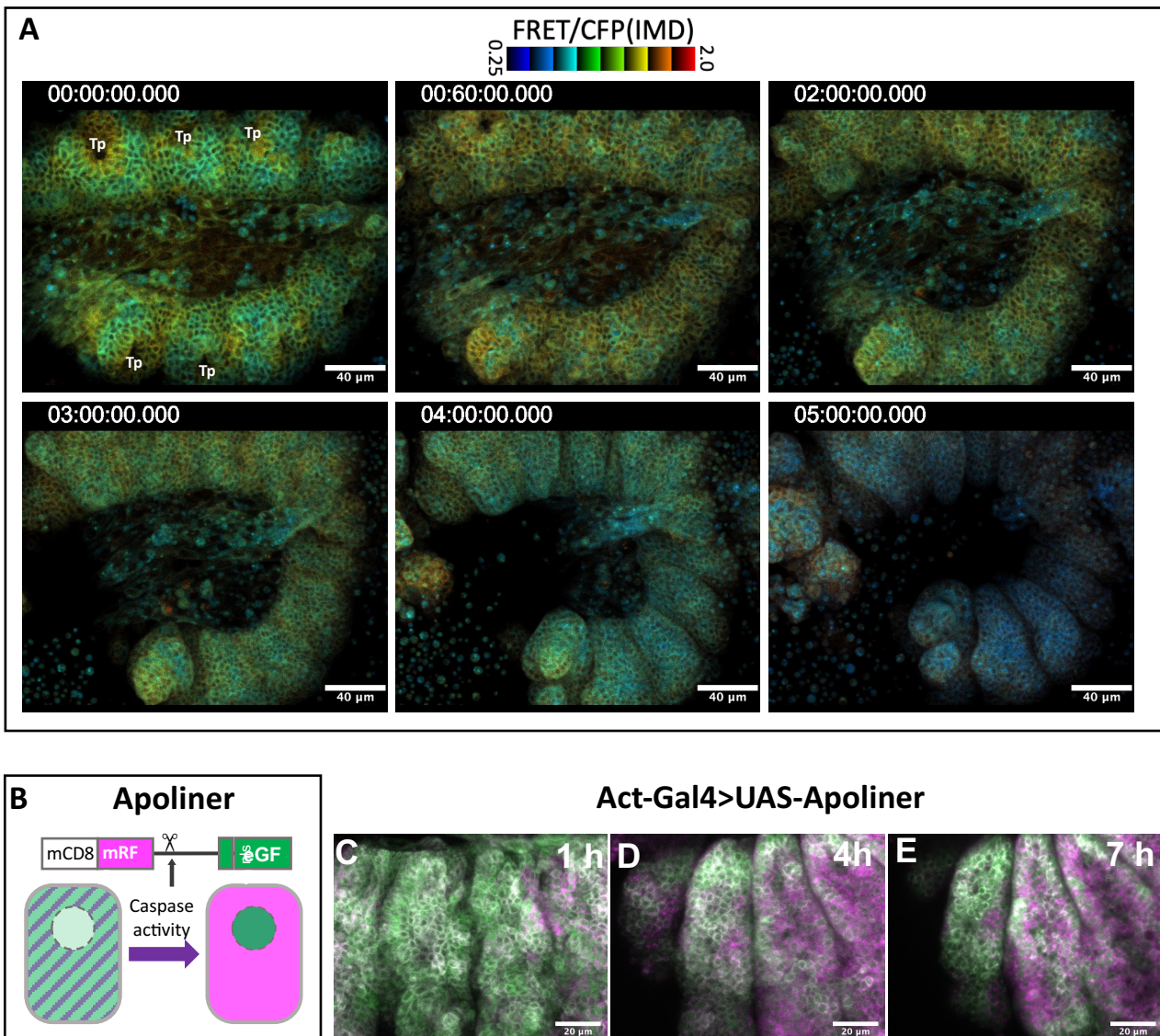


図 13 胚組織片における ERK FRET 活性とカスパーゼ活性の観察

(A) EKAREV を発現した胚組織片における ERK FRET 活性の経時変化。観察の開始(0 min)は胚の解剖から 1 時間以内に行なった。Tp: Tracheal placode。(B) カスパーゼ活性のレポーター Apoliner; (Bardet et al., 2008)。の模式図。(C-E) 胚組織片における Apoliner の観察 (N=13)。カスパーゼの活性化は Apoliner の eGFP シグナルを細胞質から核内に移行させる。

