

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18770207
 研究課題名（和文） 細胞極性形成機構の三次元網羅解析

研究課題名（英文）Three dimensional exhaustive analysis of cell polarity formation mechanism

研究代表者

堀田 耕司 (HOTTA KOHJI)
 慶應義塾大学・理工学部・助教
 研究者番号：80407147

研究成果の概要：ホヤ胚における体構築を共焦点レーザー顕微鏡により，3次元的に画像取得し，実際に1細胞レベルの解像度で個体全体を俯瞰できる画像データベース FABA および FABA2 (<http://chordate.bpni.bio.keio.ac.jp/faba2/2.0/top.html>)を開発した。さらにこの FABA における3次元胚画像をもとに、原腸陥入期における個体全体の細胞の形態変化を定量化し脊索形成に重要な遺伝子の過剰発現胚における形態異常の検出に応用した。その結果、脊索遺伝子の過剰発現胚の形態異常を定量的に検出できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	210,000	3,910,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：形態形成

1. 研究開始当初の背景

細胞極性形成の分子機構の解明は形態形成運動を解明するうえで重要になってきているが、個体全体としての形がいかんして決定されるかというマクロで三次元的な問いに対して脊椎動物胚全体を用いた解析では細

胞数も多く複雑で難解となる。体全体の形に影響を及ぼす三次元的な分子現象を細胞レベルの形態変化から記述できるようになることがこの問題を解くカギである。

2. 研究の目的

そこで申請者は体制がシンプルだが脊椎動物に近縁な尾索動物ホヤに注目し、**形態形成過程における平面内細胞極性関連タンパク質の空間的・時系列的なふるまいを個体全体で解析し、それら分子機構と個体レベルでの形態制御の結びつきを解明することを目的とした。**

3. 研究の方法

共焦点レーザー顕微鏡を用いて一視野で胚を構成する細胞すべてを見渡しつつそこに局在するタンパク質分子・分子間の動態を解析する。その後、コンピュータを用いてこれらの極性タンパク質動態を三次元的に追尾・可視化し、極性の制御が体全体としてどのように行われているかを時間・空間的に明らかにする。そのため下記2つの実験を行った。

- 1). 共焦点レーザー顕微鏡を用いたホヤ胚の時間空間的イメージングと三次元胚発生データベースの構築
- 2). コンピュータを用いた、形態形成運動の細胞一つレベルの定量的解析を行う

4. 研究成果

原腸形成運動理解のための Brachyury 下流遺伝子データベース (CINOBI、<http://hottapc.lab.nig.ac.jp/notochord/cibra/>) の構築および、共焦点レーザー顕微鏡画像に基づく三次元ホヤ胚データベース (FABA ver.1.1、<http://chordate.bpni.bio.keio.ac.jp/faba/>) の構築を行った。CINOBI を用いて Brachyury 下流遺伝子セットを調べると、「細胞極性に関わるシグナル分子の転写を制御している」分子群と、「脊索形成に関わる分子の転写を制御している」分子群に分けられることがわかった (Hotta et al., 2007)。このことは脊索をもたな

い動物における Brachyury の機能として「細胞極性に関わるシグナル分子の転写を制御している」役割が古くからあり、脊索動物ではさらに「脊索形成に関わる分子の転写を制御」する役割が付加されたのではないかと考えられる。

このように CINOBI から細胞極性遺伝子群の転写レベルの制御が Brachyury という遺伝子によって制御されている可能性を下流遺伝子群からはじめて示唆した。後者データベース FABA は卵から孵化幼生までの三次元データベースである。このデータベースにより原腸陥入過程の細胞形態変化を時系列に沿って1細胞レベルで個体全体を見渡しつつ明らかにすることができた。

以上の成果は国内・国際学会で発表した (第二回ホヤ研究集会 5月、第40回日本発生生物学会 5月、日本動物学会第78回大会 9月、4th International Tunicate Meeting 6月)。FABA は論文公開後、国内外において高く評価され、発生生物学の国際誌 *Developmental Dynamics* では前者 FABA がハイライトに取り上げられ、“次世代の標準発生ステージ表”として高い評価を得ている。

