

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06694

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Study on the mechanism that regulates asymmetric peeling involved in the separation of germ layer fates

研究代表者

高鳥 直士(Naohito, Takatori)

東京都立大学・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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胚細胞の間で胚葉運命が分離される過程はほとんどの動物で詳細が不明である。脊索動物のホヤでNot転写因子のmRNAが中内胚葉細胞から中胚葉細胞に非対称分配されることで胚葉運命が分離されることを以前明らかにした。今回は中内胚葉細胞と隣接細胞の細胞周期の長さの違いが中内胚葉細胞の変形を介して分裂面の位置を制御しており、mRNAの非対称分配に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

臓器の再生には、ES、iPSなどの細胞から適切な数・種類の分化した細胞を適切な位置に作ることが重要である。しかし、細胞分化の初期過程にある、胚葉の形成を細胞レベルで制御することは困難である。今回の研究は、胚葉形成過程にある細胞集団内にある、細胞周期のズレが中胚葉と内胚葉の適切な形成に重要であることを示しており、臓器再生の際に、幹細胞からの胚葉形成を制御するための基盤を提供する研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The details of the process of segregation of germ layer fates among embryonic cells are unknown in most animals. Using a primitive chordate, *Halocynthia roretzi*, we previously showed that the separation of embryonic fates is mediated by the asymmetric partitioning of mRNA which encodes a transcription factor called Not from mesoendoderm mother cell to the daughter mesoderm cell. In the present study, we showed that the difference in cell cycle length between mesoendoderm cells and the adjacent cell regulates the position of the cleavage plane in the mesoendoderm cell via mesoendoderm cell deformation.

研究分野：発生生物学

キーワード：胚葉運命 mRNA非対称分配 細胞分裂 核移動

1. 研究開始当初の背景

発生生物学の根本的な問いの一つは、たった一つの卵から多様な機能と形態を有する細胞がいかにして作られるか、ということである。動物の胚発生の初期における重要なイベントの一つが外胚葉、中胚葉、内胚葉の三つの胚葉の形成で、それぞれの胚葉から多様な細胞が分化してくる。胚葉運命の決定を細胞レベル、分子レベルで理解しよう、という試みは、古くから盛んに行われてきた。この研究が難航する理由の一つが、多くの動物では胚の細胞系譜が個体間で異なり、どの細胞が中胚葉または内胚葉になるのか一見してわからないことである。タイムラプスイメージングを駆使して、胚発生が進行した後に遡及的にどの細胞から中（または内）胚葉が生じたのか調べることができるようになってきたが、その細胞でどのような遺伝子発現があり、細胞間情報伝達がなされていたか、ということ、観察と同時に網羅的に記載しておき、遡及的に胚葉運命を決定する要因を探ることはまだ困難である。

細胞系譜が個体間で一定であり、どの細胞から中（または内）胚葉が作られるか明らかにされている動物の例が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) とホヤである。線虫では 90 年代後半から、EMS 細胞と後方で接する P2 細胞からの Wnt シグナルにより、EMS 細胞内に Wnt シグナル伝達経路の因子が局在し、それらを受け継いだ娘細胞における Wnt シグナルの強弱が胚葉運命の違いとして現れることが明らかにされていった。ホヤでは、申請者を中心に 2000 年台終盤から研究が進められ、中内胚葉細胞において、転写因子 Not をコードする mRNA が局在し、Not mRNA を受け継いだ娘細胞が中胚葉細胞になることがわかってきた (図 1、Takatori et al., 2010)。Not mRNA はどのようにして非対称に分配されるか、解析を進めてきたが (Takatori et al., 2010, 2015)、中内胚葉細胞の細胞分裂面を制御する機構については不明であった。

