

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H06259・20K20304

研究課題名(和文)分泌蛋白質の拡散速度の時空間制御

研究課題名(英文)Spatiotemporal regulation of morphogen distribution

研究代表者

猪股 秀彦(Inomata, Hidehiko)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：60372166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：発生過程において、胚は複雑な組織を構築するために分泌タンパク質モルフォゲンを利用している。モルフォゲン分子は産生細胞から分泌され、細胞外空間を拡散することで濃度勾配を形成する。胚を構成する細胞は、このモルフォゲン分子の濃度に応じて異なる組織に分化することが知られている。本研究では、モルフォゲン分子の空間分布を光により胚内で時空間制御する新規技術の開発を行った。さらに、モルフォゲン分布に擾乱を付与することで、組織パターン形成に異常が生じることを明らかにした。本研究成果は、モルフォゲン動態と組織パターン形成の相互機序を理解するための有力なツールになると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分泌タンパク質モルフォゲンが形成する濃度勾配は、組織パターン形成の中心的な役割を果たしている。さらに、モルフォゲンの分布は発生過程において動的に変動しており、モルフォゲン動態あるいはモルフォゲン分布のノイズに対して、胚が再現性良く組織パターンを形成するメカニズムは不明な点が多い。本研究成果は、人為的に胚内のモルフォゲン分布を時空間的にコントロールすることが可能であり、モルフォゲン動態に擾乱を付与することで、組織パターン形成に与える影響を詳細に解析することが可能である。

研究成果の概要(英文)：During the developmental processes, complex tissues of the embryo are formed by secreted proteins such as morphogen. Morphogens are secreted by the producing cells and diffuse through the extracellular space, forming a concentration gradient. It is known that cells differentiate into various tissues depending on local morphogen concentration. In this study, we have developed a novel method for spatiotemporal regulation of morphogen distribution in the embryo by light stimulation. Furthermore, we found that perturbation of morphogen distribution disrupts pattern formation. We think that this method will be a powerful tool for understanding the interactive mechanisms of morphogen dynamics and tissue patterning.

研究分野：発生生物学

キーワード：モルフォゲン 濃度勾配 時空間制御

1. 研究開始当初の背景

発生過程において、胚は分化・パターン形成・形態形成などを介して複雑な組織を再現性良く構築する。特に、組織パターン形成に関しては、分泌タンパク質モルフォゲンが胚内に形成する濃度勾配が重要な役割を果たしている。モルフォゲンは胚の局所に存在する産生細胞から分泌され、細胞外空間を拡散することで濃度勾配を形成する。さらに、モルフォゲン分子に結合するインヒビターや分解酵素の存在も知られており、勾配形状は厳密に制御されている。

近年、モルフォゲン濃度勾配は従来考えられていたような静的な勾配ではなく、発生過程において動的に変動することが報告されている。例えば、胚の大きさに応じて勾配の傾きが変化し、卵サイズの大小に関わらず相似形を保った胚が生まれることが知られている(スケーリング)。さらに、発生過程において、産生細胞あるいは胚の形状は動的に変形するため、これらの変形はモルフォゲン濃度勾配の形状を不安定化させるノイズ成分となりえる。しかし、このようなモルフォゲン分布の動的変動・ノイズに対して、胚が再現性良く組織パターンを構築するメカニズムは不明な点が多い。

モルフォゲンの動的変動とパターン形成に関しては、ノイズから自発的なパターンが形成されるチューリングモデルのように、様々な数理モデル(反応拡散方程式など)がこれまでに提唱されている。実際、粘菌などではマイクロ流体デバイスを用いて実際に様々なモルフォゲン動態(cAMPの進行波など)を人工的に作出し、粘菌がcAMP依存的に集積する過程が詳細に解析されている。一方、胚発生においても、胚内の濃度勾配を制御する試みが少数行われている。例えば、Morphotrap法では、目的の分泌タンパク質にGFPを融合し、さらに抗GFP抗体(ナノボディ)を融合した膜タンパク質を同時に発現させる。その結果、分泌タンパク質は膜タンパク質上に集積し、勾配形状を部分的に制御することができるが、モルフォゲン動態を時空間的に制御するには至っていない。

このように、モルフォゲン動態は組織パターン形成において重要な役割を果たすことが報告されているが、数理モデルで提唱されているような現象が実際に胚内で生じているかは不明な点が多い。その大きな要因の一つに、胚内でモルフォゲン分布を時空間的に制御する実験系の欠如がある。粘菌のマイクロ流体デバイスのように、胚内で任意のモルフォゲン動態を人為的に作出することは、「モルフォゲン動態と組織パターン形成の相互機序」を理解するために必須である。

