

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21770236

研究課題名（和文） 細胞内小器官のダイナミックな構造変化に依存したツメガエル胚発生制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanisms for *Xenopus* embryogenesis dependent on the dynamic shape changes of cytoplasmic organelles

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物のツメガエル胚において細胞増殖後に形態形成が始まる中期胞胚遷移（MBT）の間に細胞内小器官の構造を大きく変化させることを発見した。例えば MBT 期にはタンパク輸送・修飾に必要なゴルジ体が断片から再集積され、mRNA が効率的に分解される P-body が出現する。これらの構造変化は MBT 以降でのタンパク分泌や不要になった母性 mRNA の分解に必要と考えられる。また、MBT における細胞周期の伸長開始の引き金となる分子機構を示した。

研究成果の概要（英文）：

We have found that the cytoplasmic organelles changed dynamically their shape during which the morphogenesis began after cell proliferation at MBT. For example at MBT, the golgi apparatus, which is necessary for protein traffic and modification, was reassembled from its fragments, and the P-body, in which mRNAs degrade efficiently, emerged. We think that these changes were necessary for protein secretion and maternal mRNA degradation after MBT. Otherwise, we showed that the molecular mechanism which triggered the initiation of cell cycle elongation at MBT.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：細胞内小器官、細胞周期、Xenopus、Convergent Extension、P-body、PI3K、PTEN

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 非常に速い卵割が行われるツメガエルの初期胚発生の進行には、卵内に蓄積された母性(由来) mRNA から適切な時期に翻訳されるタンパク群が不可欠となる。特に MBT (中期胚遷移) 期までの卵割期では新たな転写がほとんど起きないため、発生に不可欠な母性 mRNA を分解させない機構が必要となる。母性 mRNA は 3'末端の Poly(A) の増減によって翻訳量が制御され、卵割期の S 期に翻訳抑制される CyclinB や、受精直後から MBT 期まで翻訳抑制される Mos などの Poly(A) 短縮が知られている(文献①)。体細胞では Poly(A) の短縮した mRNA がデキャッピング(5'末端の Cap 構造の除去)されることで分解を受けるが、初期胚では母性 mRNA がデキャッピングを受けないことで安定に存在している(文献②)。しかしながら、MBT 前に母性 mRNA のデキャッピングを受けさせない分子機構は不明のままであった。

(2) 卵割期は 30 分程度の M 期と S 期のみの早い細胞周期だが、MBT 期以降に S 期の伸長と G2, G1 期の出現により細胞周期が伸長する(文献③)。この細胞周期の伸長による G1 期の出現が形態形成に必要な細胞移動(細胞は M 期には移動出来ない)や胚性遺伝子の転写を可能にしている。卵割期の細胞分裂に伴い小さくなる細胞表面積に反比例して MBT 後に細胞周期が伸長する報告がある(文献④)。しかしながら、表面積のサイズ情報が細胞分裂の進行を制御する機構は不明のままであった。

(3) 様々な細胞内小器官は細胞分裂時に等分される必要がある。そのためゴルジ体や小胞体などの比較的大きな膜構造を持つ細胞内小器官は細胞分裂時に小胞状になることが知られている。細胞周期の進行に依存して集合・分散を繰り返すゴルジ体の細胞分裂期における小胞状化機構は G2→M 期のチェックポイントともなっている(文献⑤)。また前述の mRNA のデキャッピングが行われる細胞内構造の P-body は間期の微小管上において集合・形成され、分裂期に消失する報告がある(文献⑥)。これらの報告から MBT 以降の細胞周期の伸長に伴い、細胞内小器官の成長(小胞状から袋状化)や mRNA 分解に必要な P-body が出現し機能する可能性が示唆された。

発生過程を制御する様々な因子の解析は発現量や活性の増減を指標に進める手法が主流となっていた。本研究では初期胚で見られる細胞内小器官の構造のダイナミックな変化が発生の進行と協調して起きている可

能性を考えて、リアルタイムでの細胞内構造変化の解析に最適な透明化割球のシステムによる研究を進めることとした。

(参考文献)