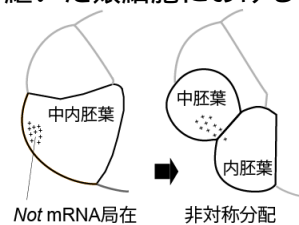


図1:ホヤ胚における胚葉運命分離

2. 研究の目的

胚葉形成はその後の細胞分化の基盤となる重要な発生イベントであるが、その細胞・分子レベルでの詳細は多くの生物で不明である。脊索動物のホヤでは、転写因子 Not の mRNA が中内胚葉細胞から中胚葉細胞へと非対称に分配されることで胚葉運命が分離されることがわかっていった。しかし、mRNA を将来の中胚葉細胞の領域に局在させ、さらに非対称に分配させる機構は理解できていなかった。今回の研究は、mRNA の非対称分配において重要な役割を果たす細胞分裂面の制御機構に注目して、中内胚葉細胞の細胞分裂面がどのようにして決められるのか、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞分裂面の観察のために、細胞の形態と分裂装置の両方を共焦点顕微鏡を用いて等方的に 3D で記録した。Cdc25 や wee1 などの細胞周期制御因子の細胞特異的な機能阻害・機能亢進により、細胞周期の進行を隣接細胞または中内胚葉細胞特異的に変化させ、細胞周期のズレがどのように分裂面の位置の制御に関わるか、共焦点顕微鏡画像から分裂溝の位置を定量的に計測して調べた。中内胚葉細胞における *Not* mRNA を Whole mount *in situ* hybridization 法により染色し、その局在を共焦点顕微鏡により観察して定量的に評価した。胚葉運命の分離を、内胚葉・中胚葉特異的なマーカー遺伝子の発現により検証した。

4. 研究成果

細胞周期制御因子 wee1 を隣接細胞特異的に機能阻害した胚で中内胚葉細胞の細胞分裂面の位置を計測すると、分裂面が中胚葉側に移動したことが統計的に支持された。細胞質分裂後に *Not* mRNA のシグナル強度を中胚葉細胞と内胚葉細胞で計測すると、機能阻害により、内胚葉細胞に正常胚より多くの *Not* mRNA が受け継がれており、内胚葉決定因子の *Lhx3* の発現が失われていた。隣接細胞と中内胚葉細胞の間では、細胞表層張力が異なっていることがわかっていたので、細胞周期のズレとの関係を調べたところ、細胞周期のズレが表層張力の違いを作り出していることがわかった。さらに、wee1 の機能阻害胚で表層張力の違いを回復した胚では、細胞周期のズレを変化させた際に起こった分裂面の位置の変化、*Not* mRNA の非対称分配の崩れ、内胚葉決定の攪乱がいずれも抑制され、細胞周期のズレが細胞表層張力の非対称性を介して胚葉運命分離に関わることを示唆された。

中内胚葉細胞と隣接細胞の間の細胞表層張力の違いがどのようにして中内胚葉細胞の分裂面の位置を制御しているか調べたところ、表層張力の違いが中内胚葉細胞の長軸の向きを決めていることがわかった。中内胚葉細胞の形態を定量的に評価したところ、分裂装置が形成されて、その向きが決まる過程(ただし分裂溝の形成以前)で徐々に長軸と短軸の差が明確になっていた。表層張力の違いの大小と長軸と短軸の差が明確さの間には強い相関が認められ、隣接細胞特異的な Rho の機能阻害・機能亢進により長軸形成の過程がそれぞれ阻害・促進された。

長軸の向き、細胞周期のズレ、分裂面の位置などを用いた統計的モデルを作成し、AIC を用いて統計モデルを評価したところ、細胞周期のズレと表層張力の違いにより分裂溝の位置が決まる、というモデルが選択された。これらの実験と数理的解析の結果から、中内胚葉細胞と隣接する細胞の間での細胞周期のズレが細胞の表層張力の違いを作り出すことが示唆された。この違いが中内胚葉細胞に明確な長軸を作り出し、その長軸に従って細胞分裂が進行することで適切な位置に細胞分裂面が作られ、胚葉運命が分離されることがわかってきた。

以上の結果を論文投稿準備中であり、学会発表では第 93 回遺伝学会で発表し、Best Paper 賞を受賞した。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Naohito Takatori, Yuuya Tachiki | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Cell cycle difference creates cortical tension difference that separates germ layer fates | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.11.10.468043 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 高鳥直士 |
| 2. 発表標題 プレナリーワークショップ -第 90 回大会 BP 賞受賞講演から- 胚葉運命分離に関わる細胞核移動を制御する機構の解析（招待講演） |
| 3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 清水 優紀、高鳥 直士 |
| 2. 発表標題 中胚葉運命と内胚葉運命を分離する核移動の過程における Not mRNA の発現レベルの解析 |
| 3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 古井 佳奈、高鳥直士 |
| 2. 発表標題 マボヤ胚中内胚葉細胞における JAK2 依存的な紡錘 体位置制御機構の解析 |
| 3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高鳥直士、立木佑弥 |
| 2. 発表標題 細胞周期のズレによる細胞変形を介した中胚 葉・内胚葉運命の分離 |
| 3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 高鳥直士、立木佑弥 |
| 2. 発表標題 未定 |
| 3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|