

# 咽頭上皮の形態変化における Ripply3 の機能解析

土屋 凱寛

博士（理学）

総合研究大学院大学

生命科学研究科

基礎生物学専攻

平成29（2017）年度

## 目次

I	概要.....	1
II	序論.....	4
III	材料および方法.....	8
IV	結果.....	12
V	考察.....	20
VI	謝辞.....	25
VII	参考文献.....	26
VIII	図表.....	33



## I 概要

動物の組織や器官は単純な構造が複雑に変化することで形成される。多くの組織は上皮によって覆われており、組織形成には部位および時期特異的に秩序正しく上皮シートが形態変化を繰り返す必要がある。上皮シートの形態変化はそれを構成する細胞の形態変化や増殖などによって起こるとされているが、分子機構についてはあまり明らかとなっていない。本研究では、脊椎動物の前腸内胚葉上皮のくびれである咽頭嚢に着目し、上皮シートの形態変化の分子機構の理解を目指した。

咽頭弓は脊椎動物の初期発生過程で咽頭部にできる繰り返し構造である。咽頭弓は内胚葉および外胚葉の上皮シートにより覆われており、各咽頭弓は上皮シートがくびれることによって形成される咽頭嚢によって隔てられている。咽頭嚢の発生過程では、単純な前腸内胚葉の上皮シートが発生の進行に応じて一定の時間間隔でくり返しくびれ曲がることにより分節的な構造へと変化する。マウスにおいては咽頭弓形成に異常を示す変異体が複数知られているが、そのうちでも咽頭嚢上皮シートの形態に重篤な異常を示すものとして *Ripply3* 変異体が報告されている。この変異体では第3咽頭弓より後方の咽頭弓が形成されない。咽頭弓は咽頭の内胚葉上皮が主に屈曲することによって形成されるため、上皮シートの形態変化に異常があることが考えられる。*Ripply3* の機能解析は咽頭弓形成メカニズムの理解に重要であるとともに、上皮シートの形態変化のメカニズムの解明につながることを期待できる。そこで、本研究では *Ripply3* に着目し、咽頭弓における上皮シートの形態変化の制御機構を明らかにすることを目指した。

第一に、*Ripply3* 変異体において異常が認められる第3咽頭弓の形成過程を把握するために、正常胚での第3咽頭弓形成における上皮シートの形態変化の詳細

細を観察した。その結果、正常な胚では、第 3 咽頭弓は内胚葉上皮シートが 3 回屈曲することにより形成されることが初めて明らかになった。さらに、*Ripply3* が 3 回の屈曲の開始と同時に屈曲部位特異的に発現することが明らかになった。

第二に、第 3 咽頭弓形成過程において、*Ripply3* 変異体と正常胚の比較を行った。第 3 咽頭弓形成期の複数のステージにおいて組織切片を比較した結果、変異体では屈曲部位において上皮シートの形態が乱れていることを見出した。さらに、このような形態の乱れが組織切片の作成過程でたまたま生じたアーティファクトではないことを確かめるため、マウス胚全体を免疫染色し、透明化することで咽頭弓の上皮シートを 3 次元的に解析した。その結果、野生型胚では咽頭弓の上皮シートは長方形の細胞が連なる単層のシート構造であったのに対し、変異体胚では単層構造が壊れ、基底膜に接していない細胞が存在することが明らかとなった。このことから、*Ripply3* 変異体における第 3 咽頭弓の形成異常は屈曲部付近における上皮シートの単層構造の乱れによることが示唆され、*Ripply3* は、物理的なストレスがかかる上皮シートの屈曲部位において、単層構造を維持する上で必須な役割を果たしているものと考えられた。

第三に、この単層構造の乱れが生じる理由を探るため、細胞レベルの解析を行った。まず、第 3 咽頭弓形成期において細胞増殖や細胞死の異常を調べたが、*Ripply3* 変異体において見られなかった。そこで、上皮細胞において特徴的に発現するいくつかのタンパク質の分布を免疫組織染色により解析した。*Ripply3* 変異体では上皮細胞の基部側および頂端部側に局在するタンパク質の分布が異常であり、特に正常胚では上皮シートの基部側に連続的に見られた活性型のインテグリン  $\beta 1$  の局在が最も早期に異常を呈していた。さらに、電子顕微鏡により上皮シートの構造を詳細に観察したところ、*Ripply3* 変異体では基底膜構造の

形成が部分的に低下していた。これらのことから *Ripply3* は上皮シートの屈曲部位において、正常な上皮細胞構造の維持に必要であり、この異常が上皮シートの単層構造の異常に繋がることが示唆された。

最後に、*Ripply3* の分子機構を理解するため、*Ripply3* 変異体において最も早期に異常を呈した活性型のインテグリン  $\beta 1$  に着目し、COS7 細胞を用いて *Ripply3* の過剰発現を行った。インテグリン  $\beta 1$  の活性化は細胞と細胞外基質間の接着構造である接着斑 (focal adhesion) の発達とともに起きることが知られているが、*Ripply3* は focal adhesion に局在していた。*Ripply3* 結合タンパク質の候補の一つとして LIM ドメインタンパク質の一つである WTIP が先行研究により同定されていた。LIM ドメインタンパク質の多くは focal adhesion に局在することから、免疫沈降法によりいくつかの LIM ドメインタンパク質と *Ripply3* との相互作用を調べた。その結果、WTIP や WTIP と構造的に類似な複数の LIM ドメインタンパク質の他に focal adhesion の構成因子として解析が進んでいる Paxillin と *Ripply3* が結合することが明らかになった。そこで、Paxillin を *Ripply3* とともに COS7 細胞に発現させた結果、*Ripply3* は focal adhesion の成熟を促進することが明らかになった。

以上の結果から、*Ripply3* は、上皮シートの屈曲に伴い発現し、基底膜と内胚葉上皮細胞の結合を強化し、内胚葉上皮シートの単層構造に維持に不可欠であることが示された。おそらく、内胚葉上皮シートの屈曲により生じる機械的なストレスに対抗して上皮シートの単層構造を維持するために、*Ripply3* を介した細胞外基質と内胚葉上皮細胞の結合を強化が重要な役割をはたすものと考えられる。本研究により、上皮シートの形態変化において、単層構造の維持に細胞外基質と上皮細胞との結合が強化されることの重要性が初めて示唆され、その分子機構の一端が明らかにされた。

## II 序論

多細胞生物において、比較的単純な上皮シートは屈曲を繰り返すことによって様々な形状の上皮構造が形成される。屈曲のメカニズムは様々なモデルが提唱されており、apical constriction のように上皮シートの細胞の頂端側が収縮することによって引き起こされる屈曲や、上皮シートの細胞の一部がアポトーシスすることによって引き起こされる屈曲などが知られている (Sawyer et al., 2010; Sai et al., 2008; Monier et al., 2015, 図 1)。このような上皮シートの屈曲は時空間的に厳密に調整されており、細胞間シグナル伝達および細胞内遺伝子調節を含む多くの因子によって引き起こされていることが知られている (Plageman et al., 2011; Lee et al., 2006)。しかし、これらの屈曲の分子メカニズムの詳細は依然として不明な点も多い。一方、最近の研究では、機械的な力も上皮の屈曲に重要な因子であることが示されている (Legoff et al., 2013)。しかしながら、機械的な力がどのように上皮シート構造で伝達されているか、遺伝子の発現や細胞間シグナル伝達を制御しているかなどの詳細は明らかになっていない。

咽頭弓は内胚葉と外胚葉の上皮により囲まれた繰り返し構造であり、脊椎動物の初期発生過程で咽頭部に一過的に形成される。(図 2)。咽頭弓は、発生の進行とともに頭部から胸部にかけた様々な器官へと発達する。例えば、マウスでは第 3, 4 咽頭弓から胸腺や副甲状腺などの免疫に関する器官が形成され、第 3~6 咽頭弓からは心臓流出路につながる動脈が形成される。各々の咽頭弓は咽頭の内胚葉上皮が主に屈曲することで形成される分節構造であり、単純な上皮シートである前腸内胚葉が発生の進行に応じて一定の時間間隔でくり返し屈曲することにより形成される。(Graham et al., 2001; Graham, 2003)。

上皮の屈曲が見られる様々な組織と比べると、咽頭内胚葉は高度に分化した構造を持たない単純な上皮シートであり、上皮の屈曲過程をシンプルに観察することができる。また、咽頭内胚葉は体表に近い組織であるため、共焦点顕微鏡による観察に適している。さらに、個々の咽頭嚢が胚の発生に応じて一つずつ決まったタイミングでできることから、屈曲が時空間的に正確に制御されていることが推測され、上皮シートが屈曲する過程を正確に追跡することが可能である。したがって、咽頭弓は上皮シートの形態変化のメカニズムを解析するうえで、優れたモデルであると考えられる。

咽頭弓の形成には様々な遺伝子が関与していることが知られている。咽頭弓形成に関与している代表的なものとして *Tbx1* が知られている。*Tbx1* は咽頭弓で発現し、*Tbx1* 変異体では胸腺および副甲状腺の形成不全や心臓の流出路の異常が観察される (Jerome and Papaioannou, 2001; Lindsay et al., 2001; Merscher et al., 2001; Yagi et al., 2003)。 *Tbx1* 変異体では咽頭弓の屈曲が全く起きない (Okubo et al., 2011)。さらに、*Tbx1* の下流で作用する因子として *Fgf8* が知られている。*Fgf8* の変異体では心臓の血管および咽頭弓に異常がみられる (Abu-Issa et al., 2001)。また、ニワトリ胚において、屈曲部位ではN-カドヘリンやFアクチンが集積することが知られている (Quinlan et al., 2004)。このように、咽頭弓形成に関与する因子は様々なものが知られているが、屈曲の詳細なメカニズムは未だ不明である。

これらのタンパク質とともに咽頭弓の発生に必須な遺伝子として *Ripply3* が同定されている (Okubo et al., 2011)。 *Ripply3* は、T-box タンパク質と相互作用する Ripply homology (RH) ドメインや WRPW ドメインなどの高度に保存された領域を有するアダプタータンパク質である (Kawamura et al., 2005; Kondow et al., 2006)。マウスやゼブラフィッシュにおいては *Ripply3* と構造的に類



似たタンパク質をコードする遺伝子が他に2つ存在し、これらの Ripply タンパク質は、転写コリプレッサーである Groucho / TLE と結合し (Kawamura et al., 2008; Kondow et al., 2007)、Tbx タンパク質を分解することによって転写活性を調節する (Takahashi et al., 2012, Wanglar et al., 2014; Zhao et al., 2015)。マウス胚では、*Ripply3* は咽頭内胚葉および外胚葉に特異的に発現し、咽頭内胚葉においては、*Ripply3* 発現は *Tbx1* の発現と部分的に重複する (Jerome and Papaioannou, 2001; Lindsay et al., 2001; Merscher et al., 2001; Yagi et al., 2003)。*Ripply3* 欠損胚では第2咽頭嚢の後方の咽頭弓が欠損する (Okubo et al., 2011)。これまでの研究から、Tbx1 が *Ripply3* を介し転写活性が調節されることが、咽頭嚢の適切な発達にとって重要であると考えられてきた

(Okubo et al., 2011)。しかし、*Ripply3* の機能には Tbx1 との相互作用が必要なのかは明らかになっておらず、*Ripply3* の分子機構の詳細は未だ不明である。本研究では咽頭弓発生における *Ripply3* の機能及び作用メカニズムの詳細を解析し、咽頭弓の屈曲のメカニズムの解明を目指した。

