

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07091

研究課題名(和文) 神経堤細胞の進化的起源

研究課題名(英文) The evolutionary origin of the vertebrate neural crest cells

研究代表者

大塚 幸雄(OHTSUKA, YUKIO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：90344192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経堤の進化的起源を探るために、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物であるホヤの神経板境界にどのような細胞が存在し、その細胞がどのように分化するのかを調べた。その結果、神経板境界に存在する末梢神経前駆細胞が尾芽胚期に尾部先端部分から背側正中線に沿って前方に移動することを突き止めた。また、この末梢神経前駆細胞はneurogeninを発現し、そのneurogeninの発現はMEKシグナルとレチノイン酸シグナルにより誘導されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In ascidians, invertebrate chordates, the neural plate border gives rise to peripheral neurons and pigment cells, as in vertebrates. Here I identified migratory neural progenitors derived from the neural plate border in *Halocynthia roretzi*. Fluorescence live cell imaging showed that these progenitors migrate anteriorly along the tail dorsal midline from tail tip during the tailbud stage. Furthermore, I found that migratory neural progenitors express neurogenin and that neurogenin expression in migratory neural progenitors requires MEK and retinoic acid signaling.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経堤 細胞移動 末梢神経 ホヤ

## 1. 研究開始当初の背景

神経堤は脊椎動物の発生初期に神経板と表皮の境界(神経板境界)に一時的に生じる構造である。神経堤の細胞は脱上皮化能と移動能があり、移動後に色素細胞や感覚神経細胞などの様々な細胞種に分化する。このように移動能と多分化能をもつ外胚葉の細胞はこれまで無脊椎動物では報告されておらず、神経堤の獲得が脊椎動物の進化をもたらしたと考えられている。しかし、神経堤に類似した細胞群は無脊椎動物にも存在することが知られている。脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物であるホヤでは、神経板境界に移動能はないが色素細胞、筋肉、感覚神経に分化する細胞が存在する。また、このホヤ神経板境界が形成されるまでの遺伝子発現は脊椎動物と共通していることが報告されている。したがって、ホヤ神経板境界にどのような細胞が存在し、その細胞がどのように分化するのかを明らかにすることは、神経堤の発生・進化を理解する上で極めて重要と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ホヤ神経板境界の発生メカニズムを明らかにすることにより、脊椎動物に固有な形質である神経堤の進化的起源を探ることにある。予備的に行ったマボヤ胚の細胞系譜解析で神経板境界に移動能を有する細胞の存在が示唆された。そこで本研究では、神経板境界に移動性外胚葉細胞が存在することを証明し、その細胞の誘導・分化・移動の分子メカニズムを明らかにする。本研究で取り組む具体的な課題としては、

(1) マボヤ胚の神経板境界に存在する移動性外胚葉細胞を網羅的に同定し、その細胞の移動経路を明らかにする。

(2) ホヤ移動性外胚葉細胞と脊椎動物神経堤細胞との類似点および相違点を明らかにするために、神経堤細胞の誘導・分化・移動に関わる遺伝子をマボヤ胚からクローニ

グし、その遺伝子の発現様式をホヤと脊椎動物で比較する。

(3) 機能阻害実験により移動性外胚葉細胞の分化誘導に関わるシグナル伝達経路を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 移動性外胚葉細胞の同定および移動経路の解析:

マボヤ後期囊胚の神経板境界を構成する18個の細胞一つ一つをカルボシアニン蛍光色素でラベルし、ラベルされた細胞が幼生のどの部分に存在するかを調べる。ラベルされた細胞間の距離が離れている場合、ラベルされた細胞内に移動性外胚葉細胞が存在すると考えられる。そのような場合は、ラベルされた細胞の発生過程をタイムラプス撮影することにより胚体内での細胞の挙動を明らかにする。

(2) マボヤ神経板境界の発生に関わる遺伝子のクローニングおよび発現解析:

脊椎動物で神経堤細胞の形成および分化に関与することが知られている遺伝子をマボヤ胚からクローニングする。まず、公開されているマボヤのゲノム情報から遺伝子配列を推測する。配列情報をもとにプライマーを作成し、RT-PCR法によりの翻訳領域全長をコードする1 kb以上の遺伝子断片をクローニングする。

また、クローニングした遺伝子が神経板境界由来の細胞に発現するかをホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べる。

