

# タイトル 細胞ターンオーバーを介した発生時間軸補正と その分子機構の解明

## Epithelial cell-turnover that ensures time dependent robust coordination of tissue growth

(日本発生生物学会推薦)

代表研究者	名古屋大学	大澤 志津江	Nagoya University	Shizue OHSAWA
協同研究者	名古屋大学	赤井 菜々美	Nagoya University	Nanami AKAI

Highly reproducible tissue development is achieved by robust, time-dependent coordination of cell proliferation and cell death. To study the mechanisms underlying robust tissue growth, we analyzed the developmental process of *Drosophila Minute/+* mutants, a series of heterozygous mutants for a ribosomal protein gene. *Minute/+* animals show significant developmental delay during the larval period but develop into essentially normal flies, suggesting there exists a mechanism ensuring robust tissue growth during abnormally prolonged developmental time. Surprisingly, we found that both cell death and compensatory proliferation were dramatically increased in developing wing discs of *Minute/+* animals. Blocking the cell-turnover by inhibiting cell death resulted in morphological defects, indicating the essential role of cell-turnover in *Minute/+* wing morphogenesis. Genetic analyses showed that *Minute/+* wing discs elevate Wingless (Wg; a Wnt homolog) expression and JNK-dependent Dilp8 expression that causes developmental delay, both of which are necessary for the induction of cell-turnover. Furthermore, forced increase in wg expression together with developmental delay caused by a ecdysone depletion induced cell-<sup>^</sup>turnover in the wing discs of non- *Minute/+* animals. Our findings suggest a novel paradigm for robust coordination of tissue growth by cell-turnover, which is induced when developmental time axis is distorted. In parallel, We investigated the mechanism by which *Minute/+* wing discs achieve robust morphogenesis during development. Our analyses showed that Yokie (Yki; a homolog of transcriptional-coactivator in the tumor suppressive Hippo pathway) has a crucial role for robust development of *Munte/+* wing discs by preventing ectopic apoptosis during development.

### 研究目的

多細胞生物の発生は、様々な攪乱のもとでも何とかそのプロセスを正常に維持しながら最終的には必ず決まった形・大きさ・機能をもつ組織・器官を形成する、きわめてロバストなシステムである。この正常発生を脅かす攪乱としては、ゲノム DNA の突然変異に代表される内的な攪乱（内乱）と、生体内外の環境変化が引き起こす外的な攪乱（外乱）が存在する。遺伝的な内乱に対してロバストネスを發揮する機構としては、進化的に獲得された遺伝子重複や、突然変異により生じた変異タンパク質の機能を正常

化するシャペロン分子の存在が知られる。一方、外乱に対するロバストネス機構としては、進化的に獲得された遺伝的多様性（遺伝子機能の多様性）や、ホルモンなどを介したシステム的な生体制御が知られる。ここで、発生中の個体が様々な内乱・外乱に対処しながら正常発生を維持しようとする際、発生の時間軸に異常（歪み）が生じると考えられる。たとえば、ショウジョウバエの発生過程において、幼虫期の上皮組織である成虫原基に損傷が起これば組織はそれを直ちに修復するが、その間個体発生は一時的に中断される。個体発生は時間軸に沿った精

密かつ計画的な形作りのプロセスであり、その時系列の異常は発生過程に重大な破綻を引き起こし得る。すなわち、生体はそのような時間軸の歪みを補正して正常発生を実現させる機構を備えていると考えられるが、その実体は不明である。多細胞生物の発生は、様々な内的・外的攪乱のもとでもそのプロセスを正常に維持しながら正確な組織・器官を形作る、きわめて頑強（ロバスト）なシステムである。ここで、発生中の生体が外的・内的攪乱に対処する際、発生のプロセスに遅れが生じることがある。たとえば、ショウジョウバエ幼虫期において、成虫原基に損傷が起こると組織はそれを直ちに修復するが、その間、幼虫期の発生が一時的に中断される。個体発生は時間軸に沿った精密かつ計画的な形作りのプロセスであり、その時系列の異常は重大な破綻を引き起こし、表現型の揺らぎを生み出し得る。すなわち、生体は発生遅延を何らかの機構で補正して正常発生を実現する仕組みを備えていると考えられるが、その実体はいまだ不明である。

