

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19570207
 研究課題名(和文) 透明化ツメガエル割球を用いた細胞分化と調和した細胞周期調節の解明
 研究課題名(英文) Study of regulation mechanisms in the cell cycle coordinated with cell differentiation with translucent blastomeres of the frog, *Xenopus laevis*
 研究代表者
 岩尾 康宏 (IWAO YASUHIRO)
 山口大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：10144916

研究成果の概要(和文)：アフリカツメガエルの透明化割球での優れたバイオイメーjingシステムを用いて、細胞周期転換と細胞分化の分子メカニズムを細胞内での分子挙動に着目して新たな視点から明らかにした。とくに、DNAポリメラーゼとともに複製フォークを移動するcdc45などの分子間相互作用をFRET法を用いて詳細に解析した。また、MBT期でのタンパク合成の低下が細胞周期の伸張開始を決定し、その後の細胞分化を引き起こしていることを示した。さらに、Caイオンの細胞周期と細胞分化の初期胚発生における役割を検討した。

研究成果の概要(英文)：We studied the molecular mechanisms in cell cycle and cell differentiation with the efficient bio-imaging system of the translucent blastomeres of the frog, *Xenopus laevis*. The interactions of molecules necessary for DNA synthesis, such as DNA polymerase and cdc 45, was clarified with FRET methods. we found that the decrease in protein synthesis during MBT determined the onset of cell cycle elongation followed by cell differentiation. In addition, we investigated the role of Ca ions in the regulation of cell cycle and cell differentiation during early embryonic development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化、卵割、形態形成、Caイオン

1. 研究開始当初の背景

動物の初期発生では初期胚型(卵割型)から体細胞型の細胞周期への転換が起き、細胞の分化が始まる。受精後の卵由来のmRNAとタンパク質に依存した制御(母性型)から、

接合核由来のゲノム遺伝子の発現を伴う制御(胚性型)へと細胞周期が転換することは、哺乳類を含む多くの動物の発生過程で普遍的に見られ、発生に必須な現象である。脊椎動物における発生メカニズムの有用な研究

モデル動物であるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) では、胞胚中期以降に体細胞型の分裂周期へ移行し (Mid-Blastula Transition; MBT)、母性型/胚性型転移 (MZT) の分子メカニズムの解明は初期胚での細胞分化と形態形成のしくみを明らかにするために欠くことができない。とくに MBT 後の体細胞周期は細胞のサイズ (半径の2乗: 表面積) に反比例して伸長する (Wang et al. 2000; Iwao et al. 2005)。細胞サイズと細胞周期との密接な相関は分裂酵母やヒト培養細胞でもみられる。このサイズ依存的細胞周期の解明は、現在ほとんど未知の体 (細胞・器官) のサイズ決定の分子機構を探るのに最適な実験系の一つである。

これまでに、母性の cyclin A1, cyclin E1, Cdc25A などの細胞周期調節分子は、MBT 期から初期ノウ胚に発生開始後の時間 (発生タイマー) に依存して分解・消失することが知られている。一方、胚性の体細胞型 cyclinA2, cyclinE2, Cdk インヒビター (p27Xic) などは MBT 期以後に転写・翻訳が開始されることが知られてきた。しかし、これまでの研究は主として胚の細胞集団全体を扱っており、これらの分子が個々の細胞の細胞周期 (G1 期、S 期、G2 期、M 期) をどのようにして変更・調節しているかは未知であった。しかし、我々が独自に開発した透明なツメガエル割球では、これらの細胞周期の調節分子の挙動を生きた割球 (細胞) においてバイオイメージングの手法を用いて観察することに成功した (Iwao et al. 2005)。S 期の DNA 合成量を生きた割球でモニターすることが可能となり、細胞周期の伸長に比例して S 期の長さが伸長することを初めて発見した。生きた1細胞での各期の測定は初めてであり、MBT 後はまず G2 期が現われ、その後 G1 期の出現により体細胞型の周期へ転換することも明らかにした。さらに、初期の細胞周期伸長には細胞表面の MPF (cdc2/cyclinB) 量の低下が関与していること (Iwao et al. 2002; Nakamura et al. 2005)、また G1 期の出現などによる伸長にはガン抑制遺伝子と知られている PTEN フォスファターゼの活性調節が必要であることを初めて明らかにした (Ueno et al. 2006)。しかし、正常な発生に必須である細胞分化・形態形成と調和のとれた細胞周期調節の分子機構は未解明である。本研究では、透明化割球の優れたバイオイメージングシステムを用いて、細胞周期転換と細胞分化の分子メカニズムを細胞内での分子挙動に着目して新たな視点から明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

