

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460258

研究課題名(和文) 分化誘導シグナルの時空間変化：全胚ライブイメージングによる背腹分化過程の解析

研究課題名(英文) In vivo measurement of developmental signaling activities during dorso-ventral patterning in zebrafish embryo

研究代表者

近藤 晶子 (KONDOW, Akiko)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：90396838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：胚の背腹軸形成において、分化誘導シグナルは強度だけでなく時期が重要である。しかし、個々の細胞がシグナルを受けた場所と時間に関する詳細な解析は少ない。私達はゼブラフィッシュ胚の背腹軸形成に関わるTGF-スーパーファミリーのBmpシグナルの時間効果を探るべく、可視化方法が確立していたTGF-スーパーファミリーNodalシグナルを用い分化誘導シグナルの時間変化を全胚で調べる方法の開発を目指した。Nodalシグナルを可視化したゼブラフィッシュ胚を光シート顕微鏡でライブイメージングを行い、細胞毎のシグナル強度の時間変化の解析も行うことができた。さらに自動3次元細胞トラッキング方法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：During establishing the dorso-ventral pattern in vertebrate embryos, the timing of cells to be exposed to a certain signal is known to be important. However it is not well known when and where each cell is exposed to a certain signal in an embryo during development. In order to investigate the spatio-temporal change of a TGF-beta super family Bmp signaling in each cell during dorso-ventral patterning in zebrafish, we tried to develop a method to track Nodal signal activities, another TGF-beta super family member, in each cell of a zebrafish embryo. We visualized Nodal response by the localization of Smad2-Smad4 complex to nucleus, and observed it with digital scanned light sheet microscope. We were also successful in developing a novel 3D cell tracking method.

研究分野：発生生物学

キーワード：ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュ胚の背腹軸形成において、複数の分泌性の分化誘導シグナル (Bmp, Nodal, Wnt, FGF など) が段階的に作用する。

TGF- β スーパーファミリーに属する分泌性タンパク質リガンドのひとつである Bmp は、発生初期に胚の背腹軸に沿った濃度勾配を形成し、腹側の細胞への分化を促進する。Bmp を介したシグナル (Bmp シグナル) が阻害されると、胚は背側化する。つまり脊索や体節中胚葉などの背側の領域が拡大し、表皮・血球・腎臓といった腹側の領域が減少することが知られている。

Bmp シグナルは、シグナル強度だけでなく、作用する時期が重要である (時間効果)。ゼブラフィッシュ胚の Bmp シグナルを胞胚後期に阻害すると、胚全体が背側化するが、遅い時期の阻害では背側化する領域が胴尾部の領域に限定される (Tucker et al., Dev. Cell, 14, 108-119 '08)。

個々の細胞で Bmp シグナルを受けた場所と時期を初期胚において *in vivo* で調べることにより、体軸に沿った細胞の未知の分化制御機構が見つかることが期待される。だがそれまでの技術では、解析が困難だった。共焦点顕微鏡では深部の観察が難しく、全胚での観察は困難である。一方固定胚の切片を作製する方法では、同じ胚で分化誘導シグナルの時間変化を追うことはできない。

2. 研究の目的

本研究は、ゼブラフィッシュ胚の背腹軸形成に関わる分化誘導シグナルである Bmp シグナルの時間効果を探るべく、シグナルの時間変化を全胚で調べる方法の開発を目的とする。

原腸胚期では細胞運動が多く、腹側から背側へ、動物極から植物極へ、胚の外側から内側へと胚全体でダイナミックに移動する。そのため、細胞がどのような時期に Bmp シグナルが活性化しているかを、固定胚での知見から定量的に推測するのは困難である。

それを克服するため、本研究では新技術の導入及び開発を行う。私たちは、選択的平面照明顕微鏡 (DSLM) を用いゼブラフィッシュの全胚多色蛍光ライブイメージングに成功していた (前・基盤 C)。この技術を応用し、発生初期のゼブラフィッシュ胚で Bmp シグナルが活性化する場所と時期を定量的に解析することを目指した。

3. 研究の方法

Bmp シグナルの時間変化を全胚で調べる方法の開発は、以下の段階を踏んで進める。

まずは、ゼブラフィッシュ初期胚で、分化誘導シグナルが活性化される場所と時期の定量的な解析法を開発をする。そのため、同じく TGF- β スーパーファミリーに属する分泌性タンパク質リガンドで、ゼブラフィッシュ初期胚で作用し、かつ可視化方法が開発されていた Nodal シグナルの応答の可視化を行う。これを用いて DSLM でのライブイメージング画像取得条件を検討する。

