

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2011

課題番号：21870043

研究課題名（和文） 上皮性形態形成に必須な微小管の機能とその調節機構

研究課題名（英文） Function and regulatory mechanism of the microtubule cytoskeleton required for epithelial morphogenesis in vivo

研究代表者

鈴木 誠 (SUZUKI MAKOTO)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・助教

研究者番号：10533193

研究成果の概要（和文）：上皮性の形態形成運動における微小管の機能とその調節機構を理解するため、ツメガエルとゼブラフィッシュの神経管形成過程をモデルとして発生細胞生物学的な見地から解析を行った。その結果、微小管が神経上皮細胞で起こる伸長運動を促進すること、その機能が xMID タンパク質と Mig12 によって調節されていることを明らかにした。この成果は上皮組織の破綻に由来する様々な疾患の原因解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：To understand the function and regulatory mechanisms of microtubule cytoskeleton in epithelial morphogenesis in vivo, we performed cell biological analyses of neural tube formation in Xenopus and zebrafish embryos. Results presented here showed that correct microtubule organization positively regulates cell elongation, one of the important cellular behaviors in the neuroepithelial cells. We also found that xMID and Mig12 proteins were involved in microtubule-mediated cell elongation. These findings would help us to understand pathological mechanisms of various disorders in human, resulted from the abnormalities in epithelial tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：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：神経管閉鎖、細胞伸長、頂端収縮

1. 研究開始当初の背景

上皮構造は細胞間に強固な接着構造を形成することによって外界と体内の間に境界を創り出すと共に、中枢神経系・消化管系・循環器系などの高度に秩序だった器官の基礎となっている。よって多細胞生物の恒常性維持にとって欠かすことのできない重要な構

造であり、脊椎動物における上皮性の形態形成システムの分子基盤は、解明が待たれる大きなトピックの1つである。中でも中枢神経系の原基である神経管の形成過程は、器官としての重要性に加え、発生初期に起こるダイナミックな形態形成運動であることから、細胞レベルでの解析が最も進んでいる現象と

言える。

神経管形成の過程では、表皮と連続的であった神経板が体幹部側方より隆起しつつ正中線上で融合することにより、頭尾軸に沿った管腔構造（神経管）が形成される。この過程では細胞レベルでもダイナミックなリモデリングが起こっており、頂端-基底軸に沿った細胞の伸長（cell elongation）と頂端側における収縮（apical constriction）により、神経上皮細胞の形態は単純な球型から円錐型へと変化する。この細胞レベルでのリモデリングを制御する機構としてはアクトミオシン系がよく知られており、アクチン結合タンパク質である Shroom がミオシンを活性化し apical constriction を誘導するというモデルが提唱されてきた（Development 135, 1493-1502, 2008）。一方、微小管に関しては Shroom が間接的に γ -tubulin を頂端側に偏在させて非中心体微小管の編成に関わる（Development 134, 1431-1441, 2007）ことが報告されていたが、その役割には不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、神経管形成における微小管の機能とその調節機構を明らかにすることにより生体内で機能する上皮性の形態形成システムの全容解明に近づけると着想するに至った。この考えに立脚し、本研究では“上皮性の形態形成を微小管の振る舞いから理解する”を大きな目的として設定し、分子レベル・組織レベルでの微細操作と細胞の振る舞いが容易に観察できるツメガエル胚とゼブラフィッシュを材料として以下の解析を行った。

(1) 神経管閉鎖における微小管の役割に関する解析

(2) 微小管の振る舞いを調節する因子 xMID 遺伝子の機能解析

(3) ライブイメージング技術を活用した神経管形成過程の定量解析

以上の解析を通して上皮性形態形成における微小管の振る舞いと個々の細胞の形態変化の関連性についての理解を深め、個体発生の原理の理解と医工学的・医学的応用へと繋がる知見の獲得を目指した。

3. 研究の方法

(1) 神経管形成における微小管の機能を細胞・細胞内レベルから探るため、阻害剤により微小管の重合を時期特異的に阻害し、細胞形態、微小管の配向・安定性、アクチン繊維・細胞接着因子・細胞極性因子の分布に与える

影響を主に免疫染色法にて解析した。また、神経管形成における細胞形態と微小管動態の制御に関わるシグナル伝達経路を同定するため、in situ hybridization と免疫染色を利用した迅速アッセイ系を確立し、阻害剤を利用してプロテインキナーゼ、G タンパク質シグナル、セカンドメッセンジャー、カルシウムシグナル経路の神経管形成への関与を調べた。

(2) 以前の解析から神経管形成を制御する因子として同定していた微小管結合タンパク質 xMID の機能解析を(1)と同様の方法にて実施した。また、xMID が有する各ドメインの機能と神経管形成における機能の関連性について、ドメイン欠失型の xMIDs を作製・導入し神経管形成と微小管の分布に及ぼす影響・細胞内局在について精査した。更に xMIDs と直接的に相互作用する PP2A サブユニット Alpha4 や機能未知の Mig12、質量分析を利用して同定した新規の相互作用因子の神経管形成における機能を検討した。具体的には生化学的手法による相互作用の確認、細胞内局在の確認、アンチセンスモルフォリノを用いた機能抑制実験、xMIDs との機能の関連性の確認を行った。

(3) 神経管形成のライブイメージングを高速共焦点レーザー顕微鏡と新型顕微鏡 DSLM を用いて行った。ツメガエル胚・ゼブラフィッシュ胚の神経管形成における神経上皮細胞の形態と核・微小管の挙動を細胞レベルで経時的に観察した。この時、細胞膜移行型・微小管移行型の蛍光タンパク質融合遺伝子を利用し、細胞形態の変化、微小管の重合度とその方向性の変化を、時間空間的に設定した複数ポイントについて計測した。