まず、*Ripply3* の作用機構よく理解するために、*Ripply3* 欠損マウス胚での形態の異常の詳細を観察した。第3咽頭嚢の形態や形成中の *Ripply3* 発現を経時的に観察することにより、*Ripply3* 発現が上皮の屈曲が生じた位置と相関することを見出した。さらに、*Ripply3* 欠損胚の経時的な観察は、推定第3咽頭嚢領域の内胚葉上皮が曲がり始めた直後に内胚葉上皮の単層構造を維持することができなかったことが明らかになった。また、インテグリン  $\beta 1$  は野生型において咽頭内胚葉細胞の基底側で特異的に活性化されたが、*Ripply3* 欠損胚では適切に維持されなかった。したがって、*Ripply3* は、屈曲中の咽頭上皮シートの適切な構造の維持に必要であった。次に、培養細胞を用いた過剰発現実験を行い、細胞内の *Ripply3* の機能を解析した。その結果、*Ripply3* は focal adhesion に局

在し、成熟を促進した。これらの結果から、Ripply3 が咽頭内胚葉細胞と細胞外基質の接着を増強することによって上皮の屈曲時の物理的ストレスに抵抗する役割を果たすというモデルを提案する。

### Ⅲ 材料および方法

#### マウス及び遺伝子型の決定

野生型マウスおよび Ripply3 <sup>-/-</sup> マウス (Okubo et al., 2011) を使用した。野生型マウスは Japan SLC または Japan CLEA より購入した。Ripply3 <sup>-/-</sup> マウスの繁殖は、基礎生物学研究所モデル生物研究センターで行った。Ripply3 対立遺伝子の PCR 遺伝子型決定は以下のプライマー (5' ~ 3') を用いた PCR によって決定した: Rpy3-geF1、AACCTGAGATCGACTACTGC; Rpy3-geR1、ATCCCTTAAGGTCTGTCTGC; lacZ-F1、TGTTTGGACCGCTGGGATCTGC; および lacZ-R1、CCAGACCAACTGGTAATGGTAGC。遺伝子の増幅は Ex-taq (TaKaRa) を用いて行った。PCR はサーマルサイクラーを用いて、①95°C 3min、②98°C 10sec、③60°C 30sec、④72°C 30sec、②~④を 25 回繰り返す、⑤72°C 1min で行った。

#### in situ ハイブリダイゼーション

Whole-mount in situ ハイブリダイゼーションは *Ripply3* の全長 cDNA を含む pBluescriptIIISK-Ripply3 を用いて作成したプローブを使用した。プローブの作成には Dig RNA Labeling Kit (Roche) を用いた。頸椎脱臼法により安楽死させたマウスからマウス胚を取り出し、PBS で洗浄後に 4°C で 4% パラホルムアルデヒドを用いて o/n で固定した。マウス胚を PBS で洗浄し、100% MeOH で 5min、75% MeOH で 5min、50% MeOH で 5min 処理した後、再び PBS で洗浄した。その後、20 µg/ml ProK/PBST で 6.5min、2.0mg/ml Glycin/PBST で 10min 処理した後、PBS で洗浄し、65°C で o/n でハイブリダイズさせた。次に、65°C で 5xSSC で 30min 処理を 2 回行い、2xSSC の処理を同様に行った。その後、TBST で洗浄し、10% sheep serum/TBST で 2h ブロッキングし、4°C で抗 Digoxigenin-AP (Roche) を o/n で

処理した。TBST で洗浄後、NTMT で 10min 処理し、BM purple (Roche) で染色した。

## 免疫染色

マウス胚を 4℃で 4%パラホルムアルデヒドを用いて o/n で固定し、PBS 洗浄後に 50% EtOH で 30min、75% EtOH で 30min、99% EtOH で 30min、100% EtOH で 30min 処理した。その後、キシレンで 5min 処理し、パラフィンに包埋し、10  $\mu$ m で切片化した。パラフィン切片をスライドガラス上で伸展し、貼り付けた。その後、サンプルをキシレンで 1min 3 回処理し、99% EtOH で 1min、75% EtOH で 1min 処理した後、PBS で洗浄した。その後、10% FCS/PBST で 1h ブロッキングし、E-カドヘリン抗体 (610182、BD Biosciences) を 1h 処理した。PBST で洗浄後に、抗マウス IgG-Alexa Fluor 555 を用いて 45min 処理して染色した。二次抗体は 500 倍希釈で使用した。その後 PBS で洗浄し、Fluoromount-G (コスモ・バイオ) で封入した。また、マウス胚を 4℃で 4%パラホルムアルデヒドを用いて o/n で固定し、PBS 洗浄後に 10% sucrose で 30min、20% sucrose で 30min、30% sucrose で 30min 処理した後、OCT コンパウンドに包埋し、14  $\mu$ m で切片化した。凍結切片をスライドガラスに張り付け、PBS で洗浄した。その後、10% FCS/PBST で 1h ブロッキングし、E-カドヘリン抗体 (610182、BD Biosciences)、ラミニン抗体 (L9393、Sigma)、活性化インテグリン  $\beta$ 1 抗体 (550531、BD Biosciences)、PKC  $\zeta$  抗体 (sc-216、Santacruz) および phospho-Histon H3 抗体 (Ser10、Millipore Upstate) を 1h 処理した。これらの抗体は 1000 倍または 200 倍希釈で使用した。PBST で洗浄後に、抗ラット IgG-Alexa Fluor 488、抗マウス IgG-Alexa Fluor 555、抗ウサギ IgG-Alexa Fluor 647 (Molecular Probes) を 45min 処理して染色した。二次抗体は 500 倍希釈で使用した。その後 PBS で洗浄し、Fluoromount-G で封

入した。

## TUNEL

インビトロ細胞死検出キット-TM-Red (Roche) を用いた。アポトーシスの特徴である断片化された DNA の 3'-OH 末端を修飾ヌクレオチドで標識することにより検出した。免疫染色後のサンプルを PBS で洗浄し、インビトロ細胞死検出キット-TM-Red を 1h 処理した。その後 PBS で洗浄し、Fluoromount-G で封入した。することができる。

## 三次元画像解析

マウス胚を 4°C で 4% パラホルムアルデヒドを用いて o/n で固定し、PBS 洗浄後に 10% FCS/PBST で 1h ブロッキングし、E-カドヘリン抗体 (610182、BD Biosciences)、ラミニン抗体 (L9393、Sigma) を 1h 処理した。これらの抗体は 1000 倍または 200 倍希釈で使用した。PBST で洗浄後に、抗ラット IgG-Alexa Fluor 488、抗マウス IgG-Alexa Fluor 555 を 45min 処理して染色した。次に、このマウス胚を CUBIC (Tainaka et al., 2014) で 1h 処理することによって透明化した。その後、ガラスボトムデッシュにマウス胚を移し、共焦点顕微鏡で観察した。取得した画像を TCS SP8 顕微鏡 (Leica) 付属のソフトウェアで三次元画像解析を行った。

## 電子顕微鏡

野生型または Ripply3 変異体胚を、2.5% グルタルアルデヒドおよび 2% パラホルムアルデヒドを含有する 0.1M カコジル酸緩衝液固定剤で一晩固定した。次に、固定サンプルを 0.1M カコジル酸緩衝液で洗浄し、1% OsO<sub>4</sub> を含む 0.1M カコジル

酸緩衝液で 1 時間後固定した。その後、試料を 1%uranyl acetate で 1 時間染色し、Epon 812 に包埋し、ダイヤモンドナイフで 100nm 切片に切断した。その後、酢酸ウラニルで 5min 処理し、ミリ Q 水で洗浄した後、クエン酸鉛を 1min 処理することで染色し、JEM-1011 電子顕微鏡 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 5000 倍および 5 万倍で観察した。

## 細胞培養

COS7 細胞を、10% (v / v) FCS を添加した DMEM 中で培養した。COS7 細胞を  $9.0 \times 10^5$  の濃度でフィブロネクチンコートしたカバーガラス上で 0/N で培養し、Gene juice (Millipore) 、Opti MEM (Invitrogen) 、Ripply3 の全長 cDNA を含む pCS2-Ripply3-FLAG もしくは Paxillin の全長 cDNA を含む pCS2-Paxillin-myc を混合し、15 分間静置したものを培養細胞に添加した。その後、二日間培養し、4%パラホルムアルデヒドを用いて 15 分間固定した。固定後に、PBS で洗い、10% FCS/PBST で 1h ブロッキングし、FLAG 抗体 (M2, Sigma) 、Myc 抗体 (562, MBL) を 1h 処理した。これらの抗体は 1000 倍または 200 倍希釈で使用した。PBST で洗浄後に、抗マウス IgG-Alexa Fluor 555、抗ウサギ IgG-Alexa Fluor 647 (Molecular Probes) を 45min 処理して染色した。二次抗体は 500 倍希釈で使  
用した。その後 PBS で洗浄し、Fluoromount-G で封入した。

## IV 結果

### 第3咽頭嚢の形成過程

*Ripply3* 変異体では第1および第2咽頭弓の形成は正常であるが、第3および第4咽頭弓の形成は異常である (Okubo et al., 2011)。咽頭弓の発生は頭部から尾部に向けて前後軸方向に逐次的に進行するため、*Ripply3* 変異体における最初の異常は第3咽頭弓が形成される段階で発生すると推測された。そこで、*Ripply3* 変異体における形態的な欠陥が生じる理由を明らかにするためには、*Ripply3* 変異体の第3咽頭弓の発生の初期段階を解析することが重要であると考えた。しかしながら、第3咽頭弓の発生の初期段階については正常胚においても詳細な報告がなかったため、まず、正常胚の第3咽頭弓の形成過程を詳細に経時的に観察した。咽頭弓の構造を詳細に解析するためには、組織切片による観察が不可欠であると考え、第3咽頭弓の初期発生段階をできるだけ細分化して観察することにした。胚の発生ステージを詳細に特定するため、各胚の体節数をカウントし、それを発生段階の指標とした。15体節期から27体節期までのマウス胚を2体節期ごとに用意し、抗E-カドヘリン抗体で上皮細胞を染色することによって、第3咽頭弓の形態形成を観察した (図3A~F)。その結果、第3咽頭弓と第4咽頭弓の間を区切る構造である第3咽頭嚢の形成が19体節期から開始されることが明らかとなった (図3B)。19体節期から内胚葉上皮が曲がり始めた (図3Bの赤矢印)。この屈曲が第3咽頭弓形成過程の最初の屈曲であるため、以後、第1屈曲と呼称する。この屈曲の後、21体節期において、第1屈曲の後部で第2屈曲が生じた (図3C、Dの青色の矢印)。最後に、22体節期において、第1屈曲が起きた部位でさらに新たな屈曲 (第3屈曲) が生じた (図3E、Fの緑色の矢印)。この第3屈曲によって、内胚葉と外胚葉が隣接し、第3咽頭

嚢が形成された。従って、マウス胚における第3咽頭嚢の形成過程は予想されていたよりも複雑であり、第3咽頭嚢は3回の屈曲が順序だてて生じることでより形成されることが明らかとなった。

次に、この複雑な上皮シートの形態変化と *Ripply3* がどのように関与しているかを検証するために、第3咽頭弓形成における *Ripply3* の発現を in situ hybridization によって解析した (図 4A-E)。内胚葉の屈曲がまだ起こっていない 17 体節期において、*Ripply3* の発現は検出されなかった (図 4A)。しかし、*Ripply3* は 19 体節期での屈曲の開始と同時に屈曲部位で発現することが明らかとなった (図 4B)。さらに発生の進行とともに *Ripply3* の発現部位は後方に拡大し、第2屈曲部位まで広がった (図 4C、D)。その後、それぞれの屈曲後に消失した (図 5E)。次に、25-somite stage において、*Ripply3* の発現は第3屈曲部位で新たに観察された (図 4E)。これらの結果から、*Ripply3* は第3咽頭弓形成時に咽頭内胚葉の屈曲領域に特異的に発現することが明らかとなった。

