

令和元年6月26日現在

機関番号：94404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07139

研究課題名(和文)上皮の伸長成長と縞パターン形成を連携するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on mechanisms linking epithelial field growth and periodic stripe formation

研究代表者

小田 広樹 (Oda, Hiroki)

株式会社生命誌研究館・その他部局等・主任研究員

研究者番号：50396222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オオヒメグモ初期胚のシンプルな表層上皮組織で起こる縞パターン形成をモデル現象として捉え、組織変形と遺伝子発現制御をつなぐメカニズムの解明を目的とした。細胞をラベルし、追跡する解析からステージ5の胚の予定細胞運命地図を作成し、細胞集団に対して縞パターンを形成する遺伝子発現が動的に振る舞っていることを示した。さらに2時間をおきに固定した兄弟胚を用いた定量的解析により、体の3つの領域によって異なる縞パターン形成プロセスを共通の枠組みで再構成し、特徴付けた。さらに、頭部の体節形成に関わる遺伝子発現動態がアルマジロによって制御されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物胚の発生において、遺伝子発現パターンの時間発展は形態形成場の成長及び変形を伴う。しかしながら、“場”の成長・変形とパターン形成の緊密な関係を十分に理解することはできていない。この問題の一番のボトルネックは、細胞レベルの実験研究と再構成系による理論研究が両立しうる、実際の現象に基づくシンプルな実験解析系が存在しないことにある。本研究は、細胞挙動を追跡可能なシンプルなオオヒメグモ胚の形態形成場において、多様な縞パターン形成プロセスを共通の枠組みで定量的に再構成することに成功した。動物のパターン形成の研究において、実験研究と理論研究を両立しうる新たな実験系の構築を行った。

研究成果の概要(英文)：In this work, using the spider *Parasteatoda tepidariorum* embryonic field of epithelial cells where spatially periodic stripes of gene expression are formed, we intended to analyze the mechanisms that linked tissue dynamics and gene expression regulation. Using cell labeling and tracking, we performed a cell fate mapping of the stage 5 germ disc and showed that dynamic gene expression occurred in the cell populations while the stripe patterns being formed. Using timely fixed samples of sibling embryos, we conducted a quantitative reconstruction of stripe-forming processes varied depending on the body region in a common spatiotemporal framework. Moreover, we suggested that the armadillo/beta-catenin gene regulated gene expression dynamics associated with head segmentation in the spider.

研究分野：細胞発生進化生物学

キーワード：パターン形成 体節形成 節足動物 オオヒメグモ モデル生物 シグナル 遺伝子発現 ヘッジホッグ

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

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞動物の胚や組織の発生・再生過程において、特定の遺伝子発現は単純なパターンから秩序ある複雑なパターンへと時間発展が見られる。このような遺伝子発現パターンの時間発展はほとんどの場合、その形態形成場の成長を伴う。モデル生物の研究で、ヘッジホッグ(*hh*)やWntなどの分泌タンパク質の同定と、そのモルフォゲンとしての機能が解明されたが<sup>1)</sup>、そのモルフォゲンの存在を前提とすると、形態形成場の成長とパターン形成の緊密な関係は反応拡散系の数理モデルの解析からも支持される<sup>2)</sup>。しかし、数理モデル解析における“成長”は空間の挿入で操作されるが、形態形成場を構成する個々の細胞が果たしている役割は大きく単純化されている。

実際の生物の形態形成場において、“成長”は細胞の分裂や再配列によって達成される。そのような細胞の挙動には偶然性や乱雑性が伴っており、グローバルな2次元パターンの形成において秩序を乱す要因となりうる。しかしその一方で、細胞の分裂や再配列は細胞間の相互作用を多様化し、位置情報の精細化に積極的に寄与する可能性もある。本研究では、後者の可能性を念頭に置き、クモ胚の特性を活用した細胞・分子レベルのメカニズムの解析を行う。

### 2. 研究の目的

動物胚の発生において多くの場合、遺伝子発現パターンの時間発展は形態形成場の成長を伴う。“場”の成長とパターン形成の緊密な関係は、反応拡散系の数理モデルで説明されるものの、形態形成場を構成する細胞の個性や偶然的要素を含んだ細胞のダイナミクス(分裂や運動など)を組み込んだ形で理解することはできていない。この問題の一番のボトルネックは、細胞レベルの実験研究と再構成系による理論研究が両立しうる、実際の現象に基づくシンプルな実験解析系が存在しないことにある。本研究は、オオヒメグモ胚の伸長成長と縞パターン形成を、そのボトルネック打開のためのモデル現象として捉え、クモ胚の特性を最大限活用して、細胞運動と遺伝子発現制御をつなぐ細胞・分子メカニズムの解明とその基本原理の追究を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞の標識と細胞運命の追跡

