

上皮の組織修復における

Slit-Robo2 シグナルの役割とその分子メカニズム

飯田 千晶

目次

| | |
|---------------|----|
| 目次..... | 1 |
| 1. 要旨..... | 2 |
| 2. 序論..... | 3 |
| 3. 結果・考察..... | 7 |
| 4. 方法..... | 27 |
| 5. 引用文献..... | 38 |
| 6. 謝辞..... | 47 |

1. 要旨

発生中の上皮組織は、物理的な損傷を受けるとそれを自身で修復する能力を有している。ショウジョウバエ幼虫において成虫原基が損傷を受けると、損傷部位付近において c-Jun N-terminal kinase (JNK) が活性化して組織修復が行われる。この JNK 活性化は、組織修復プロセスの序盤から終盤にかけて複数のステップに関与することが報告されている。しかし、それぞれのステップで JNK がどのような役割を担っているのか、その詳細はいまだ明らかでない。そこで本研究では、組織修復における JNK の役割とその分子メカニズムの解明を目指した。ショウジョウバエ幼虫の翅成虫原基（将来成虫の翅のブレードになる上皮組織）に物理的に損傷を与えると、発生過程でその傷は修復され成虫ではほぼ正常な翅が形成される。興味深いことに、上皮細胞の細胞表面リガンド-受容体分子 Slit-Roundabout2 (Robo2) の機能を抑制すると、この組織修復が顕著に阻害されることを見いだした。Slit-Robo2 は、JNK シグナルの下流で活性化され、がん抑制性細胞競合（がん原性の極性崩壊細胞が正常細胞に囲まれると組織から排除される現象）において極性崩壊細胞を組織外へと排除するのに必要であることが知られている。実際に、損傷部位付近において JNK が活性化し、この活性に依存的して *slit* 遺伝子の発現上昇が観察された。Slit-Robo2 は上皮組織から細胞を排除するのに機能することから、修復中の組織において死にゆく細胞 (dying cell) が出現した際にこれを排除するのにも寄与している可能性を考え、組織中の dying cell の空間的局在を解析した。その結果、通常は dying cell は修復中の組織において時間経過とともに組織外へと排除されたが、Slit-Robo2 シグナルが抑制された組織では dying cell の排除が有意に遅滞することがわかった。逆に、Slit-Robo2 シグナルを亢進させると dying cell の排除が促進された。さらに、修復中の組織に出現する dying cell では分泌性増殖因子 Wingless (Wg) や Decapentaplegic (Dpp) が過剰に発現しており、組織全体で Wg や Dpp の発現を抑制することで Slit-Robo2 抑制による組織修復の異常が軽減した。以上の結果から、損傷部位付近で起こる JNK 依存的な Slit-Robo2 シグナルの活性化は、修復中の組織に出現する dying cell を速やかに組織外へと排除することで、dying cell から分泌される細胞増殖因子の量を適正に制御し組織修復を促していると考えられた。

2. 序論

2.1 組織修復

組織修復は進化的に高度に保存された生命システムの一つである (Belacortu and Paricio, 2011; Poss, 2010; Tanaka and Reddien, 2011)。発生中の上皮組織に物理的な傷が生じると、多くの分子が協調しながら組織が修復されその恒常性が維持される。このプロセスにおいて重要な役割をもつのが MAP キナーゼである c-Jun N terminal kinase (JNK) であり、ショウジョウバエの上皮組織 (Bosch et al., 2005; Galko and Krasnow, 2004; Hariharan and Serras, 2017; Rämetsch et al., 2002)、プラナリア個体 (Almuedo-Castillo et al., 2014; Tasaki et al., 2011)、またゼブラフィッシュの尾ヒレ (Ishida et al., 2010) の組織修復に必要であることがわかっている。JNK の役割として、ショウジョウバエ上皮組織の組織修復において次のようなものが報告されている。

- (1) アクチン細胞骨格の再構成：アクチン細胞骨格を傷の周囲に凝集させることで開裂部を閉鎖する (zipping) (Bosch et al., 2005; Mattila et al., 2005)。
- (2) 細胞増殖の亢進：増殖促進因子 Yorkie (Yki) (Yap ホモログ) (Grusche et al., 2011; Tsai et al., 2017)、Wg (Wnt ホモログ) (Smith-Bolton et al., 2009)、Dpp (BMP2/4 ホモログ) (Perez-Garijo et al., 2009)、Myc (Smith-Bolton et al., 2009) を介して細胞増殖を亢進することで、傷により消失した領域を代償する。
- (3) アポトーシスの誘導：ダメージを受けた細胞にアポトーシスを誘導し、組織から排除する (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Diaz-Garcia et al., 2016; Igaki, 2009; Ryoo and Bergmann, 2012; Shlevkov and Morata, 2012)。
- (4) 細胞の再分化：Polycomb グループタンパク質依存的なエピジェネティックなゲノム不活性化を抑制して細胞の再分化を促進することで、傷により消失した細胞とは異なる発生運命を辿っていた細胞による組織の代償を可能にする (Lee et al., 2005)。
- (5) 発生遅延：幼虫に傷をつけた場合に、エクダイソン（発生を制御するステロイドホルモン/脱皮ホルモン）合成経路の抑制制御因子である *Drosophila*

insulin-like peptide 8 (Dlip8) の分泌させることで幼虫期から蛹期への移行を抑制し、組織を修復する時間を延長させる (Katsuyama et al., 2015)。したがって、JNK は組織修復プロセスの序盤から終盤にかけてあらゆるステップを制御している重要な制御因子の一つであると言える (図 1)。

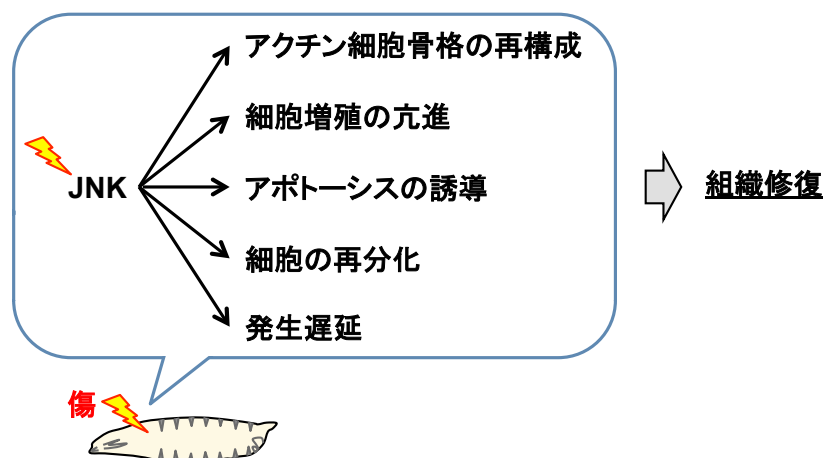


図 1. 組織修復において JNK は多様なステップを制御する

2.2 細胞の排除

上皮組織中にアポトーシスが誘導されると、死にゆく細胞 (dying cell) は、上皮組織の頂端側または基底側へと押し出され、上皮層から物理的に排除される (Ohsawa et al., 2018)。例えば、培養中の Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞 (Eisenhoffer et al., 2012) やゼブラフィッシュの尾ヒレ (Eisenhoffer et al., 2012)、またショウジョウバエの notum 領域 (Marinari et al., 2012) では、細胞の密度が高くなると細胞死が誘導された細胞が組織から押し出される。またショウジョウバエの胚の発生では、胚の背側閉鎖 (dorsal closure) (羊漿膜細胞の左右に存在する上皮が正中線上方向に移動し、融合・閉鎖する発生イベント) においても羊漿膜の細胞が細胞死を起こし排除されることで上皮の閉鎖が促進される (Muliylil et al., 2011; Reed et al., 2004; Toyama et al., 2008)。dorsal closure は、JNK 依存的な細胞の移動、上皮の zipping、また細胞死といった組織修復と同様のプロセスで制御されている (Hayes and Solon, 2017; Jacinto A et al., 2001)。さら

に、細胞の頂端-基底極性を規定する *scribble (scrib)* や *discs large (dlg)* の遺伝子に変異が入ったがん原性の上皮細胞（極性崩壊細胞）は、周囲を野生型細胞に囲まれると、“細胞競合”により組織から積極的に排除されるが、この現象は JNK 依存的に引き起こされる (Igaki et al., 2006, 2009; Katsukawa et al., 2018; Ohsawa et al., 2011; Vaughen and Igaki, 2016; Yamamoto et al., 2017)。最近、興味深いことに、リガンド-受容体分子である Slit-Robo2 が極性崩壊細胞の排除を駆動することが明らかになった (Vaughen and Igaki, 2016)。具体的には、極性崩壊細胞で活性化した JNK が Slit-Robo2 を活性化し、その下流で Ena/VASP を介したアクチン重合の促進、さらに E-Cadherin の分解が起こることで極性崩壊細胞が組織から排除される (図 2a)。Slit-Robo2 は高度に保存された反発性の軸索誘導因子の一つであり (Blockus and Chédotal, 2016)、交連神経の正中線の交叉を制御している (Kidd et al., 1999; Kuan et al., 1999; Nguyen Ba-Charvet et al., 2001; Rajagopalan et al., 2000; Simpson et al., 2000b, 2000a)。グリア細胞から Slit が分泌されると、その N 末端の luciferin-rich repeat (LRR) が交連神経に存在する Robo2 の immunoglobulin (Ig)-like motif に結合し、これによりグリア細胞に対する反発性の軸索誘導が起こる (Ypsilanti et al., 2010) (図 2b, c)。さらに最近、Slit-Robo2 と同様に反発性の軸索誘導因子のひとつであるリガンド-受容体分子 Semaphorin-PlexinA (Sema-PlexA) が、ショウジョウバエやゼブラフィッシュの上皮組織の修復において、dying cell の排除を正に制御していることが報告された (Yoo et al., 2016)。しかしながら、この Sema-PlexA システムがどのように駆動されるのか、なぜ dying cell が排除される必要があるのかはわかっていない。

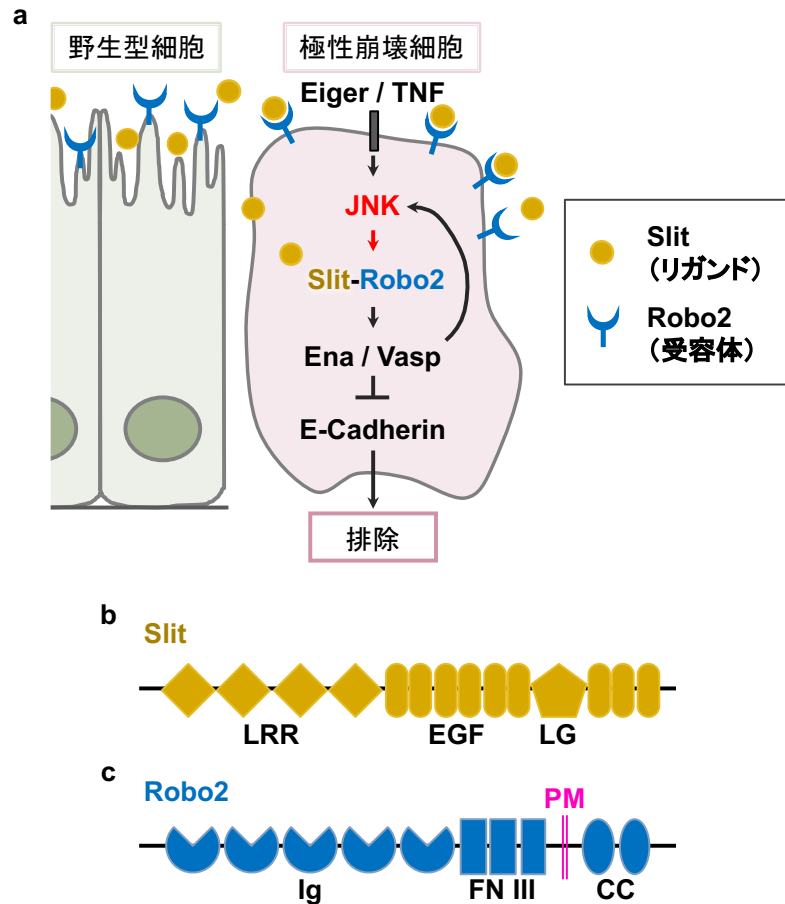


図 2. 細胞競合における Slit-Robo2 シグナル

(a) 野生型細胞と極性崩壊細胞が隣接すると、極性崩壊細胞で Slit-Robo2 シグナルが活性化し、極性崩壊細胞の排除を駆動する。(b, c) Slit と Robo2 の分子構造。

LRR: leucine-rich repeat, EGF: EGF repeat, LG: laminin G domain, Ig: Ig-like motif, FN III: fibronectin type III domain, CC: conserved cytoplasmic domain, PM: plasma membrane.

