

基底膜の穴のサイズに破綻をきたした変異体の確立

国立遺伝学研究所 多細胞構築研究室
伊原 伸治

1. はじめに

緒言

基底膜を介した細胞移動は細胞浸潤と呼ばれ、多細胞体を構築するために必須な現象である。細胞浸潤は、発生段階のみならずリンパ球の遊走でも観察され、生体の恒常性維持に必要な現象である。さらに癌転移の最初のステップでもあり、分子機構を明らかにする事は、癌転移を理解するために極めて有用である。細胞が浸潤するときに基底膜に穴をあけることはよく知られているが、その大きさ（穴の直径）がどのように制御されているのか？まったく不明であった。申請課題では、細胞浸潤に観察される穴の形成とその大きさの制御に焦点を絞り、さらに浸潤において障壁として作用する基底膜形成を明らかにするために、遺伝学的手法を用いて、それぞれの現象に異常をきたした変異体の確立を目指した。これまでに、私は線虫*C. elegans*をもちいて基底膜の穴のサイズがどのように制御されているのか、その実験モデルを報告した。

(Ihara S, *et al.*, *Nature Cell Biology*, 2011)。基底膜の穴の大きさを測定できる研究モデルは、世界で初めて報告した*in vivo*実験モデルであり、新しい研究分野を切り開くことのできるポテンシャルがあると確信している。申請課題では、線虫*C. elegans*と化学的突然変異誘起剤（EMS）を用いて、穴のサイズが異常になる変異体を確立することを目的とする。さらに基底膜はシート状の超巨大蛋白質複合体だが、発生段階でどのように形成されるのか？殆どわかっていない。そこで、同様にEMSをもちいて、基底膜形成に異常を示す変異体の確立を行った。

目的

申請課題では、3つのテーマに焦点を絞って、変異体スクリーニングを行う。

(1) 発生に伴う基底膜形成を制御する分子メカニズム

基底膜はシート状の超巨大蛋白質複合体だが、発生段階でどのように形成されるのか？殆どわかっていない。基底膜の形成に異常を示す複数系統の新規変異体を樹立して変異体を解析することで、基底膜制御に関わる原因遺伝子を特定する。そして発生において基底膜がどのように形成されるのか、その全容を明らかにする。

(2) 細胞は形成された基底膜にどのように穴をつくるのか？（初期浸潤）

シート状の構造をもつ基底膜が生体内でどのような構造変化をとるのか、興味深い問題である。癌細胞の浸潤のみならず原腸陥入やリンパ球の遊走時にも、基底膜に穴が開くことは必須であり、そして穴のサイズの正確な制御機構が器官の気密性維持に必要であると考えられている。線虫*C. elegans*のアンカー細胞の実験モデルは、浸潤時に基底膜に穴を開けるためにどのような遺伝子が必要なのか？遺伝学的解析を行うことができる。突然変異誘起剤（EMS）を用いて、細胞浸潤過程に異常を示す新規変異体変異体を樹立する。

(3) 細胞浸潤時に観察される穴のサイズはどのように調節されるのか？（浸潤後期）

これまでに基底膜の穴の形の可視化に成功している（図1）。この可視化モデルを用いて、穴の大きさが異常になる変異体を樹立する。

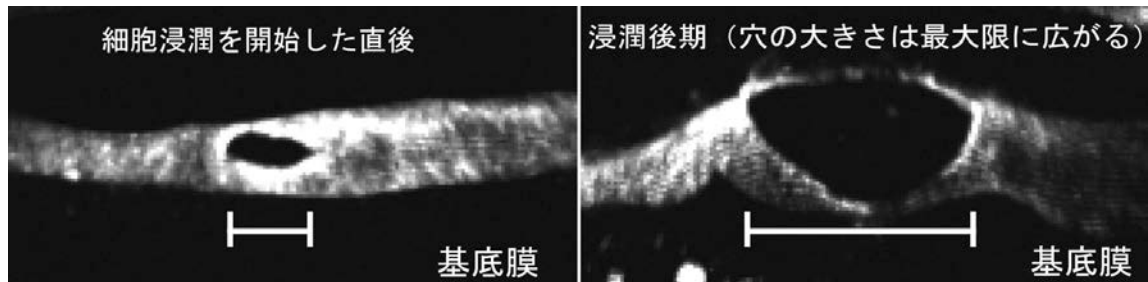


図1 基底膜の可視化(三次元構築像)

背景

基底膜は足場として細胞の極性を制御するが、その構造的な特徴から細胞同士が無秩序に行き交うことを防ぐ障壁として働くことが知られている。基底膜を介する細胞移動の事を細胞浸潤と呼ぶが、細胞浸潤は癌細胞のみならず、原腸陥入などの発生過程でも観察される現象である。浸潤時に細胞は基底膜に穴をつくって移動するが、その*in vivo*解析は殆ど行われていない。主たる理由は、基底膜を人工的に合成することができないため、適切に観察することが困難なためである。基底膜と浸潤細胞を可視化することで確立された線虫(*C. elegans*)のアンカー細胞の浸潤モデルは、有用な*in vivo*実験モデルであり(Sherwood DR, *et al.*, *Dev. Cell.*, 2003; Sherwood DR, *et al.*, *Cell*, 2005)、遺伝学、細胞生物学を組み合わせることで解析できることが特徴である。私は従来の緑色、赤色蛍光蛋白質、そして光転換型の蛍光蛋白質と共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせた3次元構築を行うことで、基底膜制御と細胞浸潤における新たな分子メカニズムを報告した。(Ihara S, *et al.*, *Nature Cell Biology*, 2011)。論文で報告した実験モデルは注目を集め、*Current Biology* 8月号で研究成果が紹介され(Schramm M and Hardin-J *Current Biology*, 2011)、またF1000でも、3人のF1000 facultyに評価されている。

