

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15358

研究課題名（和文）新規検出系による体軸骨格筋の分節性崩壊過程のメカニズム解明

研究課題名（英文）The mechanism of segmental breaking in the axial muscle development using a novel detection system

研究代表者

磯部 茉莉（Isobe, Mari）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：60850758

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：魚からヒトに至る脊椎動物の体軸骨格筋は、分節性に区切れた体節から筋芽細胞が分化し、体節の分節性が崩壊するとともに隣り合った体節由来の筋細胞が融合することで形成される。現在までに体節がどのように崩壊していくかは分かっていない。本研究では、炭素コーティングを応用した卵殻外でのニワトリ胚培養システムを導入することで、安定したニワトリ胚培養システムを作製し、この培養システムを用いて詳細なタイムラプス観察を行うことができた。今後はこれらのシステムを応用することで、myoseptum消失に関する遺伝子探索を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水生生物が陸生生物へと進化する過程では、水中での単純な運動とは異なり陸上での複雑な運動が必要となる。このような複雑な運動を可能とするのが高等動物の体幹筋にて発達している回旋筋群であり、回旋筋群の形成には分節性が崩壊し分節をまたいだ構造となることが必須である。以上のように本研究は、分節性の崩壊過程を明らかにすることで体軸骨格筋の形成過程を解明するだけでなく、脊椎動物の進化過程の理解に繋がる重要な意義がある。

研究成果の概要（英文）：Axial skeletal muscles of vertebrates, from fish to humans, are formed by fusing adjacent somite-derived myocytes, which are differentiated from myoblasts in segmentally demarcated somite, on collapsing segmentation of somites. The mechanism by which the segmentation of somites breaks down has not been understood to date. In this study, the novel chicken culture system using carbon coating enabled time-lapse observation of early embryos in culture dish. We would seek the gene(s) involved in the myoseptum breaking down by utilizing this culture system.

研究分野：解剖学

キーワード：ニワトリ胚 胚発生 筋発生 体軸骨格筋形成 myoseptum

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物における胚発生では、原腸陥入により三胚葉に分かれた後、伸長した中胚葉が一定間隔でくびり切れることで体節が形成される。その後、表皮や脊索などの周辺環境からのシグナルを受け、体節の一部は後に体幹筋となる筋節に分化する。分節性に区切れた体節から筋芽細胞が分化し、体節の分節性が崩壊することにより隣り合った体節由来の筋細胞が融合し、体軸骨格筋が形成される。魚類や両生類などの下等生物は分節性が残存したまま体幹筋が形成されるのに対し、鳥類や哺乳類などの高等生物では発生過程で分節性が消失し、長大な骨格筋を形成する(図1)。このことから高等脊椎動物における分節性の消失は発生過程における重要な過程であることが分かる。しかし、筋節の発生・分化過程は時期特異的筋分化マーカーの発見により詳細が明らかになりつつあるのに対し(Berti F. et al., J. Anat. 2015. Mok et al., J. Anat. 2015)、分節性の消失は瞬間的に生じる現象であるため、形態学的に捉えることが難しくその時期や過程の詳細に関する理解が進んでいない。

魚類における体軸骨格筋の分節性は myoseptum と呼ばれる筋隔膜が存在することで維持される(Abe et al., Cell Rep. 2019)。一方、哺乳類や鳥類では魚類と同様に各体節の間に myoseptum が形成される(図2)が、発生過程のどこかで消失する。哺乳類のような高等動物の体幹筋は、なぜ分節性が崩壊するのか、またどのように崩壊するのかが学術的な問いである。水生生物が陸生生物へと進化する過程では、水中での単純な運動とは異なり陸上での複雑な運動が必要となる。このような複雑な運動を可能とするのが高等動物の体幹にて発達している回旋筋群であり、回旋筋群の形成には分節性が崩壊し分節をまたいだ構造となることが必須である。以上のように本研究は、分節性の崩壊過程を明らかにすることで体軸骨格筋の形成過程を解明するだけでなく、脊椎動物の進化過程の理解に繋がる重要な意義がある。