2.3 本研究での発見

本研究から、ショウジョウバエ上皮の組織修復に物理的な傷が生じると、JNK によって活性化された Slit-Robo2 シグナルが傷によって生じた dying cell を組織から積極的に排除することがわかった。さらに、Slit-Robo2 により dying cell が速やかに排除されることで、分泌性の細胞増殖因子である Wg や Dpp の過剰な供給が抑えられていることを見いだした。

3. 結果・考察

3.1 Slit-Robo2 シグナルは組織修復に必要である

上皮の組織修復における JNK の役割とその分子メカニズムの解明を目指し、まず組織修復の実験系を確立した（方法参照、図 16）。具体的には、ショウジョウバエ幼虫の上皮組織である翅成虫原基の *pouch* 領域（成虫の翅になる領域）を狙って、体外から針を用いて物理的な傷を導入した。幼虫は一对の翅成虫原基をもっているが、本研究では右側の翅成虫原基にのみ傷をつけ（図では "Wounded" とした）、もう一方をコントロールとした（図では "Intact" とした）。野生型系統では、幼虫期に組織に導入された傷は発生過程で修復され、成虫ではほぼ正常な翅を形成した（図 3a, a'）。ここで、組織修復の主要な制御因子である JNK シグナルを、JNK をコードする *basket (bsk)* 遺伝子の RNAi を Gal4/UAS システムを用いて *pouch* 領域特異的に誘導することで抑制した。その結果、組織修復プロセスに異常をきたし、傷をつけた右翅（図 3b'）は傷を入れていない左翅（図 3b）と比べて著しく小さくなった（図 3g）。すなわち、本実験系においても JNK が創傷治癒に必要であることがわかった。そこで次に、JNK の下流で働く分子を明らかにするため、上皮組織の細胞競合において JNK により活性化される Slit-Robo2 シグナルに注目した (Vaughen and Igaki, 2016)。*slit* や *robo2* の遺伝子量を半分にする、またはこれらの RNAi を *pouch* 領域特異的に誘導することで Slit-Robo2 を抑制すると、非常に興味深いことに、翅の発生には影響を与えないにも関わらず（図 3c-f）組織修復に異常をきたし翅の大きさが小さくなった（図 3c'-f', g）。この結果から、Slit-Robo2 シグナルが組織修復に必要であることが示唆された。なお、JNK シグナルを抑制した時の方が Slit-Robo2 破壊時の方が組織修復への影響が大きかった（翅の修復に異常をきたし、成虫の翅のサイズがより小さくなった）が（図 3g）、これは JNK が上述の通り組織修復のあらゆるステップを制御しているためであると考えられる。

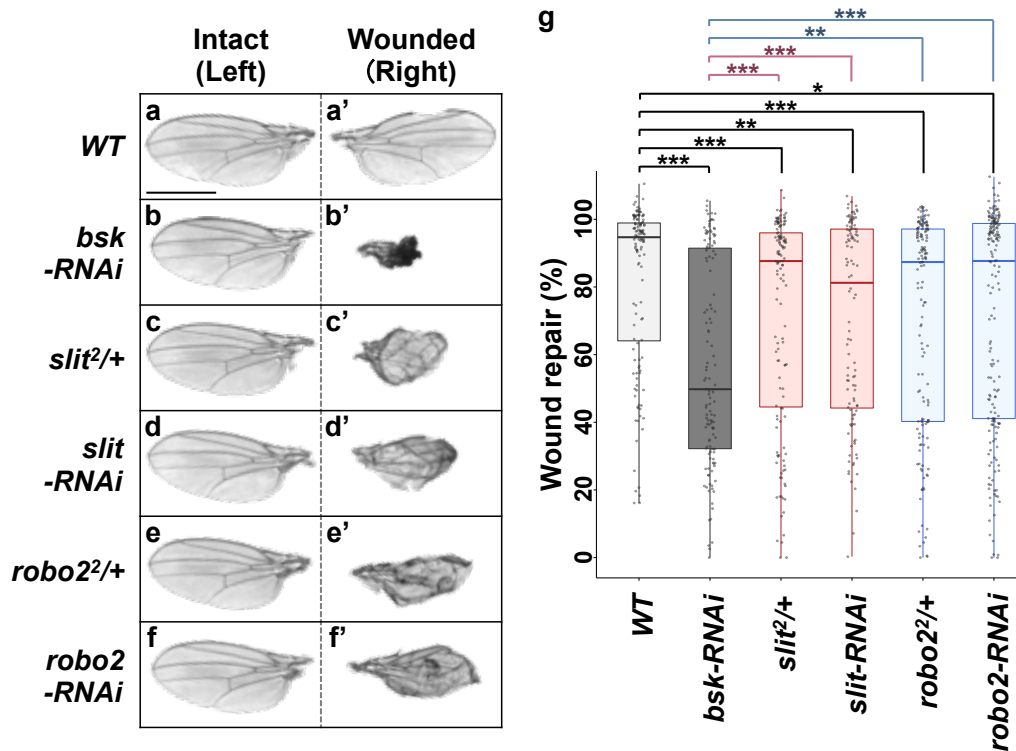


図 3. Slit-Robo2 は組織修復に必要である

(a-f') 傷をつけた翅 (Wounded, a-f) と傷をつけていない翅 (Intact, a'-f'). スケールバー: 500 μ m、全て同じ倍率で撮影。(g) 各系統の Wound repair (%) のボックスプロット (wild-type (n = 136), *bsk-RNAi* (n = 131), *slit^{2/+}* (n = 139), *slit-RNAi* (n = 113), *robo2^{2/+}* (n = 154), *robo2-RNAi* (n = 189)). Mann-Whitney U 検定; * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001。

そこで次に、JNK と Slit-Robo2 シグナルの上下関係を調べた。傷をつけてから 6 時間に幼虫から翅成虫原基を取り出し、JNK のターゲット遺伝子の一つである Metalloprotease (Uhlířova and Bohmann, 2006) の抗体 (anit-Mmp1) と、*slit* のレポーター遺伝子 *slit-lacZ* を用いて JNK 活性と *slit-lacZ* の発現に変化があるかどうかを検出した。まず、傷をつけていない組織では、JNK 活性はほとんど見られず、また *slit-lacZ* は内在性の発現パターンを示していた (図 4a-b^{'''})。しかし、傷をつけた翅成虫原基では傷の周辺で JNK が活性化しており、さらに異所的な *slit-lacZ* の発現が見られた (図 4b-b^{'''})。さらに、この JNK の活性化と *slit-lacZ* の発現が *bsk-RNAi* による JNK シグナルの抑制によって有意に減少した (図 4c-f)。

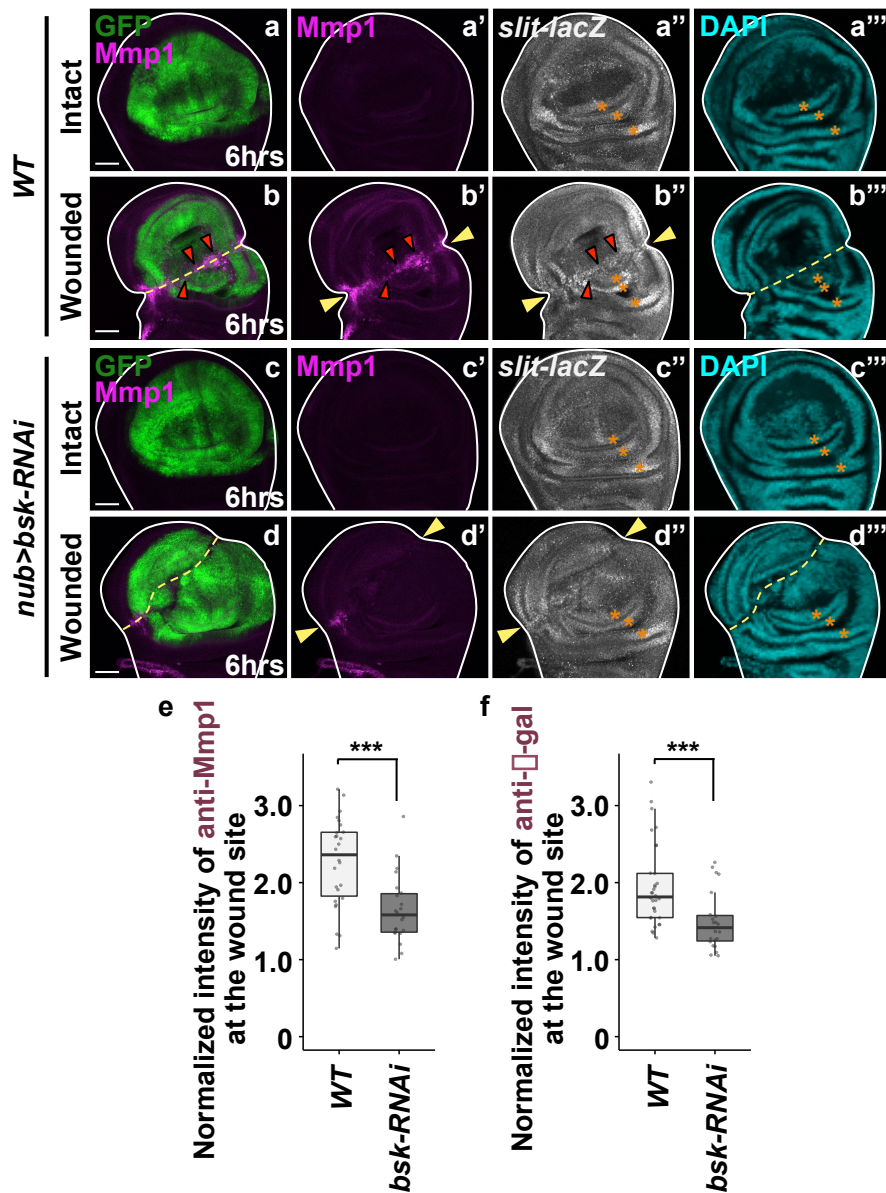


図4. JNK シグナルは *slit-lacZ* の発現を誘導する

(a-d''') 傷導入 6 時間後の野生型翅成虫原基 (a-b''') と JNK を抑制した翅成虫原基 (c-d''')。翅成虫原基の pouch 領域は *nub-gal4* ドライバーで GFP を発現させてラベルした (緑)。JNK 活性、*slit-lacZ* の発現、細胞核はそれぞれ anti-Mmp1 抗体 (マゼンタ)、anti-β-gal 抗体 (グレー)、DAPI (シアン) で検出した。黄色の破線と矢尻は傷の位置を示す。赤色の矢尻は異所的な *slit-lacZ* の発現を示す。アスタリスクは内在性の *slit-lacZ* の局在を示す。スケールバー：50μm。(e, f) 傷導入 6 時間後の野生型翅成虫原基と JNK を抑制した翅成虫原基における、傷周辺の anti-Mmp1 抗体 (e) (wild-type (n = 32), *bsk-RNAi* (n = 23)) と anti-β-gal 抗体 (f) (wild-type (n = 28), *bsk-RNAi* (n = 22)) の輝度のボックスプロット。Mann-Whitney U 検定; * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001。

また、JNK と Slit-Robo2 の両方を抑制しても、JNK のみを抑制した場合と組織修復後の成虫の翅の大きさが変わらなかった (図 5)。以上の結果から、組織修復のプロセスにおいて、傷によって誘導された JNK シグナルが Slit-Robo2 システムを活性化することが示唆された。

