

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：31101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06735

研究課題名(和文) 胴部と尾部の境界を創り出す新規の形態形成機構の細胞・分子・力学基盤及び進化の研究

研究課題名(英文) Study of cellular, molecular and mechanical mechanisms of the trunk/tail boundary formation and analysis of evolutionally aspects of the morphogenesis.

研究代表者

中本 章貴 (Nakamoto, Ayaki)

青森大学・薬学部・准教授

研究者番号：40738100

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)：脊索動物ホヤ胚は、形態形成の仕組みを個々の細胞レベルで解析するのに適した系の1つである。ホヤのオタマジャクシ幼生が形作られる過程では、胴部と尾部の境界に砂時計型の「くびれ」が形成される。本研究では、マボヤ(*Halocynthia roretzi*)を用い、「くびれ」形成機構の解析を行った。その結果、将来胴部となる前方の上皮細胞と将来尾部となる後方の上皮細胞が、明瞭な境界を保ちつつ異なった方向に分裂することによって「くびれ」が形成されることが明らかとなった。このような分裂方向の違いによって「くびれ」や「凹み」が形成される仕組みはこれまで報告されておらず、本研究は形作りの新原理を提供するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の胚発生過程では、細胞が適切な位置に配置されることによって、複雑で精密な構造の組織や器官が形成される場合がある。例えば、ある一定の方向に沿った細胞分裂によって組織が伸長したり、厚みが増加することが知られている。しかしながら、方向性を持った細胞分裂がそれ以外の形態形成に関与するのことは明らかではなかった。本研究の学術的意義は、方向性を持った細胞分裂が上皮細胞層の「くびれ」形成に関与することを初めて明らかにしたことである。本研究成果は、組織、器官、体全体の形づくりの更なる理解に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ascidians are marine invertebrates that belong to the phylum Chordata. They are useful model systems to study mechanisms of morphogenesis at individual cell levels. In transitioning from the neurula and tailbud stages, a boundary between the future trunk and tail region appears morphologically as an hourglass-like epithelial bending. In this study, an ascidian *Halocynthia roretzi* was used to analyze the mechanisms of epithelial bending. It was found that differently oriented cell divisions in the epidermis of the future trunk (anterior) and tail (posterior) regions create an hourglass-like epithelial bending between the two regions. This study is the first report that regulation of cell division orientation contributes to the epithelial bending and provides a new principle for morphogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 細胞極性 分裂装置

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物の胚発生において、個々の細胞がどのように協調して振る舞い、新しい形を創り出すのかを明らかにすることは重要な課題の1つである。特定の領域における個別の形態形成の仕組みは、様々なモデル生物を用いて詳細に明らかにされている。しかしながら、空間的、時間的に異なる形態形成運動がどのように連動しているのか、どのような力学的カスケードが関与しているのかは十分には明らかにされていない。また、マクロな視点では、細胞の振る舞いにどのような変化が生じ、新しい形態が進化したのかについても十分には明らかにされていない。

脊索動物ホヤ胚は細胞数が比較的少なく、発生に個体差が少ないことから、このような課題に取り組む上で適した系の1つである。マボヤ(*Halocynthia roretzi*)の発生において、神経胚から尾芽胚になるときに体の前後中央付近に砂時計型の「くびれ」が形成され、胴部と尾部の境界は初めて目に見えて形成される。その後、尾部は著しく伸長し、オタマジャクシ幼生期では尾部は胴部の4~5倍の長さになる。本研究ではオタマジャクシ幼生が形づくられる初期段階である「くびれ」に着目し、「くびれ」が形成される仕組みの解析を行った。

### 2. 研究の目的

胴部と尾部の境界を創り出す「くびれ」という上皮形態形成の仕組みを明らかにすること、2種のホヤの上皮形態形成機構の比較から形態進化との関連を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では蛍光タンパク質を発現させてのライブイメージング、阻害剤を用いたタンパク質の機能阻害、免疫染色等の手法を用い、主に以下のような実験・観察を行った。

#### (1) 「くびれ」が形成される過程の上皮細胞の振る舞いの観察

膜局在型の蛍光タンパク質(PH-YFP)の mRNA を受精卵に顕微注入し、上皮細胞の細胞膜を可視化して上皮細胞の振る舞いをライブイメージングで観察した。

#### (2) 上皮細胞の分裂装置の振る舞いの観察

微小管結合タンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質(MAP7-EGFP)の mRNA を受精卵に顕微注入し、上皮細胞の分裂装置の振る舞いをライブイメージングで観察した。

#### (3) ダイニン阻害剤の「くびれ」形成に対する影響の解析

分裂装置の方向制御に関わっていることが知られているモータータンパク質ダイニン(Lu and Johnson, 2013)に着目し、ダイニンの阻害剤(Ciliobrevin D)で胚を処理し、「くびれ」形成および上皮細胞の分裂方向への影響を解析した。