- (1) 体細胞型細胞周期転換の分子機構の解明
S 期の開始と進行の変換機構について、と

くに G1/S 期の進行に関わると考えられる調節分子の細胞内での時空間レベルでの詳細な挙動を観察し、それらの分子間相互作用を明らかにする。MBT 前の卵割期では核あたり多数の複製開始点があり、極めて早い DNA 合成が起きるが、MBT 後の DNA 合成の開始 (G1 期終了) と合成速度の低下がどのような分子メカニズムによって調節されているかは未解明である。我々は Origin Recognition Complex (ORC) の主要構成分子の PCNA が間期に核内に集積して M 期には核膜崩壊とともに細胞質に分散することを明らかにしたが、MBT 後の ORC における DNA 複製の進行の変化を計測することは難しかった。そこで、DNA 複製の直接の引き金であるライセンス因子; MCM (Mini Chromosome Maintenance)、Cdc6、それをリン酸化する Cdk2 キナーゼ、DNA ポリメラーゼとともに複製フォークを移動する cdc45 などの挙動を、それらの GFP などとの融合タンパク質を透明化割球で発現させ、MBT 後の時空間分布の変化を明らかにする。とくに、各分子間の相互作用を Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 法を用いて詳細に解析することを目指した。

- (2) タンパク合成活性化機構による細胞周期の調節機構の解明

MBT 期後の細胞周期の伸長にはタンパク合成系が深く関わっている。PI3 キナーゼは PI3-AKT カスケードの活性化を通じてタンパク合成の促進し、細胞分裂を進行させるが、我々は PI3 キナーゼと拮抗して働く PTEN フォスファターゼ活性により、MBT 後の細胞周期が部分的に調節されていることを明らかにした (Ueno et al. 2006)。さらに多くは細胞膜に局在して活性化する PTEN が MBT 後に核内に入り、とくにタンパク合成に必要な rRNA を合成する核小体に特異的に分布することを発見した。今回、MBT 期のタンパク合成の変化がどのようにして細胞周期を調節して細胞分化を引き起こしているかを明らかにすることを目指した。

- (3) 形態形成と調和した細胞周期制御機構の解明

細胞内イオン濃度変化は細胞周期進行の重要なシグナルであると考えられている。とくに、両生類では L 型 Ca チャンネルが背側化の遺伝子発現や収斂・伸張に働いていることが知られており、予定神経板領域の細胞では高頻度で Ca 上昇 (スパイク) がみられ、細胞分裂が抑制されている。今回、背側細胞への分化 (神経誘導) に Ca イオン濃度の変化が必要かどうか、まだこれらの細胞への分化時に細胞周期がどのように調和しているかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

ツメガエル透明化割球を用いてS期の進行をリアルタイムで計測することにより、個々の割球細胞でMBT後にどのように各相が出現し、細胞周期が変更されているかを明らかにする。ゼリー層を除去したツメガエル受精卵を定温(20°C)で発生させ、第3卵割直前に、Ficollのクッション上のSteinberg氏溶液中に置き、定温(20°C)に保ちながら遠心する。適度な遠心力(600g、15min)では、卵は壊れずに、最上部に不透明な脂質層、その下に透明な細胞質層が分離し、さらに色素顆粒が卵黄顆粒の順に沈殿する。この条件では細胞膜は壊れずに、透明化細胞質中に核、ミトコンドリアや小胞体などの細胞内小器官が分布する。遠心した胚をCa²⁺-free培養液中で発生させると細胞質部分にある核が同調して分裂を続け、細胞質分裂が起きるので、ほぼ透明な細胞質のみをもつ単離割球が多数得られる。透明化割球は約12回目の卵割までは同調して分裂するが、MBT以後は各割球での細胞周期が不均一に延長して非同調分裂になり、表皮、繊毛などに分化できるので、細胞周期転換の過程を調べることが可能である(Iwao et al, 2005)。この透明化卵の特徴を生かし、個々の割球(細胞)での1回の細胞周期内でのS期進行をモニターするため、S期のORC形成に必要なPCNA, POL D3, Cdc45などと蛍光タンパク質との融合タンパク質をFRET法に適した形にデザインをした。それらのmRNAを受精卵の細胞質中に注入すると融合タンパク質は速やかに合成されるので、それらの細胞周期中の挙動を透明化割球を作成して共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に観察した。さらに、これらの2分子間の結合が開始される時期をFRET法によりリアルタイムに測定した。これまでのDNA合成量の増加測定の結果と比較することでS進行の指標となるかを検討した。これらによりS期決定の主要な因子を明らかにすることを目指した。

