

機関番号：32409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790190

研究課題名（和文） 細胞変形運動から解明する原腸陥入のしくみ

研究課題名（英文） Unique cell movement of isolated embryonic cells during amphibian gastrulation

研究代表者

高野 和敬（TAKANO KAZUHIRO）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：80364769

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物の「形づくり」において「原腸胚形成」は極めて重要な過程であるが、そのしくみはほとんど解明されていない。本研究では、この時期の両生類胚から胚細胞を単離すると自律的かつ胚葉特異的な細胞運動を行うこと、および、この運動が細胞内カルシウムイオン動員機構の発達とアクチン線維を主とした細胞骨格の再構築により制御されていることを明らかにした。さらに、細胞内カルシウムイオン動員機構の発達は原腸胚形成運動の開始と維持において重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Mechanisms of unique cell movement of isolated gastrula cells and roles of this movement in morphogenetic cell movement during gastrulation were studied in amphibian gastrulae. Cell biological study revealed that intracellular Ca^{2+} concentration changes and actin polymerization play in the unique cell movement of isolated gastrula cells and morphogenetic cell movement of intact gastrula. The present study suggested that development and formation of the Ca^{2+} signaling mechanisms in embryonic cells during gastrulation play an important role in the initiation and execution of morphogenetic cell movement during gastrulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
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：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：両生類, 原腸陥入, 形態形成, 細胞運動, カルシウムイオン, カルシウムイオンチャネル, 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

「原腸胚形成」は多細胞動物の「形づくり」において極めて重要な現象であるにもか

わらず、現在までそのメカニズムの実質的な解明が進んでいない。その理由は、原腸胚形成が細胞間接着・細胞-基質間接着・細胞変形・細胞運動・細胞分化などの現象の時間

的・空間的に複雑に絡み合った複合現象であることが要因となっている。

原腸胚形成においてとりわけ重要な現象は、胚表面に存在する予定中胚葉細胞の胚内への潜り込み、すなわち「原腸陥入」である。この原腸陥入が起きる時期に両生類胚を解離して胚細胞を単離すると、自律的な「細胞変形運動」が観察されることが50年以上前に報告されている。しかしながら、それ以降この現象について詳しく調べた報告はほとんどなく、現在では忘れ去られた現象といっても過言ではない。しかし、申請者はイモリ原腸胚を用いた細胞運動の研究中に、原腸胚形成を解明する糸口になると思われるいくつかの新たな知見を得た。すなわち、単離胚細胞の細胞変形運動は、形態形成運動を活発に行う予定外胚葉細胞と予定中胚葉細胞および一部の予定内胚葉細胞でみられること、細胞変形運動に伴って細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することを見出した。

申請者が見出したこれらの現象から、原腸胚細胞の自律的な「細胞変形運動」は細胞内 Ca^{2+} 調節機構により調節されており、この運動性は実際の胚内において外胚葉上皮シートの表面積拡大や予定中胚葉細胞や予定内胚葉細胞の胚内への潜り込みなど、原腸陥入の原動力として働いているのではないかと、この着想を得るに至った。

2. 研究の目的

上に示した現状と背景をもとに、「細胞変形運動が起きるしくみと原腸陥入に果たす役割の解明」を研究目的として設定した。すなわち、胚細胞が原腸胚期に獲得する自律的な細胞変形運動の特徴はどのようなもので、どのようなメカニズムにより制御されているのか、さらに、この運動性は原腸胚形成にどのような役割を果たしているのかについて、細胞変形運動の解析を通してこれら基本原理の解明を研究目的とした。

なお、2年間の期間内に行う研究に関して、より具体的な研究目標を以下のように設定した。

- (1) 細胞変形運動の特性の理解
- (2) 細胞変形運動と細胞内遊離 Ca^{2+} との関係の解明
- (3) 細胞変形運動を制御する細胞内 Ca^{2+} 調節機構の解明
- (4) 細胞変形運動に関与する細胞骨格の解明
- (5) 細胞変形運動が原腸胚形成に果たす役割の解明

3. 研究の方法

研究目的で掲げた研究目標を達成するため、それぞれについて具体的な研究計画を立てて研究を行った。

(1) 細胞変形運動の特性の理解

アカハライモリの原腸胚から各胚葉(外胚葉・中胚葉・内胚葉)に属する細胞を単離して、タイムラプスビデオ撮影により運動様式および部域・発生段階による差異などについて解析する。