図14

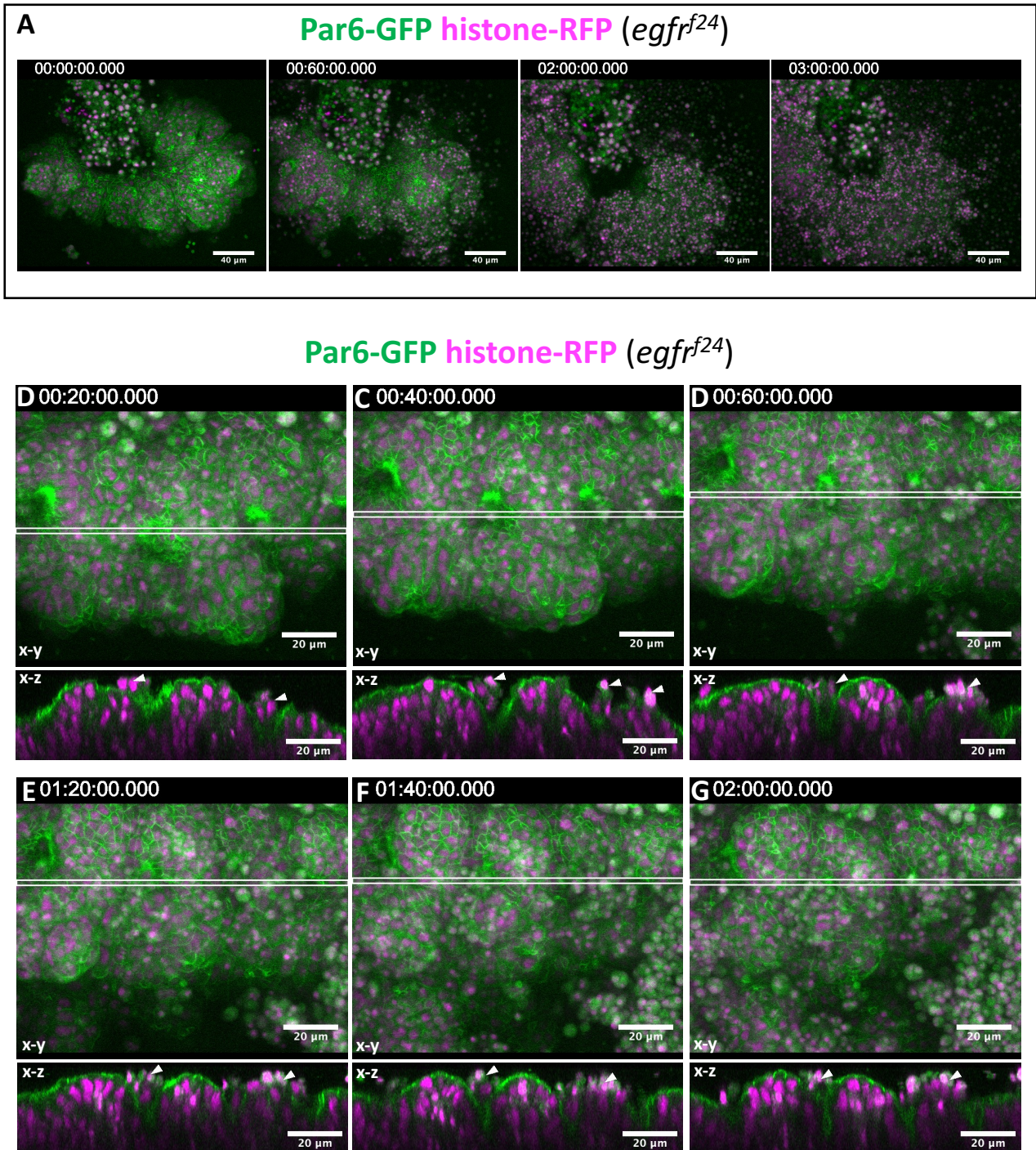
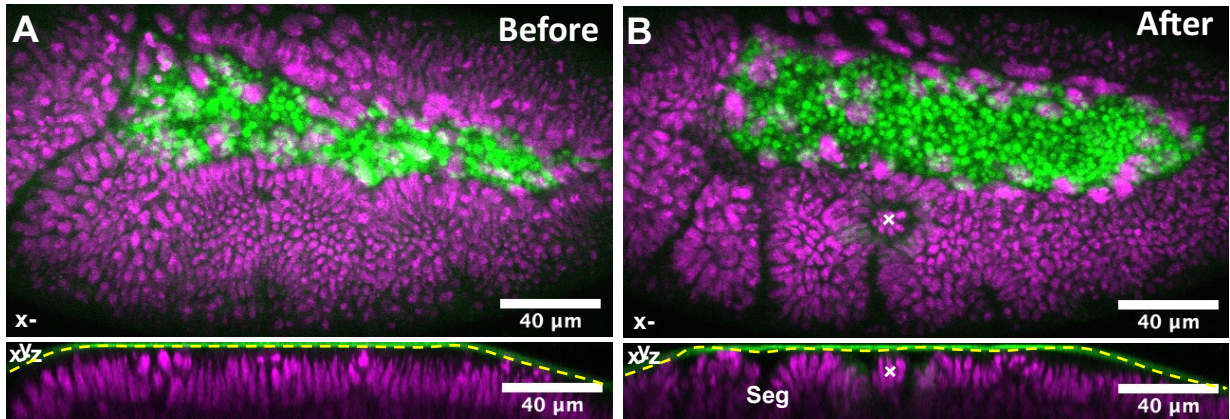


