

令和元年5月31日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07088

研究課題名（和文）収斂運動を効率化する周期性を持った細胞動態の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of periodic cellular dynamics to facilitate convergence movements

研究代表者

鈴木 誠（Suzuki, Makoto）

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・助教

研究者番号：10533193

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では動物の胚発生における集団的細胞運動の典型例である収斂運動で観察された周期的な細胞運動の意義とそれを保証する分子機構の解明を目的とし、ゼブラフィッシュ胚を用いた解析を行った。その結果、神経上皮細胞の表層における周期的かつ等方的なアクトミオシン収縮は移動端側の細胞突起と細胞外基質の相互作用を介して異方的な細胞退縮に繋がること、それが神経管の形成過程でおこる収斂運動に頑強性を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクトミオシン骨格と細胞の挙動の周期性は他の器官形成過程でも報告が相次いでおり、その新たな意義を明らかにした本研究の成果は動物に保存された集団的細胞運動の基本原理の理解に繋がることが期待される。また細胞の集合に基づく神経管の形成機構は哺乳類胚でも尾部領域で観察されることから、本研究の成果の更なる発展は神経管の形成異常により発症するヒト先天異常である神経管閉鎖障害の病態理解に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the significance and the molecular mechanism of periodic cellular movements observed in convergence movements, a typical example of collective cell movement in animal development. The results from the analyses using zebrafish embryos suggest that the periodic and isotropic contraction of actomyosin in the cell cortex leads to the anisotropic cellular movement through the interaction between the cellular protrusion and the extracellular matrix on the leading edge, which ensures robustness of the convergent movements during neural tube formation.

研究分野：発生生物学

キーワード：収斂運動 ゼブラフィッシュ アクトミオシン 神経管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物は胚構築過程において複雑な立体構造を形成する。例えば収斂運動では数千～万単位の規模まで細胞数を拡大させた胚組織が体軸に沿って幅を狭めると同時に伸長するが、この時に有効となる多細胞レベルの機構が細胞の配置の能動的な変化である。収斂運動は複数のモデル生物を材料に研究が進められており、これを支える細胞の挙動と分子機構は細胞の状態に依存することが明らかにされてきた。上皮細胞では細胞の頂端側に位置する細胞間接着構造が異方的にリモデルすることが収斂運動の基盤となっており、分子レベルではカドヘリンが機能を担う (Curr. Opin. Cell. Biol., 23, 531-539, 2011)。一方で間充織細胞では場の情報に従い双極型か単極型に極性化した細胞が突起構造を異方的に形成することで収斂運動が進むとされており、この考えは主にツメガエルの原腸形成運動をモデルとした解析から提唱されてきた (Nat. Cell. Biol., 9, 1010-1015, 2007)。

間充織細胞における異方型の細胞突起の重要性は古くは 1990 年代から示唆されてきた。その理由は細胞突起が比較的安定で観察が容易であったことに因る。一方で細胞突起の他の要素の関与については検討が十分に進んでおらず、収斂運動と関連性がある細胞あるいは細胞内の動態が他に存在するのかが不明のままであった。以上を踏まえ研究代表者は、収斂運動における細胞(内)動態を理解する目的で、胚体内の細胞を生きたまま長時間・空間分解能で解析できるゼブラフィッシュ胚を用いた高速ライブイメージング解析系を構築した。その結果、脳・脊髄原基である神経管が形成される過程で起こる収斂運動を 5 秒以下の間隔で可視化する事が可能になり、収斂運動の速度が一定ではなく周期的に変動することを見出した。この収斂運動の周期性は過去に報告が無かったことから、間充織性の収斂運動を調節する新規の細胞動態である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景のもと、本研究では集団的細胞運動の典型例である収斂運動における周期的な細胞運動の発生学的意義とそれを保証する分子機構を理解することを目的とした。より具体的には、(1) 細胞表層で周期的なアクトミオシンの収縮が生まれる仕組み、(2) 等方的なアクトミオシン収縮が異方的な細胞退縮に繋がる仕組み、そして(3) 周期的な側方端の収縮が収斂運動の効率化に繋がる仕組みの 3 点を明らかにすることである。

3. 研究の方法

予備的研究で確立した細胞移植技術を用いた単細胞レベルでのモザイク標識実験を基礎とした。加えて(1) 細胞表層で周期的なアクトミオシンの収縮が生まれる仕組みを明らかにするために、細胞表層と突起のライブイメージング解析を実施した。(2) 等方的なアクトミオシン収縮が異方的な細胞退縮に繋がる仕組みを明らかにするために、UV パルスレーザーによる細胞表層 F-actin の焼灼実験と Focal adhesion 機能の阻害実験を実施した。また(3) 周期的な側方端の収縮が収斂運動の効率化に繋がる仕組みを明らかにするために、F-actin の動態解析から個々の細胞が有する周期の変化と収斂運動の活性の関連性の検証、さらに周期性を阻害した時に組織レベルの収斂速度に与える影響の検証を行った。