(2) 細胞変形運動と細胞内遊離 Ca^{2+} との関係の解明

細胞変形運動には細胞外からの Ca^{2+} の流入は必要なのか、それとも、細胞内にストアされている Ca^{2+} の放出のみで賄われているのかを、細胞外 Ca^{2+} の除去あるいは thapsigargin(小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害薬)を用いて、タイムラプスビデオ撮影により解析する。

(3) 細胞変形運動を制御する細胞内 Ca^{2+} 調節機構の解明

細胞変形運動に関与する Ca^{2+} チャネルの種類、局在様式およびその調節機構について解析する。具体的には、原腸胚細胞に各種 Ca^{2+} チャネルの調節薬(開口促進あるいは阻害)を投与した場合の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化、および、それに伴って細胞変形運動がどのように変化するかを細胞内 Ca^{2+} 濃度測定装置を用いて解析する。また、各種 Ca^{2+} チャネルに特異的に結合する蛍光標識化合物を用いて、原腸胚全体および個々の細胞における各種 Ca^{2+} チャネルの発現および局在様式について解析する。

(4) 細胞変形運動に関与する細胞骨格の解明

単離原腸胚細胞における、微小管、アクチンなどの細胞骨格構造について、特異的蛍光マーカー等を用いて明らかにする。さらに、微小管重合阻害薬、アクチン重合阻害薬などの細胞骨格重合阻害薬を用いて、細胞骨格タンパク質の重合阻害により細胞変形運動がどのような影響を受けるか、タイムラプスビデオ撮影により解析する。

(5) 細胞変形運動が原腸胚形成に果たす役割

の解明

以上の解析結果をふまえて、無傷の原腸胚に各種 Ca^{2+} チャネルの調節薬(開口促進あるいは阻害)を投与した場合の原腸胚形成運動への影響を解析することで、原腸陥入における役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 細胞変形運動の特性の理解

単離胚細胞の細胞変形運動は、中期胚期から発現して初期原腸胚期に活発になることがわかった。初期原腸胚期に単離された予定外胚葉細胞では大きな硝子様仮足(ブレップ)が形成され、この仮足は時間経過とともに細胞周囲を周転する運動を繰り返した。一方、単離された予定中胚葉細胞や一部の予定内胚葉細胞は、硝子様仮足を伴ったシリンダー状の形態をしており、細胞表面には複数の収縮部位が次々と現れた。この収縮部位は時間経過とともに硝子様仮足の反対側へ移動し、これに伴って細胞全体は徐々に伸長した。

(2) 細胞変形運動と細胞内遊離 Ca^{2+} との関係の解明

単離原腸胚細胞にみられる細胞変形運動は、細胞外から Ca^{2+} を除去した条件下でも阻害されなかったが、小胞体 Ca^{2+} ポンプの阻害薬であるタプシガルジンを投与することで完全に阻害された。

(3) 細胞変形運動を制御する細胞内 Ca^{2+} 調節機構の解明

初期原腸胚期に単離した予定外胚葉細胞では、ブレップ領域で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められ、 Ca^{2+} チャネルであるジヒドロピリジン受容体およびリアノジン受容体の開口促進薬投与により細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とそれに伴う細胞運動の活性化が認められた。また、ジヒドロピリジン受容体およびリアノジン受容体の阻害薬投与により予定外胚葉細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は低下して細胞変形運動は阻害された。

初期原腸胚期に単離された予定中胚葉細胞および予定内胚葉細胞では、伸長端領域と細胞表面の収縮部位で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められ、 Ca^{2+} チャネルであるイノシトール3リン酸受容体およびリアノジン受容体の阻害薬投与により細胞内 Ca^{2+} 濃度は低下して細胞変形運動は阻害された。

さらに、各 Ca^{2+} チャネルについて無傷胚における局在を調べたところ、リアノジン受容体は予定外胚葉、予定中胚葉および予定内胚葉のいずれの細胞においても発生初期から細胞内に局在が認められたが、ジヒドロピリジン受容体は原腸胚期以降になって予定外胚葉細胞の側底部の細胞膜付近に強い発現が認められた。また、この時期の予定外胚葉細胞の透過電子顕微鏡観察から、小胞体と細胞膜が 12nm の距離で近接したペリフェラルカップリング構造の急速な増加が確認された。

以上の結果から、予定外胚葉細胞にみられる自律的な細胞変形運動は、原腸胚期になると細胞膜に発現するジヒドロピリジン受容体と小胞体に存在するリアノジン受容体を介した小胞体からの Ca^{2+} の放出(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR)機構によって制御されていることが明らかとなった。予定中胚葉細胞および予定内胚葉細胞にみられる自律的な細胞変形運動は、イノシトール3リン酸受容体およびリアノジン受容体を介して小胞体から放出される Ca^{2+} によって制御されていることが示唆された。