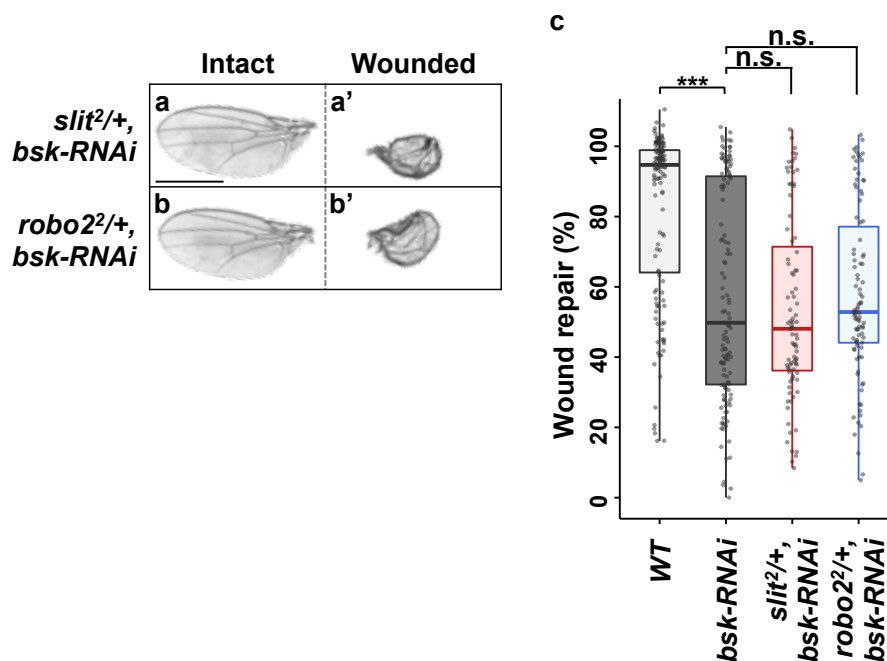


図 5. Slit-Robo2 は JNK シグナルの下流である

(a-b') 傷をつけた翅 (Wounded, a-b) と傷をつけていない翅 (Intact, a'-b'). スケールバー: 500 μ m、全て同じ倍率で撮影。(c) 各系統の Wound repair (%) のボックスプロット (wild-type (n = 136), *bsk-RNAi* (n = 131), *slit^{2/+}; bsk-RNAi* (n = 87), *robo2^{2/+}; bsk-RNAi* (n = 94)). Mann-Whitney U 検定, *** p < 0.001。

3.2 傷により JNK 依存的なアポトーシスが起こる

次に、組織修復における Slit-Robo2 システムの役割の解明を目指した。細胞競合ではこのシステムが上皮組織から極性崩壊細胞を積極的に排除する役割をもつことから (Vaughen and Igaki, 2016)、組織修復ではダメージによって生じた dying cell の排除を制御している可能性があると考えた。そこでまず、本実験系において組織で起こる細胞死について解析した。傷をつけてから 6 時間後に翅成虫原基を解剖し、アポトーシスにより死につつある dying cell (活性型エフェ

クターカスパーゼの抗体 cleaved-Dcp1 [c-Dcp1] で検出) を観察した。その結果、傷をつけた翅成虫原基には傷をつけていない翅成虫原基の約 10 倍の数の dying cell が存在し (図 6a-b', i)、その数は JNK を抑制することで有意に減少することがわかった (図 6c-d', i)。一方、Propidium Iodide (PI) を用いてネクローシス細胞を検出したところ、傷をつけた翅成虫原基にはネクローシス細胞が存在していたものの (図 6e-f', j)、JNK を抑制してもその数に変化は見られなかった (図 6g-h', j)。すなわち、組織への物理的なダメージにより、JNK 依存的なアポトーシス (Diaz-Garcia et al., 2016; Ryoo and Bergmann, 2012; Shlevkov and Morata, 2012) と JNK 非依存的なネクローシスの両方が誘導されていることが示唆された。

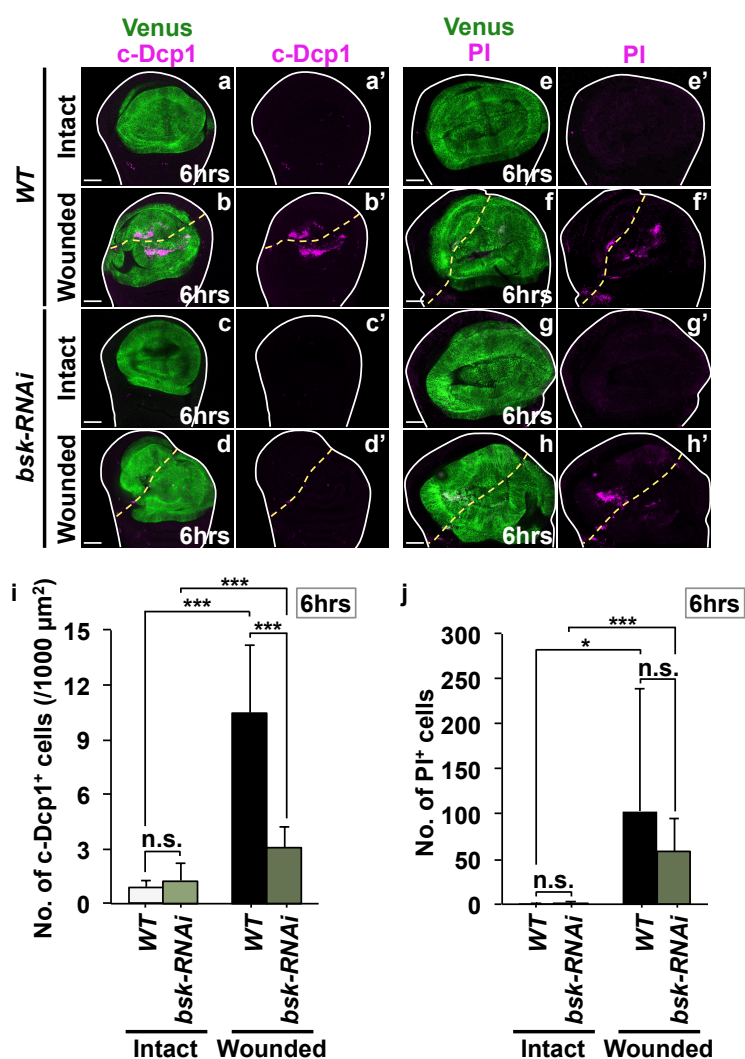


図 6. JNK シグナルはアポトーシスを誘導するがネクローシスは誘導しない

(a-h') 傷導入6時間後の翅成虫原基におけるアポトーシス細胞は、anti-c-Dcp1 抗体(マゼンタ)で検出し (a-d')、ネクローシス細胞はPI染色(マゼンタ)で検出した (e-h')。翅成虫原基の pouch 領域は *nub-gal4* ドライバーで Venus を発現させてラベルした(緑)。黄色の破線は傷の位置を示す。スケールバー : 50 μ m。 (i, j) 傷導入6時間後の野生型翅成虫原基と JNK を抑制した翅成虫原基における、pouch 領域の c-Dcp1 陽性細胞 (i) (wild-type (intact: n = 12, wounded: n = 11), *bsk-RNAi* (intact: n = 20, wounded: n = 13)) と PI 陽性細胞 (j) (wild-type (intact: n = 9, wounded: n = 8), *bsk-RNAi* (intact: n = 10, wounded: n = 10)) の数。 Welch T 検定; * p < 0.05, *** p < 0.001。

3. 3 Slit-Robo2 は dying cell を組織から積極的に押し出す

次に dying cell の空間的局在を調べることで、傷によって生じた dying cell が組織から排除される経過を詳細に解析した。具体的には、傷をつけた翅成虫原基の断面を観察して、dying cell の局在を”Apically extruding”、”In disc”、”Basally extruding”の3つに分類した (図 7a、方法を参照)。傷をつけてから3時間後、6時間後、9時間後に翅成虫原基を解剖して解析した結果、野生型組織では時間の経過とともに組織中に残る dying cell (”In disc”に分類される) の割合が低くなり、基底側へ排除されつつある dying cell (”Basally extruding”に分類される) の割合が高くなることがわかった (図 7b-d; k [3hrs], l [6hrs], m [9hrs] の wild type を比較)。つまり、傷によって生じた dying cell が時間の経過とともに組織の内部から基底側へと押し出されていると考えられた。

そこで、Slit-Robo2 シグナルを抑制した時の dying cell の局在を解析し、Slit-Robo2 シグナルがこの dying cell の押し出しに関与しているかどうかを調べた。*slit²* や *robo2²* の変異体の翅成虫原基を観察したところ、興味深いことに、傷をつけてから6時間後と9時間後の変異体の翅成虫原基では基底側に排除されつつある dying cell (”Basally extruding”に分類される) の割合が野生型の翅成虫原基と比べて減少した (図 7f, g, i, j, l, m)。この結果から、Slit-Robo2 シグナルを抑制すると dying cell の排除が遅滞することが示唆された。なお、傷をつけてから3時間後には野生型と変異体で dying cell の局在に差は見られなかったが、これは野生型でも dying cell の排除があまり進行していなかったためであると考

えられた (図 7e, h, k)。

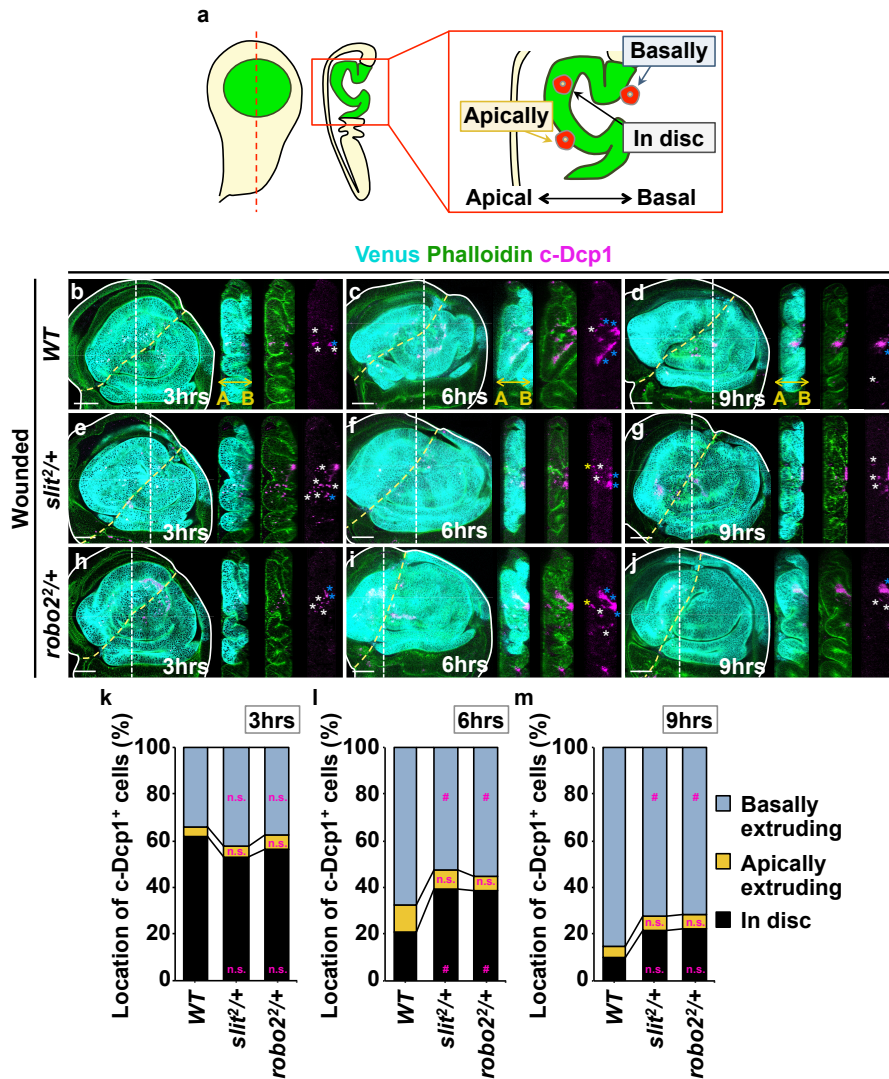


図 7. Slit-Robo2 抑制は dying cell の排除を遅滞させる

(a) 翅成虫原基における dying cell の空間的局在のモデル図。翅成虫原基の pouch 領域は一層の上皮細胞で構成されている。(b-j) 傷導入3時間後 (b, e, h)、6時間後 (c, f, i)、9時間後 (d, g, j) の翅成虫原基の xy と yz 断面。翅成虫原基の pouch 領域は *mub-gal4* ドライバーで Venus を発現させてラベルした (シアン)。dying cell、F-actin はそれぞれ anti-c-Dcp1 抗体 (マゼンタ)、Pahlloidin (緑) で検出した。黄色の破線は傷の位置を示す。白色の破線は yz 断面の位置を示す。yz 断面中のアスタリスクは、”Basally extrusion” (青)、“Apically extrusion” (黄)、“In disc” (白) に分類された dying cell を示す。スケールバー：50 μ m。(k-m) 傷導入3時間後 (k) (wild-type (n = 17), *slit²/+* (n = 12), *robo2²/+* (n = 13)), 6時間後 (l) (wild-type (n = 12), *slit²/+* (n = 12), *robo2²/+* (n = 14)), 9時間後 (m) (wild-type (n = 12), *slit²/+* (n = 14), *robo2²/+* (n = 8)) の翅成虫原基における dying cell の局在。 χ^2 検定調整済み残差; # > 2.56。

