

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月3日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08456

研究課題名(和文) 全胚3D蛍光トラッキング法を用いた中内胚葉誘導因子の活性定量と細胞運命の追跡

研究課題名(英文) Dynamics of Nodal signal activation in a single cell during zebrafish mesendoderm formation

研究代表者

近藤 晶子 (Kondow, Akiko)

藤田医科大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：90396838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：中内胚葉形成におけるNodalシグナルのダイナミクスを明らかにすることを旨とし、ゼブラフィッシュ胚後期から原腸胚初期にかけて可視化したNodalシグナルの活性化を、胚の広範囲を高速で撮影できる光シート顕微鏡を用いタイムラプス撮影をした。得られた画像より細胞を三次元追跡し、個々の細胞におけるNodalシグナル活性化の時間変化を追跡した。さらにタイムラプス画像より、胚のNodal産生領域から個々の細胞の距離の解析方法を開発した。これにより、ゼブラフィッシュ胚の広範囲において、予定内胚葉の個々の細胞が受けたNodalシグナルの強度・作用時間の変化を複合的に検証できるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚の広い範囲に分布し移動する細胞について、細胞の分化運命や細胞の挙動(運動・極性)に対するNodalシグナルの時間変化の効果を検証できる基盤的技術を開発できた。本解析系を用いて得られる知見は哺乳類幹細胞の分化制御技術の開発に対しても有益な情報となり得るので、再生医療への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate dynamics of nodal signal activation during mesendoderm formation, we utilized a light-sheet microscope for whole-embryo 3D time-lapse imaging of Nodal signal activation. We performed 3D single cell tracking and analyzed Nodal signal dynamics in single cell. We also measured the distance of each cell at each time point from the yolk syncytial layer at which Nodal protein is produced. Thus we established a system that enables to compare the dynamics of Nodal signal activation simultaneously in distant cells in an embryo.

研究分野：発生生物学

キーワード：三胚葉形成 Nodal zebrafish 発生学・形態形成学 分化誘導シグナル

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

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の中内胚葉形成において、分泌性タンパク質である Nodal タンパク質の作用は濃度 (Nodal シグナル強度) 依存的に変わる。Nodal シグナルを受けた細胞は、Nodal リガンド源である卵黄多核層の近くから遠くへ、内胚葉、中胚葉、外胚葉へと分化する。さらに作用時間も影響する。脊椎動物のモデル生物であるゼブラフィッシュ胚では、強い Nodal シグナルで発現誘導される遺伝子は、弱いシグナルでも持続時間が長いと発現する (参考文献)。しかし、多くの知見は異所的に活性化させた Nodal シグナルに対する応答や、胚全体での Nodal シグナル阻害実験によるもので、中内胚葉形成の過程で個々の細胞において Nodal シグナル強度と時間がどのような関係にあり、個々の細胞の分化運命や性質にどのように影響があるかを調べた知見は少ない。

Nodal シグナル経路では、リガンドが細胞膜上の受容体に結合すると、細胞内タンパク質 Smad2 はリン酸化されて核に移行し、他の転写因子とともに標的遺伝子の転写を活性化する。そのため Smad2 の核移行は Nodal シグナル活性のひとつの指標となる。

この方法で胚全体の Nodal シグナル強度分布及び時間変化や、個々の細胞の Nodal シグナル強度の時間変化が調べられた (文献)。その結果、シグナル強度が勾配を形成し、さらに強度分布の時間変化についてもわかってきた。しかし、胚の広い領域において個々の細胞が、いつ、どのくらいの強度の Nodal シグナルを受けたのかを、細胞を追跡して調べた知見はなかった。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュの中内胚葉形成過程の個々の細胞で、Nodal シグナルの時間変化、及びそれが個々の細胞の性質 (分化運命決定、細胞運動など) にどのような影響を与えるのかを明らかにするため、全胚の動態を調べるライブイメージングを用いた全胚 3D 蛍光トラッキング法を開発し、個々の細胞を追跡して Nodal シグナルの強度、作用時間、および分化運命の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