オオヒメグモ初期胚(32細胞期から64細胞期)のひとつの細胞に、核移行シグナル(NLS)と蛍光タンパク質tdEosFPを融合したタンパク質(NLS-tdEosFPと呼ぶ)をコードするmRNAとビオチン標識デキストランを注入し、ステージ5の始まりとステージ5の中期/後期に蛍光で標識される細胞クローンの位置を画像に記録し、ステージ7の中期/後期まで胚を発生させ、固定して、ヘッジホッグ縞/ビオチン/DNAに対する蛍光染色を行った。特定された細胞運命をあらかじめモデル化したステージ5の胚盤にマップした。細胞標識したいくつかの胚についてはタイムラプス観察を行った。NLS-tdEosFPに加えて、NLSとtdTomatoとの融合タンパク質、Histone H1とtdEosFPとの融合タンパク質を発現させるコンストラクトを作製し、細胞挙動の解析に用いた。

#### (2) 胚の染色と三次元画像の取得及び解析

オオヒメグモ胚の表面細胞層で展開する縞パターンを可視化するために、ヘッジホッグ(*hh*)、パッチト(*ptc*)、*noto1*に対する標識RNAプローブを作製し、胚を多色蛍光in situハイブリダイゼーション法(Akiyama-Oda and Oda 2016)で染色した。染色した胚は共焦点レーザー顕微鏡(TCS SPE, Leica)で三次元的に画像データを取得し、Imaris version 7.6.5(Bitplane)とImageJ version 1.47n(Schindelin et al. 2012)を用いて解析した。胚の表面細胞層に沿ってシグナル強度を取得するためにImageJプラグインを独自に作成した(<https://github.com/hirokioda/>)。数値データの解析及びグラフの作成はOriginPro 9.0.0(OriginLab)を使って行った。

#### (3) 胚性RNA干渉(embryonic RNA interference, eRNAi)による遺伝子機能解析

オオヒメグモ初期胚(32細胞期から64細胞期)のひとつの細胞に、アルマジロ遺伝子の二本鎖RNAを蛍光標識デキストラン+ビオチン標識デキストランと合わせて微量注入した。ステージ7/8まで発生を進めてから固定し、*hh*と*noto1*に対する標識RNAプローブを混ぜてホールマウントin situハイブリダイゼーションを行った。

### 4. 研究成果

#### (1) オオヒメグモ胚盤期(ステージ5)の細胞運命地図の作製

ステージ5の始まりを細胞の位置の参照ステージとしてオオヒメグモ胚盤期胚の細胞運命地図の作製を行った。ステージ5の始まりの時点で、胚盤の表層の細胞数は約1,400(n=4)であった。胚盤の半径は平均274µmで、23-24列の細胞に相当した。将来の頭部になる領域は胚盤の縁から5-6列の細胞であり、将来の後体部になる領域は胚盤の中心(原口閉鎖部)から9-10列の細胞であった。中間の7-8列の細胞が胸の領域になった。胚盤の中心部及びその近くの細胞は形成されつつある胚帯の後端領域に存在し、細胞増殖が他の領域に比べて活発化していることもなかった。研究成果(2)に示す予定後体部領域では見られる遺伝子発現パターンの変化は細胞の動きや細胞の増殖で説明することはできず、その領域では遺伝子発現が非常にダイナミ

