



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。



(別紙様式3)

論文内容の要旨

氏名 吉田 健太郎

専攻 生物学専攻

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

ショウジョウバエ胚の上皮安定性を維持する
上皮成長因子受容体シグナルの研究

指導教員

林 茂生

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

増加する。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、上皮組織の基底側側に脱落する。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の 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。

氏名	吉田 健太郎		
論文 題目	ショウジョウバエ胚の上皮安定性を維持する上皮成長因子受容体シグナルの研究		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	林 茂生
	副 査	教授	井上 邦夫
	副 査	教授	森本 充
	副 査	准教授	影山 裕二
	副 査		
要 旨			
<p>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。</p> <p>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 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されている。</p> <p>本論文ではまず 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が考えられた。</p> <p>次に 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増加する。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。</p> <p>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、上皮組織の基底部側に脱落する。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。</p>			

氏名

吉田健太郎

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で、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た領域で生じた。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察された。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られた。

以上のように、本研究は、ショウジョウバエの上皮形成における上皮成長因子受容体の役割について、その変異体の表現型解析と胚操作によって細胞生物学的に研究したものであり、上皮組織の完全性維持の機構に関して重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の吉田健太郎は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。