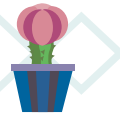




研究者エッセイ 第1話



大阪大学 微生物病研究所 生体統御分野
石谷 太

モルフォゲン勾配修復型細胞競合の発見

若手PIとしての悩み

以前より私は、モデル動物を用いて細胞運命決定を支えるシグナル制御機構について研究してきた。学生時には、リン酸化を介した Wnt シグナル制御が線虫の内胚葉の誘導に必要であることを発見し (Nature 1999)、ポスドク時にはユビキチン化を介した Wnt シグナル制御がゼブラフィッシュの神経堤細胞の形成を制御することを明らかにした (Nat Cell Biol 2005)。独立後もゼブラフィッシュをモデルとして、リン酸化・ユビキチン化を介した Notch シグナル・Wnt シグナル制御の神経前駆細胞の増殖・分化における機能を解析してきた (Nat Cell Biol 2010; EMBO J 2012; Cell Rep 2014 など)。これらの研究では、翻訳後修飾酵素に注目してプロテオミクスや生化学を組み合わせることで *in vivo* のシグナル制御を高精度で解析し、順調に論文発表することができた。しかし一方で、残り 30 年 (当時) ある PI 人生を考えたとき、このような既知の現象を深掘りするような研究 (悪く言えば論文を作るための研究) を続けていくことに疑問を抱き始めていた。自分のバックグラウンドを活かして何か新しいマクロな現象 (独自の研究対象) を見つけることができないか、と考えた。そこで、未だ誰も観察したことがないレベルの深い *in vivo* イメージングを行うことで、新たな現象を発見しようと試みた。具体的には、高感度で時間分解能の高い Wnt シグナルレポーターを独自開発し、これを用いてゼブラフィッシュ胚発生というマクロな現象とその過程における Wnt シグナル動態というミクロな現象の同時観察を実現した (Dev Biol 2012; Nat Commun 2019)。Wnt シグナルは、動物組織の構築過程において活性勾配 (モルフォゲン勾配) を形成して組織中の各細胞に位置情報を与えること

で場に適合した細胞運命を誘導し、これにより組織にパターンや極性を誘導する (図1)。私たちは、このレポーターを用いることで、動物発生過程における Wnt シグナル活性勾配の形成プロセスのライブイメージングに世界で初めて成功した (Nat Commun 2019)。このイメージングの過程で、「Wnt シグナル活性勾配が教科書や総説で記載されているような綺麗な勾配

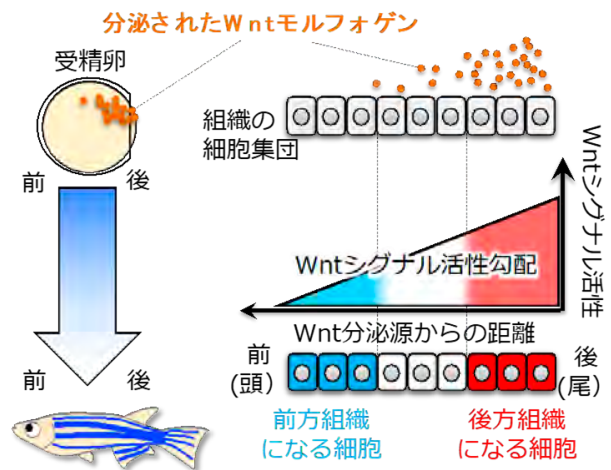


図1. モルフォゲン勾配による前後パターン形成

配ではなく、本来シグナル活性が低くあるべき領域でシグナル活性が高い細胞が出現したり、逆にシグナル活性が高くあるべき領域で活性が低い細胞が出現することに気づいた (図2左)。また興味深いことに、それらの活性異常は時間経過とともに解消された。非常に興味をそそられる現象であったが、この時点ではアプローチする術がなく、放置してしまっていた。。