図 14 EGFR 機能欠損変異体の胚組織片の組織崩壊と apical extrusion の観察  
 (A) EGFR 機能欠損変異体(*egfr<sup>f24</sup>*)の胚組織片における組織崩壊の様子 (N=13)。(D-G) 組織崩壊を示す *egfr<sup>f24</sup>* 胚の胚表皮組織における細胞の apical extrusion。横断面図は白線内。白矢印; apical extrusion された細胞のクラスター。観察の開始(0 min)は胚の解剖から 1 時間以内に行なった。



図15

HS-GFP his-RFP (100 mW 0.5 s)



Par6-GFP (100 mW 0.5 s)

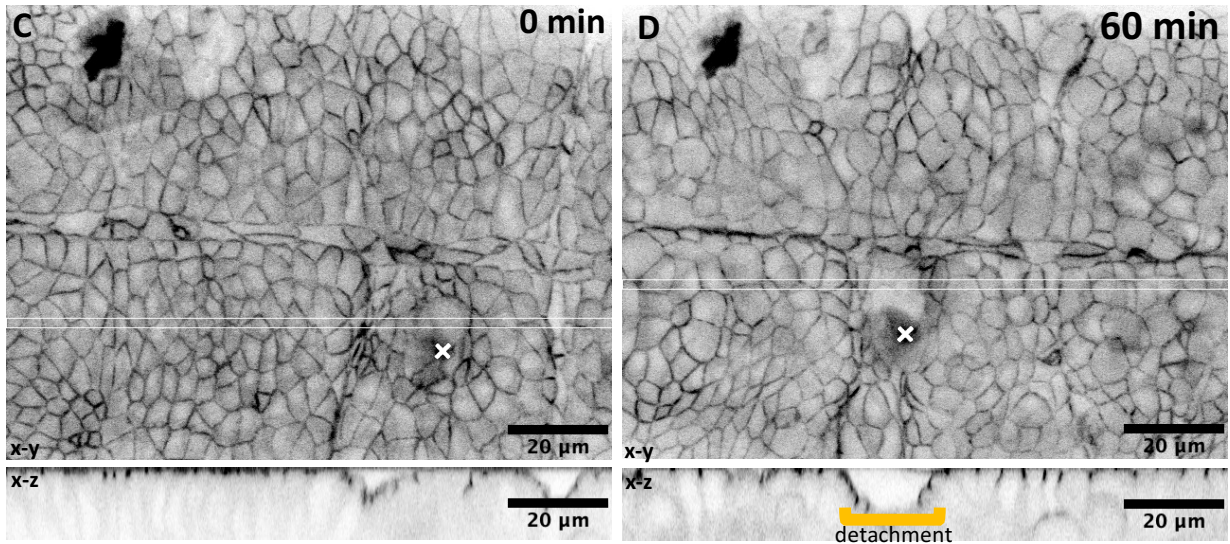


図 15 赤外線レーザーを用いた胚表皮組織の創傷

(A,B)HS-GFP, his-RFP 発現胚 (Stage 11)。赤外線レーザーを照射前の胚 (A)。赤外線レーザー照射後の胚 (B)。赤外線レーザーの照射(X 印)は細胞を固定し、胚組織を創傷するがビテリン膜に傷は生じない。また固定された細胞の周辺ではヒートショックによる GFP の発現が生じた。黄色破線;ビテリン膜。Seg; Segmental groove(体節溝)。(C, D) 赤外線レーザー照射後に生じる胚表皮組織の異所的なビテリン膜からの剥離。赤外線レーザーを照射後の撮影開始直後 (0 min)の腹側胚表皮組織 (C)。赤外線レーザー照射後の撮影開始から 60 分経過した腹側胚表皮組織 (D)。オレンジで示した領域はビテリン膜から離れた胚表皮組織。X 印:赤外線レーザーを照射した領域。観察の開始 (0 min)は赤外線レーザーの照射から 5 分以内に行なった。