## 研究経過

研究代表者のグループは、生体の発生遅延を補正する発生ロバストネスの仕組みを明らかにする目的で、ショウジョウバエ *Minute/+* 変異体に着目した。*Minute/+* 変異体とは、進化的に保存された一連のリボソームタンパク質遺伝子の機能欠失変異をヘテロにもつ変異体の総称である。重要なことに、*Minute/+* 変異体は幼虫期に個体の成長速度が顕著に低下するものの、最終的には正常な形・大きさの組織が形成される。すなわち *Minute/+* 変異体では、「成長速度の遅延」を補正して正常な組織形成を実現するための何らかのロバストな機構が働いていると考えられた。そこで、この機構を明らかにするために、*Minute/+* 変異体の発生過程を詳細に解析した。その結果、驚くべきことに *Minute/+* 変異体の翅原基の pouch 領域(将来翅のブレードを形成する領域)では、個体の成長遅延に伴って大量の細胞死が起こり、それに伴い細胞増殖も亢進していることを見いだした。ここで非常に興味深いことに、細胞死を遺伝学的に抑制し、この細胞死/細胞増殖による細胞の入れ替わり(細胞ターンオーバー)を抑制すると、翅脈のパターン異常や形態異常等の種々の表現型が成虫翅に出現することが分かった。このことは、(1) *Minute/+* 変異体の翅原基で誘導される細胞ターンオーバーが、発

生遅延が起きた条件で正常発生を成し遂げるために必要なイベントであること、および(2)この細胞ターンオーバー機構の偶発的なエラーが多細胞生物個体の多様な表現型を出現させ得る(表現型の「揺らぎ」が生じる)可能性を示唆している。そこで、この *Minute/+* 翅原基で観察された細胞ターンオーバーが引き起こされる仕組みを明らかにするために、遺伝学的解析を行った。その結果、*Minute/+* 翅原基では、進化的に保存されたモルフォゲン *Wingless (Wg)* の発現が上昇し、通常よりも濃度勾配が強くなっていると同時に、JNK シグナル依存的にインスリン様ペプチド *Dilp8* の発現が上昇し、これにより発生遅延を引き起こすこと、また、これら *Wg* の発現上昇と *JNK-Dilp8* 依存的な発生遅延が、*Minute/+* 翅原基で観察される細胞ターンオーバーを誘発する上で重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに我々は、同様の細胞ターンオーバー現象が、野生型ショウジョウバエ幼虫の複眼原基の一部に損傷や腫瘍を誘導して個体発生を一時的に中断させた場合にも引き起こされることを発見した。すなわち、ショウジョウバエ翅原基では、個体の成長遅延を補正する「細胞ターンオーバー」の場が何らかの機構で形成され、これが未知の機構を介して多細胞生物個体の表現型を制約していると考えられた (#Akai, #\*Ohsawa (#Equal contribution, \*Co-corresponding author) *et al.*, *PLOS Genetics*, 2021) (図1)。

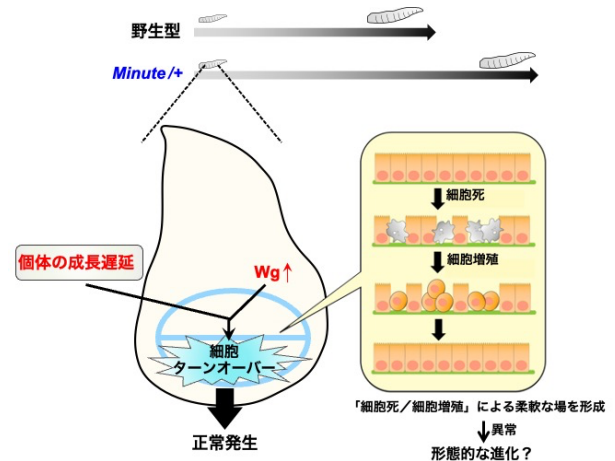


図1 「細胞ターンオーバー」を介した発生時間軸制御と表現型の制約

では、個体の成長遅延を補正する「細胞ターンオーバー」の場が形成される仕組みは何か。この問題にアドレスするために、トランスクリプトーム解析を実施した。具体的には、(i) 野生型コントロール、(ii) 幼虫期に顕著な発生遅延を示す *Minute* 変異体、およ

び (iii) 発生遅延を遺伝学的に抑制した *Minute* 変異体 幼虫の翅原基で発現する転写産物を RNAsequence により解析し、そのうち、細胞ターンオーバーに影響を与える遺伝子群を同定する RNAi スクリーニングを行った。その結果、細胞ターンオーバーを翅原基に誘導する遺伝子群を複数同定することに成功した。このことは、個体の成長遅延にตอบสนองして、翅原基において細胞ターンオーバーを誘発する仕組みが確かに翅原基に内包されていることを示唆している。今後は、同定された細胞ターンオーバー制御因子の機能と役割を遺伝学的解析およびライブイメージングにより明らかにしていく予定である。

