

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16110

研究課題名(和文)ニワトリ胚を用いた体軸骨格筋の分節性崩壊過程の形態学的解析

研究課題名(英文)Segmental breaking of axial skeletal muscle in the chicken embryo

研究代表者

磯部 茉莉(Isobe, Mari)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：60850758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：爬虫類や哺乳類の体軸骨格筋は、分節性に区切れた体節から筋芽細胞が分化し、体節の分節性が崩壊するとともに隣り合った体節由来の筋細胞が融合することで形成される。現在までに体節がどのように崩壊していくかは分かっていない。本研究では、ニワトリ胚におけるmyoseptum形成、消失過程を形態学的に解析し、myoseptum消失を簡便に検出するための新規検出系の作製過程で、卵殻外でのニワトリ胚培養システムを作製した。このシステムにより培養皿内で初期胚のタイムラプス観察が可能となった。今後はさらに安定した胚培養システムを作製し、より長時間の観察が可能となるようにニワトリ胚の長寿命化を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水生生物が陸生生物へと進化する過程では、水中での単純な運動とは異なり陸上での複雑な運動が必要となる。このような複雑な運動を可能とするのが高等動物の体幹筋にて発達している回旋筋群であり、回旋筋群の形成には分節性が崩壊し分節をまたいだ構造となることが必須である。以上のように本研究は、分節性の崩壊過程を明らかにすることで体軸骨格筋の形成過程を解明するだけでなく、脊椎動物の進化過程の理解に繋がる重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Axial skeletal muscles of the amniotes are formed by fusing the myotubes derived from adjacent somite, following disruption of somite segmentation. In this study, we morphologically analyzed the process of the formation and breakdown of the myoseptum present between somites and generated a chick ex ovo culture system to easily detect the disappearance of the myoseptum. The system enabled us to observe early chick embryos using time-lapse imaging. We aim to improve the culture system to carry out the long-time observation in which the life span of the embryo would be prolonged.

研究分野：解剖学

キーワード：ニワトリ胚 胚発生 筋発生 体軸骨格筋形成 myoseptum

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物における胚発生では、原腸陥入により三胚葉に分かれた後、伸長した中胚葉が一定間隔でくびり切れることで体節が形成される。その後、表皮や脊索などの周辺環境からのシグナルを受け、体節の一部は後に体幹筋となる筋節に分化する。分節性に区切れた体節から筋芽細胞が分化し、体節の分節性が崩壊することにより隣り合った体節由来の筋細胞が融合することで体軸骨格筋が形成される。魚類や両生類などの下等生物は分節性が残存したまま体幹筋が形成されるのに対し、鳥類や哺乳類などの高等生物では発生過程で分節性が消失し、長大な骨格筋を形成する(図1)。このことから高等脊椎動物における分節性の消失は発生過程における重要な過程であることが分かる。しかし、筋節の発生・分化過程は時期特異的筋分化マーカーの発見により詳細が明らかになりつつあるのに対し^{1,2}、分節性の消失は瞬間的に生じる現象であるため、形態学的に捉えることが難しくその時期や過程の詳細に関する理解が進んでいない。魚類における体軸骨格筋の分節性は myoseptum と呼ばれる筋隔膜が存在することで維持される³。一方、哺乳類や鳥類では魚類と同様に各体節の間に myoseptum が形成される(図2)が、発生過程のどこかで消失する。哺乳類のような高等動物の体幹筋はなぜ分節性が崩壊するのか、またどのように崩壊するのかが学術的な問いである。水生生物が陸生生物へと進化する過程では、水中での単純な運動とは異なり陸上での複雑な運動が必要となる。このような複雑な運動を可能とするのが高等動物の体幹筋にて発達している回旋筋群であり、回旋筋群の形成には分節性が崩壊し分節をまたいだ構造となることが必須である。

以上のように本研究は、分節性の崩壊過程を明らかにすることで体軸骨格筋の形成過程を解明するだけでなく、脊椎動物の進化過程の理解に繋がる重要な意義がある。

2. 研究の目的

本研究ではニワトリ胚の分節性崩壊機構を明らかにするために、myoseptum の消失機構を解明することを目的とした。具体的にはニワトリ胚を用いて、(1)各体節の間に一時的に形成される myoseptum の消失過程をライブイメージングを用いて、正確かつ詳細に調べる。さらに(2)分節性崩壊に関与する遺伝子をスクリーニングするために、隣り合う分節由来の筋芽細胞融合を検出する新規検出系の構築を目指す。

