

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0154

研究課題名(和文)細胞内外の小分子による上皮性管構造の構築原理の解明

研究課題名(英文) Exploring of the principle of epithelial tubulogenesis by intra- and extracellular small molecules

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳と脊髄の原基である神経管が構築される過程をモデルとして、上皮シート変形における細胞内のカルシウムイオンの機能の探索を行った。その結果、上皮シート変形に必要な細胞運動である頂端収縮の誘導技術の開発、頂端収縮を実現するための分子機構の解明、さらに細胞運動の同調性と上皮シート変形の効率の間に存在する法則性の提唱に成功した。本研究の成果は、神経管に留まらず上皮性器官の普遍的な構築原理の理解に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the function of intracellular calcium ions in epithelial morphogenesis by using the neural tube closure of the African clawed frog as a model. As a result, we developed the technique that induces one of the cellular movements necessary for epithelial sheet deformation, called apical constriction, and revealed the molecular mechanism of it. Moreover, we proposed the mechanical basis by which the synchrony of the apical constriction affects the efficiency of tissue deformation. The results of this study are expected to contribute to the understanding of the principle of morphogenesis of various epithelial organs as well as the neural tube.

研究分野：発生生物学

キーワード：カルシウムイオン 神経管形成 頂端収縮 アフリカツメガエル

1. 研究開始当初の背景

医学・生物学の発展により、機能的なヒト器官を人為的に再構築し創薬と医療に応用できる可能性が高まりつつある。しかし、全ての器官前駆細胞が自律的なパターン形成能を保持する訳ではないことから、複雑な構造を特徴とする器官の人為的構築は未だ限定的にしか実現されていない。従って今以上に多様な立体構造を創出するためには、まず細胞集団からパターンを作り出される際の法則性を明らかにした上で、それが人為的に操作可能であるかを検証することが重要であると考えられる。

一方で研究代表者は、アフリカツメガエルの神経管(脳と脊髄の原基)をモデルとした研究を進める中で、細胞内のカルシウムイオン(Ca^{2+})シグナルがアクチオシンの制御を介し、上皮細胞シートの屈曲に必要な細胞形態変化を誘導する可能性を見出していた。

2. 研究の目的

本研究では、上皮性器官の構築に必要な細胞運動である頂端収縮を人為的に誘導する手法を開発し、その活用を通して Ca^{2+} シグナルの局所的な作用が上皮細胞シートから立体的な管構造を構築する機構を明らかにすることを目的とした。上皮細胞の形態形成運動は神経管のみならず、心臓、消化管、腎臓など他の上皮性器官の構築過程でも共通に見られる現象であることから、得られる成果は上皮性器官の普遍的な構築原理の理解に貢献すると期待された。

3. 研究の方法

アフリカツメガエルを用いた実験は、「大学共同利用機関法人自然科学研究機構動物実験規程」に従い自然科学研究機構動物実験委員会において審査・承認された計画に沿って、動物実験に関する取り決めを遵守して行った。遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく研究実施機関の諸規定のもとで、遺伝子組換え実験安全委員会により審査・承認された実験計画に沿って、遺伝子組換え生物等の使用等の取り決めを遵守して行った。

アフリカツメガエルの胚は、ホルモン剤により性成熟を促進させた成体から受精卵を採取し、それを目的の発生段階まで飼育することにより入手した。ライブイメージング解析は、目的の蛍光タンパク質などを発現するアフリカツメガエル胚を横河電機製共焦点スキャナユニット CSU-X1 で計測することにより行った。画像解析と統計解析には ImageJ と R ソフトウェア、数値シミュレーションには C 言語を用いた。

4. 研究成果

(1) 細胞内 Ca^{2+} 動態の操作により細胞の変形を誘導する方法の確立

Caged- IP_3 を顕微注入法でアフリカツメガエル胚に導入し、神経板の任意の領域に UV 光を照射した後に細胞の形態を計測した。その結果、光照射により一過的な細胞内 Ca^{2+} 動態の変化が細胞自律的に形成されること、光照射後約 50 秒で約 2% の頂端収縮が引き起こされることが明らかになった。また細胞内 Ca^{2+} 動態を細胞外から制御することを目的として、Caged-ATP を培養液に添加したうえで同様の計測を行った。その結果、光照射により一過的な細胞内 Ca^{2+} 動態の変化が広範に形成されること、光照射後約 50 秒で約 10% の頂端収縮が引き起こされることが明らかになった。以上より、細胞内外の小分子の動態を操作することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して頂端収縮を誘導する手法を確立することに成功した。

(2) 胚性上皮組織の変形運動を細胞レベルで解析するための技術開発

胚性上皮組織の変形を定量的かつ包括的に扱う目的で、遺伝子組み換え個体のスクリーニングと画像取得・解析技術の開発を行った。膜移行型の緑色蛍光タンパク質などを全身で発現する遺伝子組み換え個体を複数系統作製し、それらから得られた胚を共焦点レーザー顕微鏡で評価することにより、高い SN 比で細胞形態が標識される系統を選別した。加えて共焦点レーザー顕微鏡の観察条件の至適化を進め、神経管形成過程のほぼ全てを含む多次元画像データを取得できる手法を確立した。これに新規の画像解析アルゴリズムを適用することで、細胞形態輪郭抽出の効率が向上することが確認された。また同様の手法は、神経管とは異なる領域の発生・再生現象の解析においても有効であることが示唆された。