- ① Ueno S. and Sagata N. : *Developmental Biology*. 250(1): 156-167 (2002)
- ② Zhang S. *et al.* : *Methods Comp.Meth.Enzym.* 17: 46-51(1999)
- ③ Iwao Y. *et al.* : *Development Growth & Differentiation*. 47(5): 283-294(2005)
- ④ Wang P. *et al.* : *J.Exp.Zool.* 287: 128-144 (2000)
- ⑤ Colanzi A. and Corda D. : *Current Opinion in Cell Biol.* 19: 386-393 (2007)
- ⑥ Aizer A. *et al.* : *Mol. Cell Biol.* 19(10): 4154-4166 (2008)
- ⑦ Ueno S. *et al.* : *Developmental Biology*. 297(1): 274-283 (2006)

## 2. 研究の目的

ツメガエルの胚発生では未分化な細胞が早い細胞分裂を繰り返す卵割期から、分化した細胞が適切な位置に細胞の移動を行う形態形成期へと移行する。この移行期(中期胚遷移; MBT)に細胞周期の伸長、母性 mRNA の分解、胚性遺伝子の転写などの発生に欠かせないイベントが起きている。一方、我々の確立した透明化割球を用いた実験から MBT 期では様々な細胞内小器官のダイナミックな構造変化が観察されている。本研究では MBT 以降の細胞周期の伸長開始に伴う細胞内小器官の構造変化が更なる細胞周期伸長や母性 mRNA 分解を開始させる発生時計の歯車として機能する新しい概念の発生制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

ツメガエル胚の細胞内小器官(P-body、ゴルジ体、細胞内骨格)の構造を局在配列付の蛍光タンパクおよび蛍光試薬を用いて標識し、特に(本来不透明な)MBT期の初期胚では透明化割球を用いてリアルタイムの構造変化を共焦点レーザー顕微鏡によって解析した。これらの構造変化が発生の進行に必要な細胞内の機能を制御する仮説(P-body出現と mRNA 分解開始、ゴルジ体集合と細胞周期伸長、Ca 濃度上昇に依存した細胞内骨格と細胞内小器官の構造変化)の検証を mRNA 量の RT-PCR、蛍光標識した mRNA の細胞内での検出、FRET 等を用いた細胞周期の位相解析、生細胞内での Ca 濃度変化と

細胞内骨格の同時解析、各種促進・阻害実験等を用いて行った。

#### 4. 研究成果

(1) MBT後のP-bodyの出現と母性mRNA分解の発生過程のライブセルにおけるリアルタイム検出・・・Dcp1-EGFPを発現させた初期胚から単離した生細胞である透明化割球を用いて、mRNA分解のプラットフォームとなる細胞内構造のP-bodyがMBT後に出現することを初めて確認した。また、P-bodyが細胞周期進行に伴って構造変化を行い、同時期の間期の伸長に依存して出現することを確認した。このP-body上において母性mRNAの分解が進行している可能性を検証するために、ULYSIS546で蛍光標識したCyclinB1mRNAの局在と蛍光量変化を確認した。その結果、P-bodyと同様の局在を示し、かつ蛍光量の減少(mRNAの分解)が確認出来た。これらの結果より、母性mRNAの分解が始まる中期胞胚遷移(MBT)以降に細胞周期の伸長に伴いP-bodyが出現し、母性mRNA分解が行われていることを初めて示した。

(2) 細胞表層のタンパク合成促進経路(PI3K-TOR-S6K)の減少によるMBT期の細胞周期伸長開始・・・ツメガエル初期胚では卵割期におけるS期とM期のみの短い細胞分裂から、MBT期(中期胞胚遷移)にS期の伸長とG2期、G1期の出現を伴う長い細胞分裂へと移行する。このMBT期には細胞周期の伸長に伴い、形態形成や胚性の遺伝子転写が始まる。今回、割球細胞の表層近辺の細胞質に局在するPI3Kの制御サブユニットであるp85αが細胞分裂に伴う細胞サイズの減少に伴って低下することをEGFP-p85αや抗体染色によって確認した。更にPI3Kの下流のS6Kの活性がMBT期に減少することを生化学的に検出した。また、PI3K-TOR-S6Kの各因子を阻害・促進することでMBT期における細胞周期伸長のタイミングが変化することを確認した。これらより以前から不明であった細胞の表面積の減少に依存したMBT期の細胞周期伸長開始の分子機構を明らかにした(発表論文①)。

原腸陥入時の中胚葉における細胞周期制御・・・Xenopus初期胚においてMBT期以降に最初に見られる顕著な形態形成として原腸陥入がある。この原腸陥入には外胚葉、中胚葉、内胚葉といった組織の分化が不可欠であり、かつ中胚葉領域での著しいM期細胞数の低下が起きるが、その細胞周期制御は不明な点が多かった。今回、リアルタイムでの細胞周期の位相変化を観察するために、DNA複製因子の分子間FRETの有無と、EGFP-Gemininの局在変化を指標にした解