3. 研究の方法

本研究では分節性消失時の形態学的な変化を直接的に捉えるだけでなく、隣り合った筋節由来の筋細胞の融合を検出することで、分節性消失を間接的に捉えることにより遺伝子探索の効率化を図る。後者の方法では極めて少ない細胞融合を感度良く検出する系が必須となる。そのため本研究では、近年申請者らが開発した筋芽細胞融合検出システム(HiMy法:HiBiT-based myoblast fusion assay)を発展させて、新規検出系を作製し、より効率的な遺伝子探索を実施する(図3)。この系は2分割したルシフェラーゼをそれぞれ別々の筋節に導入し、それらが細胞融合すると、ルシフェラーゼが再構成し発光することで顕微鏡下では観察できない初期の分節性消失を間接的に高感度に検出できる(図3B)。これまで見逃されてきた分節性崩壊という現象に着目し、さらにオリジナルな検出系を利用してこの現象を細胞融合の観点から解明することで全く新しい発見に繋がると予想される。

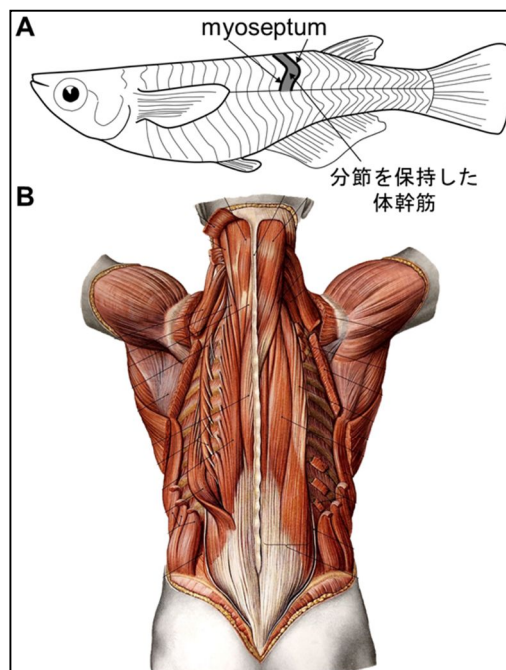


図1 分節性が残存するメダカと消失するヒトの体幹筋の構造
脊椎動物の発生過程において、メダカなどの魚類、両生類では分節性が維持される(A)が、ヒトやニワトリなどの哺乳類、鳥類では分節性は残存しない(B)。

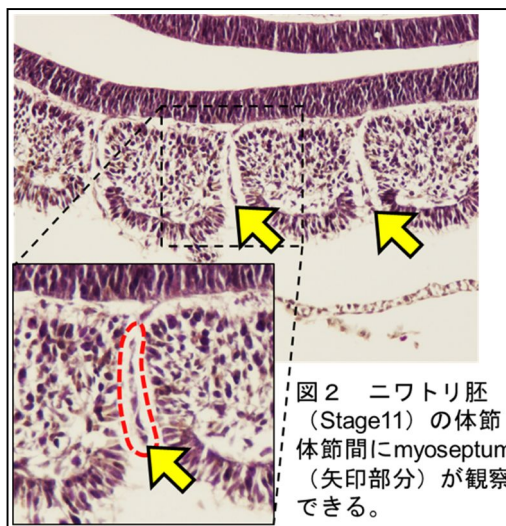


図2 ニワトリ胚 (Stage11) の体節体節間にmyoseptum (矢印部分) が観察できる。

(1) ニワトリ胚を用いた myoseptum の消失時期の同定
筋発生マーカー抗体の作製
myoseptum 消失時期を発生段階と比較するために筋発生マーカーでの免疫染色が必要となるため、MyoD と Myogenin 抗体を作製する。

パラフィン切片を用いた形態解析

体節形成初期から中期 (HH8-25) のニワトリ胚を 4%PFA で固定し、発生段階ごとにパラフィン切片を作製する。作製した切片を用いて HE 染色および免疫染色を行い、myoseptum 消失時期を同定する。