これまでにゼブラフィッシュ、ツメガエル、マウスなどで卵割(細胞分裂)周期中に、細胞内Caイオン濃度の変動が起きることが報告されており、細胞周期のオッシレーターとしての機能している可能性が高い。また、ノウ胚や神経胚形成期には予定神経板領域の細胞に特有の高頻度なCa上昇(パルス)が知られている。ツメガエルでは卵割溝付近でのCa濃度の一過的な上昇も報告されているが、これらの分布や変動が細胞周期の各相の進行の制御にどのように関わっているかは明らかではない。とくに、L型Caチャンネル本体である α サブユニットの過剰発現胚ではノウ胚形成・神経管形成が異常となる。本研究では、細胞外のCaイオンが割球での

細胞周期と細胞分化についてどのような役割をもつかを詳しく調べた。さらに、細胞周期進行と体軸形成・神経誘導における細胞外Caイオンの役割を検討した。

4. 研究成果

(1) 体細胞型への細胞周期転換の分子機構の解明

アフリカツメガエルの初期胚では、卵割期におけるS期とM期の位相のみの早い同調的な分裂を行い、MBT(中期胚遷移)以降になるとS期の伸長とG1期・G2期の位相の出現により非同調的な分裂へ移行する。MBT期では胚性遺伝子の転写開始と細胞運動を伴う形態形成が始まり、細胞周期の伸長と細胞分化の協調的な制御が必要であると考えられている。そこで、今回、生きた細胞における細胞運動や形態形成と細胞周期の位相変化の関係を解析した。卵割期から原腸胚初期にかけては細胞内が不透明で観察が困難なため、透明化割球を用いて解析を行った。M期の開始は核膜崩壊で、M期の終了は細胞質分裂から分かるので、間期中のS期を特定することでG1・G2期が明らかにできる。核内でのDNA複製因子(PCNA, POL D3, Cdc45)を用いてFRETの検出を試みた。PCNA同士やPCNAとPOL D3ではFRETが検出できた。今後、この方法を用いてさらに詳細な検討が可能となった。

(2) タンパク合成活性化機構による細胞周期の調節機構の解明

アフリカツメガエル胚での細胞周期伸長は、卵割の進行により核に対する細胞質の比が減少することで開始し、細胞周期の長さが割球半径の2乗(表面積に相当)に反比例して伸長することが知られている。しかし、細胞質の量や表面積に依存して細胞周期を規定する因子や分子機構は不明である。今回、細胞質中のPI3K-TORシグナル経路に依存したタンパク質合成量の減少が、MBT期に分裂に必要な因子を減少させることで細胞周期伸長を開始させると考えた。MBT前後において、PI3Kの制御サブユニットp85 α は細胞質に分布し、細胞分裂と共に細胞質での分布が減少していた。PI3K活性をLY294002で阻害すると、細胞周期の伸長開始時の細胞サイズが大きくなった。また、TOR活性をRapamycinで阻害しても、細胞周期の伸長開始時の細胞サイズが大きくなった。一方、TOR経路を活性化させるRhebの恒常的活性型変異体を発現させると、より小さなサイズの細胞で細胞周期の伸長が始まった。また、TORの下流で働いているS6KはMBT以降にそのリン酸化量が減少し、活性が減少していた。このS6Kのリン酸化量は、PI3KまたはTOR活性を阻害するとMBT以前に減少させることができた。以

上の結果から、ツメガエル初期胚発生において、卵割による細胞質の減少に伴ってPI3K-TOR-S6K 経路でのタンパク質合成の活性が減少し、MBT 期において細胞周期が伸長を開始するしくみがあることを明らかにした。