ックに挙動していることが示唆された。

## (2) 縞パターン形成の再構成

ひとつの卵嚢由来の兄弟胚を2時間おきに20時間にわたって固定したタイムシリーズのサンプルをもとに、体節形成に関連した縞パターンの発展過程を再構成した。形態形成場となる胚領域の前後長  $L_{AP}$  と触肢に対応するヘッジホッグの長さ  $L_{Pp}$  を計測し、各固定時間におけるパラツキを見たところ、パラツキが大きかったため、個々の胚の胚形の指標として  $S$  指標を導入した。この  $S$  指標は  $\log_2 (L_{AP}/L_{Pp})$  で表され、胚盤から胚帯へ変形し、伸長する際に増加することが期待される。 $S$  指標を時間の関数としてプロットしたところ、 $S$  指標が時間に対して直線的に増加することが示された。つまり、 $S$  指標が発生の進行度合いを反映する定量的指標になることが示された。この  $S$  指標に従って遺伝子発現プロファイルを配置させ、縞パターンのピークが発生の進行とともに増加する過程を再構成することができた。予定頭部領域では、胚盤の縁を起源とするヘッジホッグのひとつの縞パターンが繰り返し縦に分裂を受け、3つの縞パターンに変化する様子が捉えられた。この領域は前後軸方向に13-14%/時の成長を示した。予定後体部領域では、繰り返し新たな縞パターンが形成される様子が捉えられた。研究成果(1)で示された細胞の追跡データと合わせると、後体部末端領域の細胞集団でヘッジホッグの発現が同調的に振動し、前方へ動く進行波が生成されていることが示唆された。この領域の前後軸方向への成長は時間当たり約5%/時で、比較的遅かった。また予定胸部領域では、ヘッジホッグの発現の開始は遅れていたが、*noto1* 遺伝子の発現は  $S$  指標が-1のときにすでに体節ごとに縞状に検出されたことから、この領域では早いタイミングで同調的にすべての体節単位が特異化されることが示唆された。この領域の成長は約6%/時であった。兄弟胚を用いた今回の再構成解析は、一つの共通の空間的、時間的枠組みで多様な縞パターン形成過程を、場の成長度合いとともに定量的に示すことができたことに大きな意義がある。

## (3) アルマジロ/ カテニンの縞パターン形成における役割

ウィングレスシグナルを受容したのを受けて転写活性化因子として働くことが知られているアルマジロ/ カテニンに対して eRNAi を行い、アルマジロ eRNAi 細胞クローンが予定頭部領域の分裂タイプの縞パターン形成に異常をもたらすことが分かった。胚盤の異なる場所に位置したアルマジロ eRNAi 細胞クローンの解析から、アルマジロの活性が抑制された細胞では胚盤の縁に由来するヘッジホッグの発現縞 (*hh* 発現縞) が動的に振る舞うことが妨げられることが示唆された。つまり、胚盤の縁を出発点として細胞から細胞へ順次伝播するヘッジホッグの発現縞はその一部がアルマジロ eRNAi 細胞クローンに差し掛かるとその部分でのみ動態が失われ、ヘッジホッグの発現は固定される。その結果、*hh* 発現縞が分裂期に入ると、アルマジロ eRNAi 細胞クローンに接した部分だけ *hh* 発現縞の分裂が妨げられ、他の部分は連続性を保ったまま分裂を受けるアルマジロ eRNAi 細胞クローンが正中線近くにある場合、眼鏡型に縞分裂が起こることになる。またアルマジロ eRNAi 細胞クローンが胚盤の縁に掛かった状態で存在している場合、*hh* 発現縞の伝播はその部分で妨げられることになる。一方、予定胸部領域では *noto1* 遺伝子の発現縞に影響が出る場合と出ない場合が観察されたが、影響が出た場合の半数程度でアルマジロ eRNAi 細胞クローンの形態的異常(細胞層の隆起や肥厚など)が観察された。予定後体部領域ではアルマジロ eRNAi 細胞クローンが表面細胞層に残ることがほとんどなく、*hh* 発現縞への影響を評価することが困難であった。予定胸部領域と予定後体部領域の状況に比べて、予定頭部領域に存在したアルマジロ eRNAi 細胞クローンは胚表層で比較的正常な上皮形態を保っている例がほとんどであり、頭部 *hh* 発現縞において観察された表現型はアルマジロ遺伝子の機能抑制による直接の影響と考えられた。これらのすべての結果を合わせると、頭部の体節形成に関わる *hh* 発現縞の動的制御にアルマジロが細胞自律的に必須の役割を果たすことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- 1) **Akiyama-Oda, Y. and Oda, H.** (2016) Multi-color FISH facilitates analysis of cell-type diversification and developmental gene regulation in the *Parasteatoda* spider embryo. *Development Growth and Differentiation* **58**, 215-224.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dgd.12263/full>
- 2) **Sasaki, M., Akiyama-Oda, Y., and \*Oda, H.** (2017) Evolutionary origin of type IV classical cadherins in arthropods. *BMC Evol. Biol.* **17**, 142.  
<https://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12862-017-0991-2>
- 3) **Schwager E.E., Sharma P.P., Clarke T., Leite D.J., Wierschin T., Pechmann M., Akiyama-Oda Y., Esposito L., Bechsgaard J., Bilde T., Buffry A.D., Chao H., Dinh H., Doddapaneni H., Dugan S., Eibner C., Extavour C.G., Funch P., Garb J., Gonzalez L.B., Gonzalez V.L., Griffiths-Jones S., Han Y., Hayashi C., Hilbrant M., Hughes D.S.T., Janssen R., Lee S.L., Maeso I., Murali S.C., Muzny D.M., Nunes da Fonseca R., Paese C.L.B., Qu J., Ronshaugen M., Schomburg C., Schönauer A., Stollewerk A., Torres-Oliva M., Turetzek N., Vanthournout B., Werren J.H., Wolff C., Worley K.C., \*Bucher G., \*Gibbs R.A., \*Coddington J., \*Oda H.**