(3) 上皮シートの変形と機械的性質の変化の関連

原子間力顕微鏡と高倍率ズーム顕微鏡を組み合わせることにより、アフリカツメガエル胚表面の細胞・組織の形態と弾性率をほぼ同時に解析できる装置を構築した。また UV パルスレーザーによる細胞焼灼法の至適化を行うことにより、上皮細胞が有する局所的な残留応力を計測する手法を構築した。これらの装置で神経管の形成過程を計測した結果、神経上皮細胞が細胞伸長と頂端収縮を起こす過程で神経板の弾性率が上昇すること、一方で自律的な変形を起こさない非神経表皮細胞では神経管形成の過程を通して弾性率は低い値が保たれることが明らかになった。また、神経上皮細胞における弾性率の上昇は F-アクチンと非筋型ミオシンの機能に依存した。以上より、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加により誘導された頂端収縮は、神経板の機械的性質を変化させることで組織変形を誘導している可能性が示唆された。

(4) 数理・統計学的手法により明らかにされた Ca^{2+} シグナル依存的な頂端収縮が組織変形に与える影響

神経管の形成過程では細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過的な上昇が隣接する細胞で同調的に行われる場合と非同調的に行われる場合が存在する。この2種類の細胞内 Ca^{2+} 動態が上皮シートの屈曲に寄与する様式を検討する目的で、細胞の機械的性質を扱うことができる2次元セルバーテックスモデルにより神経管形成を数理モデル化した。この時、 Ca^{2+} 濃度の一過的な上昇は細胞の頂端面の収縮力の上昇を誘導することで、細胞が持つ弾性に由来するポテンシャルを増加させることとした。この数理モデルを用いてシミュレーション解析を行った結果、細胞の頂端収縮は頻度に依存せず常に屈曲を促進する一方、収縮運動の同調性が低いほどより効果的な屈曲が引き起こされるという予測が得られた。この予測は数理モデルの主要なパラメータの変動に影響を受けない安定した性質を示していたことから、一定の信頼性を備えることが示唆された。

(5) 統計モデルによる予測の検証

シミュレーション解析によって得られた頂端収縮の同調性と神経板の屈曲の程度の関係に関する予測を実際の胚で検証するため、異なる空間密度の細胞内 Ca^{2+} 動態と組織変形効率の関係性を評価する統計学的手法、即ち神経管の閉鎖運動を応答変数とし、細胞内 Ca^{2+} 動態を固定効果、胚をランダム効果とした混合効果モデルを構築した。この手法を用いて、カルシウムプローブを発現する実際の胚のライブイメージング解析から得た多数のタイムラプス画像データセットの評価を行ったところ、数理モデル解析により予測されたランダム且つ単細胞レベルの細胞内 Ca^{2+} 動態の有利性が実際の生体内で観測されることが明らかになった。以上より、本研究で構築した数理モデルとそこから得られた予測の妥当性が示唆され、また収縮運動の同調性が低いほど効果的な屈曲が引き起こされるという法則性が、神経管以外の上皮性器官の構築においても存在する可能性が提唱された。

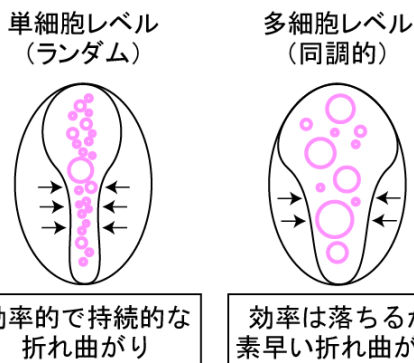


図1 本研究により提唱された、頂端収縮の同調性と上皮の屈曲様式に関するモデル

(6) 上皮シート変形に寄与する細胞形態変化の分子基盤の解明

本研究で開発した細胞内 Ca^{2+} 動態の操作により細胞の変形を誘導する方法を用いて、上皮シート変形に寄与する頂端収縮において機能する分子を同定した。細胞膜と細胞骨格 F-アクチン、更に Ca^{2+} に対する蛍光プローブを発現する細胞の動態を定量的に解析した結果、細胞内 Ca^{2+} 動態が変化した直後に頂端面における F-アクチンの動態が変化していること、それが頂端収縮に先立って起こることが明らかになった。更に Caged-ATP によって誘導される頂端収縮が細胞間接着因子 N-カドヘリン依存性であることが、N-カドヘリンの機能阻害実験より明らかになった。以上の結果より、細胞内の Ca^{2+} は頂端面における F-アクチンの動態変化を誘導し、それが細胞周縁部に局在する N-カドヘリンとの機能的相互作用を介して頂端収縮に転換する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

