

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770261

研究課題名(和文) 生体内上皮構造の形成に必須なセカンドメッセンジャーコード

研究課題名(英文) Second messenger systems 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：上皮性の形態形成運動におけるセカンドメッセンジャー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、細胞内カルシウム経路が神経上皮細胞で起こる頂端収縮を促進すること、その機能の一部が細胞外ATP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 function and regulatory mechanism of second messenger systems in epithelial morphogenesis in vivo, we performed cell biological analyses of neural tube formation in *Xenopus* and zebrafish embryos. Results presented here showed that intracellular calcium ion signaling positively regulates apical constriction, one of the important cellular behaviors in the neuroepithelial cells. We also found that extracellular ATP was involved in calcium-mediated apical constriction. These findings would help us to understand pathological mechanisms of various disorders in human, resulted from the abnormalities in epithelial tissues.

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 頂端収縮 カルシウム

### 1. 研究開始当初の背景

上皮は生体内構造の基本単位であり、隣接する細胞との間に安定した接着構造を形成し、外界と体内を分ける物理的境界や、中枢神経系・消化管系・循環器系などの複雑な器官を創り出す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と言える。一方で神経管は胚の背中側に一過的に形成される脊椎動物の脳や脊髄のもとになる上皮性のチューブ状の構造で、その形成過程は胚発生の初期に起こる顕著な上皮性の形態形成運動である。

一方、セカンドメッセンジャーは細胞外からの化学的・物理的刺激に応答して細胞内で産生され、限られた時間で細胞外刺激を増幅する物質である。結果として引き起こされる細胞応答は遺伝子発現制御、細胞骨格制御、小胞輸送など多岐に渡ることから、神経管の形成過程でセカンドメッセンジャーが機能すると考え、研究代表者らはツメガエルとゼブラフィッシュをモデル生物として低分子化合物を利用した予備実験を行った。その結果、細胞内  $Ca^{2+}$  経路、細胞内 cGMP 経路の阻害により神経管の閉鎖過程が遅延することを見出した。更に、阻害胚で神経前駆細胞の収斂運動と形態の異常、細胞突起の消失が引き起こされたことから、細胞内  $Ca^{2+}$ 、cGMP 濃度の時空間的な動態変化が個々の細胞の挙動を制御することで、神経管の形成過程を適切に制御している可能性が示唆された。更に、上皮性の形態形成システムは他の器官、モデル生物でも共通したメカニズムとして機能していると予想されることから細胞内  $Ca^{2+}$ 、cGMP が関連するシグナル経路は、他の生体内上皮性構造の形成過程にも寄与している可能性が高いと考えられた。

### 2. 研究の目的

上皮性器官の形態形成の分子基盤を明らかにするためゼブラフィッシュとアフリカツメガエルの神経管形成過程をモデルとしてセカンドメッセンジャー、特に細胞内経路の機能とその制御機構を明らかにする。モデル生物の特色を生かした細胞生物学的解析と光学顕微鏡を活用した定量的解析によりこの問題に取り組み、得られた成果から神経系構築の理解に留まらない上皮性器官の形成機構の基本原理の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1)  $Ca^{2+}$ プローブと cGMP プローブを用いて高速イメージングを行い、得られたデータの定量解析から細胞内  $Ca^{2+}$ 、cGMP 経路の動態と上皮細胞の挙動の間に存在する時空間的な関連性を明らかにする。

