

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07406

研究課題名(和文) 上皮間充織転換による幹細胞化の分子機構をカイメンに学ぶ

研究課題名(英文) Attempt to detect and analyze epithelial mesenchymal transition in demosponges

研究代表者

船山 典子 (FUNAYAMA, NORIKO)

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：30276175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：当初の研究計画が技術的に困難と判明した為、上皮細胞での発現が強く期待されるクラシカルカドヘリン遺伝子のクローニング、大腸菌で発現させた組み換えタンパク質を抗原としたポリクローナル抗体作成を試みたが、得られた抗体価が低く成功に至っていない。一方、襟細胞の上皮間充織転換が起きている可能性が高い芽球形成過程に着目、各個体で同調した芽球形成過程を進行させ得る誘導系を確立、RNAseqを共同研究で行い、7日間の過程で発現変動する遺伝子群を抽出、各段階での発現変動を解析した。今後、襟細胞の上皮間充織転換の可能性が高い時期に発現が上昇する候補遺伝子群のWISHを進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮間充織転換は、多細胞動物の胚発生において重要な機構である。本研究は、EMTの分子機構は多細胞動物の進化の過程でどのように発達してきたのかを知ることを大きな目標に、これまで全く解析されていない、カイメン動物において上皮間充織転換がどのような生命現象で用いられ、その分子基盤の解明を目指す挑戦的な研究である。現時点の技術では当初の計画が困難と分かったものの、新たな実験系の確立、網羅的なmRNA発現変動解析の成果を得、今後の研究展開の基礎を構築することが出来た。

研究成果の概要(英文)：The original attempt to detect and analyze epithelial transition of choanocytes turned out to be technically difficult. Thus, we cloned two Classical Cadherin genes of Ephydatia fluviatilis, and tried to raise polyclonal antibody of a Classical Cadherin using a recombinant protein as antigen but could not succeed. On the other hand, we focused on the process of gemmule formation in which we expected the epithelial mesenchymal transition of choanocytes might occur. We had established the condition in which the formation of a gemmule per individual juvenile sponge could be induced and could process synchronously. Then we performed RNAseq as international collaboration. Periluminally analysis showed differentially expressed genes during gemmule formation. Thus, this data could be used as the basis for further molecular analysis of not only for EMT of choanocyte but for gemmule formation.

研究分野：発生生物学

キーワード：カイメン 上皮細胞 カドヘリン

1. 研究開始当初の背景

上皮間充織転換(EMT)は、調和のとれた細胞間および細胞-基質間相互作用により上皮細胞が上皮組織から離脱(脱上皮化)し、細胞骨格の再構築により細胞移動が可能となり、新たな転写プログラムに間充織細胞という性質が維持されるという事象である。EMTは、中胚葉形成、神経冠細胞形成に代表されるように、広い範囲の多細胞動物の胚発生において重要である。これまでの様々な動物の研究から、Wnt, Tgf など様々なシグナルにより、Snai, Twist, Slug に代表される転写因子の制御を受け、E-cadherin, β -cateninなどの遺伝子発現が抑制され、細胞が脱上皮化するという共通の分子機構が明らかになっている。EMTの分子機構は動物の進化の過程でどのように発達してきたのか、即ち起源的な分子機構の解明は動物の形態形成機構の進化の理解に重要である。しかし、進化系統樹の根元に位置するカイメン、刺胞動物などにおける研究は無かった。

2. 研究の目的

本研究では、多細胞動物の進化系統樹の最も根元に位置するカイメンにおけるEMTに着目、その分子機構を解明し、他の動物との比較によって、EMTの起源的な分子機構を解明することを目的とした。多細胞動物の進化を考える上で重要と考えられているカイメン特有の襟細胞においてEMTが報告されている点に着目、襟細胞のEMTを捉えることに挑戦し、詳細なEMT過程の解明、及びこの過程に關与する遺伝子をmRNA発現解析から同定、分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

初年度に、襟細胞のEMTを捉える顕微鏡観察法の確立を目指し、観察カイメン個体の一部を約70 μ mの厚さに形成させることで観察を容易にし、倒立顕微鏡、コンフォーカル顕微鏡など各種顕微鏡を用いた明視野タイムラプス撮影による観察を行った。しかし当初の予想以上に、襟細胞周囲の間充織細胞が活発に襟細胞室にそって移動するため、襟細胞のEMTの有無を判断することが困難であった。さらに、Dilなど生細胞染色素を用いた襟細胞の染色を目指し、カイメン体内への顕微注入法の確立を含む様々な工夫を試みたが成功せず、技術的に非常に困難であると分かった。このため研究計画を大きく以下に変更した。

