

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06736

研究課題名(和文)原腸陥入時にトロポニンが担う細胞形態変化の仕組み

研究課題名(英文)Troponin function during gastrulation of sea urchin embryos

研究代表者

谷口 俊介(Yaguchi, Shunsuke)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00505331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞動物の単純な細胞シートが陥入を経て原腸を作る過程の分子メカニズムを完全に説明するにはまだまだ情報が不足している。そこで、本研究ではウニ胚で一層の細胞シートが陥入して原腸を作り上げる過程において、トロポニンが非筋肉細胞で担う働きを明らかにすることを目的とした。トロポニンは遺伝子タンパク質共に陥入中の原腸細胞で発現していること、また、その機能抑制により原腸が陥入しなくなることを明らかにした。さらに、*in vitro*アッセイで筋肉のアクチンミオシンの相互作用を止める役割を担っている可能性を示す結果を得ることができた。これは筋肉成分と考えられていたトロポニンの新たな機能を示す成果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トロポニンはトロポミオシンと並んで、筋肉が弛緩状態にある時に働く主成分であり、アクチンとミオシンの相互作用を阻害する役割を持つ。また、骨格筋と心筋のみでその発現が示されてきたため、筋肉成分とされていた。しかし、今回の研究でトロポニンは筋肉と全く関係のないウニの陥入中の原腸細胞で発現していることが明らかになった。さらに、ヒトにおいても内臓などの骨格筋とは無関係な場所での発現も見られた。加えて、機能抑制するとウニで原腸陥入が起きなくなることから、非筋細胞でも細胞の形を変えることに働いていることが明らかになった。本成果は他の動物においてもトロポニンの発現や機能を再検証してみるべききっかけになる。

研究成果の概要(英文)：There is still a lack of information to fully explain the molecular mechanisms by which simple cellular sheets in multicellular animals invaginate to form the gastrula. Therefore, this study aimed to elucidate the role of troponin in non-muscle cells during the process where a single layer of cells in sea urchin embryos invaginates to form the gastrula. It was demonstrated that troponin is expressed in the invaginating gastrula cells, both at the gene and protein levels, and that inhibition of its function prevents gastrulation. Furthermore, results from *in vitro* assays suggested that troponin may play a role in blocking the interaction between actin and myosin, indicating a novel function for troponin, previously considered solely a muscle component.

研究分野：発生 形態・構造

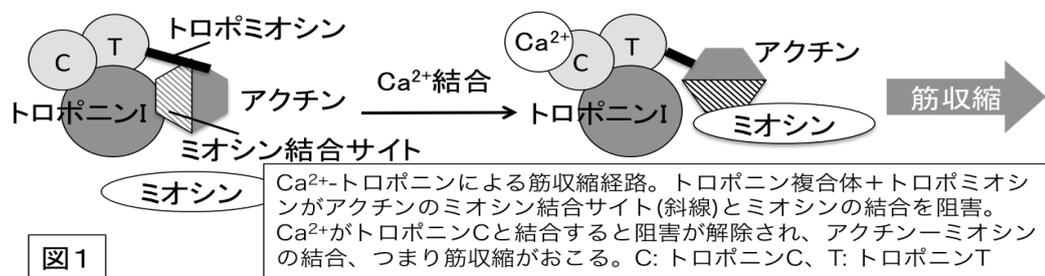
キーワード：原腸陥入 トロポニン 細胞形態

1. 研究開始当初の背景

筋収縮を担うアクチン-ミオシンは、弛緩状態ではトロポニン複合体とトロポミオシンにより、その結合を阻害されている。収縮時には、神経からの刺激で上昇した細胞内 Ca^{2+} がトロポニン複合体のトロポニンCに結合し、トロポニンIとトロポニンT、さらにトロポミオシンの構造変化を引き起こして、アクチン-ミオシンの結合を許す(図1)。

