

令和元年6月18日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19407

研究課題名(和文)細胞の運命決定/特異性の分子レベルでのダイナミクス解析

研究課題名(英文) Dynamic analyses of cell-fate determination and cell specification at the molecular level

研究代表者

黒田 玲子 (Kuroda, Reiko)

東京理科大学・研究推進機構総合研究院・教授

研究者番号：90186552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：螺旋卵割動物である巻貝の初期胚を対象に選び、最先端の一細胞質量分析法及び顕微ラマン分光法で解析する方法を開拓した。とくに、胚を生かした状態で発生過程を追跡しながら個々の細胞内の代謝産物を抽出し、それを網羅的に検出する技術の開発を行った。その結果、4細胞期胚で一見等価に見える4つの割球には差があること、発生進行中の胚での細胞内代謝環境が割球により異なるという予備的結果を得、今後、多細胞生物の細胞運命決定と分化のプロセスの解明に向けた展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物の初期発生過程における細胞運命決定と分化プロセスを解明するために、生きた状態の巻貝の初期胚を用いて、網羅的分子探索と分子ダイナミクスの追跡を可能にする新手法の開拓を目的とした。その結果、割球によって細胞内代謝環境に差があるという予備的結果を得ることができた。更なる手法の精査、開発を進める必要があるが、現在主流の遺伝子発現解析に頼った研究手法では捉えられない、細胞内の分子動態と細胞分化の関連性を知る手がかりが得られれば、再生医療や幹細胞研究への大きな波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Single fertilized egg of multi-cellular organisms differentiates and the cell-fates are determined during the early embryogenesis. To understand the molecular basis of these fundamentally important biological processes, we have challenged to develop methods to extract a very small amount of cytosol from each cell of a live snail embryo and to measure it with a cutting-edge single-cell mass spectrometry. Raman spectroscopy of each cell at the early developmental stage was also measured. Our preliminary results have shown spatial and temporal differences of metabolites despite the similar appearance of the cells at the early embryonic stages. These results are promising.

研究分野：発生生物学、分子生物学、固体化学、結晶学、分光学

キーワード：発生生物学 予定運命決定 分化 質量分析 ラマン分光

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

### 1. 研究開始当初の背景

巻貝の左右巻型は8細胞期という発生初期の割球配置の左右性で決定されており、この時期の細胞間相互作用が下流の左右非対称な遺伝子発現を誘導していることを我々は明らかにしてきた。これは、「細胞レベルの左右性が遺伝子発現パターンを制御し、個体レベルの左右性を支配している」という、これまでの動物の左右形態形成の基本概念を変える新たなモデルである。この詳細を解明するには、軟体動物の発生における最大の特徴である螺旋卵割について、螺旋卵割胚を特徴付ける割球特異性や卵割パターンの制御メカニズムに関与する分子実体から解明する必要がある。しかし、螺旋卵割を制御しているのは母性発現遺伝子であり、現在主流の次世代シーケンサーを用いた網羅的発現解析の適用は困難である。有効な解析手法が存在しなかったために、螺旋卵割は長らく未解明の発生現象として取り残されてきた。

### 2. 研究の目的

本研究は多細胞生物の細胞運命決定と分化プロセスの解明に向け、最先端の質量分析技術および分光学的解析法を応用した複合的なアプローチによって、初期卵割の段階から存在すると仮定されてきた割球特異性の分子実体を明らかにすることを目的とする。研究モデルとして使用する淡水産巻貝 *Lymnaea stagnalis* では、4細胞期胚の、外見上等価に見える A,B,C,D と名づけられている4つの大割球で螺旋卵割胚が定義されているが、この時期の4細胞に実際に割球特異性が存在しているのかを検証し、さらに、発生過程を経て細胞特異性がどう変化するのかを追跡する。そのために、胚を生かして発生を継続させたまま、細胞内の分子探索を網羅的時系列的に行い、分子ダイナミクスの解明を可能とする技術の開発を目指す。その手法として、一細胞質量分析法によるメタボローム解析と顕微ラマン顕微鏡による割球間分子組成比較の応用を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞質微量抽出法の検討と質量分析