析を行った。その結果、EGFP-Geminin-Nの核内移行の時期を指標にして、G1期の特定が可能になった。このシステムを用いて、原腸陥入時の各胚葉における細胞周期の位相変化をKeller Explantを用いて観察した。すると外胚葉や中内胚葉(中胚葉の予定頭部側の組織)の細胞に比べ、Convergent Extensionを起こしている中胚葉の細胞においてS/G2期における著しい細胞周期伸長が起きることを明らかにした(学会発表④⑤)。更に細胞周期抑制因子であるPTENが中胚葉のG2期停止に関わる可能性を調べた。その結果、PTENは中胚葉領域において特にG2期に核に移行(残留)しており、PTENの核残留は原腸陥入時に見られるCaイオン濃度の一過的な上昇(G-Campによって可視化)の見られる領域で顕著に起きていることが分かった(学会発表①②)。以前、原腸陥入の進行にPTEN活性が必要であることを示していたが(文献⑦)、今回の結果は細胞周期制御と形態形成との関連を説明する上で未解明だった部分を補完するものである。

これらの結果は最近発表されたG2/M期に依存したWnt経路の活性化が中胚葉で起き得ることを示唆するものであり、初期胚発生の細胞周期と分化過程を協調的に制御する機構を理解する上で非常に興味深い発見である。

(3) 原腸陥入時の中胚葉領域におけるG2期停止とゴルジ構造の再構築・・・細胞内小器官の多くは細胞分裂により各細胞に分配される。その分配のために分裂期には小胞状にゴルジ構造が分断化されるため、核と細胞質間のタンパク質の修飾や分泌経路が維持されていない。そのため中胚葉におけるG2期の停止は、袋状ゴルジによる分泌経路の維持に必要な可能性が高い。そこで中胚葉を含む背側組織片におけるゴルジ構造の変化をGT-KO2を指標に確認した。各発生過程の胚表層の細胞においては、細胞周期の伸長に伴うゴルジ構造成長と袋状化が確認された。一方、Keller外植体において細胞周期の伸長に伴うゴルジ体(小胞状)の成長がGT-KO2とEGFP-Gemininを用いて確認された。これらの結果は中胚葉でのG2期停止によってゴルジ構造が維持されることで中胚葉分化に必要なWntの分泌が行われる可能性を示した。また、核周辺の輸送経路となるゴルジ体の成長がPTENの核移行を促進することで原腸陥入の進行に必要な細胞周期の伸長を促進する可能性も示している。

#### 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 S. Ueno, T. Ueno, Y. Iwao, ; Role of the PI3K-TOR-S6K pathway in the onset of cell cycle elongation during *Xenopus* early embryogenesis. *Development Growth & Differentiation*, (査読有) 53(8), p924-933 (2011)

〔学会発表〕(計 7件)

① 上野 秀一、山口 壮太、岩尾康宏 ツメガエル原腸胚の背側中胚葉における細胞周期制御 第82回日本動物学会 2011年9月21日(旭川・旭川市大雪クリスタルホール)

② 上野秀一、山口壮太、岩尾康宏 Cell cycle arrest of mesodermal cells in *Xenopus* Keller explants 第33回日本分子生物学会 2010年12月8日(神戸・神戸ポートアイランド)

③ 桑名 貴幸、上野 秀一、岩尾康宏 A novel role of extra-mitochondrial citrate synthase during *Xenopus* early embryonic development 第43回日本発生生物学会 2010年6月21日(京都・国立京都国際会館)

④ 上野 秀一、山口 壮太、岩尾康宏 Imaging of the cell cycle phases in *Xenopus* Keller explants 第43回日本発生生物学会 2010年6月21日(京都・国立京都国際会館)

⑤ 桑名 貴幸、上野 秀一、岩尾 康宏 両生類ツメガエルの初期発生におけるクエン酸合成酵素の役割 第32回日本分子生物学会 2009年12月11日(横浜・パシフィコ横浜)

⑥ 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・パシフィコ横浜)

⑦ 上野 秀一、瀧水 智代、岩尾 康宏 Beginning and progression of cell cycle elongation after MBT in *Xenopus* embryos 第42回日本発生生物学会 2009年5月30日(新潟・朱鷺メッセ)

〔その他〕

ホームページ等

(研究概要・成果公表)

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

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