図16

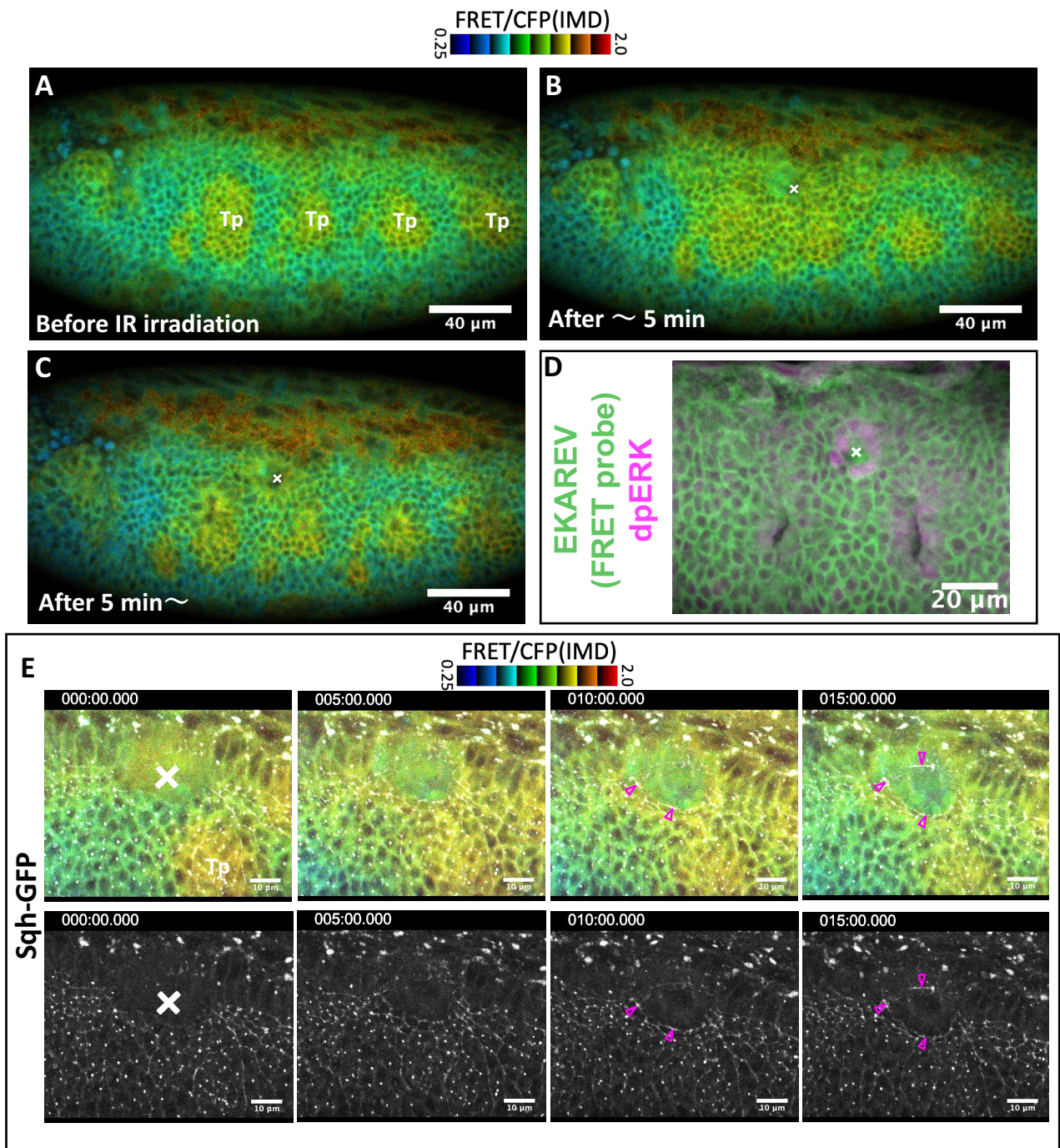


図 16 赤外線レーザーによる創傷で生じる ERK FRET の活性化とミオシンの蓄積

(A-C) 赤外線レーザー (100 mW 0.5 秒)による創傷前後の ERK FRET 活性。創傷前(A)は各体節で気管原基 (Tp)での ERK 活性化が生じていた。創傷直後 (5 分以内に観察)には複数の体節にまたがる広い ERK FRET の活性化(B)。創傷後 5 分後以降の傷(X 印)近傍の ERK FRET の活性化(C)。(D) 赤外線レーザーで創傷した固定胚における dpERK の局在。(E) 傷(X 印)周辺の ERK FRET 活性とミオシンの蓄積 (紫矢頭)のタイムラプス画像。観察の開始 (0 min)は創傷から 5 分以内に行なった。

