

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770215

研究課題名(和文) 体幹部組織群の配置転換現象におけるフィブロネクチンダイナミクスの役割

研究課題名(英文) Roles of fibronectin dynamics in tissue remodeling

研究代表者

佐藤 有紀 (Sato, Yuki)

熊本大学・大学院先導機構・助教

研究者番号：90508186

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)：組織群の形態形成機構を細胞挙動とその足場(細胞外基質)制御の観点から理解する為、体節・内胚葉・脊索間隙に特徴的な蓄積パターンを示すフィブロネクチン(FN)繊維に注目し、その蓄積パターンが細胞挙動に果たす特異的役割、蓄積パターンができる仕組み、足場情報を細胞内へ伝える分子機構をタイムラプス観察解析により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at further understanding the mechanisms of tissue morphogenesis from the perspective of cell behaviors and substrate patterning. Fibronectin (FN) fibrils are characteristically patterned between somites, endoderm, and notochord. We investigated the specific role of patterned FN fibrils in cell behaviors, mechanisms underlying patterned FN deposition, and molecules involved in substrate-cell interaction by time-lapse imaging analysis.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：細胞外基質 フィブロネクチン イメージング 体節 内胚葉

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の初期胚の体幹部は、正中線上に神経管と脊索、その両側に体節、さらにその側方に側板という平面的な配置パターンをもつ。これらの組織群は、発生が進行するに従い、神経管と体節は背側へ、側板と内胚葉は腹側へと相対的に位置を変化させ、成体型の位置関係を確立する。近年、前後軸に沿って起こるグローバルな形態変化のひとつ、収束伸長現象の分子機構は、かなり詳細になっているが、発生初期の平面的パターンが立体的に変化するしくみは、ほとんど理解されていない。

大動脈の形成過程は、組織配置転換現象を顕著に示す例である。大動脈の前駆組織として知られる背側大動脈は、からだの側方に左右平行に現れる。二本の背側大動脈は、発生が進むに従い正中軸方向へと移動し、やがて正中線上で出会い、最終的に融合して一本の大動脈となる。申請者のこれまでの研究から、背側大動脈が移動して正中線上で融合する際、体節-内胚葉-脊索間隙において、細胞外基質フィブロネクチンがダイナミックに分布パターンを変化させることがわかっている。フィブロネクチンの時空間的分布変化が体幹部組織群の細胞挙動に重要な役割を果たしていることが予想された為、以下の研究を行った。

## 2. 研究の目的

体節-内胚葉-脊索間隙に特徴的な蓄積パターンを示すフィブロネクチン繊維が、それぞれの組織内を形作る細胞挙動に対してどのように作用するのかを明らかにする。また、フィブロネクチン繊維束の蓄積パターンを作り出すしくみを解明する。これにより、組織群の形態形成機構を細胞挙動とその足場(細胞外基質)パターン制御の観点から理解する。

## 3. 研究の方法

発生中の体幹部腹側へアクセスしやすく、タイムラプス観察が可能なウズラ胚を用い、以下の実験を行った。

### (1) 体節・内胚葉の可視化の為に蛍光標識とタイムラプス観察

体節と内胚葉の位置がどう変化するのかを詳細にするため、エレクトロポレーション法を用いて、発生中のウズラ胚内へ蛍光レポーター遺伝子を導入し、それぞれの組織の核を蛍光標識した。

### (2) ファイブロネクチン繊維束の可視化

ファイibroネクチン繊維束が体節-内胚葉-脊索間にアセンブルされる過程をタイム

ラプス観察する為、以下の実験を行った。

ウシ由来の精製ファイibroネクチン(FN)をAlexa488で標識し、ウズラ胚内へ顕微注入した。Alexa488標識ファイibroネクチン(FN-Alexa488)が内在性のファイibroネクチン繊維へ取り込まれる様子をタイムラプス観察解析した。

ウズラのファイibroネクチン1(qFN1)遺伝子(全長約7.5kb)をRT-PCR法を用いて単離した。Ohashiら(PNAS 1999)の報告に従い、ウズラFN1遺伝子の3番目と4番目のFNドメイン間へEGFP遺伝子を挿入し、EGFP融合ウズラFN1(qFN1-EGFP)を作製した。エレクトロポレーション法を用いてqFN1-EGFP発現ベクターをウズラ胚の体節あるいは内胚葉へ導入し、EGFP標識されたFN繊維の検出を試みた。

### (3) ファイibroネクチンの機能障害

ファイibroネクチンが細胞挙動にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするため、時期・組織特異的な機能障害実験を行った。

ウズラFN1遺伝子に改変を加え、ドミナントネガティブ型FN1(70kDa FN)を作製した。70kDa FNを発現するベクターをエレクトロポレーション法を用いてウズラ胚内へ導入した。

shRNAコンストラクトを作製し、これを体節、内胚葉それぞれへ導入し、FN1遺伝子のノックダウン実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 体節・内胚葉の可視化

ウズラ胚の体節および内胚葉細胞へ特異的に遺伝子を導入するエレクトロポレーション法を確立した。これにより、各組織の細胞群を蛍光タンパク質により標識し、タイムラプス観察解析できるようになった。