(2) モルフォリノ、変異型コンストラクト、ケージド化合物を導入した細胞の動態解析を通して着目するシグナル経路と細胞形態、神経管形態の間に存在する因果関係を明ら

かにする。

(3) 細胞極性因子や接着因子との機能的な相互作用を細胞生物学的解析により検証し、上皮性器官において着目するシグナル経路の活性を調節するメカニズムを明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) カルシウム経路と cGMP 経路の動態を可視化する蛍光プローブを初期神経胚に発現させてタイムラプス観察を行った結果、神経管形成過程において cGMP 経路は顕著な動態変化を示さない一方、 $Ca^{2+}$ 経路は神経上皮細胞で一定の頻度で活性が変化することが明らかになった。統計学的手法により  $Ca^{2+}$ 経路の活性パターンを詳しく解析した結果、神経管の形成過程で特異的に大規模かつ高頻度での細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の上昇が起こること、それが神経管の閉鎖速度の一過的な加速と時空間的に関連があることが明らかになった。この時、神経上皮細胞は伸張運動と頂端収縮運動を起こしたことから、神経管形成過程でのカルシウム経路は動的な性質を持ちかつ細胞形態形成を制御する可能性が示唆された。従って以降の解析は  $Ca^{2+}$ 経路に着目して行った。

(2)  $Ca^{2+}$ 経路の動態を阻害する変異型コンストラクトや小分子化合物を初期神経胚に作用させて影響を解析した結果、カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼ MLCK のドミナントネガティブ変異体、膜電位依存性の  $Ca^{2+}$ チャネルの阻害剤、更に小胞体からの  $Ca^{2+}$ 放出に関する経路の阻害剤が神経管形成を阻害することが分かった。単細胞レベルでの観察では処理胚では頂端収縮が阻害されていた。従って  $Ca^{2+}$ 経路は頂端収縮を促進する機能があることが示唆された。この可能性は、ケージド化合物による人為的な  $Ca^{2+}$ 経路の活性化が頂端収縮に似た細胞形態変化を誘導したことからも支持された。次に神経管形成過程におけるカルシウム活性の時空間的なパターンの変化が頂端収縮と閉鎖運動の進行に与える効果について数理モデルを用いて検討した結果、 $Ca^{2+}$ パターンには閉鎖運動に対して非線形の効果があること、更にこの効果は一過的な  $Ca^{2+}$ 経路の活性化に依らない持続的な閉鎖運動の効果と独立に与えられることを示唆する結果が得られた。この結果は神経管の形成過程での  $Ca^{2+}$ パターンの存在意義を示唆するものである。

(3)  $Ca^{2+}$ 経路の動的な性質を制御する上位の機構を明らかにするため、神経管形成過程での機能が明らかになっている細胞極性因子(非古典的 Wnt/PCP 経路)やアクチン結合タンパク質、非筋型ミオシンの機能を抑制した時の  $Ca^{2+}$ 動態を解析したが明らかに変化は見られなかった。このことは  $Ca^{2+}$ 経路が神経

管形成においては新規の機構により調節されていることを示唆する。そこで  $\text{Ca}^{2+}$  経路を細胞外から制御する因子の候補として細胞外 ATP に着目し  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法と種々の阻害実験を組み合わせて、神経組織における細胞外 ATP の存在と機能を検討した。まず細胞外 ATP が神経管形成に与える影響を検討するために胚に ATP を添加した結果、神経板の大規模な収縮運動が観察された。この時の細胞内カルシウムの動態を観察した結果、ATP 添加直後に大規模な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が起こった。生理的条件下に存在する細胞外 ATP の機能を検討するために細胞外に ATP 分解酵素を強制発現した結果、神経管の閉鎖運動時に生じる  $\text{Ca}^{2+}$  変動の伝播現象が減少することが明らかになった。更に内在性の細胞外 ATP を可視化して観察した結果、ATP 結合能に依存してシグナルの上昇が見られた。以上の結果は、初期神経細胞の間隙には ATP が存在し、それがカルシウム動態の活性化を通して神経管の閉鎖運動を制御する可能性を示唆している。これを検証するため、Caged-ATP の UV 照射系を導入して細胞外 ATP の細胞形態形成への影響を調べた結果、ごく局所的な ATP の投与は一過的かつ伝播性の  $\text{Ca}^{2+}$  活性の上昇を引き起こし更に ATP 源を中心とした短時間での組織変形を誘導した。この時に細胞頂端面の面積減少が観察されたことから細胞外 ATP は頂端収縮を誘導することが示唆された。更に細胞外 ATP と既知の神経管閉鎖の制御因子との相互作用について検討した結果、細胞外 ATP による頂端収縮には神経管閉鎖の制御因子の一部の機能を必要とすることが明らかになった。以上より  $\text{Ca}^{2+}$  活性は他の神経管制御因子と協調的に頂端収縮を引き起こすという、新規の頂端収縮の分子機構を提唱することができた。