一細胞質量分析法を適用するため、各大割球から非破壊的に微量の細胞質を抽出する技術の確立を目指した。DTT 処理により胚表面のピテリン膜を軽く溶かした。これにより、抽出操作後の傷口を塞がり易くした。実体顕微鏡下でマイクロマニピレーターを使用して抽出操作を行うときに、胚の向きを固定して観察できるようにするため、アガロースを微細加工して作製したクレーター状のマイクロステージを開発した。細胞質の抽出には専用のナノスプレーチップ (Cellomics Tip, HUMANIX) を用いるが、固定するホルダーはシリンジと連結させ、手動操作で慎重に細胞質抽出を行った。これらの実験手法を確立することによって、4細胞期または8細胞期の植物極側の各大割球から順番に細胞を壊すことなく細胞質の微量抽出を行えるようになった。抽出後すぐにナノスプレーチップごと -80°C のディープフリーザーに保管し、測定前まで凍結した状態を保った。チップを質量分析計 Orbitrap (ThermoFisher) のイオン源にセットして測定を行った。

#### (2) 顕微ラマン散乱分光顕微鏡による測定

細胞内に含まれる分子組成をラマン散乱光で調べることで、割球間の特異性を見出すことを試みた。理研 QBiC の渡邊研究室で開発した顕微ラマン散乱分光顕微鏡を用い、4細胞期の各大割球の狭い領域に 532 nm 波長のレーザーを照射して測定を行った。測定サンプルは固定胚とライブの2種類行った。

### 4. 研究成果

#### (1) メタボローム解析から割球間の特異性を見出した

4細胞期および8細胞期の個々の4つの大割球から順番に細胞質を微量サンプリングして一細胞質量分析を行った。1回の測定で、分子量 100~1000 の間に 20000 分子以上の代謝物を検出することができた。この各割球から得られた分子スペクトルを基に PCA(主成分)解析を行った結果、それぞれのステージで、B or D 割球と A or C 割球の間に特異的な代謝環境が存在する可能性が示唆された。さらに、4細胞期と8細胞期の検出ピークをすべて用いて PCA 解析を行ったところ、それぞれのステージの割球群で異なる位置にクラスターが形成された。このことは、発生の進行による細胞内代謝環境の変化を表していると考えられる。また、各割球系譜で共通の特異的な代謝産物も見出されたことから、4細胞期の段階で B or D 割球と A or C 割球で異なる分化を誘導する代謝経路が機能している可能性も示唆された。以上のことから、一細胞質量分析を用いたメタボローム解析は、螺旋卵割胚の割球特異性の解明に有効な手段であることが示された。まだ、技術的に検討の余地は多いが、改良すべき点を克服し、再現性よく解析できる条件を整えば、さらに4つ個々の割球特異性を実証することも可能かもしれない。すでに、抽出操作後も発生を進行させ、抽出割球の系譜を 24 細胞期まで追跡することで、4細胞期の A,B,C,D 割球のいずれであったのかを判別できる実験方法を確立している。発生初期から割球単位で特異的な分化誘導メカニズムが機能していることを質量分析法で解析できる基盤は整えられた。今後、この巻貝胚をモデルに、これまでの発生研究では未解明であった、初期卵割から割球単位で分化が進行するメカニズムの解明にメタボロミクスの観点から迫っていきたいと考えている。

## (2) 顕微ラマン分光法の巻貝胚への応用

ライブで観察しながら割球特異性の変化を追跡する実験系を模索したが、この巻貝胚ではβ-カロテンのラマン散乱光が非常に強く、他の分子種に由来する微弱なスペクトルの検出を妨げてしまうという問題点が生じた。そのためエサの野菜に由来するβ-カロテンを含まないように、エサを変更して長期間飼育し、その個体が産卵した卵を用いて実験を行った。しかし、卵の黄色はかなり減少したが、ライブでの観察結果、相変わらずβ-カロテンが強く検出され、大幅な改善は見られなかった。これがエサ由来のものなのか、それとも生合成されたものなのかは現段階では不明である。固定胚の状態であればβ-カロテン含有量を十分無視できるところまで改良することができたが、生体中の化学物質の組成を正しく反映している保証はない。今のところ4細胞期で各割球間の内容物に差異を見出すことはできていない。今後、レーザー光の波長を変えるなど測定条件の検討を重ねたいと思っている。生きたままの胚を用いた初期発生の研究が与える細胞運命決定と分化プロセスに関する情報は大変貴重であり、両手法の更なる開拓が期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者及び研究分担者には下線)

[雑誌論文](計10件)