- \*Stanke M., \*Ayoub N.A., \*Prpic N.M., \*Flot J.F., \*Posnien N., \*Richards S., \*McGregor A.P. (2017) The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution. *BMC Biology* **15**, 62.  
<https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-017-0399-x>
- 4) Hemmi, N., Akiyama-Oda, Y., Fujimoto, K., and \*Oda, H. (2018) A quantitative study of the diversity of stripe-forming processes in an arthropod cell-based field undergoing axis formation and growth. *Developmental Biology* **437**(2):84-104.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160617309089>
- 5) Iwasaki-Yokozawa, S., Akiyama-Oda, Y., and \*Oda, H. (2018) Genome-scale embryonic developmental profile of gene expression in the common house spider *Parasteatoda tepidariorum*. *Data in Brief* **19** (2018): 865-867.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352340918306127>
- 6) Leite, D. J., Baudouin-Gonzalez, L., Iwasaki-Yokozawa, S., Lozano-Fernandez, J., Turetzek, N., Akiyama-Oda, Y., Prpic, N. M., Pisani, D., Oda, H., Sharma, P.P., and \*McGregor, A.P. (2018). Homeobox gene duplication and divergence in arachnids. *Mol Biol Evol* **35**, 2240-2253.  
<https://academic.oup.com/mbe/advance-article/doi/10.1093/molbev/msy125/5040134>
- 7) Oda, H., Iwasaki-Yokozawa, S., Usui, T. and Akiyama-Oda, Y. (2019) Experimental duplication of bilaterian body axes in spider embryos: Holm's organizer and self-regulation of embryonic fields. *Development Genes and Evolution*, DOI:10.1007/s00427-019-00631-x.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00427-019-00631-x>

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) Hemmi, N., Akiyama-Oda, Y. and Oda, H. Quantitative reconstruction of three types of stripe-forming processes that occur in a dynamic epithelium of the spider embryo. 第48回日本発生生物学会、口頭発表、2015.6.4(筑波)
- 2) \*Oda, H., Iwasaki, S., Akiyama-Oda, Y. A spider model to study mechanisms behind the capacity for self-regulation in axis formation. The 6th Meeting, European Society for Evolutionary Developmental Biology, 講演、2016.7.27 (Uppsala, スウェーデン)
- 3) Oda, H., Stripe-forming waves of gene expression in a dynamic epithelial cell field of early spider embryo. Join meeting of the German and Japanese societies of developmental biology, 招待講演、2017.3.16 (Kiel, ドイツ)
- 4) 小田広樹、オオヒメグモの体節形成 ～保存された縞パターンを作り出す遺伝子発現の波～. 第53回日本節足動物発生学会、招待講演、2017.5.26(蒲郡)
- 5) Oda, H., Hemmi, N., Fujimoto, K., Akiyama-Oda, Y. Cellular and quantitative characterization of three distinct processes of stripe formation in a growing epithelium of the spider *Parasteatoda tepidariorum*. 18th International Congress of Developmental Biology, ポスター発表、2017.6.19(シンガポール)
- 6) Oda, H. Segmentation dynamics and diversity in a cell-based field. SpiderWeb meeting 2019, 2019.4.11 (London, イギリス)

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 小田広樹 (2018) 6-5 分節化 (担当) 「動物学の百科事典」公益社団法人 日本動物学会編、丸善出版

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

1) JT 生命誌研究館ホームページ

日本語：<https://www.brh.co.jp>

英語：<https://www.brh.co.jp/en/>

2) 研究室ホームページ（細胞・発生・進化研究室）

日本語：<https://www.brh.co.jp/research/lab04/>

英語：<https://www.brh.co.jp/en/research/lab04/>

3) 本研究に関連して開発・公開したデータベース

<https://www.brh2.jp>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：秋山-小田康子

ローマ字氏名：Yasuko Akiyama-Oda

研究協力者氏名：野田彰子

ローマ字氏名：Akiko Noda

研究協力者氏名：逸見なつき

ローマ字氏名：Natsuki Hemmi

研究協力者氏名：岩崎-横沢佐和

ローマ字氏名：Sawa Iwasaki-Yokozawa

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。