#### (4) ダイニンの免疫染色およびライブイメージングの観察

ダイニンの上皮細胞における発現を観察するために、ダイニンの免疫染色を行った。また、ダイニンと蛍光タンパク質の融合タンパク質(DCIC-EGFP)の mRNA を上皮細胞の前駆細胞に顕微注入し、ダイニンの細胞内局在をライブイメージングで観察した。

#### (5) ヨーロッパザラボヤ (*Ascidella aspersa*)を用いた「くびれ」形成の解析

ヨーロッパザラボヤのオタマジャクシ幼生の胴部と尾部の長さの比を計測し、マボヤのオタマジャクシ幼生と比較した。また、上皮細胞の分裂方向のライブイメージング観察を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 「くびれ」が形成される過程の上皮細胞の振る舞いの観察

「くびれ」の位置と細胞系譜の関係を解析したところ、「くびれ」の最深部(胴部と尾部の境界)は、上皮細胞の前後の系譜の境界と一致していることが明らかとなった(図1赤線)。ライブイメージングの観察から、「くびれ」は上皮細胞の分裂に伴って形成されることが明らかとなった。さらに、細胞分裂阻害剤(Hydroxyurea)で胚を処理すると、上皮細胞の分裂が阻害されるとともに、「くびれ」形成が著しく阻害された。このことから、「くびれ」形成には上皮細胞の分裂が必要であることが示唆された。

また、上皮細胞は明瞭な境界を持って異なった方向に分裂することも明らかとなった。すなわち、将来胴部となる前方の細胞は胚周囲(背腹軸方向)に沿って分裂するのに対し、将来尾部となる後方の細胞は前後軸に沿って分裂した。興味深いことに、分裂方向の境界(図1青線)と上皮細胞の前後の系譜の境界(図1赤線)は1細胞列分ずれていた。

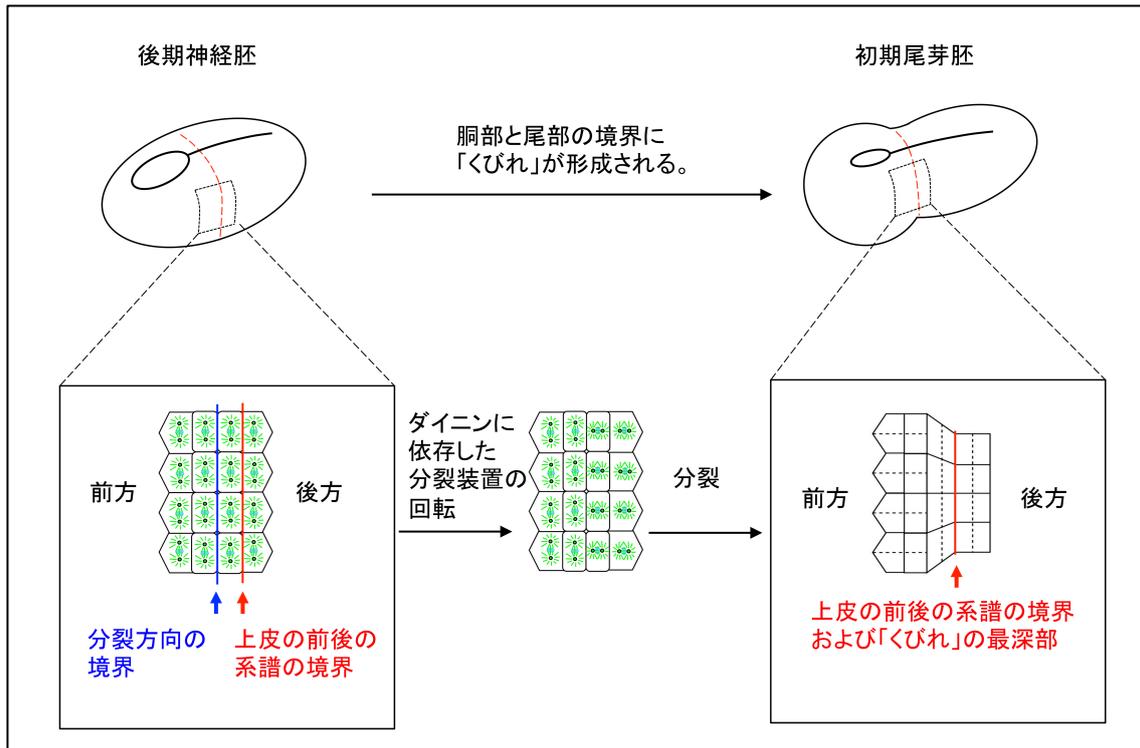


図1：マボヤ胚における「くびれ」形成の仕組み

（左側）後期神経胚の模式図。枠内は将来「くびれ」が形成される領域の上皮細胞の模式図を示している。上皮細胞の分裂方向の境界（青線）と前後の系譜の境界（赤線）は1細胞列ずつずれている。