また次に、*slit* や *robo2* の変異により細胞死の数に影響を与えるかどうかを調べた。傷をつけてから 6 時間後に、野生型と *slit*² または *robo2*² の変異体を解剖し、傷をつけていない翅成虫原基と傷をつけた翅成虫原基の pouch 領域に存在する dying cell の数を測定した。傷をつけた変異体の翅成虫原基には、野生型の翅成虫原基と比べてより多くの dying cell が存在していたことから (図 8, Wounded)、dying cell の押し出しが遅滞したことにより翅成虫原基に dying cell が溜まっている可能性が考えられた。なお、傷をつけていない翅成虫原基に存在する dying cell の数は野生型と変異体で変わらなかったことから、*slit* や *robo2* の変異は発生過程に生じる内在性の細胞死の数には影響を与えないことがわかった (図 8, Intact)。

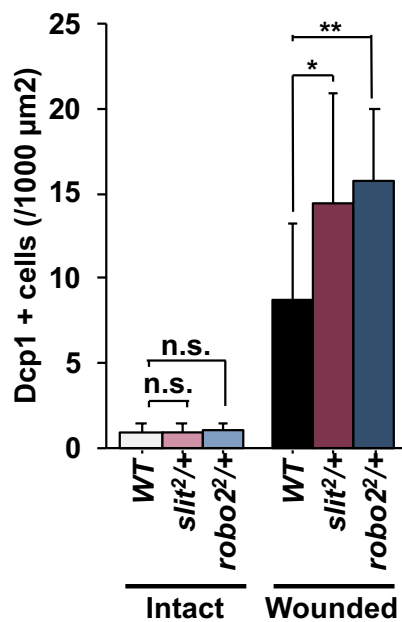


図 8. Slit-Robo2 抑制により pouch 領域の dying cell が増加した

傷導入 6 時間後の翅成虫原基の pouch 領域に存在する dying cell の数 (wild-type (intact: n = 12, wounded: n = 11), *slit*²/+ (intact: n = 27, wounded: n = 16), *robo2*²/+ (intact: n = 21, wounded: n = 16))。Welch's T 検定; * p < 0.05, ** p < 0.01。

ここでさらに、Slit-Robo2 シグナルの強制的に活性化させることで dying cell の排除を亢進しうるかどうかを調べた。pouch 領域特異的に Slit や Robo2 を強制発現させたところ、傷をつけてから 3 時間後と 6 時間後の翅成虫原基において

基底側に排除されつつある dying cell (“Basally extruding”に分類される) の割合が野生型組織と比べて高くなった (図 9a, b, d, e, g, h)。つまり、Slit-Robo2 シグナルの活性化は dying cell の排除を亢進することが示唆された。なお、傷を入れてから9時間後では野生型の翅成虫原基と Slit-Robo2 シグナルを活性化した翅成虫原基でこのような差は見られなかったが、これは野生型の翅成虫原基でも dying cell の排除が十分に進行していたためであると考えられた (図 9c, f, i)。以上の結果から、組織修復において Slit-Robo2 シグナルは dying cell の排除を正に制御していることが示唆された。

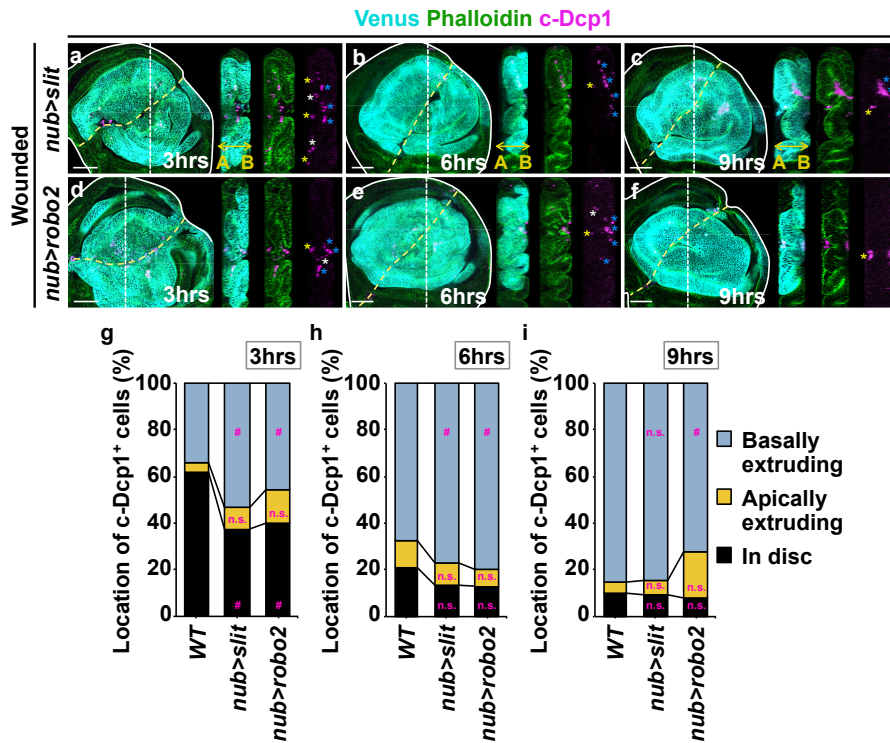


図 9. Slit-Robo2 の活性化は dying cell の排除を亢進させる

(a-f) 傷導入3時間後 (a, d)、6時間後 (b, e)、9時間後 (c, f) の翅成虫原基の *xy* と *yz* 断面。翅成虫原基の pouch 領域は *nub-gal4* ドライバーで Venus を発現させてラベルした (シアン)。dying cell、F-actin はそれぞれ anti-c-Dcp1 抗体 (マゼンタ)、Pahlloidin (緑) で検出した。黄色の破線は傷の位置を示す。白色の破線は *yz* 断面の位置を示す。*yz* 断面中のアスタリスクは、“Basally extrusion” (青)、“Apically extrusion” (黄)、“In disc” (白) に分類された dying cell を示す。スケールバー: 50 μ m。(g-i) 傷導入3時間後 (g) (wild-type (n = 17), *nub>slit* (n = 13), *nub>robo2* (n = 13)), 6時間後 (h) (wild-type (n = 12), *nub>slit* (n = 13), *nub>robo2* (n = 13)), 9時間後 (i) (wild-type (n = 12), *nub>slit* (n = 10), *nub>robo2* (n = 12)) の翅成虫原基における dying cell の局在。 χ^2 検定調整済み残差; # > 2.56。

さらに、Slit-Robo2 シグナルの活性化による dying cell の排除の亢進が組織修復に影響を与えるかどうかを調べた。pouch 領域で Slit や Robo2 を過剰発現させた幼虫に傷をつけ、修復後の成虫の翅の大きさを野生型と比較した結果、Slit-Robo2 シグナルの活性化は成虫の翅の大きさには影響しない（成虫の翅のサイズは野生型と変わらない）ことがわかった（図 10）。

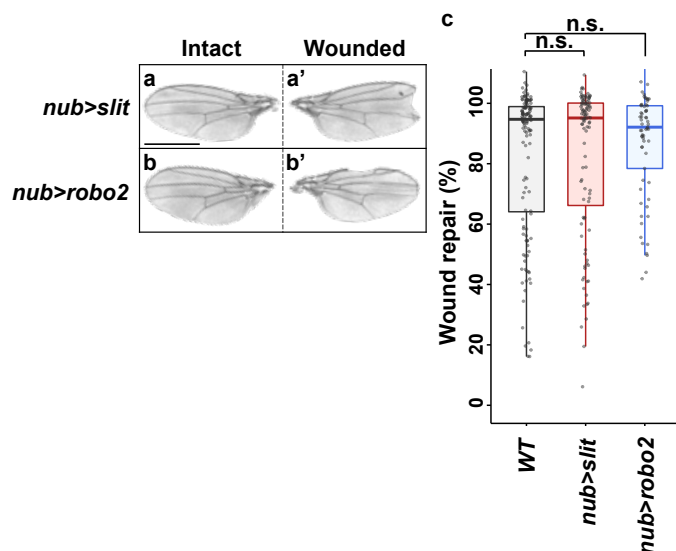


図 10. Slit-Robo2 の活性化は組織修復に影響しない

(a-b') 傷をつけた翅 (a-b) と傷をつけていない翅 (a'-b')。スケールバー：500 μ m、全て同じ倍率で撮影。(c) 各系統の Wound repair (%) のボックスプロット (wild-type (n = 136), *nub>slit* (n = 105), *nub>robo2* (n = 71))。Mann-Whitney U 検定。

3. 4 dying cell の排除不全は過剰な細胞増殖因子の発現を誘導する

dying cell が上皮層から積極的に排除されることがわかったが、組織修復における生理的意義についてはわかっていない。放射線照射により組織に細胞死を誘導した場合には、dying cell から JNK 依存的に細胞増殖因子 Wg や Dpp の発現が誘導され、これらが組織の再生を進行させる（代償性増殖）(Perez-Garijo et al., 2004, 2009; Ryoo et al., 2004; Smith-Bolton et al., 2009; Wells et al., 2006) ことから、dying cell の排除不全を起こした組織では過剰な Wg や Dpp の発現が起こっているのではないかと考えた。そこでまず、物理的に傷をつけてから 24 時間後の翅成虫原基について、Wg と Dpp をそれぞれ ant-Wg 抗体と *dpp* のレポーター遺伝

子 *dpp-lacZ* を用いて検出した。傷をつけた野生型組織では、これまでの報告通り dying cell において Wg や Dpp の発現が上昇していた (図 11c-d'', m, n)。しかし興味深いことに、Slit-Robo2 を抑制した場合には、この dying cell における Wg や Dpp の発現が野生型組織よりも過剰になっていることがわかった (図 11g-h'', k-l'', m, n)。なお、傷をつけていない組織では、Slit-Robo2 の抑制による Wg や Dpp の発現への影響は見られなかった (図 11a-b'', e-f'', i-j'', m, n)。

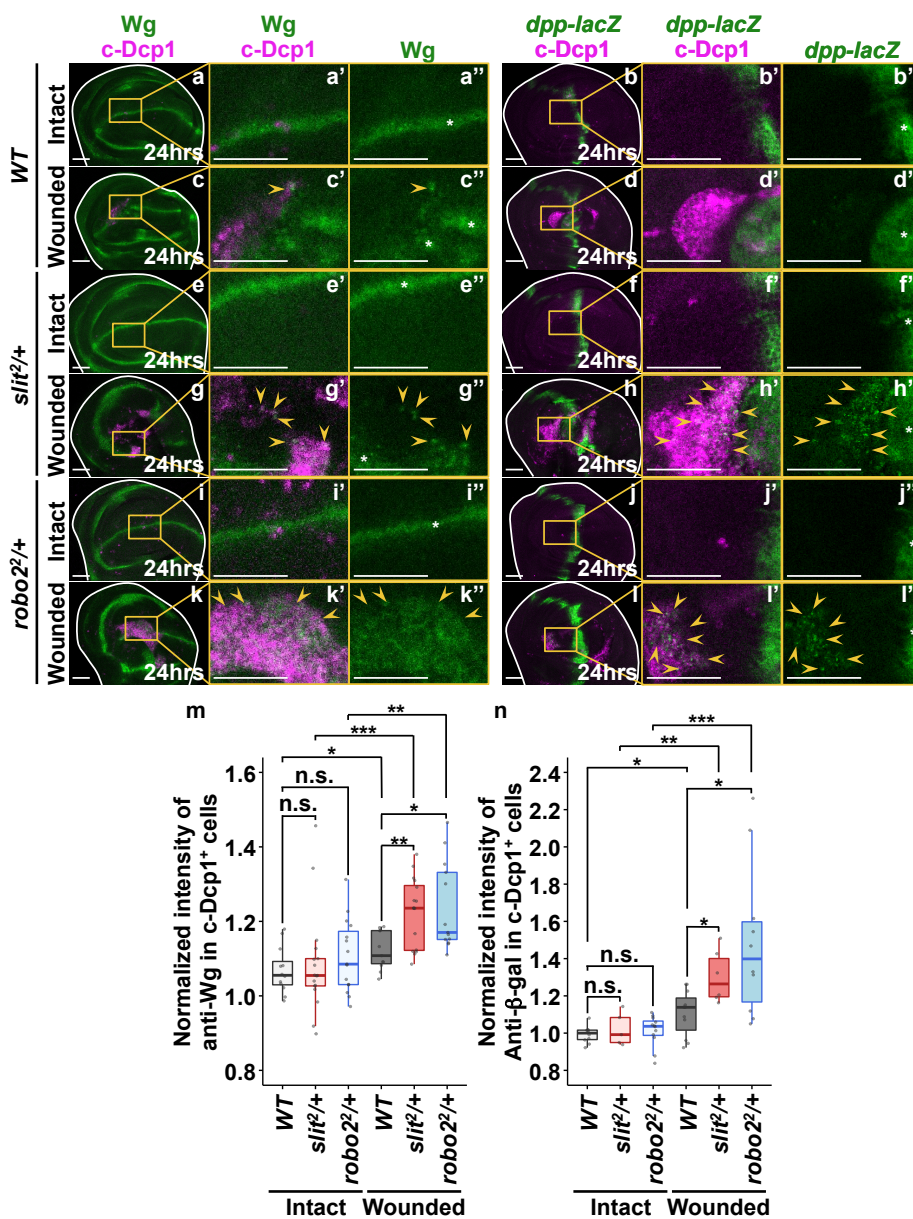


図 11. Slit-Robo2 抑制により dying cell で Wg と Dpp の発現が亢進する (a-l'') 傷導入 24 時間後の野生型 (a-d''), *slit2/+* (e-h''), *robo22/+* (i-l'') の翅成虫原基。