(4) 細胞変形運動に関与する細胞骨格の解明

初期原腸胚期に単離した予定外胚葉細胞では、細胞膜直下に豊富なアクチン線維の存在が認められた。単離された予定中胚葉細胞および予定内胚葉細胞では、収縮部位の細胞膜直下にアクチン線維が細胞の長軸と直交する向きで細胞を取り囲んでいることが確認された。これら原腸胚細胞にみられる自律的な細胞変形運動は、いずれもアクチン重合阻害剤により阻害され、微小管重合阻害剤では阻害されなかった。

(5) 細胞変形運動の原腸胚形成に果たす役割の解明

無傷の初期原腸胚に対してリアノジン受容体の阻害薬投与を行った結果、予定外胚葉の伸展覆いかぶせ運動(予定中胚葉を原口に押し込むドライビングフォースとなる)が阻害された。また、イノシトール3リン酸受容体の阻害薬投与を行った場合は、予定外胚葉の伸展覆いかぶせ運動は阻害されず、予定中胚葉の胚内への陥入および移動運動が阻害された。

これまでの全ての解析結果を統合すると、予定外胚葉細胞では、ジヒドロピリジン受容体とリアノジン受容体による CICR 機構の発

達・確立による Ca^{2+} の動員がアクチン線維の再構築を介して、単離細胞の細胞変形運動および無傷胚における伸展覆いかぶせ運動を制御していることが明らかとなった。予定中胚葉細胞および予定内胚葉細胞では、イノシトール 3 リン酸受容体およびリアノジン受容体からの Ca^{2+} 動員がアクチン線維の再構築を介して、単離細胞の細胞変形運動および無傷胚における胚内への陥入および移動運動を制御していることが示唆された。

本研究により、原腸胚期における胚葉特異的な Ca^{2+} 動員機構の発達が、アクチン線維の再構築を介して細胞運動および原腸陥入の開始と維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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 Takano, K., Obata, S., Komazaki, S., Masumoto, M., Oinuma, T., Ito, Y., Ariizumi, T., Nakamura, H., Asashima, M. (2011). Development of Ca^{2+} signaling mechanisms and cell motility in presumptive ectodermal cells during amphibian gastrulation. *Development Growth & Differentiation* 53, 37-47. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Kamezawa, H. Reconstruction of high-resolution 3D models of embryo and tissue by volume rendering method using serial epon section. 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, パシフィコ横浜(横浜市), 2011. 3. 30.
- ② Takano, K. Development of Ca^{2+} signaling mechanisms and cell motility in presumptive ectodermal cells during newt gastrulation. 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, パシフィコ横浜(横浜市), 2011. 3. 28.
- ③ 小畑秀一. 強固な細胞接着を介さない細胞運動のしくみと脊椎動物胚の形態形成. 日本バイオレオロジー学会主催 第 7 回バイオレオロジー・リサーチ・フォーラム, 東京大学(文京区), 2010. 12. 2.

- ④ 小畑秀一. 細胞内カルシウムイオンによるアカハライモリ胚の原腸陥入の制御機構. 日本解剖学会 第 115 回総会・全国学術集会, 岩手県民会館(盛岡市), 2010. 3. 29.

- ⑤ 高野和敬. イモリ原腸胚から単離した胚細胞にみられる自律的な細胞運動のしくみ. 日本解剖学会 第 115 回総会・全国学術集会, 岩手県民会館(盛岡市), 2010. 3. 28.

- ⑥ 小畑秀一. イモリ初期原腸胚から単離した予定内胚葉細胞にみられる細胞伸長及び細胞運動のしくみ. 日本動物学会 第 80 回大会, 静岡グランシップ(静岡市), 2009. 9. 19.

- ⑦ 増本三香. イモリ胚の原腸陥入における内胚葉細胞の運動と細胞内カルシウムイオン動員機構. 日本動物学会 第 80 回大会, 静岡グランシップ(静岡市), 2009. 9. 19.

- ⑧ 有泉高史. イモリ胚を用いた実験発生学研究の今後の展望と課題～オーガナイザーの誘導特異性と内臓逆位の解析を例に～. 第 29 回胚誘導と形態形成・第 19 回イモリネットワーク共催シンポジウム「イモリでひもとく動物学」, 日本動物学会 第 80 回大会, 静岡グランシップ(静岡市), 2009. 9. 18.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 和敬 (TAKANO KAZUHIRO)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80364769