（中央下段）後方の上皮細胞ではダイニンに依存した分裂装置の回転が生じる。その結果、前方の上皮細胞は胚周囲に沿って分裂し、後方の上皮細胞は前後軸に沿って分裂する。

（右側）初期尾芽胚の模式図。枠内は「くびれ」が形成された領域の上皮細胞の模式図を示している。分裂後の上皮細胞の配置を示しており、点線は分裂面を示している。明瞭な境界を持った異なる方向の分裂が生じた結果、胚周囲の長さや細胞数に顕著な差が生じるため、「くびれ」が形成される。

#### （2）上皮細胞の分裂装置の振る舞いの観察

上皮細胞の分裂方向の違いをさらに解析するため、分裂装置の振る舞いをライブイメージングで観察した。その結果、分裂方向の境界前方の上皮細胞は、分裂装置が胚周囲に沿った位置に形成され、胚周囲に沿って分裂した。これに対し、分裂方向の境界後方の上皮細胞は分裂直前に分裂装置が約90度回転し、前後方向に分裂することが明らかとなった。この結果から、明瞭な境界を持った異なる方向の分裂が生じた結果、胚周囲の長さや細胞数に顕著な差が生じるため、「くびれ」が形成される可能性が示唆された。

#### （3）ダイニン阻害剤の「くびれ」形成に対する影響の解析

上皮細胞が異なる方向に分裂することによって「くびれ」が形成されるという可能性を検討するために、ダイニンに着目した。ダイニンはモータータンパク質の1つであり、様々な生物で分裂装置の方向付けに関与することが知られている(Lu and Johnson, 2013)。ダイニン阻害剤(Ciliobrevin D)で胚を処理したところ、「くびれ」の形成が異常になるとともに、上皮細胞の分裂方向も異常になることが明らかとなった。この結果は、後方上皮細胞の分裂装置の回転はダイニンに依存することを示唆しており、「くびれ」形成には分裂方向の制御が重要であることを示唆している。

#### （4）ダイニンの免疫染色およびライブイメージングの観察

上皮細胞におけるダイニンの細胞内局在を免疫染色とライブイメージングの両方で観察した。その結果、後方の上皮細胞では分裂装置が回転する前にダイニンが前方表層に濃縮していることが明らかとなった。このことはダイニンが分裂装置の前後方向への回転に関与することをさらに強く示唆するとともに、後方の上皮細胞が前後軸に沿った極性を帯びていることを示唆し

ている。

(5) ヨーロッパザラボヤ (*Asciodiella aspersa*)を用いた「くびれ」形成の解析

ヨーロッパザラボヤのオタマジックシ幼生の胴部と尾部の長さの比を計測し、マボヤのオタマジックシ幼生と比較した結果、ヨーロッパザラボヤの幼生はマボヤと比較して胴部が長く、尾部が短いことを見出した。このことは、ヨーロッパザラボヤの「くびれ」の位置はマボヤより後方にあり、進化の過程で「くびれ」の位置がシフトすることで胴部/尾部のプロポーシオンが変化したことを示唆している。

ヨーロッパザラボヤでも分裂方向の違いによって「くびれ」が形成されるのかを検討するために、上皮細胞の分裂方向の予備的な観察を行った。その結果、将来胴部となる前方の上皮細胞と将来尾部となる後方の上皮細胞は同じ前後方向に分裂することが観察された。このことはヨーロッパザラボヤでは分裂方向の違いは「くびれ」形成に関与しない可能性を示唆している。

脊索動物ホヤの特徴の1つとして、オタマジックシ型の幼生が挙げられる。本観察結果は、オタマジックシ幼生という共通の形を作り上げる仕組みが進化の過程で変更されてきたことを示唆しており、発生システムの浮動(Developmental System Drift)の研究に繋がると考えられる。

引用文献

Lu, M.S., and Johnston, C.A. (2013). Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development* 140, 1843–1856.

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 1件）

1. 著者名 Ayaki Nakamoto, Gaku Kumano	4. 巻 23
2. 論文標題 Dynein-Mediated Regional Cell Division Reorientation Shapes a Tailbud Embryo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	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） 10.1016/j.isci.2020.100964	査読の有無 有
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ホヤの幼生がオタマジャクシ型になる 仕組みを発見 上皮細胞の「くびれ」を創り出す新しい原理  <a href="https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/results/detail---id-49280.html">https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/results/detail---id-49280.html</a></p>
---

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
---------	---------