4. 研究成果

(1) 予備的解析から収斂運動ではアクトミオシンの活性が細胞表層において 60 秒前後で変動していること、変動の幅(集積時と消失時の F-actin 密度の差)が非筋型ミオシンと低分子量 G タンパク質 RhoA の活性により制御される可能性が示唆されたが、周期性が生まれる仕組みに関しては未解明のままであった。そこで低分子 GTP 結合タンパク質の活性動態の測定を複数種の蛍光プローブを用いて行った。しかし明瞭な時空間的な活性の変化は観察されなかったことから、RhoA の活性は現存する蛍光プローブの検出範囲より小規模な範囲で変化している可能性が示唆された。

(2) 予備的解析からアクトミオシンの動態が細胞側方端の退縮に先んじていることが明らかになっていたが、このことは細胞表層の等方的なアクトミオシン収縮を異方的な形態形成運動に変換する機構が存在することを示唆している。そこでレーザー焼灼法により F-アクチンを含む細胞表層を限局的に破壊し直後の細胞形態の変位を測定することで、細胞表層に存在する物理ストレスの方向性を解析した。その結果、破壊直後に細胞の形態が一過的に拡張すること、また細胞の移動端側の破壊により移動端の退縮が観察されたことから、細胞内に異方的な収縮力が発生している可能性が支持された。

また蛍光プローブで可視化された接着斑が収斂運動を起こす細胞の移動端側に偏在していたことから、異方的に形成された接着斑がアンカーとなり移動端側での細胞形態の退縮を抑制している可能性が考えられた。そこで細胞外基質との接着構造をインテグリンまたはラミニン遺伝子に対するアンチセンスモルフォリノを用いて阻害した上で細胞の動態を解析した結果、細胞の移動動態に異常が生じることが明らかになった。以上より、等方的なアクトミオシン収縮は移動端側の細胞突起における細胞外基質との相互作用を介して、異方的な細胞退縮に繋がる可能性が示唆された。

(3) 周期的な側方端の退縮が組織レベルの収斂運動の効率化に繋がる仕組みを検証するため、神経前駆細胞における細胞表層 F-アクチンの集積ならびに異方的な細胞退縮の短期的な周期動態を、比較的長期にわたり組織レベルでの変形運動と同時に観察する手法を確立した。次にこの観察法で取得した画像データから得た信号データにトップハット様フィルターを処理し F-アクチン集積と異方的な細胞退縮の周期パターンを抽出することで、新たに確立した観察法でも両者の間に時間ずれを伴った関連性が観察されることを確認した。以上を踏まえた上で複数の前駆細胞の相対的な位置関係の時間変化から組織レベルの収斂速度を算出して周期パターンとの比較解析を行った結果、未処理の野生型胚における細胞レベルの短期的な周期性と組織レベルでの収斂速度の発生時間に伴う変化は大きくなく、むしろ一定である傾向が見出された。このことから神経管の形成過程で起こる収斂運動ではアクトミオシン活性の周期性は安定に保たれており、それが神経管の形成運動に頑強性を与える可能性が考えられた。この考えはプレピスタチン処理胚や Vangl2 変異体において細胞レベルの周期性の強度と組織レベルの収斂速度に関連性があることから支持された。一方で細胞間接着と細胞表層 F-アクチンの物理的結合に関わる N-cadherin の変異体では周期性の強度に明らかな変化は検出されない一方で組織収斂速度が低下したことから、アクトミオシン活性の周期性が神経管の形成運動に頑強性を与える過程は細胞間接着依存的に確立される可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Harris, A., Siggers, P., Corrochano, S., Warr, N., Sagar, D., Grimes, D.T., Suzuki, M., Burdine, R.D., Cong, F., Koo, B.K., Clevers, H., Stévant, I., Nef, S., Wells, S., Brauner, R., Ben Rhouma, B., Belguith, N., Eozenou, C., Bignon-Topalovic, J., Bashamboo, A., McElreavey, K.* & Greenfield, A.* (*Co-corresponding authors) ZNRF3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115, 5474-5479, 2018. 査読有.

DOI: 10.1073/pnas.1801223115

Shinoda, T.* , Nagasaka, A., Inoue, Y., Higuchi, R., Minami, Y., Kato, K., Suzuki, M., Kondo, T., Kawaue, T., Saito, K., Ueno, N., Fukazawa, Y., Nagayama, M., Miura, T., Adachi, T. & Miyata, T.* (*Co-corresponding authors) Elasticity-based boosting of neuroepithelial nucleokinesis via indirect energy transfer from mother to daughter. *PLoS Biology*, 16, e2004426, 2018. 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pbio.2004426

Yokoyama, H.* , Kudo, N., Todate, M., Shimada, Y., Suzuki, M., Tamura, K. Skin regeneration of amphibians: A novel model for skin regeneration as adults. *Development, Growth & Differentiation*, 60, 316-325, 2018. 査読有.