### (2) FN繊維束の可視化による、FNパターンニング機構の解明

FN-Alexa488を顕微注入したウズラ胚に対して、抗FN抗体を用いた免疫染色を行い、FN-Alexa488が内在性のFNと共局在していることを確認した。すなわち、FN-Alexa488は内在性のFN繊維束に取り込まれる性質を有しており、FN繊維のタイムラプス観察に有効であることが示された。この標識方法を用いてタイムラプス観察を行った結果、FN繊維は体節-内胚葉-脊索間隙をブリッジするように配置されること、さらに、FN繊維がアセンブルされる位置は、体節上皮細胞が基底膜側に形成する糸状仮足と一致することが判明した。さらに、組織間をブリッジするFN繊維の分布には、体節上皮細胞の糸状仮足との相互作用が重要であることが分かった。

作製した qFN1-EGFP 発現ベクターを培養細胞へトランスフェクション後、抗 FN 抗体を用いた免疫染色を行い、qFN1-EGFP が内在性の FN と共局在していることを確認した。さらに上記(1)で確立した方法を用いて、qFN1-EGFP 発現ベクターを体節、内胚葉へそれぞれ特異的に導入し、それぞれの組織から産生される qFN1-EGFP がどこに蓄積するのかを調べた。その結果、内胚葉に由来する qFN1-EGFP が体節-内胚葉間隙に分布する FN 繊維に寄与することが分かった。

### (3) 体節細胞の挙動とフィブロネクチン繊維パターンとの関わり

単離した qFN1 遺伝子配列をもとに、ドミナントネガティブ型 qFN1 (70kDa qFN1) 発現ベクターを作製し、培養細胞を用いて FN の機能阻害効果を確認した。また、これをウズラ胚内へ強制発現させ、影響を調べた。ドミナントネガティブ型 qFN1 を発現させた胚では、体節-内胚葉間隙の FN の正常な蓄積パターンが乱れ、体節上皮細胞の仮足形成および移動が正常に起こらなかったことから、FN 繊維は体節上皮の基底膜仮足形成、細胞移動に必須であることが明らかになった。

上記(2)の実験から、内胚葉が FN の産生組織である可能性が示唆された。この可能性を検証する為、shRNA 法を用いて内胚葉細胞特異的に qFN1 のノックダウン実験を行った。その結果、体節-内胚葉間隙の FN 繊維の蓄積が有意に低下したことから、内胚葉が FN 繊維の主な供給源であることが分かった。

### (4) 体節上皮細胞の糸状仮足と FN の相互作用機構

体節上皮細胞の糸状仮足と FN 繊維の相互作用機構を明らかにする為、インテグリン受容体および細胞内で働くアクチン細胞骨格関連分子群の関与を調べる実験を行った。その結果、FN が糸状仮足のインテグリン 1 受容体および機械刺激メディエーターの Talin を介して足場情報を体節上皮細胞に伝え、細胞挙動を制御していることが判明した。

## 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3件)

Sato Y, Lansford R, "Transgenesis and imaging in birds, and available transgenic reporter lines." *Development, Growth and Differentiation*, 査読有, Vol.55, NO. 4, 2013, p406-421 DOI: 10.1111/dgd.12058

Sato Y, "Dorsal aorta formation: Separate origins,

lateral-to-medial migration, and remodeling." *Development, Growth and Differentiation*, 査読有, Vol. 55, No. 1, 2013, p113-129

DOI: 10.1111/dgd.12010

佐藤 有紀, トランスジェニックウズラ胚を用いた血管のタイムラプス観察、顕微鏡、査読有、47 巻 4 号、2012 年、186-190 頁

[http://www.microscopy.or.jp/magazine/47\\_4/mokuji.html](http://www.microscopy.or.jp/magazine/47_4/mokuji.html)

### [学会発表](計7件)

Sato Y, Huss D, Lansford R, トランスジェニックウズラ胚を用いた血管のライブイメージング解析、2013 年 12 月 10 日、第 1 回ウズラ研究会、名古屋大学

佐藤 有紀, 血管および体節の形態形成を支える細胞群のふるまい。日本動物学会第 84 回大会 2013 年 9 月 26-28 日、岡山大学

Sato Y., Nagatoshi K., Imamura Y., Hamano A., Uchida S., "Role of somitic cell protrusions in the paraxial tissue morphogenesis". CMCB congress., June 14-16, 2013, Suzhou International Expo Center, China

Sato Y, Huss D, Poynter G, Fraser S.E, Lansford R, "Dynamic imaging analysis of blood vessel formation in transgenic quail embryo". 20th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, December 7, 2012, Awagin Hall, Tokushima, Japan

Sato Y, Nagatoshi K, "Role of somitic filopodia in the collective morphogenesis of paraxial tissues." 7th International Chick Meeting, November 14-18, 2012, Nagoya University, Japan

佐藤 有紀, ラスティー ランスフォード、血管形成を支える細胞の動き。第 22 回日本数理生物学会、2012 年 9 月 12 日、岡山大学

Sato Y, Nagatoshi K, "Role of somitic filopodia in the collective morphogenesis of paraxial tissues." Joint Meeting of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Developmental Biologists & the 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology, May 28-31, 2012, Kobe International Conference Center, Japan

### [その他]

ホームページ等

<http://bloodvesseldynamics.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 有紀 ( SATO, Yuki )

熊本大学・大学院先導機構・特任助教

研究者番号：90508186