中内胚葉形成過程の個々の細胞での Nodal シグナルの時間変化を調べるために、(1)Nodal シグナルの可視化、(2)光シート顕微鏡による 3D タイムラプスイメージング、(3) 3D タイムラプス画像における個々の細胞の 3D トラッキング、及び(4)個々の細胞での Nodal シグナル活性化の時間変化の解析を実施した。Nodal シグナルの可視化のため、蛍光タンパク質 Venus の N 末に Smad2 が融合した VNsmad2、C 末に Smad4 が融合した VCsmad4 をコードした mRNA をゼブラフィッシュ胚の 1 細胞期に顕微注射し、Smad2 と Smad4 が相互作用して核に局在していることを蛍光で検出した (参考文献)。胚の広範囲を光毒性低く高速で撮影するために、光シート顕微鏡を用いて 3D タイムラプス撮影を実施した。取得した 3D タイムラプス画像での 1 細胞 3D トラッキングには ImageJ のプラグイン TrackMate を用いた (参考文献)。個々の細胞での Nodal シグナル活性化の時間変化の解析には技術計算言語 MATLAB を用いた。

4. 研究成果

光シート顕微鏡を用いて取得した Nodal シグナル活性化の可視化画像から、蛍光シグナルの定量方法の検討を行った。その結果、胞胚後期に Smad2-Smad4 複合体の核移行が亢進することを検出できた。これは、先行研究からの知見と矛盾がなく、定量方法が妥当であることを示唆している。

次に、個々の細胞を 3D トラッキングし、蛍光シグナルの核移行度合いの時間変化を調べること、個々の細胞における Nodal シグナル活性化の時間変化を追跡した。本研究では、光シート顕微鏡を用いることで、先行研究と比べ胚のより広い領域を解析できるようになった (z 方向 $2.58 \mu\text{m} \times 97 \text{ planes}$)。それにより、胚内を三次元的に移動する細胞でも Nodal シグナルの時間変化を解析することが可能となった。

一方、Nodal シグナル強度の可視化に加えて、細胞近傍の Nodal リガンドの分布を知ることは重要であるが、Nodal リガンドの分布を生きた胚で可視化するのは困難がある。Nodal リガンドの発現が予想される胚表面及び卵黄多核層との境界からの距離は細胞近傍での Nodal リガンド量の目安になると考えられたので、取得した画像から予定中内胚葉細胞の各タイムポイントにおける距離の解析方法を開発した。これにより、ゼブラフィッシュ胚の予定中内胚葉の個々の細胞が受けた Nodal シグナルの強度・作用時間の変化を複合的に検討できるようになった。今後分化運命や細胞の挙動 (運動・極性) と比較することで Nodal シグナルの時間変化の効果を検証できる基盤的技術を開発できた。

< 引用文献 >

- Hagos, E. G. & Dougan, S. T., BMC Dev Biol 7, 22 (2007).
- Harvey, S. A. & Smith, J. C., PLoS Biol 7, e1000101 (2009).
- Dubrulle, J. et al., eLife 4, 385 (2015).
- Tinevez, J.-Y. et al., Methods 115, 80–90 (2016).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Akiko Kondow, Kiyoshi Ohnuma, Shigenori Nonaka, Yasuhiro Kamei, Ryoma Bise, Yoichi Sato, Tetsuya J. Kobayashi and Keiichiro Hashimoto, Dynamics of Nodal signal activation during early zebrafish development., The 22nd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (NBRP-medaka and zebrafish joint international meeting), 2016

Akiko Kondow, Kiyoshi Ohnuma, Shigenori Nonaka, Yasuhiro Kamei, Ryoma Bise, Yoichi Sato, Tetsuya J. Kobayashi and Keiichiro Hashimoto, 3D tracking of Nodal signal activation in a single cell of zebrafish embryo., The 23rd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2017

Akiko Kondow, Kiyoshi Ohnuma, Shigenori Nonaka, Yasuhiro Kamei, Ryoma Bise, Yoichi Sato, Tetsuya J. Kobayashi and Keiichiro Hashimoto, Dynamics of Nodal signal activation in a single cell during zebrafish mesendoderm formation., 生命科学系学会合同年次大会, 2017

近藤晶子、大沼清、野中茂紀、亀井保博、備瀬竜馬、佐藤洋一、橋本敬一郎、中内胚葉形成におけるzebrafish胚のNodalシグナル時間変化1細胞解析, 第41回日本分子生物学会年会, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：備瀬 竜馬

ローマ字氏名：Ryoma Bise

所属研究機関名：九州大学

部局名：システム情報科学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 00644270

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 洋一

ローマ字氏名：Yoichi Sato

研究協力者氏名：大沼 清
ローマ字氏名：Kiyoshi Ohnuma

研究協力者氏名：小林 徹也
ローマ字氏名：Tetsuya J. Kobayashi

研究協力者氏名：野中 茂紀
ローマ字氏名：Shigenori Nonaka

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。