一方、アクチン-ミオシン系は、“非”筋細胞においても形態変化を担っている。例えば、一層の上皮が曲がる際に、構成細胞の頂部または基部に集積したアクチン-ミオシンが、その箇所の収縮に利用されている(図2)。しかしながら筋組織と違い、非筋細胞ではRho-GTPase経路がアクチン重合や非筋ミオシンのリン酸化制御を通じて細胞形態の収縮を制御しているとされており、トロポニンの関与はこれまで報告されていない。

報告者は、長年トロポニンが存在していないとされてきた、棘皮動物であるウニの幼生においても、トロポニンが筋組織に発現し、収縮に機能している事を昨年示した。その過程で、非筋組織である原腸細胞にもトロポニンIが存在している事を発見した(未発表:図3)。原腸細胞はダイナミックに細胞形態を変化させるため、アクチン-ミオシン系の関与がこれまででも示されてきたが、そのプロセスにトロポニンの関与を示す報告はない。さらには、Rho-GTPase経路だけでは、その細胞形態変化の全てを説明するのに十分でない事も報告されている。つまり、原腸のような非筋組織の細胞が見せる形態変化の制御機構を、完全かつ最終的に説明付けるための重要なピースが欠落しており、それが何であるかという未解明な「問い」がいまだに残されている状態にある。



2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、ウニ胚の非筋細胞に発現しているトロポニンIの機能解析を通じて、アクチン-ミオシン依存的な細胞形態変化におけるトロポニンの役割を明らかにすることである。加えて、トロポニン複合体は筋組織では Ca^{2+} を受け取って筋収縮を促す事から、非筋細胞の形態変化においても、 Ca^{2+} 依存的な制御機構に寄与しているかどうかを確かめる。さらに、トロポニンIが直接結合している分子を同定することで、非筋細胞におけるトロポニン複合体の詳細な作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、バフンウニおよびハリサンショウウニの胚を用いて、原腸陥入時におけるトロポニンの機能を明らかにすることを主目的とした。具体的には、以下①~④の項目に沿って、原腸細胞が陥入時にみせるアクチン-ミオシン依存的な細胞形態の変化に対する、トロポニンの関与を検証するとともに、その詳細な作用機序を明らかにすることを試みた。

- ① 非筋トロポニンIの時間軸に沿った詳細な発現解析
- ② トロポニンIの機能抑制下で原腸細胞の形態変化を解析
- ③ トロポニンIの結合相手を同定
- ④ 原腸陥入における Ca^{2+} シグナルの役割をトロポニン機能の視点から解析

4. 研究成果

① 非筋トロポニンIの時間軸に沿った詳細な発現解析

本研究では、ウニの胚発生の初期段階における重要な細胞群である原腸陥入細胞におけるトロポニンIの発現について検討した。トロポニンIは、筋肉の収縮を調節する役割が知られているタンパク質であり、その発現が非筋肉細胞においても確認されることは、このタンパク質の機能に新たな光を当てる可能性がある。具体的な方法として、in situ hybridizationを用いてmRNAの局在を観察し、さらにトロポニンIに特異的な抗体を用いた免疫染色法を実施した。双方とも、原腸陥入細胞においてトロポニンIのmRNAおよびタンパク質が共に発現していることを確認した(図2)。特にin situ hybridizationで

は従来のアルカリフォスファターゼの発色による方法ではあまり明瞭なシグナルが見られなかったため、蛍光in situを行い、よりクリアな結果の取得を行なった。
観察された発現パターンは、トロポニンIがウニの胚発生において、従来考えられていた筋肉細胞以外の役割を持つ可能性を示唆した。特に、原腸陥入という重要な形態形成過程において、このタンパク質がどのような機能を果たしているのか、先につながる成果となった。

② トロポニンIの機能抑制下で原腸細胞の形態変化を定量的に解析

本研究では、ウニ胚における原腸陥入の過程においてトロポニンIが果たす役割を明らかにするため、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてトロポニンIの発現を特異的に抑制した。モルフォリノは、特定のmRNAに対して結合し、その翻訳を阻害することによってタンパク質の発現を下降させる分子である。トロポニンIのモルフォリノを導入したウニ胚では、原腸陥入という重要な形態形成プロセスが著しく阻害されることが観察された。具体的には、モルフォリノ処理された胚では原腸陥入が起こるべき時期において、細胞が適切に陥入しないことが確認された(図3)。