### ***Ripply3* 変異体では上皮シート構造が欠損する。**

次に、*Ripply3* の咽頭弓形成における機能を調べるために、*Ripply3* 変異体の第3咽頭弓の形成過程を正常胚と同様に観察した。*Ripply3* 変異体では、内胚葉上皮の第1屈曲は観察された。しかし、正常胚において内胚葉上皮は単層の細胞からなるシート構造であったが、変異体では 19 体節期で第1屈曲の周りの内胚葉上皮は単層のシート構造ではなく、細胞塊のようにになっていた (図 5B)。また、23 体節期では、内胚葉上皮の第2屈曲が観察されたが、内胚葉上皮の形態は部分的に乱れていた。したがって、*Ripply3* は、第1および第2屈曲が正しく



起きるために必要であり、屈曲中の上皮シート構造の維持に関与していることが示唆された。興味深いことに、*Ripply3* 変異体では第 3 屈曲は観察されなかった。この第 3 屈曲の欠落は、第 1 屈曲部位または第 2 屈曲部位における内胚葉細胞の配置の異常によって引き起こされた可能性がある。

上皮シートの異常が観察されたものの、胚の切片を観察しているため、切断の角度によって上皮シートの形態を正確に観察できていない可能性があった。そこで、この上皮シートの異常が切片作成の際の人為的な影響によって生まれた可能性を検討するために、3 次元画像解析を行った。23 体節期胚を抗 E-カドヘリン抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡で画像を取得し、3 次元画像を再構成した (図 6)。その結果、内胚葉上皮の細胞は野生型胚において単層のシート構造を形成していたが、*Ripply3* 変異体では失われた (図 7A、B)。野生型では内胚葉細胞は単層のシート構造であるため、すべての細胞が基底膜に接している。これに対し、*Ripply3* 変異体では内胚葉細胞の 8% は基底膜との接触が認められなかった (図 7C)。これらの結果は、*Ripply3* 変異体において上皮シートの形態が単層構造でなくなっていたことを示した。以上の結果から、*Ripply3* 変異体では上皮シートの単層構造が欠損すること、この異常が初期異常であることが示された。

一方、*Ripply3* 変異体では、内胚葉上皮の異常だけではなく、外胚葉上皮や間葉細胞を含む第 3 および第 4 咽頭弓全体の重篤な欠損となる (図 5A-E; Okubo et al., 2011)。大久保らによる先行研究により、*Ripply3* 変異体では、第 3 および第 4 咽頭弓の間葉細胞のアポトーシスが増加し、欠損することが報告されている (Okubo et al., 2011)。咽頭弓における *Ripply3* の発現を詳細に調べた結果、

*Ripply3* 発現が咽頭弓の内胚葉の屈曲部位特異的であったことから、間葉細胞の異常は内胚葉欠損によって引き起こされた二次的なものであると考えられる。

### ***Ripply3* 変異体の第 3 咽頭嚢における上皮細胞の特徴**

*Ripply3* 変異体での上皮の異常の原因が細胞増殖および細胞死の異常に起因する可能性がある。これを検証するために、anti-phospho Histone H3 抗体 (Hendzel et al., 1997) および TUNEL assay (Gorczyca et al., 1993) を用いて細胞増殖および細胞死を検討した。しかし、18 体節期の野生型と *Ripply3* 変異体において、咽頭上皮における細胞増殖や細胞死は有意に変化しなかった (図 8)。このことから、細胞増殖および細胞死が変異体の上皮の欠損を引き起こす原因ではないことが明らかになった。

次に、*Ripply3* 変異体での上皮の異常の原因を探るために異常が見られた上皮細胞をより正確に解析した。具体的には、上皮細胞の頂端または基底側に特異的なタンパク質の局在を免疫染色によって検討した。正常な胚では、活性化状態のインテグリン  $\beta 1$  は、18 体節期において内胚葉上皮細胞の基底側に観察され (図 9A)、24 体節期ではより明瞭になった (図 9C)。しかし、*Ripply3* 変異体では、18 体節期において内胚葉細胞の基底側の局在が部分的に欠損していた (図 9B)。さらに、24 体節期では著しく減少した (図 9D)。一方、基底膜の構成要素であるラミニン (Graham et al., 2007) は、正常胚の 24 体節期では内胚葉および外胚葉の基底側に局在していた。これに対し、*Ripply3* 変異体では部分的に欠損していた (図 9F)。そこで、透過型電子顕微鏡 (TEM) によって基底膜の構造を観察したところ、上皮シート構造が乱れている部分で基底膜が不明瞭になっていた (図 10D)。この基底膜の乱れは、第 2 咽頭弓および第 3 咽頭嚢では観

察されなかった（図 10B, F）。一方、頂端に局在する PKC $\zeta$ （Chalmers et al., 2007）は *Ripply3* 変異体において部分的に欠損していた（図 9G, H）。これらの結果は、*Ripply3* 変異体では上皮細胞の特性が局所的に失われており、このことが形態的な欠損に繋がっている可能性を示唆している。さらに、ここで用いた 3 つのマーカーの中で、活性化状態のインテグリン  $\beta 1$  の異常が最初に観察された。したがって活性化状態のインテグリン  $\beta 1$  の欠損に代表されるような基部側の異常が最初に起き、それがさらなる上皮細胞の特性の変化を引き起こし、形態的な欠損につながる可能性があるのではないかと考えられた。

#### 培養細胞における *Ripply3* による focal adhesion の成熟

次に、*Ripply3* がインテグリン  $\beta 1$  を介して細胞形態に影響を及ぼす分子機構を解析することにした。興味深いことに、大久保らによる先行研究において、イーストツーハイブリッド法によって *Ripply3* と物理的相互作用する因子の探索が行われていた（図 11）。その結果、LIM ドメインを持つ WTIP という足場タンパク質が候補の一つとして見つかった。LIM ドメインタンパク質は脊椎動物において多数同定されているが、プロテオミクス解析から、その多くが細胞と細胞外マトリックスとの接着である接着斑（focal adhesion）に局在することが示されている。一方、インテグリン  $\beta 1$  は細胞と細胞外マトリックスとの接着である接着斑（focal adhesion）の構成要素の一つである。未成熟の focal adhesion は主に細胞辺縁部にあり、ターンオーバーを繰り返している。Rac1 および RhoA などの RhoGTPase ファミリーのタンパク質の活性化によりインテグリン  $\beta 1$  が活性化される。インテグリン  $\beta 1$  の活性化は Paxillin や zyxin といった focal adhesion を構成するアダプタータンパク質を集積し、細胞骨格と結合することで、focal adhesion が安定化する。安定化した focal adhesion は細胞

辺縁部から離れ、サイズが大きくなる。この focal adhesion の成熟を媒介する因子の一つである Paxillin は LIM ドメインを持つアダプタータンパク質であるため、Ripply3 と物理的相互作用する可能性が推測された。そこで、WTIP をはじめとした LIM ドメインタンパク質が Ripply3 と物理的に相互作用するかを免疫沈降法によって検討した。WTIP は AJUBA ファミリータンパク質と呼ばれる足場タンパク質である。このことから、AJUBA ファミリータンパク質の WTIP、AJUBA、LIMD1 および LIM ドメインを持ち focal adhesion を構成するアダプタータンパク質である Paxillin について、免疫沈降法によって Ripply3 との物理的相互作用を解析した (図 12)。その結果、WTIP、AJUBA、LIMD1 および Paxillin のすべてが Ripply3 と相互作用することが明らかになった。

これらの LIM ドメインタンパク質のうち、特に Paxillin は focal adhesion の構成因子として解析が進んでいることから、次に、focal adhesion と Ripply3 および Paxillin の関連を解析した。胚の組織内では focal adhesion 様の構造を明確に見分けることが難しいため、focal adhesion が主に解析されている培養細胞を用いて Ripply3 と focal adhesion の関係を調べることにした。まず、典型的な上皮細胞であるイヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株である MDCK を用いて Ripply3 の過剰発現を行った。しかし、Ripply3 の発現効率が悪く、Ripply3 の機能を検討することができなかった。そのため、Ripply3 を効率よく過剰発現できる COS7 細胞を用いて検討することにした。インテグリン  $\beta 1$  はフィブロネクチンとの相互作用により活性化されるため (Schwartz et al., 1991; Kornberg et al., 1991)、フィブロネクチンをコートしたカバーガラス上で細胞を培養した。Paxillin および Ripply3 を COS7 細胞で過剰発現した。その結果、Ripply3 はカバーガラスとの接着面および細胞の縁にドット状に局在した。この Ripply3 の局在は、focal adhesion の構成要素の一つである Paxillin の局在とよく重なる。

っていたことから (Turner et al., 2000)、Ripply3 は、focal adhesion に局在することが明らかになった (図 13A、B)。

インテグリンとフィブロネクチンとの間の相互作用によって作られた focal adhesion は、大きさと位置によって分類することができる (Wolfenson et al., 2009)。細胞の周辺やカバーガラスとの接着面にある小さなドット状のものは focal complex と呼ばれる (図 13D、E)。これらの focal complex は成熟して focal adhesion と呼ばれる大きな構造を作る。これは細胞骨格と細胞外マトリックスを結ぶタンパク質の複合体である (図 13F)。Ripply3 は focal complex および focal adhesion の両方に局在した。ここでは、focal complex および focal adhesion が見られない細胞を stage1、focal complex のみ見られる細胞を stage2、focal adhesion が見られる細胞を stage3 とした。

次に、Ripply3 の発現が focal adhesion 形成に及ぼす影響を調べた。Ripply3 の発現は、focal adhesion を有する stage3 の細胞の数を増加させた。これらの結果は、Ripply3 が focal complex および focal adhesion に局在し、focal adhesion への成熟を促進することを示している。以上の結果から、Ripply3 は、咽頭弓の発生において、上皮の屈曲部位特異的に発現し、細胞と細胞外マトリックスとの接触を促進し、屈曲の機械的ストレスに対する耐性を獲得している可能性が示唆された。

培養細胞で観察された Ripply3 による focal adhesion の形成の促進が、咽頭弓形成時にも起きているかを調べるために、Ripply3 の免疫染色を試みた。Ripply3 に対する抗体が存在しなかったため、Ripply3 の全長をウサギに免疫することで抗体の作成を行った。ウサギへの免疫は紀和実験動物研究所およびス

クラムに委託した。作成した Ripply3 抗体は培養細胞で過剰発現した Ripply3-FLAG は検出することができたが、マウス胚において Ripply3 を検出することができなかった。咽頭弓形成時における Ripply3 の挙動は未だ不明であり、解析する必要がある。

先行研究において Ripply3 は Tbx1 によって発現が促進されること、Ripply3 は Tbx1 の転写活性を抑制することが報告されている。Ripply3 による転写抑制が咽頭嚢の適切な発達にとって重要であることが明らかになっている。そこで、Tbx1 が屈曲時の機械的ストレスに対する耐性に関与しているかを解析した。Tbx1 を COS7 細胞において同様に過剰発現させ、focal adhesion 形成へ影響を与えるかを検討した。COS7 細胞において HA-Paxillin、FLAG-Ripply3 および Myc-Tbx1 を過剰発現した。その結果、Tbx1 は focal adhesion の成熟には影響を与えないことが示された (図 14)。このことから Ripply3 は Tbx1 非依存的に細胞と細胞外基質との間の結合の促進をしていることが示唆された。一方、上皮シートの形態変化および Ripply3 と Tbx1 の関与を検証するために、第 3 咽頭嚢形成時における Tbx1 の局在についても解析した。その結果、第 3 咽頭嚢予定領域での Tbx1 の局在は *Ripply3* の発現と重複している部分が観察された (図 15)。以上の結果から、Ripply3 は Tbx1 依存的に屈曲を制御し、Tbx1 非依存的に屈曲時の機械的ストレスに対する耐性を制御している可能性が示唆された。