#### 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Directional migration of leading-edge mesoderm generates physical forces: Implication in *Xenopus* notochord formation during gastrulation. Y Hara, K Nagayama, TS Yamamoto, T Matsumoto, M Suzuki, N Ueno. *Developmental biology*. 382, 482-495, 2013. 査読有. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.07.023
2. Transgenic *Xenopus laevis* for live imaging in cell and developmental biology. C Takagi, K Sakamaki, H Morita, Y Hara, M Suzuki, N Kinoshita, N Ueno. *Development, growth & differentiation*. 55, 422-433, 2013. 査読有. DOI: 10.1111/dgd.12042
3. Translation of incenp during oocyte maturation is required for embryonic

development in *Xenopus laevis*. GG Leblond, H Sarazin, R Li, M Suzuki, N Ueno, XJ Liu. *Biology of reproduction*. 86, 161, 2012. 査読有. DOI: 10.1095/biolreprod.111.097972

4. Molecular mechanisms of cell shape changes that contribute to vertebrate neural tube closure. M Suzuki, H Morita, N Ueno. *Development, growth & differentiation*. 54, 266-276, 2012. 査読有. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2012.01346.x

〔学会発表〕(計9件)

1. ゼブラフィッシュ神経管における周期的な収縮運動. 鈴木誠. 平成25年度日本動物学会中部支部大会. 2014年3月8日. 岡崎コンファレンスセンター(愛知県).
2. 上皮性器官の形成における細胞と細胞骨格の動態に関する研究. 鈴木誠. 生命情報科学若手の会第5回研究会. 2014年2月18日. 東京大学検見川セミナーハウス(千葉県).
3. Periodic contraction of actomyosin network during convergence movements in zebrafish neurulation. 鈴木誠. 第19回小型魚類研究会. 2013年9月20日. 仙台市情報・産業プラザ(宮城県).
4. 【招待講演】上皮性器官の形態形成を支える細胞と細胞骨格の動態の制御. 鈴木誠. 第53回生物物理若手の会夏の学校. 2013年9月8日. 伊豆長岡温泉えふでの宿小松家八の坊(静岡県).
5. Periodic contraction of actomyosin network during convergence movements in zebrafish neurulation. 鈴木誠. 8th European Zebrafish Meeting. 2013年7月13日. Palau de Congressos de Catalunya (Spain).
6. Control of apical constriction by dynamic calcium signaling during *Xenopus* neural tube closure. 鈴木誠. 17th International Congress of Developmental Biology. 2013年6月16日. Cancun Convention Center (Mexico).
7. 【招待講演】The role of intracellular calcium signaling in apical constriction during *Xenopus* neural tube closure. 鈴木誠. 日本発生生物学会第45回大会. 2012年5月30日. 神戸国際会議場(兵庫県).
8. 脊椎動物の神経管にみる細胞の挙動とその制御機構. 鈴木誠. 定量生物学会第4回年会. 2012年1月8日. 名古屋大学野依記念学術交流館(愛知県).
9. Spatio-temporal pattern of

non-muscle myosin II activity in zebrafish neurulation. 鈴木誠. 日本発生生物学会第44回大会. 2011年5月20日. 沖縄コンベンションセンター (沖縄県) .

[図書] (計1件)

1. Neural Tube Closure in Xenopus. H Morita, M Suzuki, N Ueno. Xenopus Development. 163-185, 2014. Willy. DOI: 10.1002/9781118492833.ch9

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