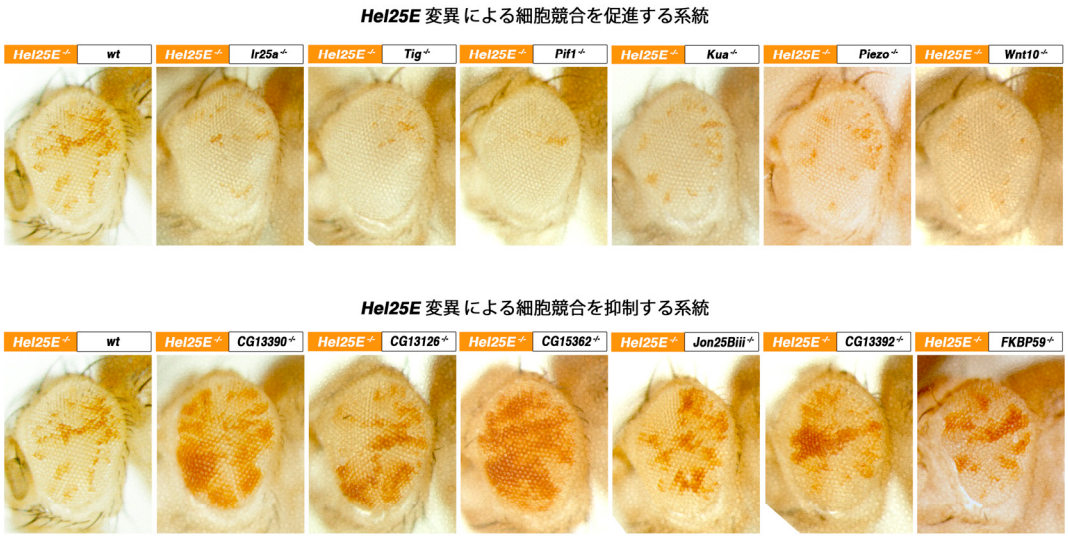
162　細胞競合の共通原理と生理的意義の遺伝学的解析	中村　麻衣

【目的】細胞社会の適者選択システムとして機能する細胞競合は、多様な生命現象に関わることが示されつつあるが、その共通原理と生理的意義はいまだ不明である。本研究では、ショウジョウバエ遺伝学を駆使し、細胞競合を引き起こす遺伝子変異を網羅的に同定してその共通項を探索・解析するとともに、細胞競合の特異的マーカー分子を同定し、生体内における細胞競合の生理的意義を解明することを目的とした。

【方法】細胞競合を引き起こしうる突然変異や遺伝子群を網羅的に同定して、その共通原理を解明するための大規模な遺伝学的スクリーニングを行い、原因遺伝子の同定を行った。さらに得られた細胞競合の共通トリガー変異を用いて、モディファイヤー・スクリーニングを実施し、細胞競合を制御する共通分子を単離・同定した。スクリーニングにはEMSによる突然変異導入系統およびCRISPR-Cas9誘導性遺伝子欠失変異系統を用いた。

【結果】EMS変異系統を用いたスクリーニングにより、細胞競合を誘発する突然変異としてRNAヘリカーゼをコードする *Hel25E* 遺伝子に突然変異をもつ系統が単離された。*Hel25E* 変異が引き起こす細胞競合の制御に関わる遺伝子群を単離するためモディファイヤー・スクリーニングを実施したところ、*Hel25E* 変異細胞クローンの排除を抑制（サプレッサー）あるいは促進（エンハンサー）する変異系統をそれぞれ37系統および42系統単離することに成功した。