## V 考察

### 上皮の屈曲における *Ripply3* の役割

本研究では、第 2 咽頭嚢より後方の咽頭弓形成に必要とされる *Ripply3* に着目し、咽頭内胚葉の上皮の屈曲メカニズムを検討した。まず、*Ripply3* の発現を時空間的に詳細に解析し、上皮シートの形態変化と正確に比較することにより、*Ripply3* が上皮シートの屈曲に伴い屈曲部位特異的に発現することがわかった。さらに、*Ripply3* 突然変異胚は、屈曲部位で上皮の単層構造を損なうことから、*Ripply3* の発現は、屈曲部位の単層上皮の維持に重要であることが示された。

異常がみられた上皮シートにおいて、細胞外マトリックスとの結合に重要な活性化状態のインテグリン  $\beta 1$  (Wolfenson et al., 2013) が欠損していた。さらに、培養細胞において、*Ripply3* は Paxillin と結合し、*Ripply3* の過剰発現は、focal adhesion の成熟を促進した。focal adhesion の形成にはインテグリン  $\beta 1$  の活性化や Paxillin の集積が必要であり (Wolfenson et al., 2013)、focal adhesion の形成が阻害されるとインテグリン  $\beta 1$  の活性化状態は維持されなくなる。以上のことから、*Ripply3* は咽頭内胚葉において Paxillin との結合を介してインテグリン媒介性の接着構造の維持を担い、上皮の単層構造を維持すると推測した。

ここで示した様なモデルは、咽頭弓形成にインテグリンおよびフィブロネクチンの必要性を示すこれまでのいくつかの研究によっても支持される。例えば、マウスの咽頭弓形成において、フィブロネクチン 1 は第 3, 4, 6 咽頭弓形成部位で特に強く発現する (Chen et al., 2015)。さらに、フィブロネクチン 1 の条件付きノックアウトは、咽頭弓が欠損した (Chen et al., 2015)。これらの

結果は、フィブロネクチンおよびインテグリンを介する接着が咽頭弓形成に重要であることを支持する。さらに、インテグリン  $\beta 1$  と結合してフィブロネクチン受容体を形成するインテグリン  $\alpha 5$  は、ゼブラフィッシュの咽頭嚢の発生に必要である (Crump et al., 2004)。フィブロネクチンとインテグリンの相互作用が、咽頭弓の単層上皮の維持に必要とされるかどうかは不明であるが、細胞外マトリックスと細胞の相互作用は、咽頭弓の形態形成に重要である。

### 機械的ストレスと Ripply3 との関係

培養細胞を用いた実験は、Ripply3 発現が培養細胞における focal adhesion の成熟を促進することを示した。Ripply3 は focal adhesion の構成因子である Paxillin と結合するとともに、Paxillin を発現させた培養細胞において focal adhesion に局在していたため、Ripply3 は focal adhesion に関与する因子を架橋するアダプタータンパク質として機能していると考えられる。

focal adhesion は、細胞外マトリックスと細胞骨格とを結ぶ接着である (Burridge et al., 1988)。focal adhesion は細胞外マトリックスと細胞の機械的な力を伝達する。したがって、Ripply3 発現によって引き起こされる focal adhesion の成熟が、細胞外マトリックスと Ripply3 発現細胞の力の伝達の増強をもたらすと推測している。Ripply3 が咽頭内胚葉上皮の屈曲において細胞外マトリックスと上皮細胞の接着の形成を促進することを考えると、このような接着が屈曲により生じる力への抵抗に寄与すると推測することができる。興味深いことに、活性化インテグリン  $\beta 1$ 、ラミニンおよび PKC $\zeta$  の抗体を用いた免疫組織化学染色および TEM 分析を用いた分析は、*Ripply3* 変異体の咽頭領域において、上皮シートが *Ripply3* 発現部位のみに局所的に異常を呈するのではなく、



内胚葉の上皮シートの広い範囲において構造に異常があることを示した。これは、*Ripply3* 変異体で生じる局所的な欠損が、上皮シートの屈曲の異常につながり、上皮シート全体の構造の以上につながることを示唆している。

上皮の屈曲のメカニズムは頂端側のアクチンの収縮によって引き起こされる apical constriction や基底膜が弛緩することで屈曲が起きやすくなる Basal relaxation、上皮シートの細胞の一部がアポトーシスすることで屈曲が引き起こされるモデルなど様々なものが提唱されている (Sawyer et al., 2010; Sai et al., 2008; Monier et al., 2015)。一方、屈曲した上皮シートは、屈曲に対して上皮構造を維持するために、細胞の物理的補強も必要であると思われる。本研究は、この補強のメカニズムを理解する手がかりとなる。この機構をさらに理解するためには、咽頭内胚葉上皮における接着形成において *Ripply3* と結合するタンパク質を同定することが重要である。*Ripply3* は Paxillin などの LIM ドメインタンパク質と結合するため、このような LIM ドメインタンパク質が実際に咽頭内胚葉上皮の維持に関わるのかを検討することが必要である。予備的な研究だが、私は *Ripply3* と結合する LIM ドメインタンパク質の一つである WTIP に着目した。培養細胞で WTIP を *Ripply3* および Paxillin とともに過剰発現させると共局在することが明らかになった。次に、AJUBA ファミリータンパク質の咽頭弓形成における役割を解析するために、WTIP および AJUBA の変異体の解析を行った。E9.5 および 11.5 で咽頭弓の形態を観察したが、異常は見られなかった。AJUBA ファミリータンパク質の咽頭弓形成時の役割は未だ不明である。咽頭弓形成における LIM ドメインタンパク質の役割は未だ不明であり、これを検討することで *Ripply3* の機能の解明につながる。

興味深いことに *Ripply3* 発現は上皮の屈曲と相関していた。このことは、*Ripply3* の発現が咽頭嚢形成時に上皮細胞にかかる機械的ストレスによって誘導された可能性を示唆している。以前の研究において、機械的ストレスが主要なシグナル伝達経路を介して転写を調節することが示されている (Ho et al., 2013; Dupont et al., 2011; Halder et al., 2012)。その様な例においては、細胞密度、ストレスファイバーおよび細胞形態は、シグナル伝達因子のリン酸化および下流遺伝子の発現を調節することが示されている。したがって、私の研究結果からは、物理的ストレスは上皮シートの形態を変化させるだけでなく、遺伝子発現を介してストレスに抵抗するための接着機構を強化すると推測することもできる。もしそうであるとするなら、*Ripply3* はこのストレスに媒介される調節ネットワークに関与する因子の 1 つと捉えることも可能であり、物理的ストレスによる *Ripply3* の発現制御が本当におきているのかどうかという問題は、今後解明すべき興味深い問題であると考えられる。

### 咽頭嚢形成における *Ripply3* 機能の多様性について

以前の研究において、*Tbx1* は咽頭弓の屈曲に必須であること、*Ripply3* は *Tbx1* の転写活性を抑制することが報告されている (Okubo et al., 2011)。また、第 3 咽頭嚢予定領域での *Ripply3* 発現は *Tbx1* の局在と重複していた (図 15)。これらのことから、*Tbx1* は第 3 咽頭嚢の形成にとって重要である可能性がある。対照的に、いくつかの研究は、*Tbx1* の過剰発現は、第 3 咽頭嚢の形態形成に重大な欠陥を引き起こさないことを示している (Liao ら、2004、Vitteli ら、2009)。さらに、本研究において、培養細胞での *Tbx1* の過剰発現は *Ripply3* による focal adhesion の形成に影響しないことを示した (図 14)。したがって、*Ripply3* は、咽頭嚢の発生において少なくとも 2 つの異なる様式で機能すると推測される。

一つ目は、Tbx1 依存的な咽頭内胚葉の屈曲時に Tbx1 の転写活性を調節し、屈曲を制御している可能性である。二つ目は Tbx1 非依存的な細胞と細胞外マトリックスとの間の結合の促進をしている可能性である。Ripply3 は二つの機能を使い分けることで、咽頭嚢形成を制御している可能性が示唆された。

## 結語

屈曲のメカニズムは様々なモデルが提唱されているものの、屈曲のメカニズムの詳細は依然として不明な点も多い。これまでの研究ではこの屈曲につながる分子メカニズムの一端が解明されてきた。それに対し、本研究では屈曲の際に生じる物理的ストレス下において、上皮シートを維持するためのメカニズムの一端を明らかにした。本研究では *Ripply3* が屈曲部位特異的に発現することで、細胞と細胞外マトリックスとの間の結合の促進をし、上皮シートを維持することが示唆された(図 16)。

## VI 謝辞

本研究を進めるにあたり、懇切丁寧なご指導を賜り、論文校閲に多大なる尽力を頂いた高田慎治先生に心よりの御礼申し上げます。また、細やかなご指導をいただきました三井優輔先生、大久保直先生、高田律子先生に深く感謝いたします。また、TEM 解析に関しては古瀬幹夫先生にご指導とご配慮を頂きました。ここに感謝の意を表します。

## VII 参考文献

- Borges, R. M., Lamers, M. L., Forti, F. L., Santos, M. F. & Yan, C. Y. 2011. Rho signaling pathway and apical constriction in the early lens placode. *Genesis*, **49**, 368-379.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G. & Turner, C. 1988. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, **4**, 487-525.
- Chalmers, A. D., Pambos, M., Mason, J., Lang, S., Wylie, C. & Papalopulu, N. 2005. aPKC, Crumbs3 and Lgl2 control apicobasal polarity in early vertebrate development. *Development*, **132**, 977-986.
- Chen, D., Wang, X., Liang, D. et al. 2015. Fibronectin signals through インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  to regulate cardiovascular development in a cell type-specific manner. *Dev Biol*, **407**, 195-210.
- Choe, C. P., Collazo, A., Trinh, L. A., Pan, L., Moens, C. B. & Crump, J. G. 2013. Wnt-dependent epithelial transitions drive pharyngeal pouch formation. *Dev Cell*, **24**, 296-309.
- Crump, J. G., Swartz, M. E. & Kimmel, C. B. 2004. An インテグリン-dependent role of pouch endoderm in hyoid cartilage development. *PLoS Biol*,

2, E244.

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M. et al. 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, **474**, 179–183.

Furukawa, M., Wheeler, S., Clark, A. M. & Wells, A. 2015. Lung epithelial cells induce both phenotype alteration and senescence in breast cancer cells. *PLoS One*, **10**, e0118060.

Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H. & Darzynkiewicz, Z. 1993. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*, **207**, 202–205.

Graham, A. 2003. Development of the pharyngeal arches. *Am J Med Genet A*, **119A**, 251–256.

Graham, A., Blentic, A., Duque, S. & Begbie, J. 2007. Delamination of cells from neurogenic placodes does not involve an epithelial-to-mesenchymal transition. *Development*, **134**, 4141–4145.

Graham, A. & Smith, A. 2001. Patterning the pharyngeal arches. *Bioessays*, **23**, 54–61.