- I) EMTを捉えるために必須である襟細胞を含む上皮細胞の可視化のため、抗体染色による解析を目指し、上皮細胞での発現が強く期待出来るクラシカルカドヘリン分子に対する抗体の作成。
- II) 当研究室では人工的に芽球形成を誘導する実験系をすでに確立していたが、芽球形成時には非常に多数の幹細胞(アーキオサイト)が必要となることから、襟細胞がEMTにより脱上皮化し、アーキオサイトに変化している可能性が高いと考えられる。このため、芽球形成過程におけるRNAseqと解析による、襟細胞EMTの分子機構解明ための基盤の形成。

4. 研究成果

I) 私達のカワカイメントランスクリプトーム及び姉妹種であるミユラーカイメンのトランスクリプトームから、2つのクラシカルカドヘリン遺伝子の塩基配列情報が得られた。カワカイメンのクラシカルカドヘリン1(EfICCad1)は約8Kb、2745アミノ酸残基、クラシカルカドヘリン2(EfICCad2)は約16.5kb、5530アミノ酸残基の巨大な分子である。Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)の結果、どちらのmRNA発現も低く、かつ、カワカイメン幼若個体の上皮細胞は非常に扁平で細胞質が薄く、mRNA発現の検出が難しいため、上皮細胞での特異的な発現であるのか判断することが困難であった。しかし、カイメンの体の縁、新たに上皮細胞が上皮に加わるのではないかとと思われる位置に並ぶEfICCad2発現細胞が観察されたため、これは表皮上皮組織に加わる新たに上皮細胞に分化した細胞なのではないか、即ち少なくとも表皮組織の上皮細胞でEfICCad2の発現があるのではないかと考えている。着目している襟細胞での発現は、カイメン体内に存在することからさらに判断が難しく、可能性は示唆されたものの確証を得られなかった。しかし襟細胞も上皮細胞であり強い細胞接着が必要であるはずであるから、クラシカルカドヘリン分子が襟細胞の細胞接着を担っている可能性は高いと考えている。

他の動物でのカドヘリン分子に対する抗体作成の際の抗原部位を参考に、2つのクラシカルカドヘリン遺伝子に関し、2ヶ所のカドヘリンリピート2つ分の領域を、組み換えタンパク質として大腸菌で発現させ、得られた組み換えを抗原とし、抗体作成を試みた。実験デザインとして可溶化しやすいSUMOタンパク質との融合タンパク質発現を行い、大腸菌での発現には成功したものの、試みた全種類の組み換えタンパク質が不溶性となってしまう、精製に必須である可溶化条件の検討等に長い時間を費やした。最終的には可溶化を断念、SDS電気泳動後にアクリルアミドゲルのバンドを切り出す粗精製を行い、E1CCad2抗原として抗体を作成した。残念ながら得られた抗血清の抗体価は低く、表皮組織の上皮細胞間の細胞接着に非常に弱いシグナルがあるものの、他の部分にもシグナルが検出され、特異的な染色であると結論づけることは出来なかった。今後、非常に短い領域ではあるが、リピート構造以外の細胞外領域、細胞質領域(他のタンパク質の結合する可能性があり当初避けたが、成功例はある)に対する抗体作成を再度試みたい。

11) 芽球形成過程の各過程のRNAseqを行う為には、通常では個体ごと、また個体内でも非同調的に形成される芽球形成を、dayオーダーで同調させる培養系の確立が必須である。幼若個体を形成させる芽球の数による幼若個体のサイズを検討することで、1個体当たり1つの芽球を形成させられ、形成率はほぼ100%、かつ、ディッシュ内の複数個体で芽球形成が同調的に進行する様な芽球形成誘導実験系を確立した。芽球形成誘導0日から8日まで、日ごとにRNAを抽出、RNAseqを共同研究により行った。一部リード数が足りていない過程があるためプレリミナリーではあるが芽球形成の過程で発現が変動する遺伝子群を得る事が出来た。一連のcollagen遺伝子の発現が上昇していることは、芽球形成過程においてcollagenを主成分とする芽球コートが形成される事実と合い、解析は妥当であると考えている。しかし、Wnt, Tgfは含まれず、カイメンにおける上皮間充織転換の調節機構は他の動物と異なる可能性も考えられる。発現が変動する遺伝子の変動パターンにより、6つのクラスターに分類出来た。襟細胞のEMTが起きている可能性の高い芽球形成過程の初期に発現が上昇する遺伝子群という今後の解析のための足がかりを得ることが出来たと考えている。また、これは、芽球形成過程の細胞・分子機構の解明という私達の別の研究プロジェクトの基礎ともなる成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noriko FUNAYAMA	4. 巻 62
2. 論文標題 The cellular and molecular bases of the sponge stem cell systems underlying reproduction, homeostasis and regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. J.Dev.Biol.	6. 最初と最後の頁 513 - 525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1387/ijdb.180016nf	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masumi Okawa, Risa Murakami, Noriko Funayama
2. 発表標題 Setting up a new model system to uncover the molecular mechanisms regulating totipotency in sponges: definition of precise stages of gemmule formation, an asexual reproduction system
3. 学会等名 GSA2018_APCC6（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	Ludwig-Maximilians University of Munchen		