*Hel25E 変異*による細胞競合を制御する遺伝子群の例



162. 細胞競合の共通原理と生理的意義の遺伝学的解析

中村　麻衣

京都大学 大学院生命科学研究科 システム機能学分野

Key words：細胞競合，細胞間コミュニケーション，ショウジョウバエ遺伝学

緒　言

細胞競合とは、隣り合う同種の細胞間で相対的に「適応度」の高い細胞（勝者）が低い細胞（敗者）を積極的に排除する現象である。ここ数年で細胞競合の分子機構の解析が大きく進展したが、それによっていま顕在化してきたことは、異なる変異によって引き起こされる細胞競合は必ずしも共通のメカニズムを持っているわけではないという事実である。細胞競合の全貌を明らかにするためには、まず細胞競合現象を根本から見直し、その共通原理と多様性を明らかにすることが必要である。本研究では、ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を用いて、細胞競合を引き起こす突然変異を遺伝学的スクリーニングにより網羅的に単離・同定し、細胞競合の分子機構の共通性と多様性を体系的に明らかにするために、得られた変異体についてさらにモディファイヤー・スクリーニングを行った。

方　法

1.　EMS 誘導性変異系統を用いた遺伝学的スクリーニング

細胞競合を引き起こす新たな遺伝子変異を探索するため、ショウジョウバエ複眼の上皮組織をモデル系として遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、まず変異原物質エチルメタンスルホン酸（EMS）を用いてゲノム上にランダムに突然変異を導入したショウジョウバエ変異系統を 6,000 系統樹立し、変異細胞クローンが正常細胞に囲まれた場合にのみ組織から排除される約 80 の変異系統を単離することに成功した。さらに、これらの変異系統のうち 2 系統が RNA ヘリカーゼをコードする *Hel25E* 遺伝子に突然変異をもつことを見いだした。Hel25E は核から細胞質への mRNA 搬出を担っており、*Hel25E* をノックダウンしたショウジョウバエ S2 細胞ではタンパク質合成がグローバルに抑制される。すなわち、これまで見いだされてきた一連のリボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異（*Minute* 変異）以外で初めて、グローバルなタンパク質合成の低下により細胞競合を引き起こす変異として *Hel25E* 変異を同定した。そこで次に、*Hel25E* 変異が引き起こす細胞競合の制御に関わる遺伝子群を単離するため EMS 変異系統を約 4,000 系統樹立するとともに、第 2 染色体の一連の CRISPR-Cas9 誘導性遺伝子欠失変異系統を用いてモディファイヤー・スクリーニングを実施した（図 1）。その結果、*Hel25E* 変異細胞クローンの排除を抑制（サプレッサー）あるいは促進（エンハンサー）する変異系統をそれぞれ 37 系統および 42 系統単離することに成功した。

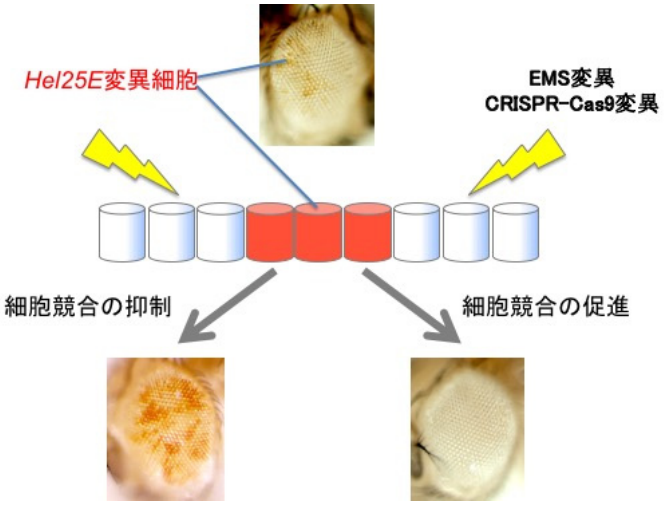


図 1. *Hel25E* 変異による細胞競合を制御する因子の遺伝学的スクリーニング
Hel25E 変異細胞に隣接する野生型細胞に EMS または CRISPR-Cas9 変異を導入し、細胞競合を抑制または促進する系統を探索した。