(2) ルシフェラーゼ再構成系を応用した myoseptum 消失検出系の作製

発現プラスミドの作製

発光酵素であるルシフェラーゼを、融合すると発光活性を持つ 2 つの断片 HiBiT、LgBiT に分割し (NanoLuc ルシフェラーゼ、Promega 社) それぞれを蛍光タンパク質と融合したキメラタンパク質を発現するプラスミドを作製する。作製したプラスミドはマウス培養筋芽細胞株 C2C12 細胞とニワトリ胚由来初代培養筋芽細胞に導入し、発現効率や局在を確認する。作製したプラスミドを用いて、検出系の詳細な条件検討を行う。ニワトリ胚に (1) と同様の方法で隣り合った体節に遺伝子導入し、1 時間後に *in vitro* で培養を開始する。ルシフェラーゼ基質を経時的に添加し、適切な添加時期を決定する。この系で隣り合った筋節由来の細胞が融合すると、発光が検出できる。

蛍光タンパク質遺伝子の筋節への遺伝子導入

で作製したプラスミドをニワトリ胚のそれぞれ隣り合った筋節に導入する。その 1 時間後、筋細胞以外の組織構造 (myoseptum など) を観察するために、膜透過性の核染色試薬を添加する。隣り合った筋節由来の筋細胞が融合する過程をライブイメージング法により蛍光顕微鏡を用いて観察する。隣り合った筋節由来の細胞が融合すると、蛍光顕微鏡下で緑色と赤色が重なることで黄色に光った像が確認できる (図 3B)。

ニワトリ胚 *ex ovo* 培養系の樹立

ニワトリ胚をろ紙に貼り付けるようにして卵黄膜ごと切り出し、6cm ディッシュあるいは 35mm ディッシュに移植後、*ex ovo* で培養する。実体顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行う。

4. 研究成果

(1) ニワトリ胚を用いた myoseptum 形成、消失時期の同定

筋発生マーカー抗体の作製

発生ステージを分けるために必要な MyoD、Myogenin、Myosin heavy chain などの筋発生マーカーのうち、MyoD、Myogenin のニワトリ胚に適した抗体が市販されていないため、抗体作製することとした。当研究室で購入しているニワトリ胚より遺伝子全長のクローニングを行い、蛋白質精製を行ったが十分な結果が得られなかったため、現在は遺伝子の一部の配列を用いた抗体精製を実施している。

パラフィン切片を用いた形態解析

におけるマーカー作製に時間を要しているため発生ステージ分類は実施できていないが、HE 染色による形態解析はできている。

(2) ルシフェラーゼ再構成系を応用した myoseptum 消失検出系の作製

発現プラスミドの作製

本研究では pEF1 プラスミドを用い、pEF1-GFP-LgBiT、pEF1-mCherry-HiBiT が作製できた。

蛍光タンパク質遺伝子の筋節への遺伝子導入

で作製したそれぞれのプラスミドをニワトリ胚の体節により効率的に導入するために、3 種類の導入方法を試した (図 4)。方法 A¹ では胚操作を行う時期が早く、胚発生効率が落ちてしまい、十分な結果が得られなかった。方法 B を用いるとそれぞれのプラスミドの発現が確認できた

