

氏 名 土屋 凱寛

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2012 号

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 咽頭上皮の形態変化における Ripply3 の機能解析

論文審査委員 主 査 教授 吉田 松生
教授 高田 慎治
准教授 木下 典行
教授 千坂 修 京都大学 大学院
生命科学研究科

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

During tissue development, the morphogenesis of epithelial sheets is considered to be regulated by many factors, although the underlying mechanisms remain largely unknown. In this study, I aimed to understand this mechanism by focusing on the morphogenesis of the pharyngeal epithelium. In the pharyngeal region of the vertebrate embryo, endodermal epithelium is reiteratively folded outward to form pharyngeal pouches, generating partitions to separate pharyngeal arches. In the development of pharyngeal pouches, *Ripply3*, encoding a member of the Ripply family of adaptor proteins, is required for the pouch formation posterior to the 3rd pharyngeal arch. To better understand the mechanism of epithelial morphogenesis in the pharyngeal arch development, I examined the function of *Ripply3* by using *Ripply3* mutant embryos and cell culture system.

For understanding the function of *Ripply3* in the pharyngeal development, it is important to identify the primary defect occurred in the *Ripply3* mutant. However, details of the morphological change in the third pharyngeal arch formation had not yet been fully described. Thus, I first observed this process in normal embryos. In contrast to my prediction, I found that this process was so complex that the endodermal epithelium was bended three times prior to the formation of the third pharyngeal pouch. Being consistent with the three times bends, *Ripply3* was specifically expressed at the bending site of the endodermal epithelium, suggesting that *Ripply3* is involved in the bending processes.

Based on this observation, I next examined the pharyngeal development of *Ripply3* mutant embryos. I found that the morphology of the epithelial sheet was disturbed at the bending site during the third pharyngeal arch formation in *Ripply3* mutant embryos. To examine this defect more precisely, three-dimensional image analysis was performed. In contrast to the monolayer structure of the wild-type epithelial sheet, this monolayer structure was partially disturbed and a part of the epithelial cells were not in contact with the basement membrane in the mutant embryo. These results show that the primary defect of *Ripply3* mutant appears to be the disorder of the monolayer structure of the epithelial sheet in the vicinity of the bent portion. Thus, I conclude that *Ripply3* is required for the maintenance of the monolayer structure at the bending site of the epithelial sheet.

I next examined this defect more precisely at the cellular level. No abnormality of cell proliferation or cell death was observed in the early third pharyngeal arch formation of *Ripply3* mutant. On the other hand, immunostaining of active Integrin $\beta 1$ and Laminin revealed that the localization of these proteins, which were continuously found in the basement membrane of the epithelial sheet in the normal embryos, was partially lost in the *Ripply3* mutant. Moreover, TEM analysis

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

also supported that the structure of the basement membrane was disturbed in the *Ripply3* mutant. These results show that Ripply3 is required for maintenance of the proper basement membrane structure through Integrin $\beta 1$ at the bending site of the epithelial sheet.

To understand the molecular mechanism by which Ripply3 affects cell morphology via Integrin $\beta 1$, I finally examined the function of Ripply3 in cultured cells. I found that exogenously expressed Ripply3 localized in the focal complex and the focal adhesion and promoted the maturation of the focal adhesion. In addition, it was revealed that Ripply3 and Paxillin physically interacted by immunoprecipitation. These results show that Ripply3 could strengthen the interaction with the extracellular substrate. Thus, I speculate that Ripply3 appears to enhance the binding between the extracellular matrix and endodermal epithelial cells *in vivo* and counteracts mechanical stress probably caused by flexion of the endodermal epithelium.

In summary, I found that *Ripply3* was expressed in bending region of the pharyngeal epithelium and required for the maintenance of the monolayer structure of this epithelium. In this process, Ripply3-mediated interaction between the extracellular matrix and cells appeared to be important. Furthermore, my *in vivo* and *in vitro* analyses also suggested that Ripply3 promotes the formation of Integrin-mediated adhesion in the pharyngeal endoderm and maintains epithelial monolayer structure by reinforcing adhesion.

個体および器官に特有な「かたち」が形成される上では、それらを取り巻く上皮シートの形態が秩序だって形成・維持されることが重要である。上皮シートの形態変化のメカニズムについては近年になり理解が進みつつあるものの、未だ明らかにされていない点が多い。出願者は上皮シートの屈曲に焦点を当て、マウス胚における咽頭内胚葉上皮をモデルにその分子機構の解析を行った。特に、咽頭内胚葉上皮の形態形成に必須な役割を果たすことが明らかにされている **Ripply3** に注目した。**Ripply3** は 100 アミノ酸程度の比較的分子量のタンパク質であり、アダプタータンパク質として転写共抑制因子 **Groucho/TLE** と転写調節因子 **Tbx1** との相互作用を橋渡しする機能があることが知られている。

まず、**Ripply3** が咽頭内胚葉上皮の屈曲に実際に関与している可能性を検討するため、出願者は **Ripply3** の発現と上皮の屈曲の関係を調べた。第 3 咽頭弓形成期における咽頭内胚葉上皮の屈曲過程を 2 体節期ごとに詳細に解析したところ、この過程において咽頭内胚葉上皮が実は 3 回も屈曲することが明らかになり、さらに **Ripply3** が各々の屈曲に伴って発現することが示された。次に、**Ripply3** 変異体における咽頭内胚葉上皮の屈曲過程を同様に観察したところ、変異体胚では屈曲が起きる際に上皮シートの単層構造が部分的に壊れていた。この単層構造の乱れに伴い、上皮細胞の基部側および頂端部側に特徴的なタンパク質の発現もしくは局在が異常になっていることが、免疫組織染色法を用いた解析から明らかになった。中でも、細胞の基底部と細胞外基質間の接着に関わる活性化型のインテグリン $\beta 1$ の異常が最も早期に観察された。これらの解析から、**Ripply3** は咽頭内胚葉上皮シートの屈曲に際して、上皮細胞の性質を維持させることにより上皮シートの構造を維持させるものと考えられた。

さらに **Ripply3** の分子機構を理解するために、出願者は **Ripply3** と相互作用するタンパク質を検討した。Yeast-two-hybrid 法を用いた先行研究により、**Ripply3** と結合する候補タンパク質が同定されていたが、そのうちの一つである **Wtip** という LIM ドメインタンパク質に出願者は注目した。LIM ドメインタンパク質の多くは細胞と基質との接着構造である接着斑(focal adhesion)に局在することから、**Ripply3** は LIM ドメインタンパク質を介して細胞と基質の接着に関与することが予想された。免疫沈降実験の結果、**Ripply3** は **Wtip** を含む複数の LIM ドメインタンパク質と実際に相互作用することが示され、また培養細胞に強制発現させた **Ripply3** は、接着斑に局在することが明らかになった。さらに、**Ripply3** の発現により接着斑がより成熟することも示された。この接着斑を成熟させる効果は **Tbx1** にはなかったことから、**Ripply3** による細胞と基質の接着は **Tbx1** との相互作用とは別の分子機構により制御されることが示唆された。

以上の胚と培養細胞を用いた研究結果より、上皮細胞シートの屈曲に伴いアダプタータンパク質である **Ripply3** が一過的に発現することにより、細胞と細胞外基質間の接着を強化し、上皮シートの構造が維持されるものと結論された。この成果は上皮シートの屈曲に関する新たな分子機構を提唱するものであり、内容の主要部分をまとめた論文は国際誌に受理されている。よって、出願者の論文は博士論文に十分相応しいものであると審査員全員一致で結論した。