結果および考察

1. EMS および CRISPR-Cas9 スクリーニングにおける Suppressor 系統の単離

EMS スクリーニングにおいて、*Hel25E* 変異による細胞競合を抑制する Suppressor 系統のうち complementation group である ON186 と ON188 について次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行ったところ、*Dbp21E2* 遺伝子に突然変異を持つことがわかった（図 2A）。また、CRISPR-Cas9 スクリーニングにおいても同遺伝子の変異体が Suppressor であることがわかった（図 2B）。*Dbp21E2* は DEAD box RNA helicase で、哺乳類（DDX28）ではミトコンドリア・リボソームの biogenesis に関わることが報告されている［1］。ミトコンドリアで翻訳されるタンパク質は、ミトコンドリア内でのエネルギー変換や ATP 産生に必要なタンパク質であることから、*Hel25E* 変異による細胞競合に ATP 産生が関わっている可能性が考えられた。

2. CRISPR-Cas9 スクリーニングにおける Enhancer 系統の単離

CRISP-Cas9 を用いたスクリーニングにおいて、protein phosphatase inhibitor-2（IPP-2、I-2）活性（図 3B、B’）を有する CG12620 および CG18666 遺伝子に突然変異を持つ系統が Enhancer として単離された（図 3A’、A”）。そこで、次にレスキュー実験を行った。野生型細胞側で CG12620 または CG18666 を過剰発現させたところ、*Hel25E* 変異クローン（GFP negative）は有意に大きくなった（図 3C’、C”）。これは *Hel25E* 変異クローンによる細胞競合が抑制されたことを示している。哺乳類において、IPP-2 は protein phosphatase-1（PP1）による脱リン酸化を阻害することが報告されている［2］。さらに、AMPK は PP1 や PP2A によって脱リン酸化されることで不活性化することが報告されている［3］。そこで、AMPK kinase である LKB1 を野生型細胞側で過剰発現させたところ、*Hel25E* 変異クローン（GFP negative）は有意に大きくなった（図 3C”’）。LKB1 はエネルギーの枯渇によって活性化され、AMPK を活性化する。これらのことから *Hel25E* 変異細胞による細胞競合にエネルギー代謝が関わっている可能性が示唆された。