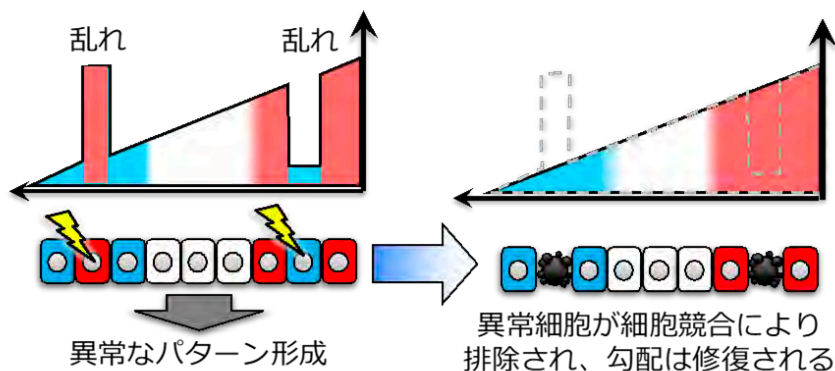


図2. 細胞競合がモルフォゲン勾配の自律性を支える

細胞競合との出会い

一方でこの頃 (2014 年頃)、Wnt シグナルとゼブラフィッシュの専門家として新学術領域「細胞競合」に計画班員として参加した。2011 年に Jean-Paul Vincent や Eugenia Piddini らがショウジョウバエの成虫原基において Wnt シグ

ナル活性が高い細胞クローンが周辺正常細胞群と競合して winner となり、正常細胞を殺してクローンを拡大させることを報告しており (Vincent *et al.*, *Dev Cell* 2011)、これを受けて私は、この新学術領域で「同様の現象がゼブラフィッシュなど脊椎動物でも起こることを確認し、その動態をイメージングするとともにメカニズム解明も行う」という研究を計画した。同領域の代表であった藤田恭之先生が既に確立されていた GAL4-UAS 系を用いたゼブラフィッシュ細胞競合系を参考にしながら、熱ショック誘導発現系や細胞移植を利用した細胞競合イメージング系を確立し、この系を用いて計画研究を実施した。ところが想定外なことに、ゼブラフィッシュ胚において Wnt シグナル活性が高い細胞を誘導しても隣接正常細胞を殺すことはなく、逆にシグナル活性が高い細胞の方が細胞死を起こすことがわかった。また、Wnt シグナル活性が低い細胞を誘導した場合もその細胞が細胞死を起こし、隣接正常細胞の生存には影響しないこともわかってきた。この結果が出た当初は、組んだ実験系がおかしいのか???と悩んだ。また、これら誘導したシグナル活性異常細胞は全てが死ぬわけではなく、2 ~ 3 割程度しか死なず、それも大きな疑問であった。しかし、このタイミングで、上述の“放置していた記憶”が蘇り、「もしかしたら胚で形成されている Wnt シグナル活性勾配に大きな乱れを誘導するような異常な細胞が出現すると選択的に細胞死によって除去されるのではないかと以前に観察したシグナル活性勾配の乱れと解消は“それ”を見ていたのではないかと」という考えが湧いてきた。この可能性を検証するために、まず、誘導したシグナル異常細胞の位置と細胞死の相関を調べた。その結果、Wnt シグナル異常活性化細胞は Wnt シグナル活性の低い前側の領域に誘導された場合は高頻度で細胞死を起こすが、Wnt シグナル活性が高い後ろ側の領域ではほとんど死なないこと、逆にシグナル活性が低い細胞を誘導した場合はシグナル活性の高い領域で高頻度に細胞死を起こし、シグナル活性が低い領域では死ににくいことがわかった。また、生理的に生じたシグナル異常細胞も細胞死を介して排除されることや、細胞死を抑制したゼブラフィッシュ胚では自然発生したシグナル異常細胞が蓄積して Wnt シグナル活性勾配が大きく乱れることがわかった。このように私の仮説に矛盾しない結果が得られてきた。