ホヤの脊索形成および原腸陥入において重要な役割を果たす転写因子 Brachyury の脊索特異的下流遺伝子群を網羅的に 40 単離されている (Hotta et al., 2007, 2008)。

これら下流遺伝子群の中には、細胞極性に関わる *prickle*, *myosin*, *frizzled* や細胞骨格制御に関わる遺伝子 *cdc42*, *IQGAP*, *ERM* などが含まれていることから、私は Brachyury がこれら下流遺伝子の発現を予定脊索細胞においてまとめて ON にすることにより、細胞極性シグナルが働くのではないかと考えている。このことは、Brachyury 下流遺伝子を網羅的に 500 単離してきたものの内訳をまとめた論文からも支持される (Hotta et al.,

2008) . Brachyury はもともと細胞の運命を司る遺伝子群の転写を抑制する働きが左右相称動物から保存されており，脊椎動物ではさらに脊索という支持構造を構築する役割が新たに加わったのではないかとこの論文では述べられている .

つまり ,Brachyury の下流遺伝子は大きく 2 つの異なる役割を持つグループに分けらる . すなわち ,1 .細胞運動を司るグループと ,2 .脊索細胞分化に関わるグループである . よって ,これまでホヤにおいて単離されてきた 500 にのぼる下流遺伝子がそれぞれどちらのグループに属しているのか ,またさらにそのグループ下でどのような役割を担っているのかを明らかにする必要がある .

しかしながら ,これまで報告された Brachyury 下流遺伝子のうち ,その機能が過剰発現やノックダウンによって明らかにされたものは ,その一部しかなく ,一見正常胚と違いが見られないものでも個々の細胞レベルで見ると相違点がある可能性がある . これら遺伝子がどのような形態変化を導いているかといった問題は ,未だ謎が多く ,また 500 にのぼるターゲット遺伝子を系統的に ,形態を機能分類する定量的指標もないのが現状である .

そこで ,FABA に登録されている 3D real embryo に対して Olivier ら (2006) によって開発された 3D Virtual Embryo (以下 3DVE、図 1) 作製法を用いて 1 . 原腸陥入期における個体全体の細胞の形態変化を定量化し ,さらに 2 . 脊索形成に重要な遺伝子の過剰発現胚における形態異常の検出に応用した . その結果 ,1 . 3DVE を用いることにより ,ホヤ正常胚 (St.10 , St.11) の全細胞の形態変化と球形度 ,伸長度 ,扁平度 ,表面積 ,体積 ,細胞間同士の接地面積の 6 つのパラメータを用いて定量化することができ ,ホヤ胚脊索細胞が

顕著に扁平度 ,伸長度において増減していることがわかった . つまり ,原腸陥入期の主たる形態変化は脊索が担っていることが示唆される . また ,2 . さらに ,St.10 から St.23 にかけて ,ホヤ胚脊索細胞におけるミュータントの表現型の検出を試み ,上記パラメータを用いて形態異常を比較し ,定量化することができた .



図 1 左から原腸陥入期のホヤ胚の共焦点顕微鏡 3 次元再構成画像、それをバーチャル CG 化した画像 (3DVE)、脊索細胞だけをハイライト表示したワイヤフレーム画像

以上の研究成果を日本遺伝学会第 80 回大会において発表した。

今後 ,発生における形態指標として広くこの方法を活用し ,高精度ミュータントスクリーニング系の開発などに役立てていきたい .

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)

[雑誌論文](計 4 件)

Shigehiro Yamada, Kohji Hotta, Takamasa S. Yamamoto, Naoto Ueno, Nori Satoh and Hiroki Takahashi

Interaction of notochord-derived fibrinogen-like protein with Notch regulates the patterning of the central nervous system of *Ciona intestinalis* embryos

Developmental Biology, 2009 in Press(査読有り)

K. Hotta, H. Takahashi, N. Satoh and T. Gojobori.

Brachyury-downstream gene sets in a primitive chordate, *Ciona intestinalis*: A link to notochord formation, cell movement and chordate evolution. Evolution and Development,10(1):37-51 (2008)

(査読有り)

K. Hotta, K. Mitsuahara, H. Takahashi, K. Inaba, K. Oka, T. Gojobori and K. Ikeo
A web-based interactive developmental table for the ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions I. From fertilized egg to hatching larva
Developmental Dynamics, 236(7):1790-1805 (2007) (査読有り)