Halder, G., Dupont, S. & Piccolo, S. 2012. Transduction of mechanical and

- cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 591–600.
- Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A. et al. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, **106**, 348–360.
- Ho, C. Y., Jaalouk, D. E., Vartiainen, M. K. & Lammerding, J. 2013. Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature*, **497**, 507–511.
- Kawamura, A., Koshida, S., Hijikata, H., Ohbayashi, A., Kondoh, H. & Takada, S. 2005. Groucho-associated transcriptional repressor ripply1 is required for proper transition from the presomitic mesoderm to somites. *Dev Cell*, **9**, 735–744.
- Kawamura, A., Koshida, S. & Takada, S. 2008. Activator-to-repressor conversion of T-box transcription factors by the Ripply family of Groucho/TLE-associated mediators. *Mol Cell Biol*, **28**, 3236–3244.
- Kondow, A., Hitachi, K., Ikegame, T. & Asashima, M. 2006. Bowline, a novel protein localized to the presomitic mesoderm, interacts with

- Groucho/TLE in *Xenopus*. *Int J Dev Biol*, **50**, 473–479.
- Kondow, A., Hitachi, K., Okabayashi, K., Hayashi, N. & Asashima, M. 2007. Bowline mediates association of the transcriptional corepressor XGrg-4 with Tbx6 during somitogenesis in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**, 959–964.
- Kornberg, L. J., Earp, H. S., Turner, C. E., Prockop, C. & Juliano, R. L. 1991. Signal transduction by インテグリンs: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 インテグリンs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8392–8396.
- Lee, J. Y., Marston, D. J., Walston, T., Hardin, J., Halberstadt, A. & Goldstein, B. 2006. Wnt/Frizzled signaling controls *C. elegans* gastrulation by activating actomyosin contractility. *Curr Biol*, **16**, 1986–1997.
- Legoff, L., Rouault, H. & Lecuit, T. 2013. A global pattern of mechanical stress polarizes cell divisions and cell shape in the growing *Drosophila* wing disc. *Development*, **140**, 4051–4059.
- Liao, J., Kochilas, L., Nowotschin, S. et al. 2004. Full spectrum of malformations in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome



- mouse models by altering Tbx1 dosage. *Hum Mol Genet*, **13**, 1577–1585.
- Monier, B., Gettings, M., Gay, G. et al. 2015. Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature*, **518**, 245–248.
- Oda, H., Tsukita, S. & Takeichi, M. 1998. Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol*, **203**, 435–450.
- Okubo, T., Kawamura, A., Takahashi, J. et al. 2011. Ripply3, a Tbx1 repressor, is required for development of the pharyngeal apparatus and its derivatives in mice. *Development*, **138**, 339–348.
- Pearl, E. J., Li, J. & Green, J. B. 2017. Cellular systems for epithelial invagination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **372**.
- Quinlan, R., Martin, P. & Graham, A. 2004. The role of actin cables in directing the morphogenesis of the pharyngeal pouches. *Development*, **131**, 593–599.
- Sai, X. & Ladher, R. K. 2008. FGF signaling regulates cytoskeletal remodeling during epithelial morphogenesis. *Curr Biol*, **18**, 976–981.
- Sawyer, J. M., Harrell, J. R., Shemer, G., Sullivan-Brown, J., Roh-Johnson, M. & Goldstein, B. 2010. Apical constriction: a cell shape change

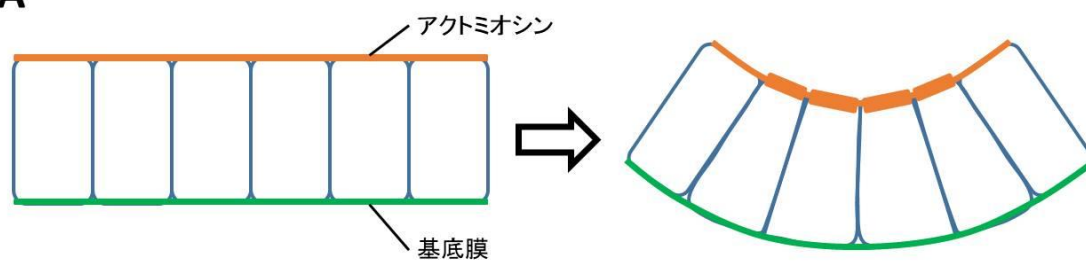
- that can drive morphogenesis. *Dev Biol*, **341**, 5–19.
- Schwartz, M. A., Lechene, C. & Ingber, D. E. 1991. Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing インテグリン alpha 5 beta 1, independent of cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7849–7853.
- Tainaka, K., Kubota, S. I., Suyama, T. Q. et al. 2014. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell*, **159**, 911–924.
- Turner, C. E. 2000. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol*, **2**, E231–236.
- Vitelli, F., Huynh, T. & Baldini, A. 2009. Gain of function of Tbx1 affects pharyngeal and heart development in the mouse. *Genesis*, **47**, 188–195.
- Wolfenson, H., Henis, Y. I., Geiger, B. & Bershadsky, A. D. 2009. The heel and toe of the cell's foot: a multifaceted approach for understanding the structure and dynamics of focal adhesions. *Cell Motil Cytoskeleton*, **66**, 1017–1029.
- Wolfenson, H., Lavelin, I. & Geiger, B. 2013. Dynamic regulation of the structure and functions of インテグリン adhesions. *Dev Cell*, **24**,

447-458.

Yoshikawa, Y., Fujimori, T., McMahon, A. P. & Takada, S. 1997. Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. *Dev Biol*, **183**, 234-242.

## VIII 図表

**A**



**B**

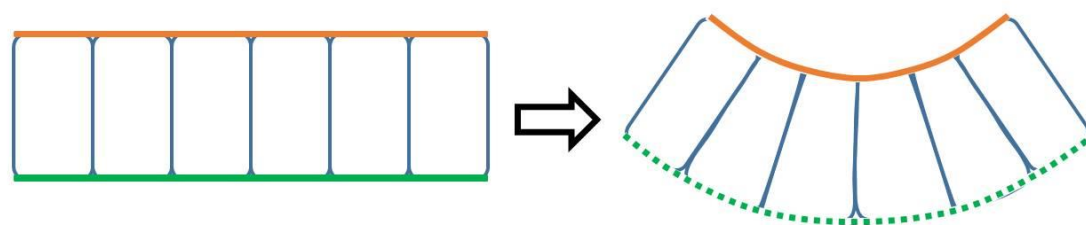
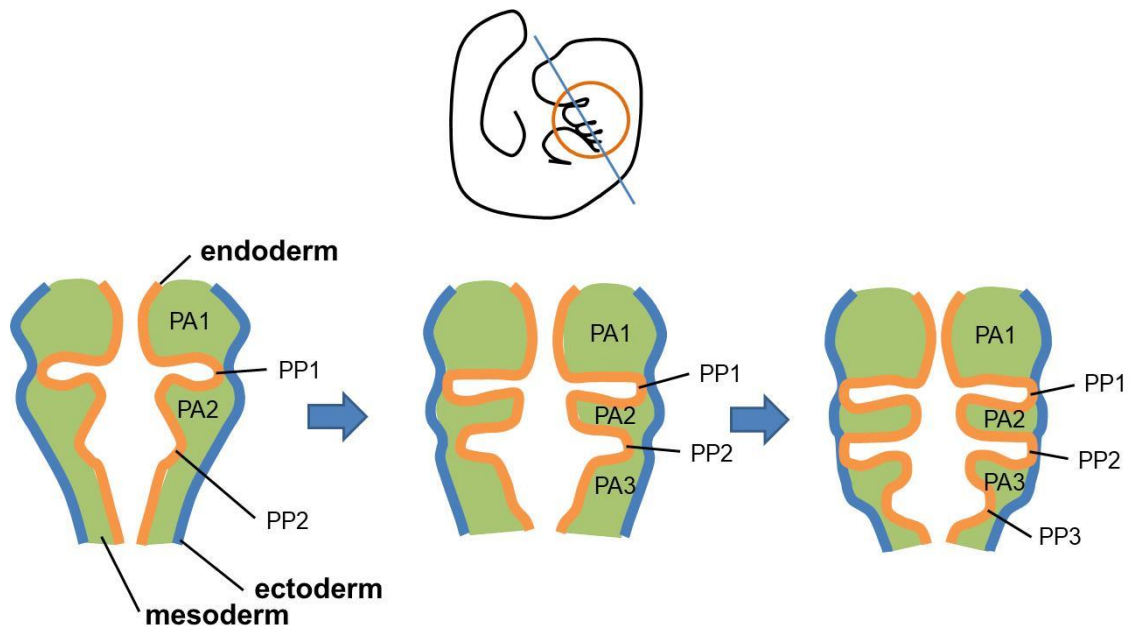


図 1 屈曲のメカニズムのモデルの一例

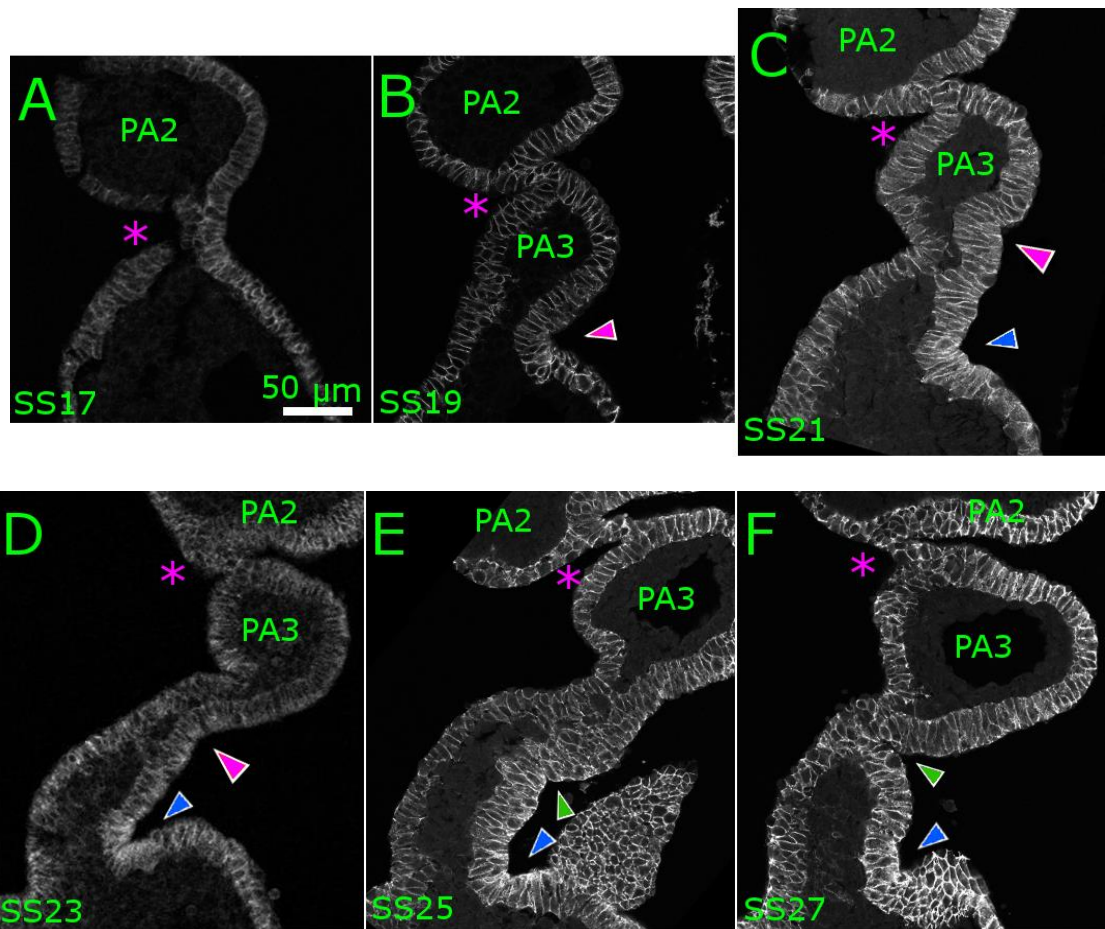
(A) 古典的な先端収縮。単層の上皮シート細胞の頂端部に集積したアクトミオシンが収縮し、くさび形の細胞が生じる。これにより上皮シートが屈曲する。