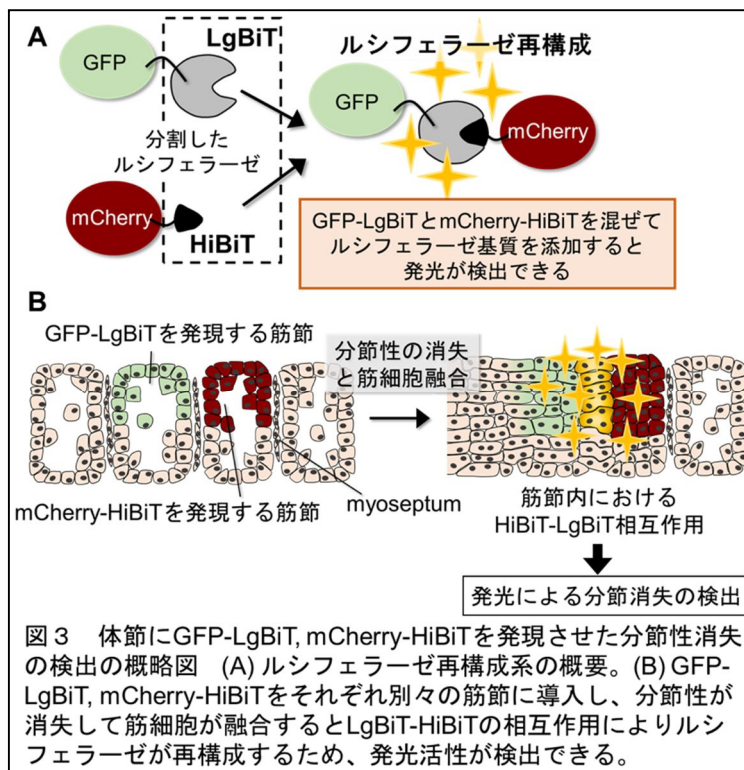


図 3 体節に GFP-LgBiT, mCherry-HiBiT を発現させた分節性消失の検出の概略図 (A) ルシフェラーゼ再構成系の概要。(B) GFP-LgBiT, mCherry-HiBiT をそれぞれ別々の筋節に導入し、分節性が消失して筋細胞が融合すると LgBiT-HiBiT の相互作用によりルシフェラーゼが再構成するため、発光活性が検出できる。

(図5)が、隣り合った体節へ別々のプラスミドを導入するという目的には適さない。そこで、方法Cを考案したが、操作中に体節からプラスミド液が漏れてしまい、安定した結果が得られなかった。

これらの結果を受けて、現在、光照射により蛍光色に変化する蛋白質 Kaede を用いた方法(図4D)を用いて検出系の確立を目指している。これにより複雑な遺伝子導入操作は不要となり、方法Bでの遺伝子導入で実施可能となるため、より安定した検出系が作製できると考える。

ニワトリ胚 *ex ovo* 培養系の樹立

Schmitz⁵らの報告を参考に方法aを実施したところ、HH13までしか発生を進めることができなかった。そこで、Darnell⁶らの報告を参考に方法bを実施したところ、HH15まで安定したの胚発生が確認できた(図6)。これにより、胚発生ステージに関わらず培養開始24時間程度の発生過程の観察が可能となり、24時間のタイムラプス撮影にも成功した。さらに、方法aでは正立顕微鏡での観察のみになるが、方法bではゲルを通して倒立顕微鏡での観察も可能となり、研究の広がり期待できる。今後、作製した検出系と組み合わせることによりこれまで観察することのできなかった myoseptum 消失の瞬間を捉えることができると考えている。

新学術領域研究「哺乳類初期発生の細胞コミュニティー」(2009~2013年度)、「生物の3D形態を構築するロジック」(2015~2019年度)のように、発生学を基盤とした新たな研究分野の創出が行われ、発生学研究の重要性が周知され続け、発生学全体への理解が進んでいる。このような中で、筋発生・筋分化過程の詳細なメカニズムが明らかになりつつある^{1,2}。ただ、体節期に形成される myoseptum は一時的にしか観察できないため、解析は困難であり、体節を越えた筋形成過程についてはほとんど分かっていない。しかし近年、魚類において myoseptum の一部形成に関わる遺伝子が国外のグループだけでなく^{7,8}、国内のグループによっても同定された³。このように、myoseptum の形成過程に関わる遺伝子が同定されたものの、依然、分節性崩壊のような瞬間的に生じる現象を捉えることは難しく、未だ完全な理解には至っていない。

本研究は形態学的な評価を行うだけでなく、その現象の瞬間をとらえることを目標としているため、非常に高い挑戦性を有している。また、独自性の強い本研究で用いる新規検出系の確立は、極めてオリジナリティーが高く、国内外のラボの追従は容易ではない。