この発見は Wnt 研究者やモルフォゲン研究者にとっても attractive なものであったようで、国際学会で話をしてみたところ、多くの研究者にす

ぐに論文にするように勧められた。しかし、「観察（現象発見）はサイエンスではない」という師の言葉を思い出し（正直なところ師の真意は不明だが、私は勝手な解釈では「現象を見つけてもその意義を証明できなければ価値はなく、意義を理解するためにはメカニズムを見つけてそれを改変する必要がある、その全てをなすためにモデル生物があり、そこまでやってこそモデル生物を使った研究をする意味がある」ということではないか、と考えている）、論文はすぐには出さずにメカニズム解明に挑んだ。ただ、当時の細胞競合研究のメカニズム解析はショウジョウバエ遺伝学を中心に進んできており、私の研究室の規模ではゼブラフィッシュを用いて同様のアプローチを行うことはほぼ不可能であった。そこで、これまでの知識・経験を総動員して **candidate approach** を行うとともに、当時同僚であった九州大学生体防御医学研究所の大川恭行先生との共同研究による **transcriptome** 解析を実施した。

まず前者のアプローチでは、Wnt シグナルの主たる構成因子であるβカテニンが転写だけでなく細胞接着分子カドヘリンの裏打ちタンパク質としても働くことに注目してイメージング解析を行い、その結果、胚ではWnt シグナル活性化によるβカテニン安定化に伴ってβカテニン依存的な転写が活性化するのみならず、安定化したβカテニンが細胞膜上でカドヘリンタンパク質を安定化することと、Wnt シグナル活性異常が持続した異常な細胞ではカドヘリンの量が増減して隣接細胞とは異なるレベルのカドヘリンを持つようになり、このカドヘリン異常を介して異常細胞が感知・排除されることを見出した（図3）。一方で後者のアプローチでは、異常