- (1) Abe M. and Kuroda R. The development of CRISPR for a mollusc establishes the formin *Lsdial* to be the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling. *Development*, 146(9), dev175976 (2019). 査読有り
- (2) Takahashi H., Abe M. and Kuroda R. GSK3β controls the timing and pattern of the fifth spiral cleavage at the 2-4 cell stage in *Lymnaea stagnalis*. *Development, Genes and Evolution*, 229, 73-81 (2019). 査読有り
- (3) Itoh T., Tamura K., Ueda H., Tanaka T., Sato K., Kuroda R. and Aoki S. Design and Synthesis of Boron Containing Monosaccharides by the Hydroboration of D-Glucal for Use in Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 26(22), 5922-5933 (2018). 査読有り
- (4) Tamura Y., Hisamatsu Y., Kazama A., Yoza K., Sato K., Kuroda R. and Aoki S. Stereospecific Synthesis of Tris-Heteroleptic Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes via Different Heteroleptic Halogen-Bridged Iridium(III) Dimers and Their Photophysical Properties. *Inorg. Chem.*, 57(8), 4571-4589 (2018). 査読有り
- (5) Kuroda R. and Kameda T. Conformation Change of Hornet Silk Proteins in the Solid Phase in Response to External Stimulation. *Chirality*, 50(3), 541-547 (2018). 査読有り
- (6) Sekiya R., Fukuda M. and Kuroda R. Site-selective anion recognition of an interlocked dimer. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15, 4328 - 4335 (2017). 査読有り
- (7) Sako A., Okuda K., Tajima N., Kuroda R. and Imai Y. Heterocyclic effect for optical properties of naphthoquinone-based pigment: 2-methyl-3-heteroarylthio-1,4-naphthalenedione. *Tetrahedron*, 73(15), 2068-2073 (2017). 査読有り
- (8) Hasuie E. Mizutani Akimoto A., Kuroda R., Matsukawa K., Hiruta Y., Kanazawa H. and Yoshida R. Reversible conformational changes in parallel type G-quadruplex structure inside a thermoresponsive hydrogel. *Chem. Commun.*, 53(21), 3142-3144 (2017). 査読有り
- (9) Tamura Y., Hisamatsu Y., Kumar S., Itoh T., Sato K., Kuroda R. and Aoki S. Efficient Synthesis of Tris-Heteroleptic Iridium (III) Complexes Based on the Zn<sup>2+</sup>-Promoted Degradation of Tris-Cyclometalated Iridium (III) Complexes and Their Photophysical Properties. *Inorg. Chem.*, 56(2), 812-833 (2017). 査読有り
- (10) Fujikura K., Abe M. and Kuroda R. β-mercaptoethanol assists efficient construction of sperm bacterial artificial chromosome library. *J. Biological Methods*, 4(1), e63 (2017). DOI: 10.14440/jbm.2017.167. 査読有り

[学会発表](計24件)

- (1) 黒田玲子、分子レベルで自然界のキラリティの不思議に迫る、第23回HiSOR研究会 分子キラリティの計測・理論技術の革新から迫る生命機能研究の新展開、2019年3月15日、広島大学(招待講演)
- (2) 黒田玲子、Linking microscopic and macroscopic phenomena through chirality - Molecules and crystals or snails., ミニ国際シンポジウム CPL最前線、2019年1月22日、首都大学東京
- (3) 佐々木和哉、阿部真典、黒田玲子、螺旋卵割胚において、Myosin IIは正常な細胞質分裂に必須である、第41回日本分子生物学会年会、2018年11月28-30日、パシフィコ横浜
- (4) 味村優輝、西川智貴、原田拓典、黒田玲子、藤木道也、今井喜胤、ピレンエチニル系光学活性超分子有機発光体の創製と円偏光発光(CPL)特性、有機結晶部会シンポジウム、2018年10月27-28日、近畿大学
- (5) 北東部巧、奥田晃史、田島暢夫、静間基博、佐藤亨平、黒田玲子、今井喜胤、キノン骨格

を有する新規機能性色素の創製、有機結晶部会シンポジウム、2018年10月27-28日、近畿大学

(6) 佐藤享平、黒田玲子、フェニル基を有するシクロブタン誘導体結晶の溶媒蒸気による結晶変換とそのメカニズムの検討、有機結晶部会シンポジウム、2018年10月27-28日、近畿大学