図17

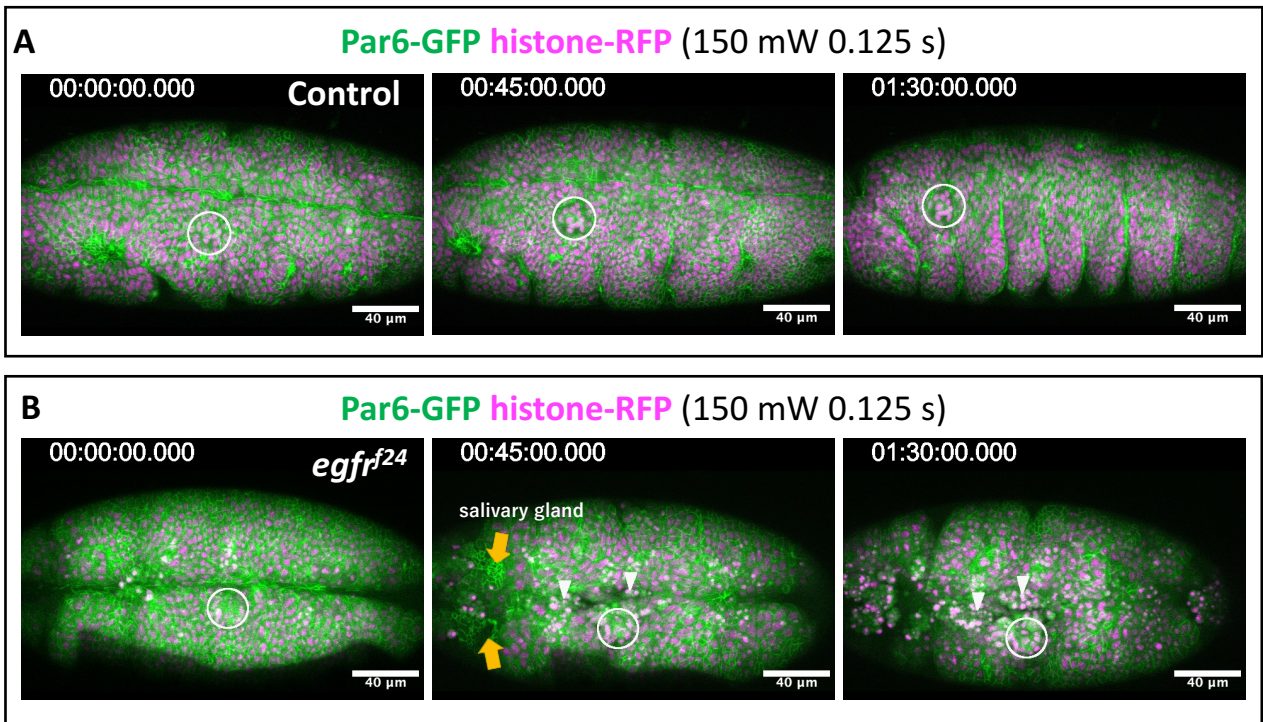


図 17 赤外線レーザーによる胸部体節の腹側胚表皮組織の創傷

(A, B) EGFR 機能欠損変異体(*egfr<sup>24</sup>*)の胚において、頭部体節の組織崩壊が生じる前の胚表皮組織を創傷した。Control 胚(A)。 *egfr<sup>24</sup>* 胚(B)。丸印;創傷された領域。白矢頭;胸部体節における異所的な apical extrusion。オレンジ矢印;唾腺陥入点(salivary gland)。観察の開始(0 min)は創傷から 5 分以内に行なった。