以上のことから、*Hel25E* 変異細胞の周辺細胞における AMPK 活性の制御が *Hel25E* 変異細胞による細胞競合に重要である可能性が考えられる。

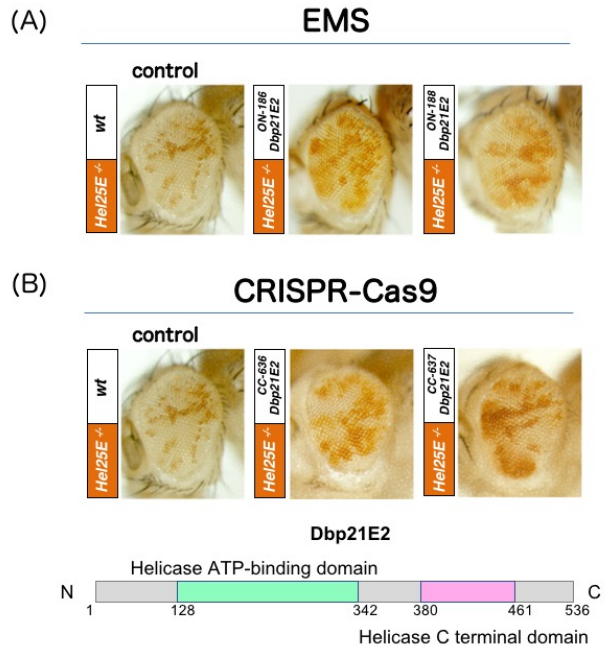


図 2. *Dbp21E2* 変異細胞は *Hel25E* 変異による細胞競合を抑制する。

(A) EMS スクリーニングの結果。

(B) CRISPR-Cas9 スクリーニングの結果。

共に *Hel25E* 変異による細胞競合を抑制した。

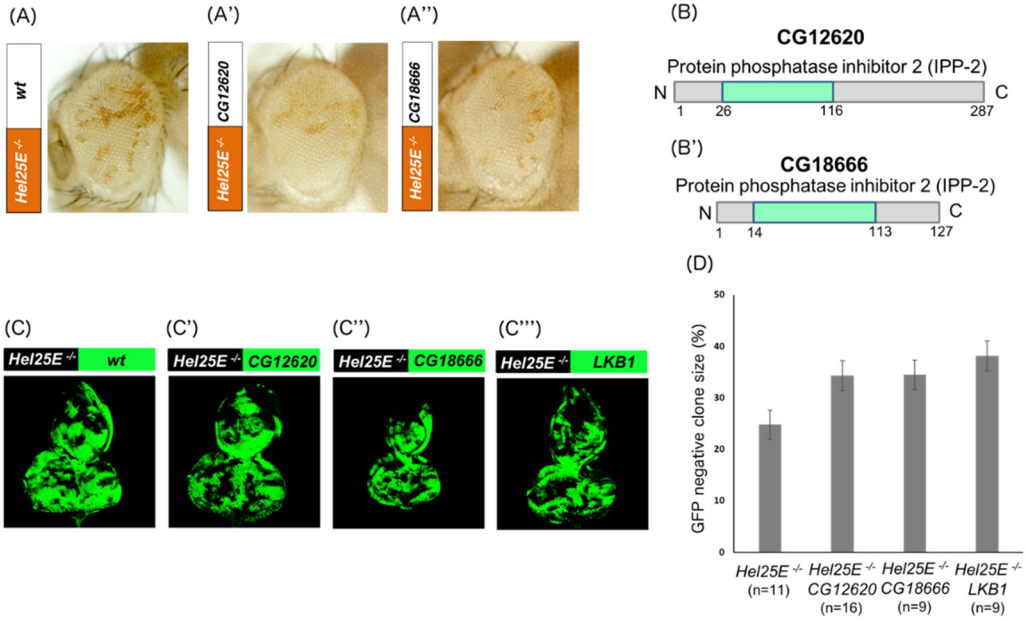


図 3. *CG12620* および *CG18666* 遺伝子の変異細胞は *Hel25E* 変異細胞による細胞競合を促進する

(A~A''') CRISPR-Cas9 スクリーニングの結果。

(B、B') *CG12620* および *CG18666* 遺伝子は protein phosphatase inhibitor-2（IPP-2、I-2）domain を持つ。scale bar：100 μm

(C~C''') CG12620、CG18666 および LKB1 の過剰発現は *Hel25E* 変異細胞による細胞競合を抑制した。

(D) C~C'''の統計結果 （t-test、$p < 0.001$）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立遺伝学研究所無脊椎動物遺伝学研究室教授の齋藤都暁博士、助教の近藤周博士および京都大学大学院生命科学研究科教授の井垣達吏博士である。また、京都大学生命科学研究科特定助教の近藤武史博士には次世代シーケンサーによる全ゲノム解析においてご助力いただき、感謝します。

文　献

1） Ya-Ting Tu, Antoni Barrientos The Human mitochondrial DEAD-Box protein DDX28 resides in RNA granules and functions in mitoribosome assembly. Cell Reports. 2015 10;6:854-864. Epub 2015 Feb 12. PMID: 25683708 DOI:10.1016/j.celrep.2015.01.033

2） Hamid R. Samari, Michael T. N. Møller, Lise Holden, Tonje Asmyhr, Per O. Seglen. Stimulation of hepatocytic AMP-activated protein kinase by okadaic acid and other autophagy-suppressive toxins. Biochemical Journal. 2005 386;2(2):237-244. Epub 2005 Mar 1. PMID: 15461583 DOI: 10.1042/BJ20040609

3） Toko Chida, Masakatsu Ando, Tasuku Mtsuki, Yutaro Masu, Yuko Nagaura, Teruko Takano-Yamamoto, Shinri Tamura, Takayasu Kobayashi N-Myristoylation is essential for protein phosphatases PPM1A and PPM1B to dephosphorylate their physiological substrates in cells. Biochemical Journal. 2013 1;449(3):741-749. Epub 2013 Feb 1. PMID: 23088624 DOI: 10.1042/BJ20121201