この現象を詳細に調査するために、顕微鏡を使用して細胞の挙動を時間経過で追跡した。通常、原腸陥入には細胞の移動と形態変化が伴うが、モルフォリノ処理によりこれらのプロセスが妨げられることが明らかになった。さらに、細胞骨格の染色と解析を行うことで、トロポニンIの欠如が細胞の収縮機能に影響を与え、これが原腸陥入不全の一因であることが示唆された。

これらの結果から、トロポニンIはウニの胚発生において、単に筋肉収縮の調節に留まらず、細胞運動と形態形成の重要な調節因子であることが推測された。トロポニンIの発現抑制が原腸陥入にどのように影響を及ぼすのかの具体的な分子メカニズムの解明のため、in vitro アッセイの研究を次に行った。

③ トロポニンIの結合相手を同定

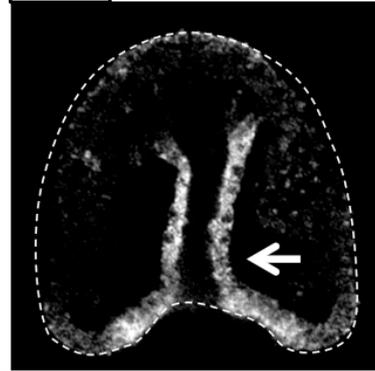
本研究では、トロポニンIがアクチンとミオシンと結合し、それによってアクトミオシン複合体の活性に影響を及ぼすかどうかを調査するためのin vitro アッセイを実施した。この実験は、筋収縮機構の理解を深めるため、特にトロポニンIが非筋肉細胞において果たす可能性のある調節的役割を探ることを目的としている。アッセイの条件下で、トロポニンI、アクチン、およびミオシンを含む反応系を構築し、これらのタンパク質間の相互作用及びその結果としてのアクトミオシンのATPase活性の変化を評価した。具体的には、トロポニンIを様々な濃度で添加し、アクトミオシン複合体の活性がどのように変化するかを計測した。実験結果は、トロポニンIがアクトミオシン複合体の活性を完全には阻害しないものの、活性をわずかに低下させる効果があることを示した。この効果は、トロポニンIの濃度が増加するにつれてより傾向は見られるようになったが、いずれの条件でも完全な活性阻害には至らなかった。

この結果から、トロポニンIはアクチンおよびミオシンと何らかの形で相互作用し、アクトミオシン複合体の機能に影響を及ぼす可能性があるが、その結合が直接的な強い阻害効果を持つわけではないことが示唆される。したがって、ウニのトロポニンIがアクトミオシン複合体の活性を調節する機構は、完全阻害よりも複雑である可能性が高いと考えられる。

③ 原腸陥入におけるCa²⁺シグナルの役割をトロポニン機能の視点から解析

本研究では、筋肉同様にCa²⁺シグナルがトロポニン機能時に働くかどうか調べるため、Ca²⁺シグナル検出タンパク質を発現し、イメージングにより観察を行った。陥入する原腸細胞で高い発現が見られたが、それが原腸陥入の原因になっているかどうかまでを検証することが叶わなかった。今後の課題である。