さらに並行してゼブラフィッシュ胚での細胞トラッキング手法の開発も行う。

その後、Bmp シグナルの応答を可視化する方法を開発、イメージングを目指す。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュ初期胚における Nodal シグナル応答の DSLM を用いた可視化：

Nodal シグナルにおいて、シグナル活性化を smad2 と smad4 の複合体形成と核移行を指標にして定量する手法が報告されている (Harvey & Smith., PLoS Biol, 7, p. e100101, '09)。この方法では Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法を用いて smad2 と smad4 の複合体形成を可視化している。Bmp シグナルの活性化においても、Smad1/5/8 と Smad4 の複合体形成と核移行が活性化の指標のひとつとなり、Bmp シグナル可視化の際の参考となえるので、この可視化方法を試みた。

蛍光タンパク質 Venus の N 末に smad2 が融合した VNsmad2、C 末に smad4 が融合した VCsmad4 をコードした mRNA をゼブラフィッシュ胚の 1 細胞期に顕微注入し、Smad2 と Smad4 が相互作用して核に局在していることを共焦点レーザー顕微鏡で検出した。

よりコントラストのはっきりした画像を得るため、VNsmad2、VCsmad4 mRNA の胚への導入量の検討を行った。その際、ポジティブコントロール胚を調製するため、活性化型 TGF- β 受容体である Taram-A-D を共顕微注入して Nodal シグナルを活性化させた。Nodal シグナルが活性化している胚を用いて、核での蛍光がより強く見られる mRNA の顕微注入条件を見いだした。

上記により得られた条件で調製した胚を DSLM で撮影した。活性化型 TGF- β 受容体である Taram-A-D との共発現で、核でより強い蛍光シグナルが検出される細胞が増加し、逆に Nodal シグナルのアンタゴニストの分泌性タンパク質 *lefty* との共発現では、核での蛍

光シグナルが減少することが確認できた。そのため検出している蛍光シグナルがNodalシグナルの活性化を反映していると考えられた。

さらに、DSLMでのNodalシグナル可視化ゼブラフィッシュ胚のライブイメージングを実施した。これにより、ゼブラフィッシュ胚の後期胞胚期から原腸胚期にかけて、z方向～200 μm、3分間隔で5時間近くライブイメージングを行うことができた。また、細胞毎の核細胞質蛍光強度比の時間変化の解析も行うことができた。

ゼブラフィッシュ胚での細胞トラッキング手法の開発：

原腸胚期のゼブラフィッシュ胚では形態的特徴が似た細胞が密に存在する。それらの細胞が盛んに移動して、約直径700 μmの胚を移動する。一方、多くの細胞を解析する場合は、自動での細胞トラッキング手法の確立が重要である。しかし、上記の細胞の挙動から長期間の自動トラッキングは困難であった。

細胞集団の3次元トラッキング方法の開発を行い、核標識したゼブラフィッシュ胚の細胞を用いて検証することができた(学会発表 Bise et al., IEEE International Symposium on Biomedical Imaging '14)。

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0件)

[学会発表] (計4件)

① 近藤晶子、大沼清、野中茂紀、橋本敬一郎、
全胚ライブイメージングによる形態形成の理解
定量生物学の会第六回年会、2013年11月22日～24日(大阪)

② 備瀬竜馬、佐藤洋一、近藤晶子、小林徹也、大沼清
大局的細胞移動推定及び局所的相対位置関係類似度を用いた密な状態における3次元細胞トラッキング
第16回画像の認識・理解シンポジウムMIRU2013(東京)
2013年07月29日～08月01日

③ 備瀬竜馬、佐藤洋一、近藤晶子、小林徹也、大沼清
密な状況での細胞群の3次元追跡
第13回東京大学生命科学シンポジウム
2013年06月08日(東京)

④ Ryoma Bise, Yoichi Sato, Akiko Kondow, Tetsuya J. Kobayashi, Kiyoshi Ohnuma
3D Cell Tracking under dense cell culture conditions by preserving the structure of neighbor cells
IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI) 2014(北京、中国)
2014年04月29日～05月02日

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 晶子 (KONDOW, Akiko)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教
研究者番号：90396838

(2) 研究分担者

佐藤 洋一 (SATO, Yoichi)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号：70302627

(3) 連携研究者

大沼 清 (OHNUMA, Kiyoshi)
長岡技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号：50396834

小林 徹也 (KOBAYASHI, Tetsuya)
東京大学・生産技術研究所・准教授
研究者番号：90513359

野中 茂紀 (NONAKA, Shigenori)

基礎生物學研究所・時空間制御研究室・准教授

研究者番号：0435529