2. 研究の目的

モルフォゲン動態と組織パターン形成の相互機序を理解するには、胚内で自由に分泌タンパク質の分布を時空間的に制御する新規技術の開発が必須である。光スイッチタンパク質を用いた細胞内タンパク質の分布制御は多く見られるが、細胞外タンパク質を対象に行われた研究はほとんど報告されていない。本研究では、光スイッチタンパク質を細胞外タンパク質に応用することで、胚内の分泌タンパク質を時空間的に制御する新規技術の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 様々な光スイッチタンパク質を膜タンパク質の細胞外領域に融合する。また、分泌タンパク質には光刺激依存的に光スイッチタンパク質に結合するドメインを融合する。これにより、光照射部位に分泌タンパク質を集積させる。

(2) 培養細胞を用いて、光刺激依存的に分泌タンパク質が集積するコンストラクトの選定を行う。選定方法としては、分泌タンパク質に蛍光タンパク質を融合し、光刺激時に膜タンパク質上に集積する分泌タンパク質の蛍光輝度値を計測する。

(3) 選定したコンストラクトをゼブラフィッシュ胚に発現させ、*in vivo*においても光刺激依存的に分泌タンパク質が膜タンパク質上に集積するか解析を行う。

(4) 光照射を制御することで、人為的に分泌タンパク質の動態制御を行う。特に、進行波と人工的なノイズの作製を胚内で試みる。

(5) 選定したコンストラクトにモルフォゲン分子(Nodal)を融合し、モルフォゲン分布をゼブラフィッシュ胚で制御することで組織パターン形成への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) 分泌タンパク質の分布を時空間的に制御するために、光スイッチタンパク質 (iLID, CRY2 など) を膜タンパク質の細胞外領域に融合させた。また、分泌タンパク質には、光刺激によって構造を変化させた光スイッチタンパク質に特異的に結合するドメイン (SspB, CIB1 など) を融合した。さらに、光刺激依存的な分泌タンパク質の集積過程を観察するために、膜タンパク質および分泌タンパク質に様々な蛍光タンパク質 (sfGFP, mCherry など) を付加した。これらのドメインを様々な組み合わせで融合し、多数のコンストラクトを作製した。

(2) 機能的なコンストラクトの選定には、HEK293 細胞または COS7 細胞を用いて各々のコンストラクトを発現させた。その後、光刺激依存的に分泌タンパク質が細胞質上に集積する過程を分泌タンパク質の蛍光強度を指標に評価を行った。最も機能的な膜タンパク質 (mem-iLID) と分泌タンパク質 (sec-SspB) の組み合わせでは、光刺激により約 2 倍程度の蛍光輝度値の上昇が見られた (図 1)。また、細胞膜の一部を短時間光刺激することで分泌タンパク質が細胞膜の局所に集積し、その後再び培地中に拡散する様子が観察された。これらの結果は、mem-iLID を発現している培養細胞が、光刺激依存的に分泌タンパク質を集積することを示しており、*in vitro* において選定したコンストラクトが適切に機能していることを示している。

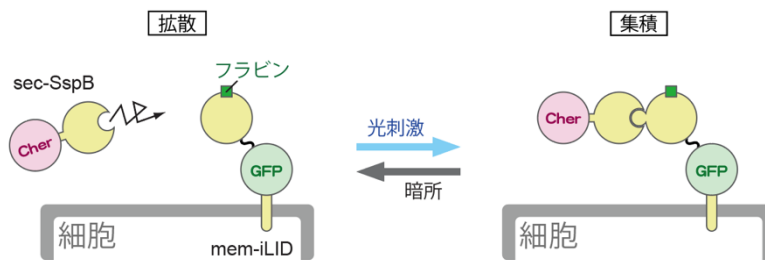


図 1. 光刺激を用いた分泌タンパク質の分布制御

(3) 次に、選定したコンストラクト (mem-iLID と sec-SspB) を用いて、ゼブラフィッシュ胚においても同様に光刺激依存的な分泌タンパク質の集積が観察されるか検証を行った。16 細胞期の 1 割球に mem-iLID を、他の 1 割球に sec-SspB をインジェクションし、30%エピボリ一期に光刺激を行った。しかし、培養細胞とは異なり、光刺激依存的な分泌タンパク質の集積は観察されなかった。

(4) 光スイッチタンパク質は光に応答して構造を変化させる際に、フラビン化合物である補因子を必要とする。細胞内ではフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) が合成されているため、外部からフラビン化合物を添加する必要はない。また、培養細胞の培地もリボフラビン (RF) が含まれているため、添加の必要はない。一方、ゼブラフィッシュ胚の細胞外領域ではフラビン化合物が存在せず、光スイッチタンパク質が機能できていない可能性がある。これを検証するために、細胞外領域にフラビン化合物をインジェクションし、上記と同様に解析を行った。その結果、光刺激条件下において、sec-SspB が mem-iLID 発現細胞の膜上に集積する様子が観察された。定量的に分泌タンパク質の集積量を測定するために、細胞膜に局在する TagRFP-CAAX を同時に発現させ、膜特異的な ROI を作製し蛍光輝度値を計測した。その結果、光照射下において、フラビン化合物を注入していない胚では分泌タンパク質の集積はほとんど見られなかったが、フラビン化合物の添加により 3 倍以上分泌タンパク質が膜上に集積した。これらの結果は、*in vivo* において、mem-iLID と sec-SspB の組み合わせが光刺激依存的に分泌タンパク質の空間分布を制御できることを示している。