これと並行して、*Minute/+*翅原基を正常に発生させるロバストな仕組みの理解を目指した。ダイヤモンド・ブラックファン貧血や先天性無脾症を初めとした、ヒトの疾患として近年着目されているリボソーム病は、*Minute/+*変異体と同様にリボソーム関連遺伝子の異常を原因とすることが最近分かってきた。興味深いことに、リボソーム病では、特定の組織・器官のみに異常をきたすことが知られている。すなわち、リボソーム関連遺伝子の異常を補正する、進化的に保存されたロバストな仕組みが存在すると考えられた。我々は、ショウジョウバエ *Minute/+*翅原基をモデルとし、染色体欠失系統および突然変異系統を用いた遺伝学的スクリーニングを実施した。その過程で、進化的に保存されたがん抑制性 Hippo 経路の転写共役因子 Yki (哺乳類 Yap) の遺伝量が半分になると (*Minute/+*, *Yki/+*変異体)、成虫翅の形態に異常をきたすことが分かった。そこで、*Minute/+*, *Yki/+*翅原基が発生異常をきたす仕組みを遺伝学的に解析した結果、*Minute/+*, *Yki/+*翅原基では、腫瘍壊死因子 TNF-JNK シグナルを介した過剰な細胞死が誘発されることが分かった。また、*Minute/+*, *Yki/+*翅原基における JNK シグナルの活性化には、通常は細胞死阻害タンパク質 Diap1 によりその機能を抑制されている細胞死誘導遺伝子 Dronc (Caspase 9 ホモログ) が必須の役割を果たすこと、および、*Minute/+*翅原基において Yki の遺伝子量が半分になることで、Diap1 の発現が減少し、これが Dronc の活性化を引き起こすことが分かった。さらに遺伝学的解析を進めた結果、Dronc と JNK シグナルが正のフィードバックを形成し、これにより Dronc の活性化が増幅されて、過剰な細胞死が引き起こされることが明らか

となった。すなわち Yki は、過剰な細胞死が起きぬようにとするブレーキとしての機能を発揮し、*Minute/+*翅原基のロバストな発生を実現させると考えられた (Wada *et al.*, *Development*, 2021)。

## 考察

本研究により、個体の成長が遅れた際に、細胞ターンオーバーを翅原基で行うことで、個体と組織の成長が足並みを揃えることが明らかとなった。この翅原基における細胞ターンオーバーは、多様な表現型が成虫翅に出現することを抑制し得ることから、多細胞生物の進化を考える上でも重要な細胞集団挙動である可能性が考えられる。

個体発生がいわば自己矯正的でロバストネスが高いシステムであることは、古くから知られている。これまでに、細胞内のシャペロンとして機能するヒートショックタンパク質 Hsp90 が遺伝的突然変異を吸収して正常に個体を発生させるキャナリゼーション制御因子であり、その機能が低下することで多様な表現型が出現することが報告されている。本研究で明らかとなった細胞ターンオーバーは、ロバストな発生を成立させる細胞集団挙動であると考えられる。

また本研究では、*Minute/+*翅原基において、細胞ターンオーバーを引き起こす細胞死の量を適切に保つ仕組みとして Yki を介した Diap1 の発現が重要な役割を果たすことが明らかとなった。上述の通り、

また、ヒトの疾患として近年着目されているリボソーム病は、*Minute* 変異体と同様にリボソーム関連遺伝子の異常を原因としており、その症状が特定の臓器・組織のみに現れるという特徴を共通して有していることが知られている。すなわち、リボソーム病の症状が、特定の臓器・組織における細胞ターンオーバー機構の破綻 (過剰な誘導) により引き起こされている可能性も考えられ、いまだ大きな謎であるリボソーム病の発症機序の解明に将来的にはつながる可能性が期待される。

## 研究の発表

口頭発表

1. Ohsawa S, Akai N, Sando Y, Igaki T: Epithelial turn-over through cell competition ensures robust coordination of tissue growth in *Drosophila*. 第 43 回日本分子生物学会年会 MBSJ 2020 Online

(2020年12月2日)

2. Ohsawa S, Akai N, Sando Y, Igaki T: Epithelial cell-turnover ensures robust coordination of tissue growth in *Drosophila*. 第126回日本解剖学会総会・全国集会/第98回日本生理学会大会、オンライン開催 (2021年3月28日) -
3. Ohsawa S: Yki/YAP ensures robust tissue morphogenesis by suppressing JNK-mediated cell death in *Drosophila*. 第73回日本分子生物学会年会、オンライン開催 (2021年6月30日)

誌上発表

1. #Akai N, #\*Ohsawa S (# Equal contribution; \*Co-corresponding author), Sando Y, \*Igaki T: Epithelial cell-turnover ensures robust coordination of tissue growth in *Drosophila*

ribosomal protein mutants, *PLoS Genetics*, **17**, e1009300 (2021)

2. Wada Y, Ohsawa, S, Igaki, T: Yorkie ensures robust tissue growth in *Drosophila* ribosomal protein mutants. *Development*, 148, dev198705.
3. Cong B, Namamura M, Sando Y, Kondo T, Ohsawa S, IGaki T: JNK and Yorkie drive tumor malignancy by inducing L-amino acid transporter 1 in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 32, e1009893, 2021
4. Nagata R, Akai N, Kondo S, Saito K, Ohsawa S, Igaki T: Yorkie drives supercompetition by non-autonomous induction of autophagy via bantam microRNA in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 32 (5)1064-1076, 2022