DOI: 10.1111/dgd.12544

Suzuki, M.*, Sato, M., Koyama, H., Hara, Y., Hayashi, K., Yasue, N., Imamura, H., Fujimori, T., Nagai, T., Campbell, R.E. & Ueno, N.* (*Co-corresponding authors) Distinct intracellular Ca²⁺ dynamics regulate apical constriction and differentially contribute to neural tube closure. *Development*, 144, 1307-1316, 2017. 査読有.

DOI: 10.1242/dev.141952

Inoue, Y.* , Suzuki, M., Watanabe, T., Yasue, N., Tateo, I., Adachi, T. & Ueno, N. Mechanical roles of apical constriction, cell elongation, and cell migration during neural tube formation in *Xenopus*. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 15, 1733-1746, 2016. 査読有.

DOI: 10.1007/s10237-016-0794-1

Koyama, H.* , Shi, D., Suzuki, M., Ueno, N., Uemura, T. & Fujimori, T.* (*Co-corresponding authors) Mechanical regulation of three-dimensional epithelial fold pattern formation in the mouse oviduct. *Biophysical Journal*, 111, 650-665, 2016. 査読有.

DOI: 10.1016/j.bpj.2016.06.032

Nagasaka, A., Shinoda, T., Kawaue, T., Suzuki, M., Nagayama, K., Matsumoto, T., Ueno, N., Kawaguchi, A. & Miyata, T.* Differences in the mechanical properties of the developing cerebral cortical proliferative zone between mice and ferrets at both the tissue and single-cell levels. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 139, 2016. 査読有.

DOI: 10.3389/fcell.2016.00139

Suzuki, M., Takagi, C., Miura, S., Sakane, Y., Suzuki, M., Sakuma, T., Sakamoto, N., Endo, T., Kamei, Y., Sato, Y., Kimura, H., Yamamoto, T., Ueno, N. & Suzuki, K.T.* In vivo tracking of histone H3 lysine 9 acetylation in *Xenopus laevis* during tail regeneration. *Genes to Cells*, 21, 358-369, 2016. 査読有.

DOI: 10.1111/gtc.12349

[学会発表](計 14 件)

鈴木 誠. 神経管の閉鎖運動と形状決定の力学制御. 日本発生生物学会秋季シンポジウム. 2018.

Suzuki, M. Mechanical regulation of epithelial folding and tubulogenesis of neural tube. 12th GfE School "Imaging and Modeling Development". 2018.

鈴木 誠. 神経管の閉鎖運動と形状決定の力学制御. 第 12 回日本ツメガエル研究集会・第 4 回次世代両生類研究会合同シンポジウム. 2018.

Suzuki, M. Mechanical regulation of closing movement and morphology of *Xenopus* neural tube. 17th International *Xenopus* conference. 2018.

鈴木 誠. 脳の発生からみる上皮組織の折りたたみと管形成の力学制御. 第 41 回日本バイオレオロジー学会年会. 2018.

Suzuki, M. Mechanical regulation of folding and tubulogenesis of *Xenopus* neural plate. 第 70 回日本細胞生物学会・第 51 回日本発生生物学会合同大会. 2018.

鈴木 誠. 動的なカルシウムシグナルによる頂端収縮と神経管閉鎖の制御. 第 27 回日本数理生物学会年会. 2017.

Suzuki, M. Periodic actomyosin contractility contributes to convergence movements during neurulation in zebrafish. 18th International Congress of Developmental Biology. 2017.

Suzuki, M. Distinct intracellular calcium ion dynamics regulate apical constriction and differentially contribute to neural tube closure. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th Meeting of the ZSJ. 2016.

鈴木 誠. 神経管形成における組織の折りたたみと管形成の力学制御. 第二回次世代両生類研究会. 2016.

Suzuki, M. Control of apical constriction during neural tube closure by dynamic intracellular Ca^{2+} signaling. The 26th CDB Meeting: Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization. 2015.

鈴木 誠. 動的カルシウムシグナルによる頂端収縮と神経管閉鎖の制御. 第一回次世代両生類研究会. 2015.

鈴木 誠. パルス性の頂端収縮に基づく神経管閉鎖の定量・数理解析. バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ. 2015.

Suzuki, M. パルス性の頂端収縮に基づく神経管閉鎖の数理解析. 第 48 回日本発生生物学会大会. 2015.

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：上野 直人

ローマ字氏名：(UENO, Naoto)

研究協力者氏名：高田 慎治

ローマ字氏名：(TAKADA, Shinji)

研究協力者氏名：矢部 泰二郎

ローマ字氏名：(YABE, Taijirou)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。