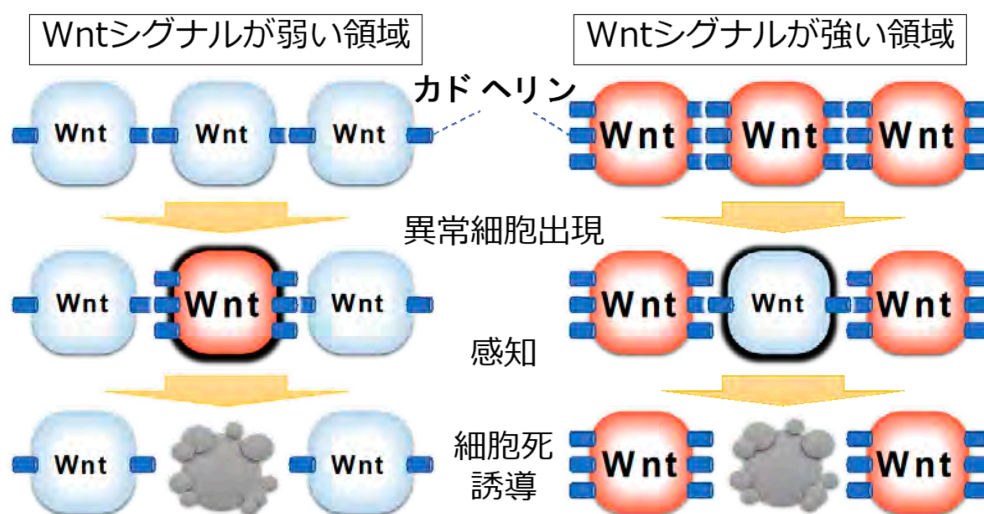


図3. カドヘリンを介した異常細胞の感知

細胞を蛍光ラベリングして FACS で回収して RNA-seq する方法を確立し、この方法を用いて「正常細胞に囲まれた Wnt シグナル異常細胞でのみ発現が増減し、単純な Wnt シグナルの増減では発現が変化しない遺伝子群」を探索・同定した。そして、それらの情報をもとにした解析により、カドヘリンの量的異常の下流でシグナル異常活性化細胞と異常活性低下細胞の双方において転写因子 Smad の活性化とそれに伴う活性酸素 ROS の産生が起きて細胞死抑制因子 Bcl2 が減少し、異常細胞に選択的に細胞死が誘導されることを明らかにした。また、正常細胞に囲まれた Wnt シグナル異常活性化細胞・異常活性低下細胞の双方で共通して発現が低下する遺伝子として *Sephs1* を見出し、これを過剰発現した胚では生理的・人為的に生じた Wnt シグナル異常細胞のいずれもが細胞死を起こさなくなる (Wnt シグナル活性勾配を修復する細胞競合を抑制できる) ことを発見した。また、*Sephs1* や *Bcl2* を過剰発現した胚では、生理的に生じた異常細胞が蓄積して Wnt シグナル活性勾配が乱れ、結果として、胚の後方 (脊髄領域) に形成されるべき神経前駆細胞が脳の前方に形成されたり前方に形成されるべき神経前駆細胞が脊髄領域に形成されるなど細胞の位置情報に異常が生じ、さらに、成長後の稚魚では目や尻尾の形成に異常が生じたり腫瘍様細胞塊が生じるなど病的な異常が発生した (*Nat Commun* 2019)。この事実は、細胞競合が Wnt シグナル活性勾配の形成のみならず正確な組織パターン形成や健康な個体発生に必須であることを示唆する。このように、メカニズム解明を行ったことで機能改変実験が可能になり現象の生理的意義を解明することができた (が、現象の発見からメカニズム解明を行うという長大なストーリーであるため、論文のリバイズは恐ろしく大変で、アクセプトされたのは新学術領域細胞競合が終了した半年後となってしまった)。この研究では、ほとんどの実験系が未経験どころか前例がないものばかりで、また体力に任せた全くエレガントでない実験も行った (例: RNA-seq などは一つの胚あたりの異常細胞の数が少ないので、4人で並行して早朝から夕方まで実験をして数千の胚を作製して行った)。めちゃくちゃに苦労したが、手作りのサイエンスは大変楽しく、達成感があった。この病みつきになる楽しさは研究室全体に伝播し、皆を新たな生命科学を模索するチャレンジャーへと生まれ変わらせたような気がする (論文を出すのが遅いのが玉に瑕だが、...)。

これからの課題、挑むべき謎

さて、上記のようにメカニズムは明らかにしたものの、いまだに多数の謎が残されている。代表的なものとしては、①シグナルが上がり過ぎた細胞も下がり過ぎた細胞もカドヘリンの量的変化から Smad 活性化 → ROS 産生 → Bcl2 減少という同じ経路を介して細胞死を起こすのはどのようなメカニズムによるものなのか?、②隣接細胞集団はどのようにしてカドヘリンの量的変化を介して異常細胞を感知し、選択的に異常細胞に細胞死を誘導するのか?、③全てのシグナル異常細胞を細胞死を介して排除しては非効率なのでおそらく別の修復機構も存在すると思われるが、それはどのような機構で、そしてそれぞれの機構はどのような原理で選択的に起動されるのか?、④細胞競合によるモルフォゲン勾配の修復はゼブラフィッシュ初期胚以外や Wnt シグナル以外の勾配についても起こるのか?、の4点が挙げられる。現在、これらの課題の解明を進めているが、いずれの課題もまずは実験系の構築と最適化が必要であり、各テーマ担当のスタッフや学生さんたちとあーでもないこうでもない毎日悶絶している。正直なところかなり大変で器用さと根気の双方を要求する実験ばかりでこれに真正面から取り組んでくれているうちのラボの皆さんには頭が下がる思いであるが、間違いなく言えるのは同じ実験を組む研究者はいないはずであり、確実に新しいことを発見できる研究になると確信している。今後も情熱あふれる彼らと一丸となって、多細胞生命システムの自律性を支える未知の細胞間コミュニケーション機構に迫っていきたい!心にそう誓っている。