dying cell、Wg、*dpp-lacZ* 発現はそれぞれ anti-c-Dcp1 抗体 (マゼンタ)、anti-Wg 抗体 (緑)、anti- β -gal 抗体 (緑) で検出した。黄色の矢尻は異所的な anit-Wg または *dpp-lacZ* の発現を示す。アスタリスクは内在性の Wg または *dpp-lacZ* の発現を示す。スケールバー : 50 μ m。 (m, n) 傷導入 24 時間後の野生型、*slit*^{2/+}、*robo2*^{2/+} の翅成虫原基における、dying cell の anti-Wg 抗体 (m) (wild-type (intact: n = 12, wounded: n = 11), *slit*^{2/+} (intact: n = 16, wounded: n = 17), *robo2*^{2/+} (intact: n = 15, wounded: n = 13)) と anti-c-Dcp1 抗体 (n) (wild-type (intact: n = 9, wounded: n = 11), *slit*^{2/+} (intact: n = 5, wounded: n = 6), *robo2*^{2/+} (intact: n = 12, wounded: n = 10)) の輝度のボックスプロット。Mann-Whitney U 検定; * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001。

ここで、dying cell で見られた異所的な Wg や Dpp の発現に JNK が関与しているかどうかを検討するため、Wg や Dpp の発現と JNK 活性を同時に観察した。JNK 活性の検出には、JNK シグナルの下流の転写共役因子 cJun/dFos の結合配列である TRE (tetradecanoylphorbol acetate response element) の下流に DsRed を繋いだ TRE-DsRed レポーター (Chatterjee and Bohmann, 2012) を用いた。傷をつけた組織では異所的に Wg や Dpp を発現した細胞が JNK の活性化領域で見られ (図 12c (30.8%, n = 13), d (22.2%, n = 9))、異常な細胞が組織に出現する頻度は Slit-Robo2 を抑制することで上昇した (図 12g (63.6%, n = 11), h (100%, n = 5), k (85.7%, n = 14), l (87.5%, n = 14))。なお、傷をつけていない組織では、どの系統でも JNK 活性はほとんど見られなかった (図 12a-b'', e-f'', i-j'')。これらの結果から、組織修復のプロセスで dying cell の排除不全が起こった場合には、過剰に Wg や Dpp を発現する細胞が JNK 依存的に生じることが示唆された。なお、JNK を抑制した場合にはアポトーシスそのものが抑制されることから (図 6a-d', i)、dying cell の排除不全による細胞増殖因子の過剰発現が JNK 依存的であることを直接的に示すこと (JNK 抑制時に過剰な Wg や Dpp の発現が減少するかどうかの確認) はできなかった。

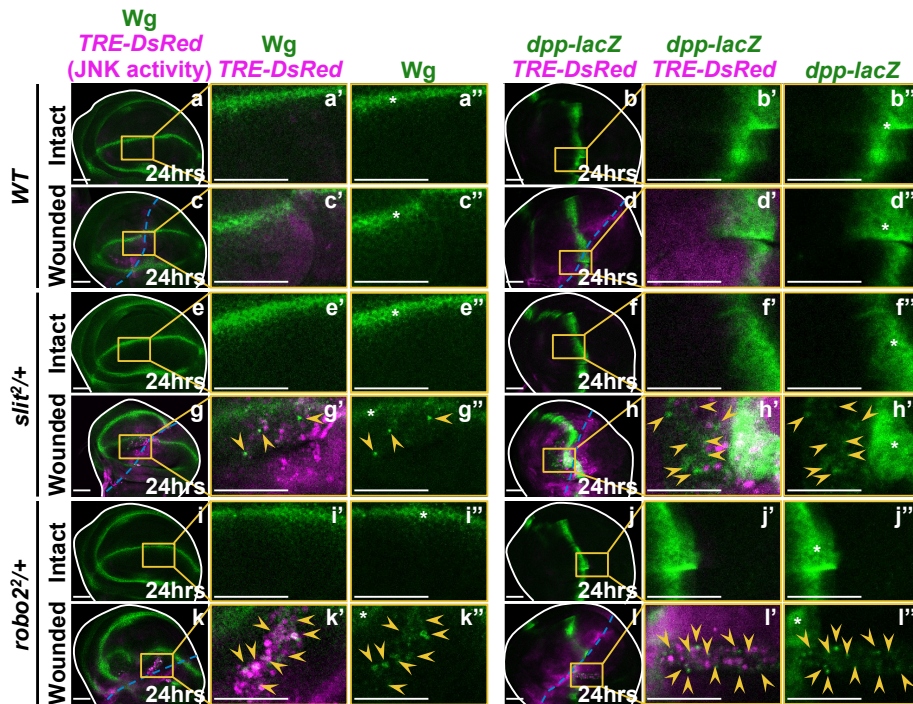


図 12. Slit-Robo2 抑制により JNK 活性領域で Wg と Dpp の発現が亢進する

(a-l'') 傷導入 24 時間後の野生型 (a-d''), *slit*^{2/+} (e-h''), *robo2*^{2/+} (i-l'') の翅成虫原基。JNK 活性、Wg、*dpp-lacZ* 発現はそれぞれ TRE-DsRed (マゼンタ)、anti-Wg 抗体 (緑)、anti-β-gal 抗体 (緑) で検出した。黄色の矢尻は異所的な anti-Wg または *dpp-lacZ* の発現を示す。アスタリスクは内在性の anti-Wg または *dpp-lacZ* の発現を示す。スケールバー : 50μm。

3.5 異所的で過剰な Wg や Dpp の発現は組織修復を破綻させる

ここで、Slit-Robo2 抑制時に見られた異所的に Wg や Dpp を過剰に発現した細胞こそが組織修復破綻の原因であるかどうかを調べた。具体的には、*wg* や *dpp* のヘテロ変異体 (*wg^l*, *wg^{Sp-l}*, *dpp^{d6}*, *dpp^{s11}*, *dpp^{hr92}*) (St. Johnston et al., 1990; Lindsley and Zimm, 1992; Neumann and Cohen, 1996; Sharma, 1973; Wharton et al., 1996) を用いて *wg* や *dpp* の遺伝量を半分にした時の組織修復後の成虫の翅の大きさを測定した。興味深いことに、これらの変異体は組織修復に影響を与えなかった (野生型と比べて組織修復後の翅のサイズは小さくならなかった) にも関わらず (図 13a-e', p)、Slit-Robo2 抑制の時に見られた組織修復の異常を軽減することができた (*slit²* や *robo2²* の変異のみを導入した個体よりも、これらの変異体にさらに *wg* や *dpp* の変異を導入した個体の方が組織修復後の翅のサイズが大きくなった) (図 13f-p)。

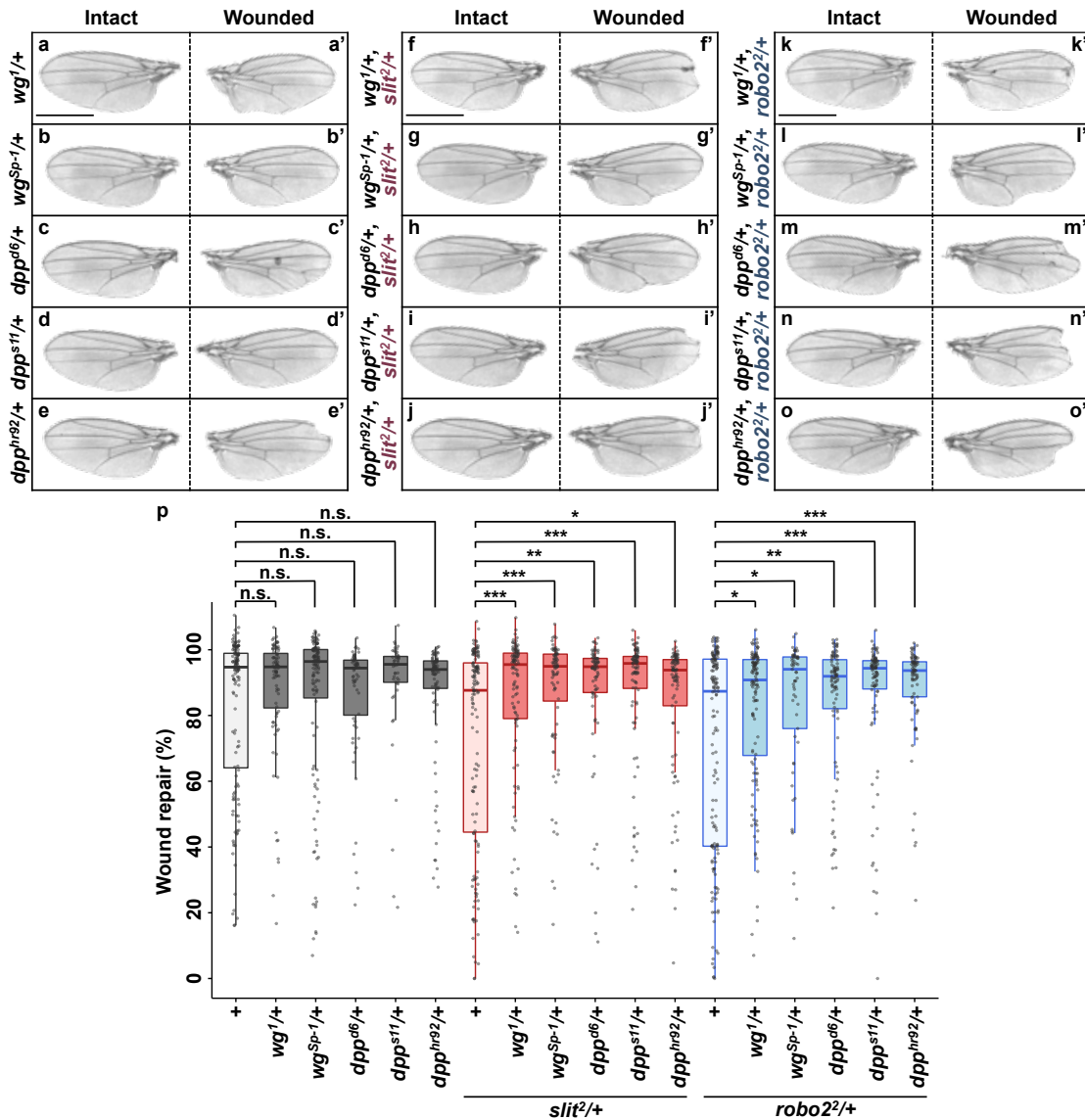


図 13. *wg*^{+/+}や *dpp*^{+/+}は Slit-Robo2 抑制による組織修復の異常をレスキューした

(a-o') 傷をつけた翅 (Intact, a-o) と傷をつけていない翅 (Wounded, a'-o'). スケールバー : 500 μ m、全て同じ倍率で撮影。(p) 各系統の Wound repair (%) のボックスプロット(wild-type (n = 138), *wg*^{1/+} (n = 89), *wg*^{Sp-1/+} (n = 128), *dpp*^{d6/+} (n = 64), *dpp*^{s11/+} (n = 48), *dpp*^{hr92/+} (n = 84), *slit2*^{+/+} (n = 139), *wg*^{1/+}, *slit2*^{+/+} (n = 105), *wg*^{Sp-1/+}, *slit2*^{+/+} (n = 81), *dpp*^{d6/+}, *slit2*^{+/+} (n = 77), *dpp*^{s11/+}, *slit2*^{+/+} (n = 92), *dpp*^{hr92/+}, *slit2*^{+/+} (n = 93), *robo2*^{2/+} (n = 154), *wg*^{1/+}, *robo2*^{2/+} (n = 128), *wg*^{Sp-1/+}, *robo2*^{2/+} (n = 61), *dpp*^{d6/+}, *robo2*^{2/+} (n = 95), *dpp*^{s11/+}, *robo2*^{2/+} (n = 98), *dpp*^{hr92/+}, *robo2*^{2/+} (n = 83)). Mann-Whitney U 検定; * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001.