(3) 移動性外胚葉細胞の分化誘導メカニズムの解析:

神経板境界の分化誘導に関わることが知られている MEK、Nodal、レチノイン酸シグナルをマボヤ胚で阻害することにより、それらシグナル分子がマボヤ移動性外胚葉細胞の分化誘導で果たす役割を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 移動性外胚葉細胞の同定および移動経路の解析:

マボヤ後期囊胚の神経板境界を構成する細胞のうち b9.36 と b9.49 を蛍光色素ラベルすると、幼生尾部に 1-2 個の細胞が他の細胞とは異なり細長い形態をとり、また遠く離れた位置に存在していた。抗体染色により、その細長い細胞は末梢神経細胞であることが判明した。次に、蛍光色素ラベルした b9.36 と b9.49 の発生過程をタイムラプス撮影したところ、b9.36 と b9.49 に由来する末梢神経細胞は尾芽胚期に尾部先端部分から背側正中線に沿って前方に移動することが判明した。この細胞移動は卵膜を除去した胚では起こらず、また卵膜に局在するテスト細胞は細胞移動に関与しないことが明らかとなった。このことから、末梢神経細胞の移動には胚体内から分泌される液性因子が関与することが考えられた。

(2) マボヤ神経板境界の発生に関わる遺伝子のクローニングおよび発現解析:

RT-PCR 法により、マボヤ胚から FGF、TGF ファミリー、Wnt などのシグナル因子 24 個、Msx を含む神経堤の決定に関与する因子 31 個、エフリンを含む細胞移動関連因子 11 個を新規にクローニングした。

また、クローニングした遺伝子のホヤ胚における発現をホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法で解析したところ、Neurogenin が移動性外胚葉細胞に発現していることを明らかにした。

(3) 移動性外胚葉細胞の分化誘導メカニズムの解析:

MEK シグナルについて

マボヤ胚を U0126 (FGF シグナル下流因子 MEK の機能阻害剤) で処理することにより、移動性外胚葉細胞の分化における MEK シグナルの役割を調べた。その結果、マボヤ胚を

U0126 で初期囊胚期から処理すると末梢神経の分化が完全に阻害され、後期囊胚期から処理すると尾部末梢神経の細胞数が増加することが分かった。また、細胞トレーサー実験と Neurogenin の発現解析により、後期囊胚期からの U0126 処理で増加した末梢神経細胞は移動性外胚葉細胞由来であることが分かった。以上の結果から、MEK シグナルは初期囊胚期に移動性外胚葉細胞の末梢神経細胞への分化を誘導する一方で、後期囊胚期以降に移動性外胚葉細胞の分化を抑制していることが示唆された。

Nodal シグナルについて

Nodal シグナルが移動性外胚葉細胞で活性化しているかを抗体染色により調べた。その結果、b9.36 では Nodal シグナルが活性化していたが、b9.49 では活性化していないことが分かった。また、後期囊胚期から U0126 処理した胚で Nodal シグナルの活性化状態を調べたところ、活性化状態に変化が見られなかった。このことから、Nodal シグナルは囊胚期以降に起こる MEK シグナルによる移動性外胚葉細胞の分化抑制には関与していないことが示唆された。

レチノイン酸シグナルについて

マボヤ胚を DEAB (レチノイン酸合成阻害剤) で処理することにより、末梢神経細胞の分化におけるレチノイン酸シグナルの役割を調べた。その結果、DEAB 処理により移動性外胚葉細胞での Neurogenin の発現が阻害され、また幼生尾部背側前方で末梢神経の細胞数が減少したことから、レチノイン酸シグナルは移動性外胚葉細胞の分化を誘導することが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 4 件)

Yukio Ohtsuka、Cell lineage of Halocynthia epidermal sensory neurons、8th international tunicate meeting、2015年7月16日、リンクステーション青森(青森)

大塚幸雄、マボヤ表皮感覚神経の細胞系譜解析、日本動物学会第86回大会、2015年9月17日、朱鷺メッセ(新潟)

Yukio Ohtsuka、Identification of migratory neuronal progenitors in the tailbud embryos of Halocynthia roretzi、The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of the Zoological Society of Japan、2016年11月17-18日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

大塚幸雄、マボヤ尾部末梢神経細胞の分化機構、日本動物学会第88回大会、2018年9月23日、富山県民会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 幸雄 (OHTSUKA YUKIO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：90344192