図 2



陥入中の原腸細胞に発現しているトロポニンタンパク質

正常胚

トロポニン抑制胚

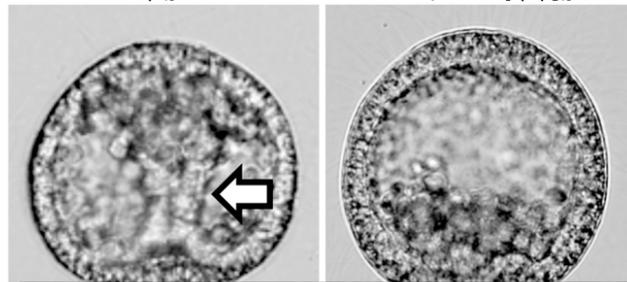


図3

正常胚で見られる原腸(矢印)がトロポニン抑制胚では同時期に見られない

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yaguchi Shunsuke, Yaguchi Junko	4. 巻 64
2. 論文標題 Temnopleurus reevesii as a new sea urchin model in genetics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 59 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kinjo Sonoko, Kiyomoto Masato, Suzuki Haruka, Yamamoto Takashi, Ikeo Kazuho, Yaguchi Shunsuke	4. 巻 64
2. 論文標題 TrBase : A genome and transcriptome database of Temnopleurus reevesii	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 210 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yaguchi Junko, Yaguchi Shunsuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Sea urchin larvae utilize light for regulating the pyloric opening	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-021-00999-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Haruka, Yaguchi Shunsuke	4. 巻 251
2. 論文標題 Direct TGF signaling via alk4/5/7 pathway is involved in gut bending in sea urchin embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 226 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yaguchi Shunsuke, Yaguchi Junko, Suzuki Haruka, Kinjo Sonoko, Kiyomoto Masato, Ikeo Kazuho, Yamamoto Takashi	4. 巻 30
2. 論文標題 Establishment of homozygous knock-out sea urchins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 R427 ~ R429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.03.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinjo Sonoko, Kiyomoto Masato, Yamamoto Takashi, Ikeo Kazuho, Yaguchi Shunsuke	4. 巻 2219
2. 論文標題 Usage of the Sea Urchin Hemicentrotus pulcherrimus Database, HpBase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 267 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0974-3_17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Atsuko, Yamamoto Akane, Yaguchi Junko, Yaguchi Shunsuke	4. 巻 57
2. 論文標題 cis Regulatory analysis for later phase of anterior neuroectoderm specific expression in sea urchin embryos foxQ2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 genesis	6. 最初と最後の頁 e23302 ~ e23302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Erkenbrack Eric M., Croce Jenifer C., Miranda Esther, Gautam Sujan, Martinez-Bartolome Marina, Yaguchi Shunsuke, Range Ryan C.	4. 巻 151
2. 論文標題 Whole mount in situ hybridization techniques for analysis of the spatial distribution of mRNAs in sea urchin embryos and early larvae	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 177 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mcb.2019.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Burke Robert D., Yaguchi Shunsuke	4. 巻 151
2. 論文標題 Analysis of neural activity with fluorescent protein biosensors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 519 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mcb.2018.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kamata Mai, Taniguchi Yuri, Yaguchi Junko, Tanaka Hiroyuki, Yaguchi Shunsuke	4. 巻 in press
2. 論文標題 Nonmuscular Troponin I is required for gastrulation in sea urchin embryos	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 YAGUCHI Shunsuke, YAGUCHI Junko	4. 巻 40
2. 論文標題 ウニ幼生の神経の形成と機能	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hikaku seiri seikagaku(Comparative Physiology and Biochemistry)	6. 最初と最後の頁 137 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3330/hikakuseiriseika.40.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鎌田真衣; 谷口友梨; 谷口 俊介
2. 発表標題 ウニ胚原腸陥入におけるトロポニンIの機能解析
3. 学会等名 第92回日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口順子; 谷口 俊介
2. 発表標題 ウニ幼生の光による幽門の開口
3. 学会等名 第92回日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki H, Yaguchi S.
2. 発表標題 Initial analysis for understanding molecular mechanisms of regulative development.
3. 学会等名 53rd Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yaguchi S.
2. 発表標題 Wnt signals regulate the anterior-posterior patterning of sea urchin embryos.
3. 学会等名 Wnt研究会2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木智佳、谷口俊介
2. 発表標題 Exploring the left-right determinant in sea urchin embryos.
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口順子、谷口俊介
2. 発表標題 Evolution of nitric oxide regulation of gut in deuterostomes.
3. 学会等名 日本発生生物学会第52回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------