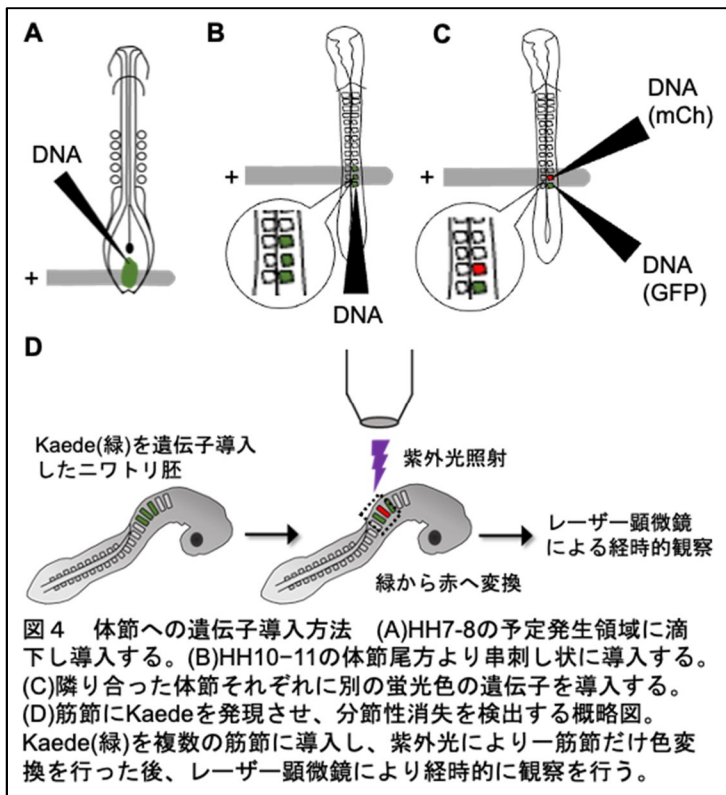


図4 体節への遺伝子導入方法 (A)HH7-8の予定発生領域に滴下し導入する。(B)HH10-11の体節尾方より串刺し状に導入する。(C)隣り合った体節それぞれに別の蛍光色の遺伝子を導入する。(D)筋節にKaedeを発現させ、分節性消失を検出する概略図。Kaede(緑)を複数の筋節に導入し、紫外光により一筋節だけ色変換を行った後、レーザー顕微鏡により経時的に観察を行う。

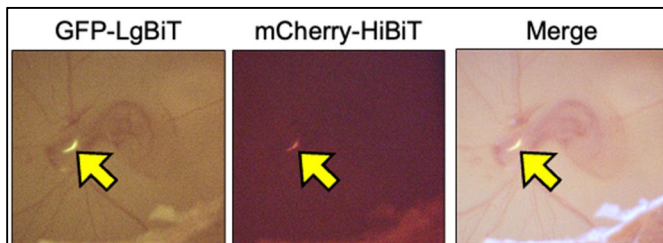


図5 体節への遺伝子導入の成功例
ニワトリ胚(HH11)の体節に串刺しすることで遺伝子導入した。プラスミドはGFP-LgBiTとmCherry-HiBiTを等倍で混ぜて用いた。18時間後、体節に遺伝子が導入されたことが確認できた(矢印部分)。

方法a



方法b

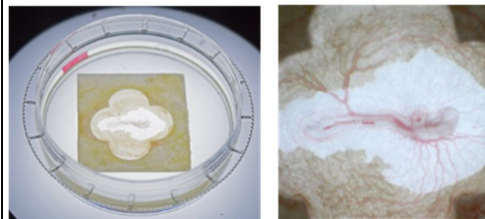


図6 ニワトリ胚 *ex ovo* 培養系の確立
方法a: ニワトリ胚をろ紙で貼り付けるようにして切り出し、ろ紙をステンレスリングで挟んで培養する。表面にはオイルを充填させ、培養皿ごと37°Cに温めたオイルにつけて培養する。
方法b: ニワトリ胚をろ紙で貼り付けるようにして切り出し、卵白で作ったゲルの上に乗せる。37°Cに温めたインキュベータ内で培養する。

<引用文献>

Berti F. Nogueira J. et al., Time course and side-by-side analysis of mesodermal, pre-myogenic, myogenic and differentiated cell markers in the chicken model for skeletal muscle formation., *Journal of Anatomy*, 227, 2015, 361-382.

Mok G. Mohammed R. et al., Expression of myogenic regulatory factors in chicken embryos during somite and limb development., *Journal of Anatomy*, 227, 2015, 352-360.

Abe K. Shimada A. et al., Horizontal Boundary Cells, a Special Group of Somitic Cells, Play Crucial Roles in the Formation of Dorsoventral Compartments in Teleost Somite., *Cell Reports*, 27, 2019, 928-939.

Sato Y. Yasuda K. et al., Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and Notch during somitic segmentation., *Development*, 129, 2002, 3633-3644.

Schmitz M. Nelemans B. et al., A submerged filter paper sandwich for long-term Ex ovo time-lapse imaging of early chick embryos. *Journal of Visualized Experiments*, 2016, 1-12.

Darnell D. Schoenwolf G., The chick embryo as a model system for analyzing mechanisms of development., *Methods in molecular biology*, 135, 2000, 25-29.

Meyers J. Planamento J. et al., Sulf1 modulates BMP signaling and is required for somite morphogenesis and development of the horizontal myoseptum., *Developmental Biology*, 378, 2013, 107-121.

Bricard Y. Ralli re C. et al., Early fish myoseptal cells: Insights from the trout and relationships with amniote axial tenocytes., *PLoS One*, 9, 2014, e91876.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------