

令和元年6月1日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06169

研究課題名(和文) 胚葉極性を具現化する中心体移動依存的な核移動の制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism that regulates centrosome-dependent migration of the nucleus

研究代表者

高鳥 直士 (Takatori, Naohito)

首都大学東京・理学研究科・准教授

研究者番号：70404960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：海産無脊椎動物のホヤ胚を用いて、中内胚葉細胞が分裂し、中胚葉運命と内胚葉運命を互いに異なる細胞に分配される機構を調べた。運命分離に重要なNot mRNAを中胚葉細胞に非対称分配する、中内胚葉細胞の核移動を時間的・空間的に詳細に記載し、核移動を司る機構の解析に必要な情報を整備した。中内胚葉細胞の形態変化がNot mRNAの非対称分配に重要であることを見出し、形態変化には動物・植物半球の細胞周期のズレが重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚葉形成過程を細胞レベルで理解しようとする研究は、多くの動物では細胞系譜が決定されていないため難しい。本研究はホヤ胚発生特長を活かし、胚葉運命分離過程の理解を細胞レベルで進めた。細胞内小器官(この場合、細胞核)を移動させる力の解析に備え、細胞内小器官の位置を経時的かつ空間的に正確に記載する方法を確立した。また、リンゼいつ細胞間の細胞周期の違いに由来する、中内胚葉細胞形態の変化が中胚葉運命と内胚葉運命の分離に重要であることを明らかにした点が画期的である。

研究成果の概要(英文)：During the development of an ascidian, *Halocynthia roretzi*, the mesendoderm cell divides and forms daughter cells which are fated to produce mesoderm and endoderm cells. Asymmetric partitioning of mRNA encoding Not to the mesoderm daughter is central to this fate segregation. In order to understand the mechanism that partitions Not mRNA, I analyzed the movement of the nucleus which is coupled to the localization of Not mRNA. Results of the 4D characterization of nuclear position within the mesendoderm has been obtained and should provide basis for further analysis of the mechanism that regulates nuclear movement. I found that the morphological change of the mesendoderm cell that accompanies nuclear migration is also important for Not mRNA partitioning. The deformation of the mesendoderm cell was caused by cell cycle differences between the animal- and vegetal-hemispheres.

研究分野：発生生物学

キーワード：胚葉 細胞分化 細胞形態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胚葉形成は、胚発生に伴い多種多様な細胞が作られる過程の基礎をなす。胚葉形成の過程を理解することは、いかにして細胞分化により様々な機能と形態を持つ細胞が作られるか理解するために重要である。しかし、胚葉運命を互いに異なる細胞に分配する機構は、多くの動物で十分に理解されているとは言えない。細胞レベルで胚葉運命を互いに異なる細胞に分配する機構は、線虫とホヤ (*Halocynthia roretzi*) で解析が進んでいる。ホヤでは中内胚葉細胞が非対称に分裂し、転写因子 Not をコードする mRNA を多く受け継いだ娘細胞から中胚葉運命の細胞が生じ、少なく受け継いだ細胞から内胚葉が生じる。Not mRNA はまず、中内胚葉細胞の中で将来中胚葉細胞になる領域に局在し、その後細胞質分裂により中胚葉細胞へと分配される。Not mRNA の局在には、中内胚葉細胞の細胞核が将来の中胚葉領域へと移動することが重要である。細胞核の移動を制御する機構を調べた結果、核の移動には微小管細胞骨格が重要であることがわかった。核の移動方向を決定するには Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) タンパク質の細胞内局在が重要であることがわかってきた。PI3K の局在は、受精直後の卵細胞質再配置により開始され、4 細胞期から核が移動する 16 細胞期までの PI3K シグナルにより維持されることがわかった。これにより、受精から中胚葉運命と内胚葉運命の分離に至るまでの過程の枠組みを明らかにすることができた。一般に、PI3K シグナルは、細胞外リガンドの受容体への結合により開始され、PI3K を含む細胞内因子の活性化により伝達され、遺伝子発現や細胞骨格の活性化に至る。シグナル伝達経路において PI3K の下流に位置する因子が核移動に必要であることがわかってきた。核を中胚葉側に移動させる機構を理解するためには、こうした下流因子がどのように核を移動させる力の向きを制御するのか明らかにする必要がある。しかし、移動中の核にどのような力が、どのような方向にかかるのかわかっていなかった。これらの点を明らかにするためには、核の空間的位置が経時的にどのように変化するか明らかにする必要がある。しかし、このような情報は得られていなかった。

2. 研究の目的

中胚葉と内胚葉の運命を、互いに異なる娘細胞に分離する機構を理解するためには、mRNA の局在に重要である、核の移動を司る機構を理解することが必要である。そのためにはまず、核の移動を経時的に、かつ空間的に記載し、移動方向を正確に把握することが必要である。次に核移動には細胞骨格が必要であることがわかっているため、細胞骨格の配向を空間的に記載し、これを制御する機構を明らかにすることが有効であると推測される。これらの解析をとおして、Not mRNA を非対称に分配させる機構を明らかにする。