基底膜形成とその構造変化、そして細胞浸潤は発生過程以外にも観察され、特に癌転移とも密接に関連しており、世界中で研究が行われているが、*in vivo*実験系を用いる私の解析手法は、非常に有用であると考えている。平成24年度には、これまでの研究成果とその発展性が認められ、文部科学大臣表彰 若手科学者賞を受賞、さらに公益社団法人、日本生化学会から24年度奨励賞を受賞している。

2. 方法

極めて有効な変異原である化学的突然変異誘起剤(EMS)を用いて、穴のサイズに破綻を示す変異体を確立する。EMSによる方法では、機能欠損変異体のみならず、機能亢進(hypermorph)、機能低下(hypomorph)などの変異体獲得が期待できる、さらにRNAiライブラリーを用いたスクリーニングを併用する。二つを併用する理由は、RNAiライブラリーは簡便な方法であるが、ノックダウンであるために、その遺伝子が生存に必須な場合、表現型を得ることが難しいため、古典的な方法であるEMSによる方法も併用する。

3. 結果 研究成果

(1) 発生に伴う基底膜形成を制御する分子メカニズム

これまでに基底膜の主要構成蛋白質(emb-9 : IV型コラーゲン)が異常に蓄積する*mde* (More Deposition of Emb-9)変異体、殆ど蓄積しなくなる*lde* (Loss Deposition of Emb-9)変異体を樹立した。*Mde*変異体と*lde*変異体の表現系を図3で示す。

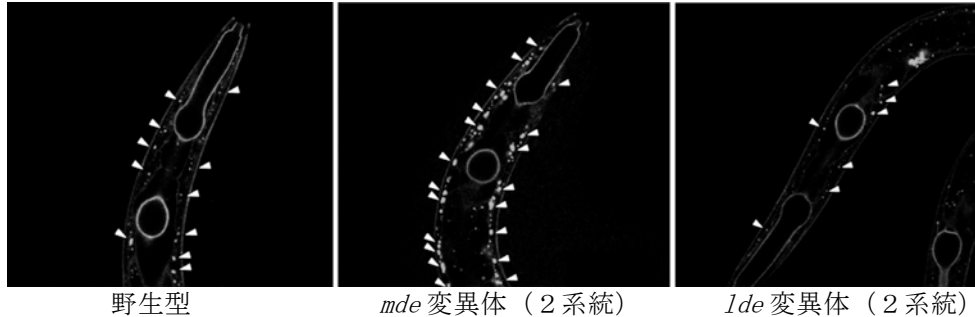


図3 基底膜の主要構成蛋白質(emb-9: IV型コラーゲン)の可視化。咽頭部分の基底膜を可視化している。咽頭は基底膜で覆われているが、野生型に比べて*mde*変異体では、emb-9蛋白質は周りの細胞に強く蓄積する(白い矢頭:蓄積したEMB-9蛋白質)。一方、*lde*変異体ではEMB-9蛋白質は野生型に比べて、殆ど蓄積しなくなる。

(2) 細胞は形成された基底膜にどのように穴をつくるのか? (初期浸潤)

細胞浸潤の全体像を明らかにするために、細胞浸潤過程に異常を示す新規変異体、*aid-1*~6(Anchor cell invasion defect)変異体を樹立した。すべて独立の変異体であり、その詳細を右の表に示す。

変異体	遺伝子座	表現型
<i>aid-1</i>	<i>os148</i>	強い浸潤異常、不稔
<i>aid-2</i>	<i>os149</i>	浸潤細胞の極性が乱れる。稔性
<i>aid-3</i>	<i>os150</i>	強い浸潤異常、不稔
<i>aid-4</i>	<i>os151</i>	弱い浸潤異常、稔性
<i>aid-5</i>	<i>os152</i>	中程度の浸潤異常、稔性
<i>aid-6</i>	<i>os153</i>	弱い浸潤異常、稔性

(3) 細胞浸潤時に観察される穴のサイズはどのように調節されるのか? (浸潤後期)

穴の大きさが異常になる *lao-1* (large opening) 変異体を獲得した。さらに RNAi スクリーニングにより、*vab-10* と呼ばれる細胞骨格を調節する遺伝子が、基底膜の穴の大きさを制御していることを明らかにした。

4. 考察 まとめ

研究成果として、想定していた以上に様々な変異体を得ることができた。今後の予定として、次世代シーケンサーの解析と染色体の決定を行う。染色体上の領域が絞り込まれた変異体から、遺伝子の決定を行う。遺伝子同定後は、発現細胞の確認、組織特異的に発現させるレスキュー実験を行い、基底膜形成の解明及び基底膜にできる穴がどのようにできるのか、そしてその穴のサイズを調節する分子機構を明らかにして、論文を提出する予定である。

5. 発表論文、参考文献

学会発表

1. Ihara, S., David, R. Sherwood, and Sawa, H. Regulation of hole size in basement membrane during cell invasion in *C. elegans*. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Kobe International Conference Room, JWS-B5 (P1-142) May 29, 2012