さらに、傷をつけてから 24 時間後の翅成虫原基において Slit-Robo2 抑制時に過剰に発現していた Wg (図 10a-k'', m) が *wg* の変異によって減少するのかどうかを調べた。その結果、*wg^l* 変異を組織全体に導入することで Slit-Robo2 抑制時にみられた dying cell における過剰な Wg の発現が抑制される (*wg^l* と *slit²* や *robo2²* の二重変異体の Wg の発現量は、*wg^l* 変異体の Wg の発現量と同程度だった) ことがわかった (図 14)。すなわち、dying cell の排除不全により誘導された異所的で過剰な Wg の発現が組織修復を破綻させることが示唆された。

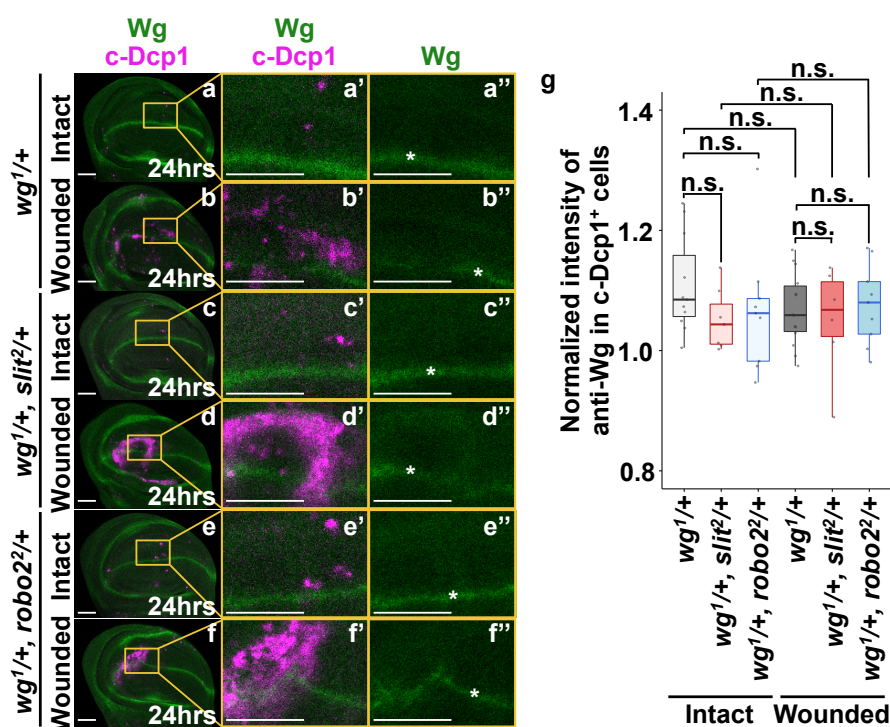


図 14. *wg^{l/+}*により異所的な Wg 発現が減少した

(a-f'') 傷導入 24 時間後の野生型 (a-b''), *slit^{2/+}* (c-d''), *robo2^{2/+}* (e-f'') の翅成虫原基。dying cell、Wg はそれぞれ anti-c-Dcp1 抗体 (マゼンタ)、anti-Wg 抗体 (緑) で検出した。黄色の矢尻は異所的な anti-Wg の発現を示す。アスタリスクは内在性の anti-Wg の発現を示す。スケールバー: 50 μ m。 (g) 傷導入 24 時間後の野生型、*slit^{2/+}*、*robo2^{2/+}* の翅成虫原基における、dying cell の anti-Wg 抗体 (*wg^{l/+}* (intact: n = 11, wounded: n = 14), *wg^{l/+}, slit^{2/+}* (intact: n = 7, wounded: n = 6), and *wg^{l/+}, robo2^{2/+}* (intact: n = 9, wounded: n = 9)) の輝度のボックスプロット。Mann-Whitney U 検定; * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001。

3.6 まとめと考察

本研究により、ショウジョウバエ上皮の組織修復プロセスにおいて、JNK によりリガンド-受容体分子 Slit-Robo2 シグナルが活性化されることがわかった。また、Slit-Robo2 シグナルは dying cell を組織から速やかに押し出すことで dying cell から分泌される細胞増殖因子 Wg や Dpp の量が過剰にならないように調節し、これにより組織修復プロセスを促進していることが示唆された (図 15)。すなわち、これまで明らかになっていなかった組織修復プロセスにおける dying cell の排除の意義が、細胞増殖因子の発現量の調整であることが見いだされた。

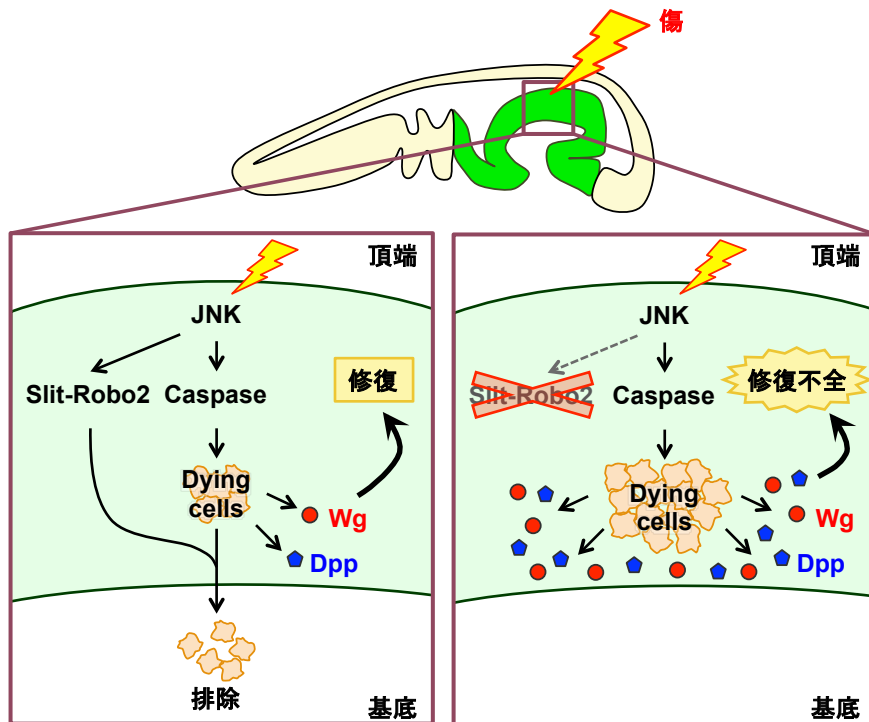


図 15. Slit-Robo2 は dying cell を積極的に排除することで Wg と Dpp の量を制御する Slit-Robo2 シグナルによる組織修復の制御メカニズムのモデル図。

しかし依然として、組織修復プロセスで細胞増殖因子を過剰に発現した細胞がどのように修復を破綻させるのかについてはわかっておらず、次の 3 つの可能性を検討している。

(1) 過剰な細胞増殖 : Wg や Dpp が分泌性の細胞増殖因子であることから、異所的に発現した Wg や Dpp は *dying cell* 周辺または組織全体の細胞増殖を亢進しうる (Perez-Garijo et al., 2004, 2009; Ryoo et al., 2004; Smith-Bolton et al., 2009; Wells et al., 2006)。これにより局所的な組織の形態異常が引き起こされ、翅の発生が阻害された可能性がある。

(2) パターニングの異常 : 翅成虫原基では、いくつもの遺伝子 (*wg*, *dpp*, *Dfrizzled 2*, *thickveins*, *brinker* など) が互いに制御し合うことで組織のパターニングが維持されている (Cadigan, 2002; Hamaratoglu et al., 2014; Ruiz-Losada et al., 2018)。その中でも特に Wg や Dpp は翅成虫原基の発生に重要なモルフォゲンであることから、Wg や Dpp の異所的な過剰発現が組織のパターニングを攪乱し、これにより翅の発生に異常をきたした可能性が考えられる。

(3) 傷の閉鎖不全 : 上皮組織に傷がつくと、その修復の過程でアクチン細胞骨格が再構成されることで傷の端同士が融合し、開裂部が閉鎖される (Bosch et al., 2005; Galko and Krasnow, 2004)。dying cell から分泌された過剰な Wg や Dpp によって異所的な細胞増殖の誘導 (Perez-Garijo et al., 2004, 2009; Ryoo et al., 2004; Smith-Bolton et al., 2009; Wells et al., 2006) やその下流の遺伝子発現の異常 (Cadigan, 2002; Hamaratoglu et al., 2014; Ruiz-Losada et al., 2018) が引き起こされ、開裂部の閉鎖が阻害された可能性がある。

組織修復の制御マシナリーとして本研究で見いだした Slit-Robo2 や Yoo 氏が報告した Sema-PlexA (Yoo et al., 2016) は、軸索誘導の反発性制御因子としてよく知られており (Comer et al., 2019; Dickson and Zou, 2010)、マウスの発生では Slit1, Slit2, Slit3 (全てショウジョウバエの Slit ホモログ) と PlexinA1 (ショウジョウバエの PlexA ホモログ) が結合することで交連神経の正中線の交叉を制御する (Delloye-Bourgeois et al., 2015)。これらのことから、組織修復プロセスにおいて、複数の軸索誘導制御因子が協調することで傷によって生じた dying cell の

排除を制御している可能性が考えられる。さらに、軸索誘導における Slit-Robo2 や Sema-PlexA の機能が高度に保存されていることから、組織修復における dying cell の排除メカニズムとその生理的意義が哺乳類でも保存されている可能性がある。今後、組織の損傷によって生じた dying cell の排除メカニズムがさらに研究されていくことで、組織修復や慢性炎症の治癒を促進する新規の治療法が開発されることが期待される。

4. 方法

4.1 ショウジョウバエの飼育

ショウジョウバエは餌を入れたプラスチックバイアルで 25°C で飼育した。ハエの餌としてコーンミール、グルコース、乾燥酵母、そして小麦胚芽をアガロースで固めたものを使用した。

4.2 *in situ* wounding

ショウジョウバエの 3rd-instar larva の翅成虫原基の pouch 領域に傷を導入した。具体的には、pouch 領域を Gal4/UAS システムを用いて蛍光タンパク質 (GFP または Venus) でラベルし、顕微鏡下で表皮の上から pouch 領域を狙って針先を研磨した直径 0.3 mm のタングステン針で押し切った (図 16)。このとき、右側の翅成虫原基のみに傷を入れ、左側の翅成虫原基を内在性のコントロールとした。傷を導入した幼虫は、エサの入ったバイアルに移し 25°C で飼育した。傷を入れるタイミングは、基本的には wandering-3rd-instar larval stage で行ったが、傷を入れてから 24 時間後の組織を観察する場合のみ例外的により早い発生タイミングである late-3rd-instar larval stage で行った (wandering-3rd-instar larval stage で傷を入れると、24 時間後には蛹期に移行してしまい翅成虫原基を観察することができないため)。

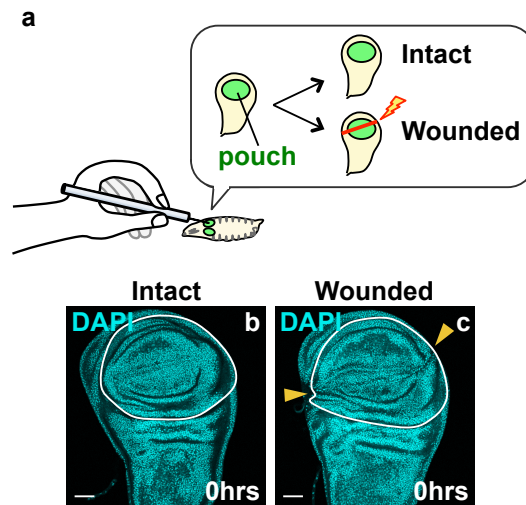


図 16. *in situ* wounding

(a) タングステン針を使って、幼虫の翅成虫原基の pouch 領域に傷を導入した。(b, c) 傷導入直後の野生型の翅成虫原基。白色の線は pouch 領域を示す。核を DAPI で染色した (シアン)。黄色の矢尻は傷を示す。スケールバー : 50 μ m。