① Harris, A., Siggers, P., Corrochano, S., Warr, N., Sagar, D., Grimes, D. T., Suzuki, M., Burdine, R. D., Cong, F., Koo, B. K., Clevers, H., Stevant, I., Nef, S., Wells, S., Brauner, R., Ben Rhouma, B., Belguith, N., Eozenou, C., Bignon-Topalovic, J., Bashamboo, A., McElreavey, K., Greenfield, A., ZNRF3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 査読有, 115, 5474-5479, 2018
DOI: 10.1073/pnas.1801223115

② Shinoda, T., Nagasaka, A., Inoue, Y., Higuchi, R., Minami, Y., Kato, K., Suzuki, M., Kondo, T., Kawaue, T., Saito, K., Ueno, N., Fukazawa, Y., Nagayama, M., Miura, T., Adachi, T., Miyata, T., Elasticity-based boosting of neuroepithelial nucleokinesis via indirect energy transfer from mother to daughter, PLoS Biol., 査読有, 16, e2004426, 2018
DOI: 10.1371/journal.pbio.2004426

③ Suzuki, M., Sato, M., Koyama, H., Hara, Y., Hayashi, K., Yasue, N., Imamura, H., Fujimori, T., Nagai, T., Campbell, R. E., Ueno, N., Distinct intracellular Ca^{2+} dynamics regulate apical constriction and differentially contribute to neural tube closure, Development, 査読有, 144, 1307-1316, 2017
DOI: 10.1242/dev.141952

④ Nagasaka, A., Shinoda, T., Kawaue, T., Suzuki, M., Nagayama, K., Matsumoto, T.,

Ueno, N., Kawaguchi, A., Miyata, T., Differences in the Mechanical Properties of the Developing Cerebral Cortical Proliferative Zone between Mice and Ferrets at both the Tissue and Single-Cell Levels, *Front. Cell Dev. Biol.*, 査読有, 4, 139, 2016
DOI: 10.3389/fcell.2016.00139

⑤ Suzuki, M., Takagi, C., Miura, S., Sakane, Y., Suzuki, M., Sakuma, T., Sakamoto, N., Endo, T., Kamei, Y., Sato, Y., Kimura, H., Yamamoto, T., Ueno, N., Suzuki, K. T., In vivo tracking of histone H3 lysine 9 acetylation in *Xenopus laevis* during tail regeneration, *Genes Cells*, 査読有, 21, 358-369, 2016
DOI: 10.1111/gtc.12349

⑥ Koyama, H., Shi, D., Suzuki, M., Ueno, N., Uemura, T., Fujimori, T., Mechanical Regulation of Three-Dimensional Epithelial Fold Pattern Formation in the Mouse Oviduct, *Biophys. J.*, 査読有, 111, 650-665, 2016
DOI: 10.1016/j.bpj.2016.06.032

⑦ Inoue, Y., Suzuki, M., Watanabe, T., Yasue, N., Tateo, I., Adachi, T., Ueno, N., Mechanical roles of apical constriction, cell elongation, and cell migration during neural tube formation in *Xenopus*, *Biomech. Model. Mechanobiol.*, 査読有, 15, 1733-1746, 2016
DOI: 10.1007/s10237-016-0794-1

⑧ 鈴木誠, 上野直人, 生物をかたちづくる細胞運動と細胞極性、領域融合レビュー、査読有、4、e006、2015
DOI: 10.7875/leading.author.4.e006

[学会発表] (計 8 件)

① Suzuki, M., Distinct intracellular Ca^{2+} dynamics regulate apical constriction and differentially contribute to neural tube closure, 第 27 回日本数理生物学会年会, 2017

② Suzuki, M., Periodic actomyosin contractility contributes to convergence movement during neurulation in zebrafish, 18th International Congress of Developmental Biology, 2017

③ 上野直人, 動物発生のバイオメカニクス、日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会、2017

④ Suzuki, M., Distinct intracellular

calcium ion dynamics regulate apical constriction and differentially contribute to neural tube closure, The 22nd International Congress of Zoology, 2016

⑤ 鈴木誠, 神経管形成における組織の折りたたみと管形成の力学制御、第二回次世代両生類研究会、2016

⑥ 鈴木誠, 動的カルシウムシグナルによる頂端収縮と神経管閉鎖の制御、第一回次世代両生類研究会、2015

⑦ 鈴木誠, パルス性の頂端収縮に基づく神経管閉鎖の数理解析、第 48 回日本発牛生物学学会大会、2015

⑧ 小山宏史, マウス卵管における管腔側上皮のヒダの形態パターン形成の力学と細胞の幾何学的形態との関係、第 48 回日本発牛生物学学会大会、2015

[その他]

ホームページ等

① 細胞内カルシウムイオンの局所的な濃度変化が脳の原型づくりに重要である
<http://www.nibb.ac.jp/press/2017/03/07.html>

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

(2) 連携研究者

上野 直人 (Ueno, Naoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・教授

研究者番号: 40221105

小山 宏史 (KOYAMA, Hiroshi)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・助教

研究者番号: 10530462

加藤 輝 (KATO, Kagayaki)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (新分野創成センター)・新分野創成センター・特任助教

研究者番号: 30391915

(3) 研究協力者

安江 奈緒子 (YASUE, Naoko)