K. Hotta, S. Yamada, N. Ueno, N. Satoh and H. Takahashi
Brachyury-downstream notochord genes and convergent extension in *Ciona intestinalis* embryos
Development, Growth and Differentiation, 49(5):373-82 (2007) (査読有り)

〔学会発表〕(計8件)

大久保玲子, Delphine Dauga, François Robin, Patrick Lemaire, 堀田耕司, 岡浩太郎
3D Virtual Embryo を用いた形態変化の1細胞レベルでの定量解析
動物学会関東支部会、ポスター発表
埼玉大学 (2009年3月20日)

K. Hotta, A. Fukuzawa, K. Mitsuahara, K. Ikeo, T. Gojobori, K. Inaba and K. Oka
Three dimensional real-image embryo reconstructions for the ascidian *Ciona intestinalis*: II. from hatching larva to juvenile
Joint Meeting of the SFBDB and the JSDB, "Frontiers in Developmental Biology, 口頭発表
フランス, Giens peninsula, Hyères(2008年9月14日) <http://www.ibdm.univ-mrs.fr/frontiersDB/>

大久保玲子, Delphine Dauga, Francois Robin, Patrick Lemaire, 堀田耕司, 岡浩太郎
Quantitative analysis of morphogenetic change during gastrulation movement in ascidian *Ciona intestinalis* by constructing 3-D virtual embryo
3次元パーチャル胚構築によるホヤ胚原腸陥入時における形態変化の1細胞レベルでの定量解析
日本遺伝学会第80回大会、ポスター発表
名古屋大学工学部IB電子情報館(2008年9月4日)

寺久保洋, 中島陽子, 堀田耕司, 岡浩太郎
Novel Peripheral Neuronal Structure Revealed by Confocal and Transmission Electron Microscopies in Ascidian Larvae
共焦点顕微鏡および透過型電子顕微鏡によって明らかにされたホヤ幼生新規末梢神経構造
日本発生生物学会第41回大会、ポスター発表
徳島文化芸術会館 (2008年5月28日)

堀田耕司, 岡浩太郎, 五條堀孝, 光原健太, 高橋弘樹, 稲葉一男, 池尾一穂
カタユウレイボヤ初期発生の新ステージと四

次元胚発生画像データベース FABA
日本動物学会第78回大会、ポスター発表
弘前大学 (2007年9月20日)

Kohji Hotta, Kenta Mitsuahara, Hiroki Takahashi, Kazuo Inaba, Kotaro Oka, Takashi Gojobori & Kazuho Ikeo
Developmental table for the ascidian *Ciona intestinalis* using 3D real image embryo: I. From fertilized egg to hatching larva
4th International Tunicate Meeting, 口頭発表
フランス, Villefranche-sur-Mer, Observatoire Oceanologique, Saint-Jean Cap Ferrat, Residence Delcloy (2007年6月25日)

Kohji Hotta, Shigehiro Yamada, Naoto Ueno, Nori Satoh and Hiroki Takahashi
Brachyury-downstream notochord genes and convergent extension in *Ciona intestinalis* embryos
第40回日本発生生物学会、ポスター発表
福岡国際会議場 (2007年5月29日)

堀田耕司・光原健太・高橋弘樹・稲葉一男・岡浩太郎・五條堀孝・池尾一穂
カタユウレイボヤ初期発生の新ステージと三次元胚発生画像データベース
第2回ホヤ研究集会、口頭発表
下田東急ホテル (2007年5月7日~9日)

〔その他〕

ホームページ等
CINOBI データベース、
<http://hottapc.lab.nig.ac.jp/notochord/cibra/cibrardownhome.html>
FABA1 データベース、
<http://chordate.bpni.bio.keio.ac.jp/fab a1/top.html>
FABA2 データベース、
<http://chordate.bpni.bio.keio.ac.jp/fab a2/2.0/top.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
堀田 耕司 (HOTTA KOHJI)
慶應義塾大学・理工学部・助教
研究者番号：80407147
- (2) 研究分担者
該当なし
- (3) 連携研究者
該当なし