4.3 翅成虫原基の観察

4.3.1 免疫抗体染色

wandering-3rd-instar larva を、Phosphate Buffered Saline (PBS) で満たしたシャーレの中で解剖し翅成虫原基を取り出した。この翅成虫原基を 4% Paraformaldehyde (PFA)で固定し (氷上で 5 分間、その後室温で 20 分間静置)、PBT (PBS + 0.1% TritonX100) で 20 分間 3 回洗浄した。PBTn (PBT + 5% Donkey serum)で 30 分間ブロッキングをした後に一次抗体を入れ、4 $^{\circ}$ Cで一晩以上反応させた。その後、PBT で 30 分間 4 回洗浄した。PBTn で 30 分間ブロッキングをした後に二次抗体を入れ、2 時間反応させた。再び PBT で 30 分間 4 回洗浄をした後に SlowFade[®] with DAPI で封入した。

以下の抗体・封入剤を使用した。

一次抗体

- mouse anti-Mmp1 (3A6B4, 3B8D12 and 5H7B11 を混合したものを使用, 1:100, Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB])

- rabbit anti-cleaved-Dcp1 (1:100, Cell Signaling Technology)
- chicken anti- β -galactosidase (1:2500, abcam)
- mouse anti-Wg (1:500, DSHB)

二次抗体

- mouse Alexa 546, 647 (1:250, Molecular Probes)
- rabbit Alexa 546, 647 (1:250, Molecular Probes)
- chicken Alexa 647 (1:250, Molecular Probes)

その他

- Alexa 546, 647-Phalloidin (1:30, Molecular Probes)
- SlowFade[®] with DAPI (封入剤として使用, Molecular Probes)

4.3.2 ネクロシス細胞の検出

ネクロシス細胞は、Propidium Iodide (PI; 1:1000, Wako Pure Chemical Industries)で検出した。翅成虫原基は、5% fetal bovine serum (FBS)を加えた Schnieder's *Drosophila* medium の中で解剖し (15分以内に作業を終えるようにした)、直ちに PI を加えた培養液の中に入れた。PI 染色は PBS で 3 回洗浄した。染色後の組織は 70%グリセロール溶液の中で保存した。

4.3.3 撮影

翅成虫原基は全て共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP8 with Leica Application Suite X ver. 2.0.1.14392 [Leica Microsystems]) を用いて撮影した。

4.4 組織の解析

4.4.1 成虫の翅

成虫の翅をスライドガラスに並べ、実体顕微鏡で撮影した (LEICA FIRECAM ver. 3.4 [Leica Microsystems])。写真は常に同じ倍率で撮影し、翅の大きさは Fiji で自動で測定した。組織修復の度合い ("Wound repair (%)") は、成虫の翅の大きさを元に算出した。具体的には、幼虫期に傷を付けていない左翅 (図では

“Intact”とした)の大きさに対する傷を付けた右翅 (図では“Wounded”とした)の大きさの割合を個体ごとに計算した。全ての計算は Excel for Mac (Microsoft)で行った。

4.4.2 死細胞の計測

アポトーシス細胞は活性化エフェクターカスパーゼの抗体 (anti-c-Dcp1) を用いて検出した。dying cell の空間的局在の解析では、翅成虫原基 (一層の上皮層から成る) の *xz* または *yz* 断面の画像を見て、anti-c-Dcp1 陽性細胞を、

- (1) ”Basally extruding” : 組織の基底側の縁に接している。
- (2) ”Apically extruding” : 組織の頂端側の縁に接している。
- (3) ”In disc” : 組織の中に留まっており、基底/頂端側の縁に接していない。

の3つに分類した。この時、傷の大きさや位置の違いによる影響を減らすため、ほぼ同じ大きさの傷が pouch 領域を交差するようについた翅成虫原基のみを解析に用いた。また、pouch に含まれる dying cell の総数は、*xy* 断面の *z*-stack 画像を用いて計測した。この時、dying cell の数と pouch の面積は Fiji を用いて自動で計測した。同様に、ネクローシス細胞の数は、*xy* 断面の画像を用いて Fiji で自動で計測した。全ての計算は Excel for Mac (Microsoft)で行った。

4.4.3 シグナルの輝度の計測

anti-Mmp1、anti-Wg、anti- β -gal (*slit-lacZ*、*dpp-lacZ*) の輝度は Fiji で測定した。anti-Mmp1 と *slit-lacZ* (anti- β -gal) については、傷の周辺の輝度を翅成虫原基の notum 領域の輝度で標準化した。また、anti-Wg や *dpp-lacZ* (anti- β -gal) については、anti-c-Dcp1 陽性の細胞で測定し anti-c-Dcp1 陰性の翅成虫原基の pouch 領域の輝度で標準化した。輝度は、全て内在性の発現を含まないように測定した。全ての計算は Excel for Mac を用いて行った。

4.4.4 統計

組織修復の度合い (“Wound repair (%)”) とシグナルの輝度は Mann-Whitney U

検定、アポトーシスまたはネクローシス細胞の数は Welch's T 検定、また dying cell の空間的局在は χ^2 検定で解析した。棒グラフに含まれるエラーバーは標準偏差を示す。また、n.s. (not significant) は、p 値 0.05 以上または調整済み残差 2.56 以下を示す。棒グラフは Excel for Mac、Boxplot グラフは R ver. 3.2.3 (<https://www.r-project.org>)で作成した。

4.5 ハエの系統

4.5.1 ハエの由来

由来は次の通りである。

- *nub-gal4* (Bloomington Drosophila Stock Center [BDSC] #42699),
- *rn-gal4^{GAL4-5}* (BDSC #7405),
- *UAS-CD8-PARP-Venus* (gift from Yasushi Hiromi) (Williams et al., 2006)
- *UAS-bsk-RNAi* (National Institute of Genetics [NIG] #5680R-2)
- *slit²* (Drosophila Genomics and Genetic Resources [DGGR] #106948) (Nambu et al., 1990)
- *UAS-slit-RNAi* (BDSC #31468)
- *robo2²* (DGGR #106843) (Rajagopalan et al., 2000)
- *UAS-robo2-RNAi* (BDSC #34589)
- *slit⁰⁵²⁴⁸* (*slit-lacZ*, BDSC #12189) (Karpen and Spradling, 1992; Tayler et al., 2004)
- *UAS-slit* (gift from Tom Kidd)
- *UAS-robo2-HA* (gift from Talia Volk)
- *wg^l* (BDSC #2978) (Sharma, 1973)
- *wg^{SP-1}* (BDSC #405) (Lindsley and Zimm, 1992; Neumann and Cohen, 1996)
- *dpp^{d6}* (DGGR #106644) (St. Johnston et al., 1990)
- *dpp^{s11}* (DGGR #106646) (St. Johnston et al., 1990)
- *dpp^{hr92}* (DGGR #106649) (Wharton et al., 1996)
- *TRE-DsRed* (BDSC #59012) (Chatterjee and Bohmann, 2012)

- $P\{PZ\}dpp^{10638}$ (*dpp-lacZ*, BDSC #12379) (Karpen and Spradling, 1992)

4.5.2 詳細な遺伝子型

各図のデータについて、それぞれの遺伝子型は次の通りである。

図 3

- a, a' $nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +$
- b, b' $nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi$
- c, c' $nub-gal4 / slit^2; UAS-CD8-PARP-Venus / +$
- d, d' $nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-slit-RNAi$
- e, e' $nub-gal4 / robo2^2; UAS-CD8-PARP-Venus / +$
- f, f' $nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-robo2-RNAi$
- g 左から右へ
 $nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +$
 $nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi$
 $nub-gal4 / slit^2; UAS-CD8-PARP-Venus / +$
 $nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-slit-RNAi$
 $nub-gal4 / robo2^2; UAS-CD8-PARP-Venus / +$
 $nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-robo2-RNAi$

図 4

- a-b''' $nub-gal4, UAS-GFP^{S65T} / slit-lacZ; + / +$
- c-d''' $nub-gal4, UAS-GFP^{S65T} / slit-lacZ; UAS-bsk-RNAi / +$
- e, f 左から右へ
 $nub-gal4, UAS-GFP^{S65T} / slit-lacZ; + / +$
 $nub-gal4, UAS-GFP^{S65T} / slit-lacZ; UAS-bsk-RNAi / +$

図 5

- a, a' $nub-gal4 / slit^2; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi$

- b, b' *nub-gal4 / robo2²; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi*
- c 左から右へ
- nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +*
- nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi*
- nub-gal4 / slit²; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi*
- nub-gal4 / robo2²; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi*

図 6

- a-b' *nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +*
- c-d' *nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi*
- e-f' *nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +*
- g-h' *nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi*
- i, j 左から右へ
- nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +*
- nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi*
- nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +*
- nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / UAS-bsk-RNAi*

図 7

- b-d *nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +*
- e-g *nub-gal4 / slit²; UAS-CD8-PARP-Venus / +*
- h-j *nub-gal4 / robo2²; UAS-CD8-PARP-Venus / +*
- k-m 左から右へ
- nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +*
- nub-gal4 / slit²; UAS-CD8-PARP-Venus / +*
- nub-gal4 / robo2²; UAS-CD8-PARP-Venus / +*

図 8

左から右へ

nub-gal4 / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

nub-gal4 / *slit*²; *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

nub-gal4 / *robo2*²; *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

nub-gal4 / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

nub-gal4 / *slit*²; *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

nub-gal4 / *robo2*²; *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

図 9

a-c *nub-gal4* / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / *UAS-slit*

d-f *nub-gal4* / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / *UAS-robo2*

g-i 左から右へ

nub-gal4 / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

nub-gal4 / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / *UAS-slit*

nub-gal4 / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / *UAS-robo2*

図 10

a, a' *nub-gal4* / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / *UAS-slit*

b, b' *nub-gal4* / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / *UAS-robo2*

c 左から右へ

nub-gal4 / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

nub-gal4 / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / *UAS-slit*

nub-gal4 / +; *UAS-CD8-PARP-Venus* / *UAS-robo2*

図 11

a-d'' + / +; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

e-h'' + / *slit*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

i-l'' + / *robo2*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 m, n 左から右へ
 + / +; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 + / *slit*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 + / *robo2*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 + / +; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 + / *slit*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 + / *robo2*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

図 12

a-d'' *TRE-DsRed* / +; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 e-h'' *TRE-DsRed* / *slit*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 g-l'' *TRE-DsRed* / *robo2*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

図 13

a, a' *wg*^l / +; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 b, b' *wg*^{Sp-1} / +; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 c, c' *dpp*^{d6} / +; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 d, d' *dpp*^{s11} / +; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 e, e' *dpp*^{hr92} / +; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 f, f' *wg*^l / *slit*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 g, g' *wg*^{Sp-1} / *slit*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 h, h' *dpp*^{d6} / *slit*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 i, i' *dpp*^{s11} / *slit*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 j, j' *dpp*^{hr92} / *slit*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 k, k' *wg*^l / *robo2*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 l, l' *wg*^{Sp-1} / *robo2*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +
 m, m' *dpp*^{d6} / *robo2*²; *rn-gal4*, *UAS-CD8-PARP-Venus* / +

n, n' *dpp^{s11} / robo2²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +*
o, o' *dpp^{hr92} / robo2²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +*
p 左から右へ
nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +
wg^l / +; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
wg^{Sp-1} / +; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
dpp^{d6} / +; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
dpp^{s11} / +; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
dpp^{hr92} / +; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
nub-gal4 / slit²; UAS-CD8-PARP-Venus / +
wg^l / slit²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
wg^{Sp-1} / slit²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
dpp^{d6} / slit²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
dpp^{s11} / slit²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
dpp^{hr92} / slit²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
nub-gal4 / robo2²; UAS-CD8-PARP-Venus / +
wg^l / robo2²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
wg^{Sp-1} / robo2²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
dpp^{d6} / robo2²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
dpp^{s11} / robo2²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
dpp^{hr92} / robo2²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +

☒ 14

a-b'' *wg^l / +; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +*
c-d'' *wg^l / slit²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +*
e-f'' *wg^l / robo2²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +*
g From Left to right
wg^l / +; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +

wg¹ / slit²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
wg¹ / robo2²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
wg¹ / +; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
wg¹ / slit²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +
wg¹ / robo2²; rn-gal4, UAS-CD8-PARP-Venus / +

☒ 16

b-c *nub-gal4 / +; UAS-CD8-PARP-Venus / +*

5. 引用文献

Almuedo-Castillo, M., Crespo, X., Seebeck, F., Bartscherer, K., Saló, E., and Adell, T. (2014). JNK Controls the Onset of Mitosis in Planarian Stem Cells and Triggers Apoptotic Cell Death Required for Regeneration and Remodeling. *PLoS Genet.* *10*, e1004400.