(3) ボディプラン決定と調和した細胞内 Ca イオンによる細胞周期制御機構の解明

今回、主として細胞膜上の Store-operated channel (SOC) などの Ca イオンチャンネルを阻害することで細胞内の Ca イオン上昇を抑制する作用がある 2-APB で 32 細胞期のツメガエル胚を処理すると、正常胚に比べて頭部がやや小さくなり、眼がかなり小さくなる胚がみられ、腹側化した胚が生じた。一方、同時期に LiCl で処理するとは胴部がかなり短くなり、脊椎軸が曲がった胚がみられ背側化した。次に、2-APB と LiCl を同時に処理すると正常発生が多く、両者の作用が相互に打ち消された。これらの結果から SOC からの細胞外 Ca イオン流入による腹側化シグナルと、IP₃ リセプターからの細胞内 Ca イオン上昇による腹側化シグナルが胚発生中に独立して作用している可能性が考えられた。さらに、初期胚細胞周期中の M 期から S 期への進行には、細胞膜上の糖タンパク質と受容体による細胞間接着が関わっていることを受精系を用いて明らかにした。この細胞内 Ca 濃度上昇に駆動に関わるシステムは、細胞分化期の細胞周期調節でも機能している可能性が示唆され、今後さらに検討が望まれる。

ツメガエルの原腸陥入期には原口周辺部において頻繁な Ca イオン濃度上昇が見られ、形態形成に必要な活発な細胞運動が見られる。そこで原口周辺部から胚の内側の領域の中胚葉における細胞移動を原口背唇部の外植片 (Keller explant) を用いて観察した。その結果、Keller explant でも原腸胚と同様に中胚葉領域での細胞移動が観察できた。一方、原腸陥入期中胚葉と外胚葉で見られる Ca イオン濃度上昇は、Keller explant の中胚葉と外胚葉を切り離した場合、中胚葉のみで観察されることが報告されている。また、中胚葉領域の領域を単離すると、個々の中内胚葉性の細胞が周辺に移動するため、細胞の追跡が容易である。そこで今回は、原口周辺部の Ca イオン濃度上昇の発生源と考えられる中胚葉周辺の中内胚葉性の細胞の移動と細胞形状の維持に対する細胞外 Ca イオンの必要性を確かめた。細胞外 Ca イオン濃度を下げていくと細胞形状が丸くなり、移動速度も減少していた。さらに、同程度の細胞の丸さ (Circularity) を示す細胞でも細胞外の Ca イオン濃度が低いほど移動速度が減少していた。以上のことより、細胞外の Ca イオン濃度が中内胚葉性細胞の移動と形状の維

持の双方に独立して必要であると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Nagai K, Ishida T, Hashimoto T, Harada Y, Ueno S, Ueda Y, Kubo H, and Iwao Y The Sperm-surface glycoprotein, SGP, is necessary for fertilization in the frog, *Xenopus laevis*. *Development, Growth & Differentiation* 51: 499-510 (2009)

査読有

[学会発表] (計 9 件)

① 山口壮太、上野秀一、岩尾康宏
ツメガエル初期胚における細胞周期位相のイメージング、第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 10 日 (横浜)

② 山口壮太、上野秀一、岩尾康宏
透明化割球を用いたツメガエル初期胚細胞周期位相のイメージング、第 31 回日本分子生物学会 2008 年 12 月 12 日 (神戸)

③ 瀧水智代、上野秀一、岩尾康宏
PI3K-TOR 経路はツメガエル初期胚における細胞周期伸長開始に関与する、第 31 回日本分子生物学会 2008 年 12 月 12 日 (神戸)

④ 瀧水智代、上野秀一、岩尾康宏
PI3K/TOR シグナル経路はツメガエル初期胚での細胞周期伸長開始に関与する、第 79 回日本動物学会 2008 年 9 月 6 日 (福岡)

⑤ 瀧水智代、上野秀一、岩尾康宏
PI3K/TOR pathway is involved in cell cycle elongation during *Xenopus* early embryogenesis、第 41 回日本発生生物学会 (ISDB 共催) 2008 年 5 月 (徳島)

⑥ 瀧水智代、上野秀一、岩尾康宏
PI3K/TOR シグナル経路はツメガエル初期胚における細胞周期伸長に関与する、第 30 回日本分子生物学会 2007 年 12 月 11 日 (横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~suenoscb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩尾 康宏 (IWAO YASUHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10144916

(2) 研究分担者

上野 秀一 (UENO SHUICHI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80363092

(3) 連携研究者 なし