4. 研究成果

(1) 微小管の重合を阻害したツメガエル胚を解析し、微小管の機能が神経上皮細胞における細胞伸長、頂端収縮、細胞接着に必須であることを明らかにした。更に in situ hybridization と低分子阻害剤を利用した迅速アッセイ系を活用して神経管形成を正に制御する分子経路を複数同定した。免疫染色とライブイメージングを利用して候補分子経路を阻害した胚を観察したところ、グアニル酸シクラーゼの活性を阻害した場合の神経細胞の形態が微小管を阻害したときの細胞形態と類似することが判明し、cGMP/PKG 経路が微小管の分布の調節している可能性が示唆された。

(2) xMID の機能解析を進め xMID が細胞伸長、頂端収縮、細胞接着、微小管ネットワークの再編成に必須であることが明らかにした。一方

で xMID の機能を阻害しても神経組織の発生・分化・背腹軸に沿ったパターンニング、Shh シグナル経路の活性に変化がなかったことから、xMID の機能は神経板(管)を構成する上皮細胞の形態と上皮構造の統合性の制御にあることが示唆された。また既知の相互作用因子と質量分析にて同定した新規の xMID の相互作用因子の機能解析を行ったところ、Alpha4 と質量分析にて同定した Casein kinase II は神経上皮細胞における機能的関連性は検出されなかったが、Mig12 に関しては上皮細胞の形態と微小管再編成の制御において xMID との間に機能的関連性が見出された。また、xMID を発現していることが新たに明らかになった他の上皮性器官において xMID の機能解析を行った結果、xMID の機能を阻害した前腸、前腎管、セメント腺において上皮細胞の形態異常、頂端膜におけるアクチン細胞骨格の集積異常、基底膜におけるラミニンの集積異常が生じることが明らかになった。これらの異常は神経管における上皮細胞の異常と類似していたことから、xMID の微小管に対する機能は神経管に留まらず多くの上皮性器官の形態形成に必須であることが示唆された。

(3) ツメガエル胚に加えゼブラフィッシュ胚のライブイメージングを高速共焦点レーザー顕微鏡と新型顕微鏡 DSLM にて行い、神経管形成における細胞伸長の過程とその際の微小管動態の経時観察を行った。その結果、ゼブラフィッシュの神経管形成過程では 30 分から 1 時間程度の間に正中線付近の細胞が急激に伸長することが分かった。この時の微小管の動態を観察すると内外方向に極性化していることから、ゼブラフィッシュにおいて微小管は内外方向に安定化することで細胞の伸長を制御する可能性が示唆された。

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 4 件)

1. Suzuki, M., Hara, Y., Takagi, C., Yamamoto, T. S., & Ueno, N. (2010) MID1 and MID2 are required for *Xenopus* neural tube closure through the regulation of microtubule organization. **Development**, 137, 2329-2339. 査読有
2. Ohgo, S., Itoh, A., Suzuki, M., Satoh, A., Yokoyama, H. & Tamura, K. (2010) Analysis of *hoxa11* and *hoxa13* expression during patternless limb regeneration in *Xenopus*. **Developmental Biology**, 338, 148-157.

査読有

3. Tao, H., Suzuki, M., Kiyonari, H., Abe, T., Sasaoka, T. & Ueno, N. (2009) Mouse *prickle1*, the homolog of a PCP gene, is essential for epiblast apical-basal polarity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 106, 14426-14431. 査読有
4. Yakushiji, N., Suzuki, M., Satoh, A., Ide, H. & Tamura, K. (2009) Effects of activation of Hedgehog signaling on patterning, growth and differentiation in *Xenopus* froglet limb regeneration. **Developmental Dynamics**, 238, 1887-1896. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Suzuki, M. & Ueno, N. Spatio-temporal pattern of non-muscle myosin II activity in zebrafish neurulation (A62). **Joint meeting of the German and Japanese societies of developmental biologists**. 2011年3月24日. Dresden, Germany.
2. 鈴木 誠. 神経管の形成における細胞の伸長と細胞骨格によるその制御機構 (ナイトレクチャー). 「三次元構造を再構築する再生原理の解明」トレーニングコース. 2011年3月10日. 愛知.
3. Suzuki, M., Hara, Y., Takagi C., Yamamoto, T. S. & Ueno, N. *MID1* and *MID2* are required for *Xenopus* neural tube closure through the regulation of microtubule organization (P108). **The 16th international conference of the international society of differentiation**. 2010年11月16日. 奈良.
4. 鈴木 誠. 神経管形成における細胞レベルでの形態変化と細胞骨格の制御 (32). **定量生物学の会 第 2 回年会**. 2010年1月10日. 大阪.
5. 鈴木 誠, 原祐介, 山本隆正, 高木知世, 上野直人. MID1/2 は微小管の調節を介して神経管閉鎖における上皮の統合性を維持する (4-4). **第 3 回日本アフリカツメガエル研究集会**. 2009年10月6日. 広島.
6. 【招待講演】 Suzuki, M., Hara, Y., Yamamoto, T. S., Takagi, C. & Ueno, N. Regulation of microtubule organization by xMID is essential for maintaining tissue integrity in *Xenopus* neural tube closure (S08-05). **16th international society of developmental biologists congress**. 2009年9月8日. Edinburgh, UK.
7. 鈴木 誠, 原祐介, 山本隆正, 高木知世,

上野直人. Regulation of microtubule organization by xMID is essential for maintaining tissue integrity in *Xenopus* neural tube closure (WS6-04).
日本発生物学会 第42回大会. 2009年5月30日. 新潟.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 誠 (SUZUKI MAKOTO)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・助教

研究者番号：10533193