(7) 阿部真典、黒田玲子、巻貝の左右巻型決定のしくみ、東京薬科大学生命科学部25周年記念シンポジウム、2018年10月20日、オリンパスホール八王子

(8) Reiko Kuroda, Left or Right Snail Shell Coiling Determination by a single Gene – Mechanogenetics and Gene Editing, BIT's 2nd International Biotechnology Congress / BIT's 8th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology, 14-16 October 2018, Fukuoka (Keynote speaker)

(9) Reiko Kuroda, *Mechanogenetics* and a single gene - determination of snail body handedness., Proteins and Peptides: Structure, Function and Biotechnology, 23-26 July 2018, Geneva, Switzerland (Invited speaker)

(10) Reiko Kuroda, Exploring Polymorph Transformation: Vapour, Solution and Crystals., Gordon Research Conference on Crystal Engineering, 24-29 June 2018, Sunday River, USA (Invited speaker)

(11) Reiko Kuroda and Tsunenori Kameda, Secondary structure of proteins/peptides changes easily in the solid state., International Symposium on Chirality 2018, 10-13 June 2018, Princeton, USA

(12) Reiko Kuroda, Single point mutation of a gene creates mirror-image animals in fresh water gastropod., Joint event. 10th International Conference of Genomics and Molecular Biology & 6th International Conference on Integrative Biology, 21-23 May 2018, Barcelona, Spain (Keynote speaker, organizer)

(13) Reiko Kuroda, Chirality Generation, Transfer and Measurement in the Solid State., PepCon (BIT's 11th Annual World Protein & Peptide Conference-2018) / AnalytiX (BIT's 6th Annual Conference of AnalytiX-2018), 26-28 March 2018, Miami, USA (Keynote lecture)

(14) 黒田玲子、高梨恭平、高橋厚弥、升島努、江崎剛司、阿部真典、淡水産巻貝 *Lymnaea stagnalis* の初期胚の分化は何時から始まるのか？ 2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6-9日、神戸ポートアイランド

(15) 高橋厚弥、阿部真典、黒田玲子、清水ゆり、佐々木和哉、渡辺靖也、淡水産巻貝 *Lymnaea stagnalis* の卵割パターン制御における Wnt シグナル伝達経路の関与、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6-9日、神戸ポートアイランド

(16) 佐々木和哉、阿部真典、黒田玲子、螺旋卵割胚において、Myosin II は紡錘体形成に関与する、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6-9日、神戸ポートアイランド

(17) 清水ゆり、阿部真典、黒田玲子、淡水産巻貝 *Lymnaea stagnalis* の生殖巣での左右巻型母性遺伝メカニズムの解明、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6-9日、神戸ポートアイランド

(18) 黒田玲子、キラリティー(左右性)からみる自然界の不思議・おもしろさ、11th Metabolic Research Cutting Edge、2017年11月18日、ステーションコンファレンス東京(特別講演)

(19) Reiko Kuroda, How the mutations in genes affect their products' functions?, Molecular Frontiers Symposium, 14-15 September 2017, Eötvös University, Budapest, Hungary (Invited speaker)

(20) Reiko Kuroda, Conformational Change of Proteins in Films and DNAs in Gels in Response to external stimulation., Chirality 2017, ISCD-29, 9-12 July 2017, Tokyo

(21) Reiko Kuroda, Erika Hasuike, Aya M. Akimoto, Ryo Yoshida, CD reveals reversible conformational changes of a DNA structure inside a thermoresponsive hydrogel., CD2017, 11-15 June 2017, Rennes, France

(22) Reiko Kuroda, Mirror-image animals - mechanical manipulation and a point mutation., Molecular Frontiers Symposium and Youth Forum, 24-25 May 2017, The Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm, Sweden (Invited speaker)

(23) Reiko Kuroda, Masanori Abe and Kohei Fujikura, *Diaphanous* gene determines chirality in snails., 第50回日本発生生物学会年会、2017年5月10-12日、船堀

(24) Hiromi Takahashi, Masanori Abe and Reiko Kuroda, GSK3 $\beta$  regulates cleavage pattern in early development of *Lymnaea stagnalis*., 第50回日本発生生物学会年会、2017年5月10-12日、船堀

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0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 0 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

## 6 . 研究組織

研究分担者  
阿部 真典 (ABE Masanori)  
東京理科大学・研究推進機構・助教  
研究者番号：60599918