3. 研究の方法

中内胚葉細胞の細胞核の位置を経時的に記載するために、核と細胞骨格を染色して共焦点顕微鏡により撮影した。細胞を空間的に等方的に撮影するために、サンプルの調整方法、撮影方法を開発した。画像から、核の位置と細胞形態を定量的に記載し、その変化を統計的に解析するためのソフトウェアパイプラインを整備した。研究の途中で、細胞形態の変化が Not mRNA の非対称分配に重要であることを示唆する観察結果が得られたので、細胞形態を操作するために、細胞形態の制御に関わる因子をコードする遺伝子をクローニングし、常活性型とドミナントネガティブ型を作成した。これらを細胞特異的に顕微注入により導入することで、中内胚葉細胞ならびにその隣接細胞の形態変化を細胞特異的に阻害し、Not mRNA の非対称分配への影響を検証した。既知の細胞周期関連因子の発現と修飾を免疫染色法により観察することで、中内胚葉細胞と隣接細胞の細胞周期のズレを観察した。細胞特異的な顕微注入法を利用することで、個々の細胞周期を操作し、Not mRNA の非対称分配が攪乱されるか調べた。

4. 研究成果

まず中内胚葉細胞の核移動を空間的に記載した。水浸レンズを用いて生体を経時的に観察する方法は、屈折率の差による画像の歪みを生じるため、核の空間的位置の変化を記載するには不適當であると考えた。まず固定胚を用いた観察を行い、次に生体での観察により確認する方法をとった。固定胚の場合、胚のサイズに個体差があるため、ステージ間の計測結果を単純に比較することはできない。そこで、統計的手法と細胞表面のラベリングにより核の位置を比較し、軌跡を記載する方法を確立した。

観察の結果、核移動は細胞表面へと移動する第一段階と、細胞表面において将来の中胚葉側へと移動する第二段階とに分けられることがわかった。いずれの段階でも、中心体が核を先導していた。第一段階における核と中心体の到達点は一定の領域に収束しており、同じ領域が将来の分裂溝形成位置である、という興味深い結果が得られた。第二段階では、中心体が中胚葉側へと移動し、同時に核が中胚葉側へと移動した。この間、Not mRNA のシグナルはほぼ核内で観察された。第二段階の移動が終了したのちに細胞が M 期に入り、分裂装置が形成され、細胞質分裂が進行した。

第二段階終了後に、中内胚葉細胞が著しく変形することがわかった。変形により、核と中心体の位置が相対的に中胚葉側へとより移動することがわかった。細胞形態の変化を解析した結果、中内胚葉細胞の変形は、中内胚葉細胞のコンパクションが解除され、隣接する細胞の一つ

のコンパクションが維持されることにより生じる、二つの細胞の間での細胞表層力の差から齎されるものであることが示唆された。細胞表層のアクチン繊維の多寡を Phalloidin 染色により観察した結果も、上記の可能性を支持していた。細胞変形が *Not* mRNA の非対称分配に重要であるか調べるために、細胞変形を阻害する方法を模索した。一般にコンパクションの進行は細胞表層力の増減によるものであると考えられている。多くの細胞で細胞表層力は Rho や Cdc42 に制御されている。分子系統学的解析から *H. roretzi* には Rho をコードする遺伝子が一つしかないことが示唆されたので、その遺伝子をクローニングし、常活性型とドミナントネガティブ型を作成した。改変型 Rho コンストラクトを隣接細胞に顕微注入して細胞特異的にコンパクションを阻害した結果、中内胚葉細胞の変形が減少し、*Not* mRNA の非対称分配が攪乱された。Cdc42 を用いた解析でも同様の結果が得られた。これらの解析から、隣接細胞間の細胞表層力の差が細胞変形を介して発生運命の分離に貢献することが示唆された。

隣接細胞間の細胞表層力の違いは、中内胚葉細胞でコンパクションが解除される一方、隣接細胞でコンパクションが維持されたためであった。コンパクション解除のタイミングの違いは、細胞周期の進行の違いによるものである可能性を考えた。細胞質分裂は隣接細胞が中内胚葉細胞より 60 分遅れていた。M 期の指標として使われる Histone H3 のリン酸化を免疫染色により観察した結果、隣接細胞では H3 のリン酸化が観察される時期が 60 分遅れていた。核膜孔タンパク質 Nup153 の細胞内局在を免疫染色法により観察したところ、隣接細胞での核膜崩壊は中内胚葉細胞のそれより 60 分遅れていた。隣接細胞での細胞周期の遅延が中内胚葉運命の分離に関わる可能性を考えた。先行研究で行われた whole mount *in situ* hybridization 法による解析により細胞周期進行に関わる *wee1* をコードする mRNA が隣接細胞に多く、中内胚葉細胞に少ないことが示唆されている。*wee1* mRNA に結合し、その翻訳を阻害するモルフォリノオリゴを隣接細胞に注入した結果、隣接細胞と中内胚葉細胞の細胞周期のズレは 20 分へと減少した。中内胚葉細胞の変形が阻害され、*Not* mRNA の非対称分配が攪乱された。これらの結果から、隣接細胞間の細胞周期のズレが細胞表層力の違いをもたらす、それにより胚葉運命が分離されている、という興味深いメカニズムの存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

高鳥直士「中・内胚葉運命分離に関わる核移動と非対称な Peeling を制御する機構の解析」若手研究者が語る 21 世紀の遺伝学 (XV) p.16 (2019)

Terui, H., Takatori, N., Re-evaluation of the role of the posterior-vegetal cortex of the embryo in regulation of spindle orientation at the 4-cell stage during ascidian embryogenesis. *Development Gene & Differentiation* (改訂中)

〔学会発表〕(計 2 件)

高鳥直士 (2018) 中・内胚葉運命分離に関わる核移動と非対称な Peeling を制御する機構の解析。日本遺伝学会第 90 回大会, 奈良。
この発表に対して日本遺伝学会第 90 回大会 Best Papers 賞

照井宙夢, 高鳥直士 (2018) マボヤ生殖系列細胞における細胞分裂面の位置と向きを制御する機構。日本遺伝学会第 90 回大会, 奈良

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。