(B) 基底部の弛緩。基底部での F-アクチンの分解や基底膜の弛緩し、細胞が楔型になりやすくなる。これにより上皮シートが屈曲する。橙色はアクトミオシン、緑は基底層を示す。



## 図 2 咽頭弓の形成過程の模式図

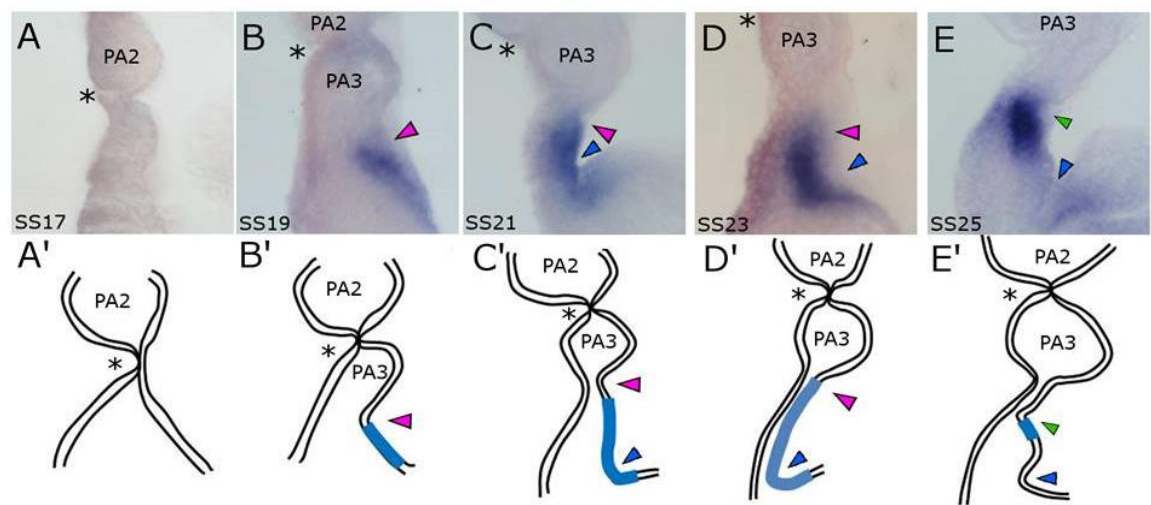
(A) マウス胚における咽頭弓の模式図。青い線は、図 1 に示す切片の位置を示す。(B) マウスの咽頭内胚葉の形態形成の模式図。咽頭内胚葉は、胚発生の進行に従って反復的に屈曲する。第 1、第 2 および第 3 咽頭弓を「PA1」、「PA2」および「PA3」と示した。第 1、第 2 および第 3 咽頭嚢を「PP1」、「PP2」および「PP3」と示した。





### 図3 第3咽頭弓形成時の上皮形態

(A-F) 17～27 体節期の野生型胚を E-カドヘリン抗体によって免疫染色し、観察した。第3咽頭弓の形成時に3つの屈曲が観察された。アスタリスクで第2咽頭嚢を示した。第2および第3咽頭弓を「PA2」および「PA3」と示した。スケールバーは50  $\mu$ m。



#### 図 4 第 3 咽頭弓形成時の Ripply3 の発現

(A-E) 野生型胚の第 3 咽頭弓の発生における Ripply3 発現を in situ hybridization によって観察した。第三咽頭弓形成時の屈曲および Ripply3 発現の概略図を A' ~ E' に示した。赤い矢頭、青い矢頭、緑の矢頭で 1 回目、2 回目、3 回目の屈曲を示した。アスタリスクで第 2 咽頭嚢を示した。第 2 および第 3 咽頭弓を「PA2」および「PA3」と示した。

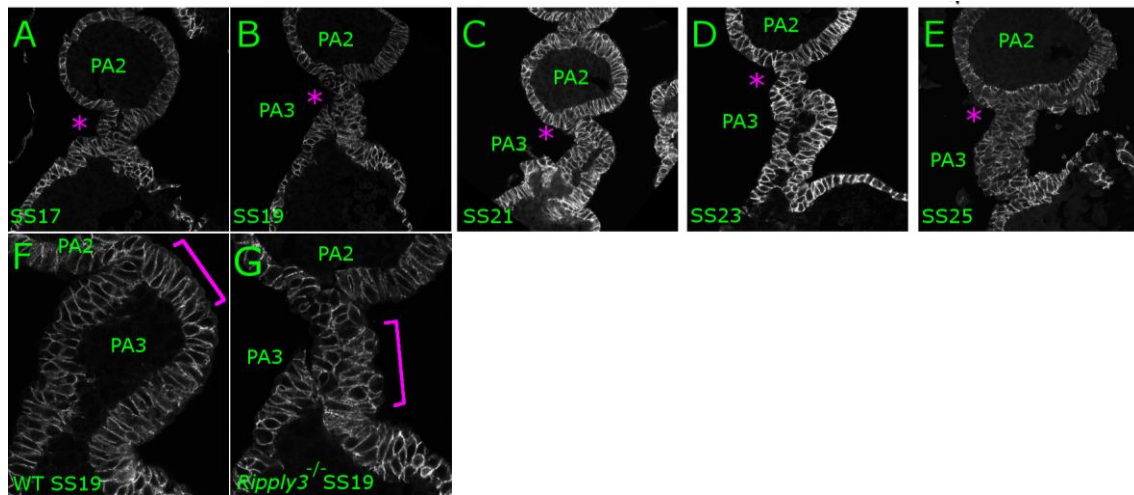
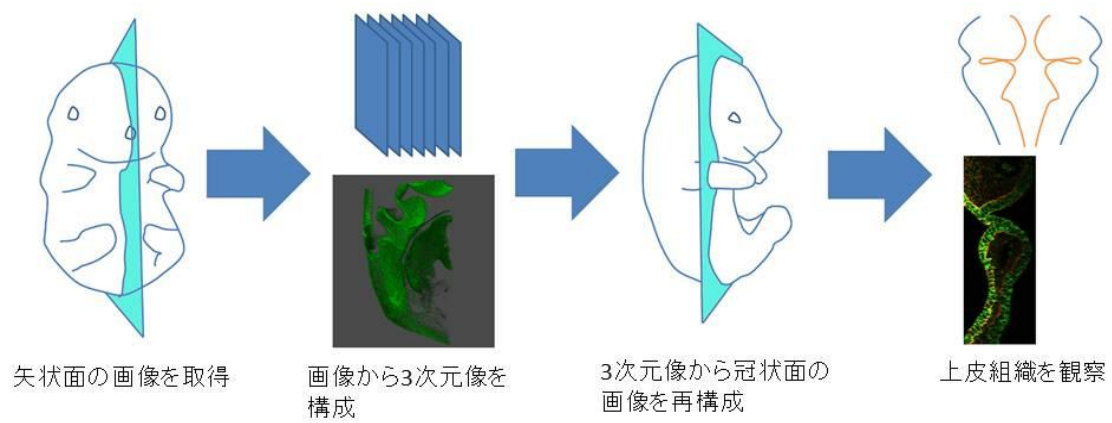


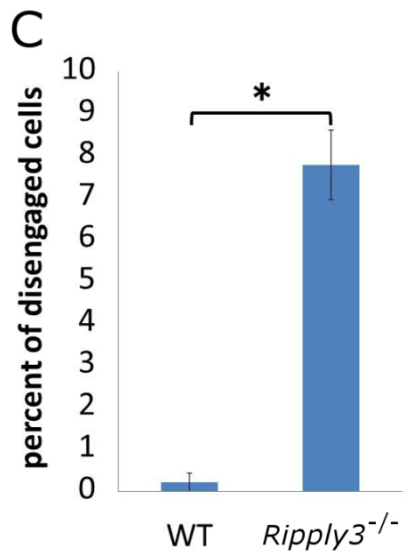
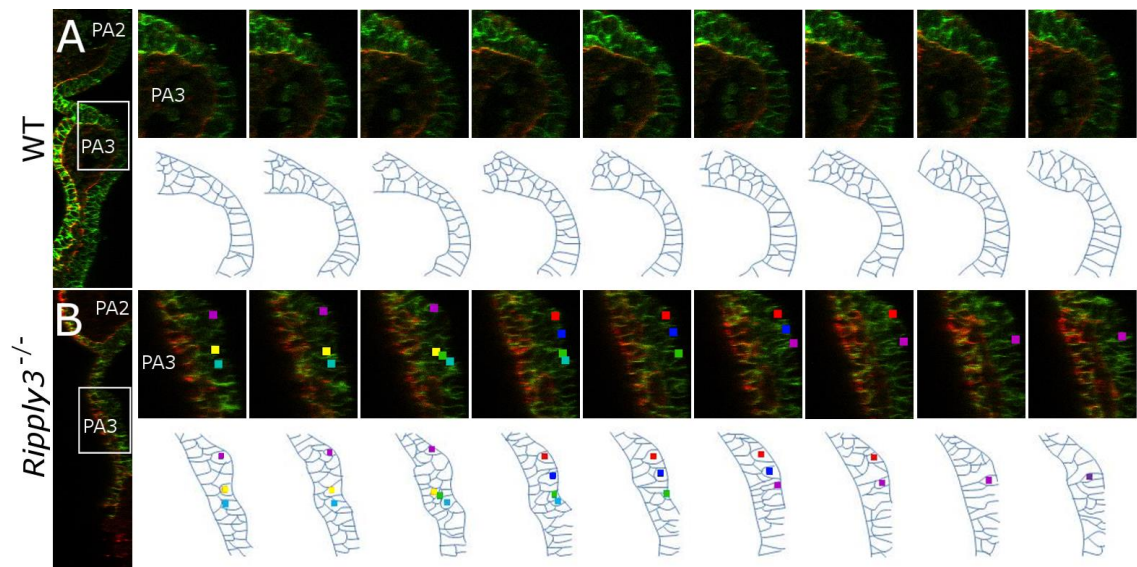
図 5 Ripply3 変異体における第 3 咽頭弓形成時の上皮形態

(A-E) Ripply3 変異体における第 3 咽頭弓を野生型と同様に観察した。(F、G) 19 体節期の野生型 (図 1B) および Ripply3 変異体 (B) の内胚葉上皮の形態を拡大し、比較した。Ripply3 変異体において内胚葉上皮の単層シート構造が壊れていた。括弧で第三咽頭弓の内胚葉上皮シートを示した。アスタリスクで第 2 咽頭嚢を示した。第 2 および第 3 咽頭弓を「PA2」および「PA3」と示した。