(5) 本研究の目的は、分泌タンパク質 (モルフォゲン) の動態を胚内で制御することにある。そこで、マイクロ流体デバイスを用いて進行波を人工的に作製するように、本手法を用いて胚内に擬似的に分泌タンパク質の進行波を形成することができるか検証した。胚全体に mem-iLID と sec-SspB を発現させ、胚の右端から左端に向かってレーザーを移動させ、分泌タンパク質の集積領域を人為的に転移させた。その結果、分泌タンパク質の集積によって蛍光輝度値が上昇した領域が、レーザーの移動に伴い転移し、擬似的な分泌タンパク質の進行波が胚内に形成された。また、発生過程においてモルフォゲン産生細胞の移動、および胚の変形は、モルフォゲン濃度勾配のノイズ要因になると考えられる。そこで、本手法を用いて、分泌タンパク質の空間分布に短期的なノイズを形成することが可能か検証した。先ほどと同様に、胚全体に mem-iLID と sec-SspB を発現させ、胚の 1 細胞に短期的に光を照射した。その結果、短期的に分泌タンパク質が細胞膜上に集積し、その後再び細胞外領域に拡散し蛍光輝度値が低下する様子が観察された (図 2)。これらの結果は、本手法が *in vivo* の分泌タンパク質の動態を制御するのに適した方法であることを示している。

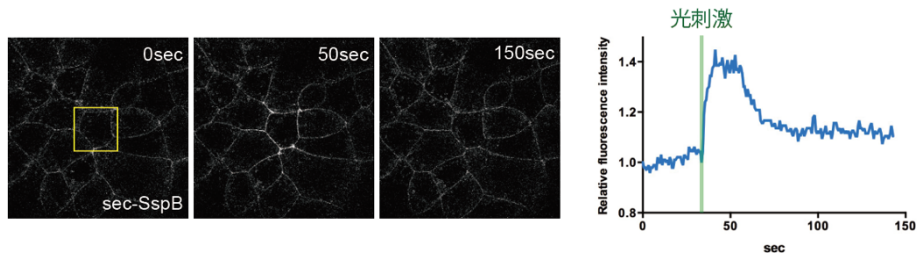


図2. In vivo における1細胞レベルの分泌タンパク質分布制御

(6) 本手法の in vivo における有効性が示されたが、実際に光刺激によりモルフォゲンを分布制御し、さらに組織パターン形成に擾乱を付与することが可能か検証を行った。発生過程において、ゼブラフィッシュ胚は三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）を形成するが、中胚葉はモルフォゲン Nodal によって誘導されることが知られている。そこで、sec-SspB に Nodal を融合し、光刺激依存的に Nodal を異所的に動物極側に集積させた。暗所で育てた胚は野生胚と比べて大きな違いは検出されなかったが、光刺激によって Nodal を動物極側に集積させると異所的な中胚葉の誘導が確認された。以上の結果は、本手法が胚内のモルフォゲン動態を時空間的に制御する有効な方法であり、モルフォゲン動態と組織パターン形成の相互機序の理解に役立つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hidehiko Inomata
2. 発表標題 Novel extracellular fluid mechanism for regulation of secreted proteins in <i>Xenopus laevis</i> .
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪股秀彦
2. 発表標題 Extracellular fluid dynamics regulates spatiotemporal distribution of secreted proteins in <i>Xenopus</i> embryos
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪股秀彦
2. 発表標題 Scaling of dorsal-ventral patterning by embryo size-dependent degradation of chordin
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪股秀彦
2. 発表標題 Regulation of secreted proteins via extracellular fluid dynamics
3. 学会等名 7th Cell aggregation meeting（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪股秀彦
2. 発表標題 体液動態を介した分泌タンパク質の物理的制御
3. 学会等名 細胞構成研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪股秀彦
2. 発表標題 モルフォゲンの拡散と流体ダイナミクス
3. 学会等名 細胞外環境と老化研究のフロンティア研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪股秀彦
2. 発表標題 生物の相似性を保証する濃度勾配スケーリング
3. 学会等名 11th Japanese Xenopus meeting (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 猪股秀彦
2. 発表標題 Extracellular fluid dynamics and morphogenesis
3. 学会等名 50th 日本発生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 猪股秀彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 5
3. 書名 生体の科学	

〔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
---------	---------