Belacortu, Y., and Paricio, N. (2011). *Drosophila* as a model of wound healing and tissue regeneration in vertebrates. *Dev. Dyn.* *240*, 2379–2404.

Blockus, H., and Chédotal, A. (2016). Slit-robo signaling. *Dev.* *143*, 3037–3044.

Bosch, M., Serras, F., Martín-Blanco, E., and Bagaña, J. (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev. Biol.* *280*, 73–86.

Cadigan, K.M. (2002). Regulating morphogen gradients in the *Drosophila* wing. *Semin. Cell Dev. Biol.* *13*, 83–90.

Chatterjee, N., and Bohmann, D. (2012). A versatile ϕ C31 based reporter system for measuring AP-1 and NRF2 signaling in *Drosophila* and in tissue culture. *PLoS One* *7*, e34063.

Comer, J.D., Alvarez, S., Butler, S.J., and Kaltschmidt, J.A. (2019). Commissural axon guidance in the developing spinal cord: From Cajal to the present day. *Neural Dev.* *14*, 1–16.

Delloye-Bourgeois, C., Jacquier, A., Charoy, C., Reynaud, F., Nawabi, H., Thoinet, K.,

Kindbeiter, K., Yoshida, Y., Zagar, Y., Kong, Y., et al. (2015). PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments. *Nat. Neurosci.* *18*, 36–45.

Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* *27*, 6245–6251.

Diaz-Garcia, S., Ahmed, S., and Baonza, A. (2016). Analysis of the function of apoptosis during imaginal wing disc regeneration in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* *11*, e0165554.

Dickson, B.J., and Zou, Y. (2010). Navigating intermediate targets: the nervous system midline. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, 1–16.

Eisenhoffer, G.T., Loftus, P.D., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C. Bin, Morcos, P.A., and Rosenblatt, J. (2012). Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature* *484*, 546–549.

Galko, M.J., and Krasnow, M.A. (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol.* *2*, E239.

Grusche, F. a, Degoutin, J.L., Richardson, H.E., and Harvey, K.F. (2011). The Salvador/Warts/Hippo pathway controls regenerative tissue growth in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* *350*, 255–266.

Hamaratoglu, F., Affolter, M., and Pyrowolakis, G. (2014). Dpp/BMP signaling in flies: From molecules to biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* *32*, 128–136.

Hariharan, I.K., and Serras, F. (2017). Imaginal disc regeneration takes flight. *Curr. Opin. Cell Biol.* *48*, 10–16.

Hayes, P., and Solon, J. (2017). *Drosophila* dorsal closure: An orchestra of forces to zip shut the embryo. *Mech. Dev.* *144*, 2–10.

Igaki, T. (2009). Correcting developmental errors by apoptosis: Lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis* *14*, 1021–1028.

Igaki, T., Pagliarini, R.A., and Xu, T. (2006). Loss of Cell Polarity Drives Tumor Growth and Invasion through JNK Activation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *16*, 1139–1146.

Igaki, T., Pastor-Pareja, J.C., Aonuma, H., Miura, M., and Xu, T. (2009). Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in *Drosophila*. *Dev. Cell* *16*, 458–465.

Ishida, T., Nakajima, T., Kudo, A., and Kawakami, A. (2010). Phosphorylation of Junb family proteins by the Jun N-terminal kinase supports tissue regeneration in zebrafish. *Dev. Biol.* *340*, 468–479.

Jacinto A, Martinez-Arias A, and Martin P. (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat. Cell Biol.* *3*, E117–E123.

St. Johnston, R.D., Hoffmann, F.M., Blackman, R.K., Segal, D., Grimaila, R., Padgett, R.W., Irick, H.A., and Gelbart, W.M. (1990). Molecular organization of the glutathione reductase gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* *4*, 1114–1127.

Karpen, G.H., and Spradling, A.C. (1992). Analysis of subtelomeric heterochromatin in

the *Drosophila* minichromosome Dp1187 by single P element insertional mutagenesis. *Genetics* 132, 737–753.

Katsukawa, M., Ohsawa, S., Zhang, L., Yan, Y., and Igaki, T. (2018). Serpin Facilitates Tumor-Suppressive Cell Competition by Blocking Toll-Mediated Yki Activation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 28, 1756-1767.e6.

Katsuyama, T., Comoglio, F., Seimiya, M., Cabuy, E., and Paro, R. (2015). During *Drosophila* disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell proliferation with Dilp8-mediated developmental delay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E2327-36.

Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96, 785–794.

Kuan, H.W., Brose, K., Arnott, D., Kidd, T., Goodman, C.S., Henzel, W., and Tessier-Lavigne, M. (1999). Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96, 771–784.

Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L., and Paro, R. (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* 438, 234–237.

Lindsley, D.L., and Zimm, G.G. (1992). *Genome Of Drosophila Melanogaster*. Acad. Press. San Diego.

Marinari, E., Mehonic, A., Curran, S., Gale, J., Duke, T., and Baum, B. (2012). Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature* 484, 542–545.

Mattila, J., Omelyanchuk, L., Kyttälä, S., Turunen, H., and Nokkala, S. (2005). Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Int. J. Dev. Biol.* *49*, 391–399.

Muliyil, S., Krishnakumar, P., and Narasimha, M. (2011). Spatial, temporal and molecular hierarchies in the link between death, delamination and dorsal closure. *Development* *138*, 3043–3054.

Nambu, J.R., Franks, R.G., Hu, S., and Crews, S.T. (1990). The single-minded gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* *63*, 63–75.

Neumann, C.J., and Cohen, S.M. (1996). Sternopleural is a Regulatory Mutation of wingless With Both Dominant and Recessive Effects on Larval Development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *142*, 1147–1155.

Nguyen Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Ma, L., Wang, K.H., Marillat, V., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., and Chédotal, A. (2001). Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *J. Neurosci.* *21*, 4281–4289.

Ohsawa, S., Sugimura, K., Takino, K., Xu, T., Miyawaki, A., and Igaki, T. (2011). Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated engulfment in *Drosophila*. *Dev. Cell* *20*, 315–328.

Ohsawa, S., Vaughen, J., and Igaki, T. (2018). Cell Extrusion: A Stress-Responsive Force for Good or Evil in Epithelial Homeostasis. *Dev. Cell* *44*, 284–296.

Perez-Garijo, A., Martín, F.A., and Morata, G. (2004). Caspase inhibition during

apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* *131*, 5591–5598.

Perez-Garijo, A., Shlevkov, E., and Morata, G. (2009). The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development* *136*, 1169–1177.

Poss, K.D. (2010). Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 710–722.

Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E., and Dickson, B.J. (2000). Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* *103*, 1033–1045.

Rämet, M., Lanot, R., Zachary, D., and Manfruelli, P. (2002). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *241*, 145–156.

Reed, B.H., Wilk, R., Schöck, F., and Lipshitz, H.D. (2004). Integrin-dependent apposition of *Drosophila* extraembryonic membranes promotes morphogenesis and prevents anoikis. *Curr. Biol.* *14*, 372–380.

Ruiz-Losada, M., Blom-Dahl, D., Córdoba, S., and Estella, C. (2018). Specification and patterning of *Drosophila* appendages. *J. Dev. Biol.* *6*.

Ryoo, H.D., and Bergmann, A. (2012). The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, 1–18.

Ryoo, H.D., Gorenc, T., and Steller, H. (2004). Apoptotic Cells Can Induce

Compensatory Cell Proliferation through the JNK and the Wingless Signaling Pathways. *Dev. Cell* 7, 491–501.

Sharma, R.P. (1973). Wingless a new mutant in *Drosophila melanogaster*. *Drosoph. Inf. Serv.* 50, 134.

Shlevkov, E., and Morata, G. (2012). A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 19, 451–460.

Simpson, J.H., Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (2000a). Short-range and long-range guidance by Slit and its robo receptors: Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28, 753–766.

Simpson, J.H., Bland, K.S., Fetter, R.D., and Goodman, C.S. (2000b). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: A combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* 103, 1019–1032.

Smith-Bolton, R.K., Worley, M.I., Kanda, H., and Hariharan, I.K. (2009). Regenerative Growth in *Drosophila* Imaginal Discs Is Regulated by Wingless and Myc. *Dev. Cell* 16, 797–809.

Tanaka, E.M., and Reddien, P.W. (2011). The Cellular Basis for Animal Regeneration. *Dev. Cell* 21, 172–185.

Tasaki, J., Shibata, N., Sakurai, T., Agata, K., and Umesono, Y. (2011). Role of c-Jun N-terminal kinase activation in blastema formation during planarian regeneration. *Dev. Growth Differ.* 53, 389–400.

Tayler, T.D., Robichaux, M.B., and Garrity, P.A. (2004). Compartmentalization of visual centers in the *Drosophila* brain requires Slit and Robo proteins. *Development* *131*, 5935–5945.

Toyama, Y., Xg, P., Ar, W., Dp, K., and Gs, E. (2008). Apoptotic force and tissue dynamics during *Drosophila* embryogenesis. *Science* (80-.). *321*, 1683–1686.

Tsai, C.R., Anderson, A.E., Burra, S., Jo, J., and Galko, M.J. (2017). Yorkie regulates epidermal wound healing in *Drosophila* larvae independently of cell proliferation and apoptosis. *Dev. Biol.* *427*, 61–71.

Uhlirova, M., and Bohmann, D. (2006). JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in *Drosophila*. *EMBO J.* *25*, 5294–5304.

Vaughen, J., and Igaki, T. (2016). Slit-Robo Repulsive Signaling Extrudes Tumorigenic Cells from Epithelia. *Dev. Cell* *39*, 683–695.

Wells, B.S., Yoshida, E., and Johnston, L.A. (2006). Compensatory Proliferation in *Drosophila* Imaginal Discs Requires Dronc-Dependent p53 Activity. *Curr. Biol.* *16*, 1606–1615.

Wharton, K., Ray, R.P., Findley, S.D., Duncan, H.E., and Gelbart, W.M. (1996). Molecular lesions associated with alleles of decapentaplegic identify residues necessary for TGF- β /BMP cell signaling in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *142*, 493–505.

Williams, D.W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y., and Truman, J.W. (2006). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nat. Neurosci.* *9*, 1234–1236.

Yamamoto, M., Ohsawa, S., Kunimasa, K., and Igaki, T. (2017). The ligand Sas and its receptor PTP10D drive tumour-suppressive cell competition. *Nature* 542, 246–250.

Yoo, S.K., Pascoe, H.G., Pereira, T., Kondo, S., Jacinto, A., Zhang, X., and Hariharan, I.K. (2016). Plexins function in epithelial repair in both *Drosophila* and zebrafish. *Nat. Commun.* 7, 12282.

Ypsilanti, A.R., Zagar, Y., and Chédotal, A. (2010). Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* 137, 1939–1952.

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、京都大学大学院生命科学研究科 井垣達吏教授、名古屋大学大学院理学研究科 大澤志津江教授、京都大学大学院生命科学研究科 谷口喜一郎助教、Universidad Autónoma de Madrid Prof. Ginés Morata、熊本大学大学院生命科学研究部 山本真寿助教に多くのご指導をしていただいた。ここに深謝の意を表す。東京大学薬学系研究科 三浦正幸教授、Dr. Barry Dickson、Dr. Yasushi Hiromi, Dr. Tom Kidd、Dr. Talila Volk、Bloomington Drosophila Stock Center、National Institute of Genetics、Drosophila Genomics and Genetic Resources にはハエを寄贈していただいた。ここに感謝の意を表す。また、京都大学大学院生命科学研究科システム機能学研究室の各位、並びに BOC、Nicol、Izarne、Noe、Angi、Rosa、Natalia、Manoro、Ernesto には研究をサポートしていただいた。ここに感謝の意を表す。本研究の一部は、日本学術振興会特別研究員 DC1 と日本学術振興会若手研究者海外挑戦プログラムによった。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Chiaki Iida, Shizue Ohsawa, Kiichiro Taniguchi, Masatoshi Yamamoto, Ginés Morata and Tatsushi Igaki

JNK-mediated Slit-Robo signaling facilitates epithelial wound repair by extruding dying cells

Scientific Reports, 9:19549, 2019