#### 図 6 マウス胚の 3 次元画像の構築方法

共焦点顕微鏡によって取得した矢状面の画像を積み重ね、胚の 3D 画像を再構成した。次に、再構成された 3D 画像から冠状面の画像を作成した。





## 図 7 Ripply3 変異体における咽頭内胚葉の三次元画像解析

(A、B) 23 体節期の野生型胚 (A) および Ripply3 変異体 (B) を E-カドヘリン およびラミニン抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡によって画像を取得し、3 次元構築した。次に、これらの 3D 画像から冠状面の画像を再構成した。"A"と "B" の白い四角で区切られた咽頭領域を右の一連の画像として示した。カラードットで基底膜に付着していない細胞を示した。(C) 第三咽頭弓の内胚葉上皮の細胞 150 個のうち、ラミニンに結合していない細胞の割合を計測した。野生型および Ripply3 変異体のそれぞれ 3 つの胚を計測した。第 2 のおよび第 3 咽頭弓を「PA2」および「PA3」と示した。\*、 $P < 0.001$  カイ 2 乗検定。エラーバーは平均  $\pm$  s. e. m を示す。



図 8 Ripply3 変異体における咽頭内胚葉上皮の細胞増殖と細胞死

(A、B) 18 体節期の野生型 (A) および Ripply3 変異体 (B) を抗 phospho-histone H3 抗体で免疫染色し、分裂細胞を標識した。(C、D) 18 体節期の野生型 (C) および Ripply3 変異体 (D) のアポトーシス細胞を TUNEL 法によって検出した。

(E、F) 野生型および Ripply3 変異体における増殖率 (E) およびアポトーシス率 (F) を示した。それぞれ 3 つの胚について 50 細胞ずつ調べ、カイ 2 乗検定によって検定した。エラーバーは平均  $\pm$  s. e. m を示す。

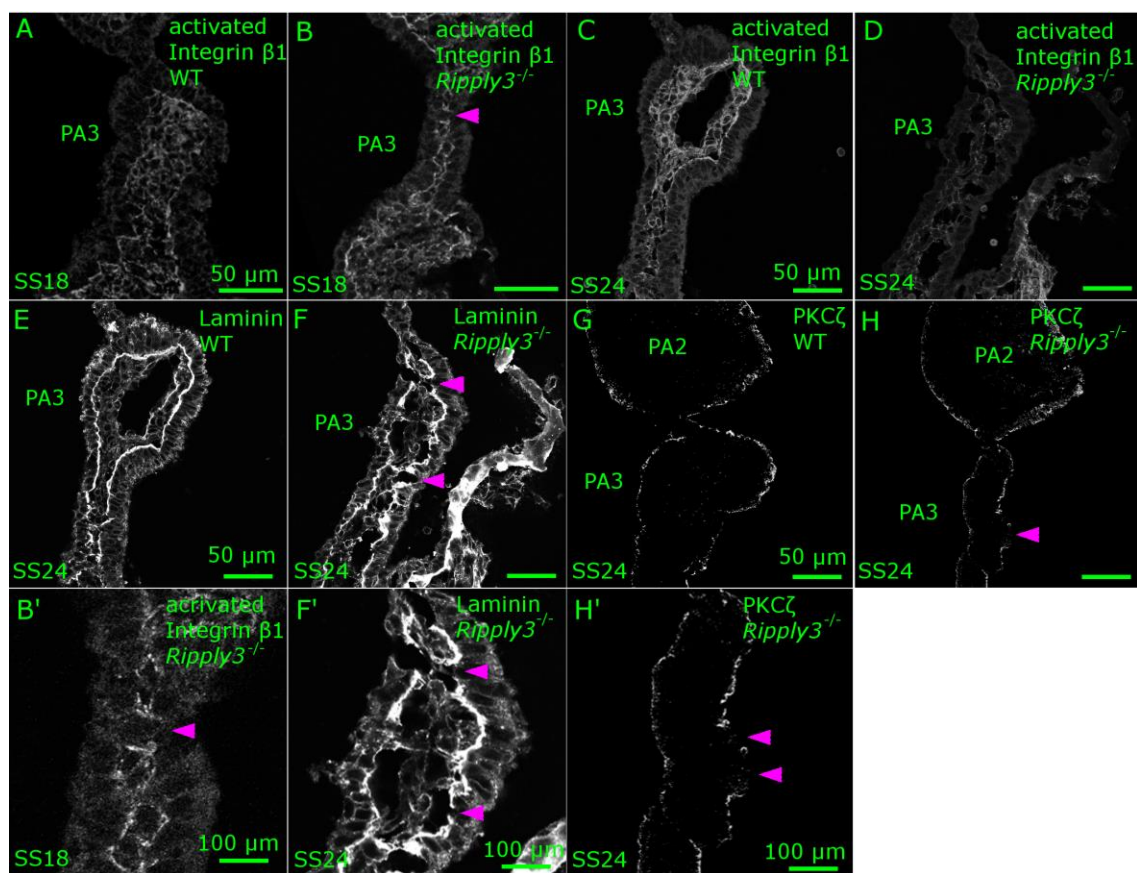


図 9 Ripply3 変異体における咽頭内胚葉の上皮細胞

(A-C) 18 および 24 体節期の野生型 (A、B) および Ripply3 変異体 (C、D) における活性化形態のインテグリン  $\beta 1$  の免疫染色。B の拡大画像を B' に示した。

(E、F) 24 体節期の野生型 (E) および Ripply3 変異体 (F) におけるラミニンの免疫染色。F の拡大画像を F' で示した。(G、H) 25 体節期の野生型 (G) および Ripply3 変異体 (H) 胚における PKC $\zeta$  の免疫染色。H の拡大画像を H' で示した。矢印は、Ripply3 変異体でシグナルが異常に現れた部位を示す。

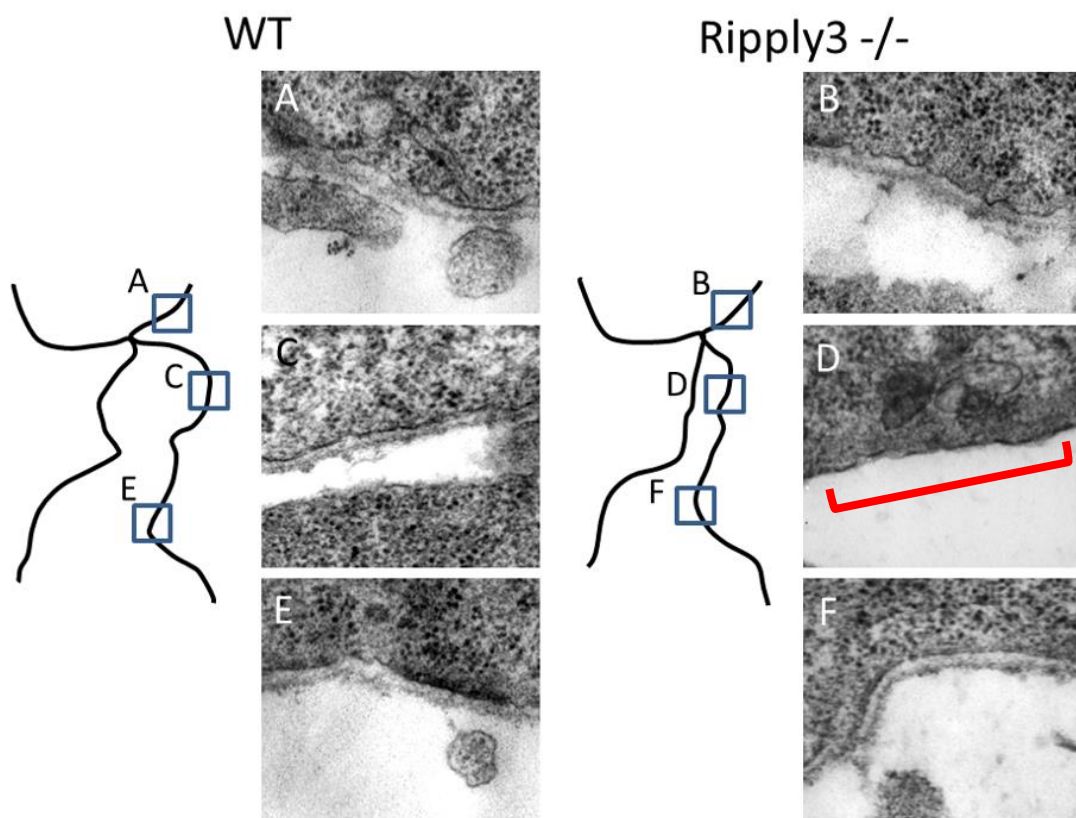


図 10 野生型および Ripply3 変異体の TEM 分析

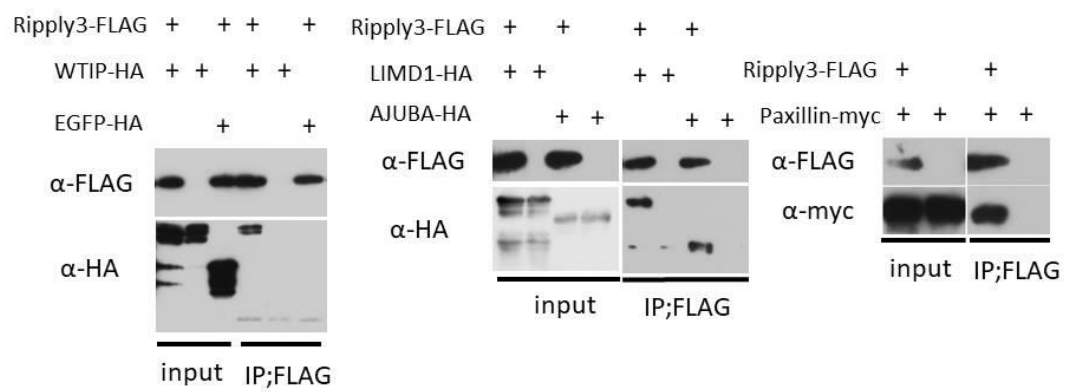
(A-C) 24 体節期における野生型の第 2 咽頭弓(A)、第 3 咽頭弓(B)、第 3 咽頭嚢(C)の TEM 分析。(D-F) 24 体節期における Ripply3 変異体の第 2 咽頭弓(D)、第 3 咽頭弓(E)、第 3 咽頭嚢(F)の TEM 分析。Ripply3 変異体の第 3 咽頭弓でのみ基底膜の欠損が観察された。

gene	クローン数
WTIP	3
filamin-C	1
Med-13	1
GLYR1	1
Jun-B	1



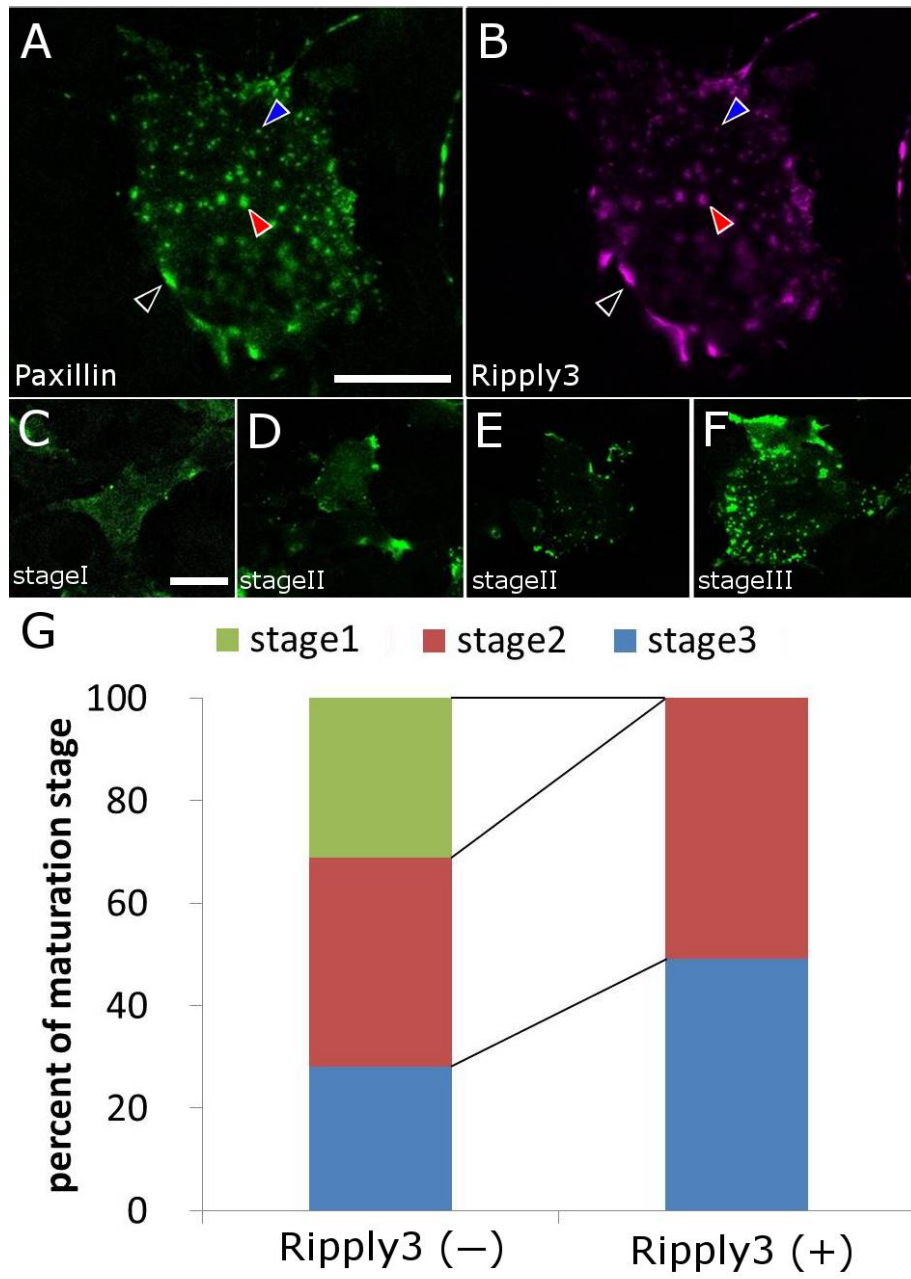
#### 図 11 Ripply3 と物理的相互作用する因子の候補

大久保らによる先行研究において行われたイーストツーハイブリッド法により発見された Ripply3 と物理的相互作用する因子の候補。mouse Ripply3 cDNA と mouse embryos E9.5-10.5 cDNA ライブラリー (1.8mg の total RNA から SuperScriptIII にて作製) を用いて行われた。スクリーニングは 3 段階で行われた。まず、第一スクリーニングとして、5000 コロニーから成長の早いコロニー 90 個をピックアップした。次に、第 2 スクリーニングとして、栄養要求性選択培地 (Leu<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup> His<sup>-</sup> 3AT<sup>+</sup>) において、GAL4 活性の評価が行われた。最後に、第 3 スクリーニングとして  $\beta$ -gal 活性の評価が行われた。このスクリーニングを 2 回行った。その結果、Filamin-C、Med-13、GLYR1、Jun-B がそれぞれ 1 つのクローンから検出された。また、WTIP が 3 つのクローンから検出された。



## 図 12 Ripply3 と Paxillin の物理的相互作用

COS7 細胞において、FLAG-Ripply3 と HA-WTIP、HA-LIMD1、HA-AJUBA および myc-Paxillin を過剰発現させ、FLAG タグ抗体ビーズを使用し、タンパク質を回収した。それぞれのタグ抗体を用いたウエスタンブロッティングによって物理的相互作用を分析した。HA-WTIP、HA-LIMD1、HA-AJUBA および myc-Paxillin は物理的相互作用することが明らかになった。



### 図 13 培養細胞における Ripply3 および Paxillin の過剰発現

(A、B) COS7 細胞において、Myc-Paxillin (A) および FLAG-Ripply3 (B) を過剰発現し、それぞれのタグで免疫染色した。(C-G) Ripply3 は、細胞内の focal adhesion の成熟を促進した。Myc-Paxillin の局在から、focal adhesion の成熟度を評価し、ステージ I (C)、ステージ II (D、E)、ステージ III (F) の 3 段階に分類した。Myc-Paxillin が細胞質中に局在するものをステージ I とした。Myc-Paxillin が細胞の縁や小さな点状に局在するものをステージ II とした。これらの局在は focal complex を示す。Myc-Paxillin が大きな点状に局在するものをステージ III とした。これらの局在は focal adhesion を示す。3 種類のパキシリン発現細胞の分布を「G」に要約した。Myc-Paxillin を発現している 100 個の細胞を計測した。黒と青の矢印で focal complex を示した。赤い矢印で、focal adhesion を示した。カイ二乗検定。スケールバーは  $25\ \mu\text{m}$ 。

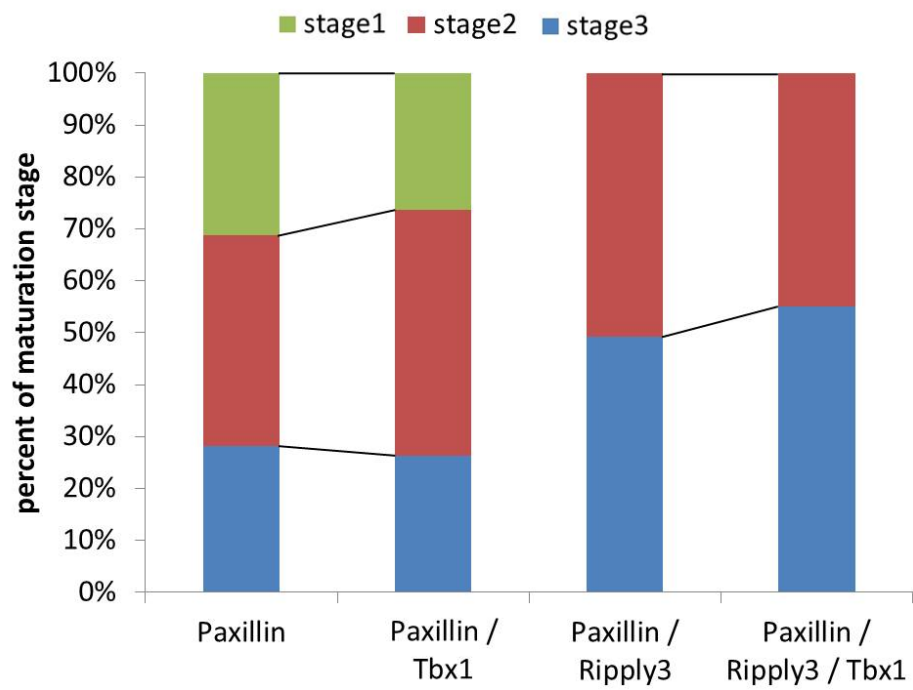


図 14 Tbx1 の過剰発現の focal adhesion 形成への影響

COS7 細胞において HA-Paxillin、FLAG-Ripply3 および Myc-Tbx1 を過剰発現した。

3 種類のパキシリン発現細胞の分布を要約した。Myc-Paxillin を発現している

70 個の細胞を計測した。  $P < 0.001$  カイ二乗検定。スケールバーは  $25 \mu\text{m}$ 。

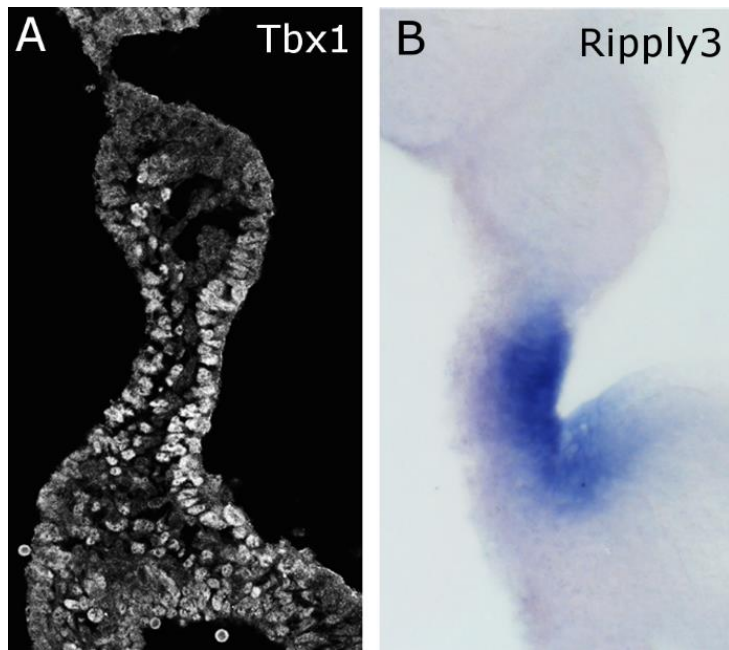
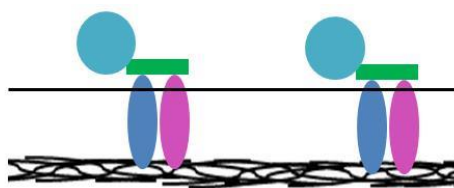


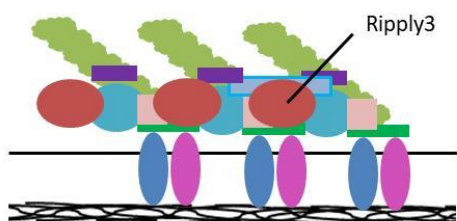


図 15 第 3 咽頭嚢における Tbx1 の局在

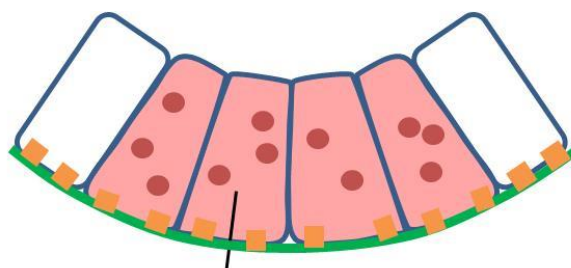
(A) 21 体節期の野生型における Tbx1 の免疫染色。 (B) 21 体節期の野生型における Ripply3 発現。第 3 咽頭嚢形成時に、Tbx1 の局在は Ripply3 発現と部分的に重複した。



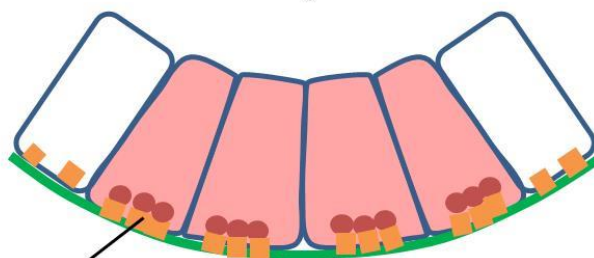
未成熟なfocal adhesionが点在する。



Ripply3がfocal adhesionに局在し、  
成熟が促進される。



上皮シートの屈曲部位特異的にRipply3が  
発現する。



focal adhesionの形成が促進され、  
細胞と細胞外基質の結合が強化される。

図 16 Ripply3 の局所的発現と上皮の単層構造の維持のモデル

野生型では Ripply3 が屈曲部位特異的に発現する。これにより、細胞と細胞外マトリックスとの間の結合が促進される。その結果、基底膜の構造が強化され、屈曲の物理的ストレスに抵抗する。