### 2. 研究の目的

本研究ではニワトリ胚の分節性崩壊機構を明らかにするために、myoseptum の消失機構を解明することを目的とする。具体的にはニワトリ胚を用いて、(1) 分節性崩壊に関与する遺伝子の探索を行うために、隣り合う筋節由来の筋芽細胞融合を検出する新規検出系の構築を目指す。さらに、(2) 作製した検出系を用いたライブイメージングにより、各体節の間に一時的に形成される myoseptum の消失過程を正確かつ詳細に調べる。

### 3. 研究の方法

本研究では 分節性消失時の形態学的な変化を直接的に捉えるだけでなく、隣り合った筋節由来の筋細胞の融合を検出することで、分節性消失を間接的に捉えることにより遺伝子探索の効率化を図る。方法 では極めて少ない細胞融合を感度良く検出する系が必須となる。そこで、光照射により蛍光色に変化する蛋白質 Kaede を用い、遺伝子導入後、一部の体節の細胞のみ緑色から赤色に変化させ、それらが細胞融合すると蛍光色が重なり黄色になることで初期の分節性消失を間接的に簡便かつ高感度に検出できる(図3)。これまで見逃されてきた分節性崩壊という現象に着目し、さらにオリジナルな検出系を利用してこの現象を細胞融合の観点から解明することで全く新しい発見に繋がると予想される。

(1)ニワトリ胚を用いた myoseptum の消失時期の同定

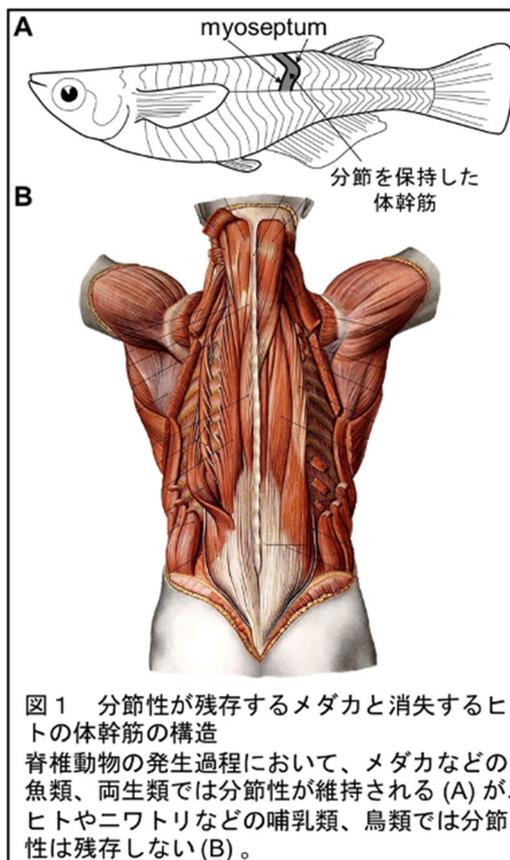


図1 分節性が残存するメダカと消失するヒトの体幹筋の構造  
脊椎動物の発生過程において、メダカなどの魚類、両生類では分節性が維持される(A)が、ヒトやニワトリなどの哺乳類、鳥類では分節性は残存しない(B)。

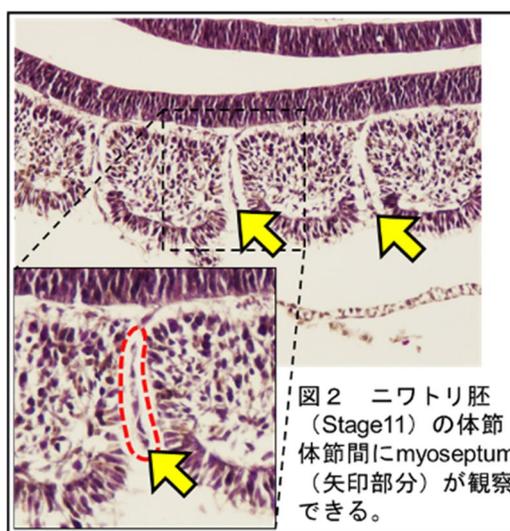


図2 ニワトリ胚 (Stage11) の体節体節間にmyoseptum (矢印部分) が観察できる。

### 筋発生マーカー抗体の作製

myoseptum 消失時期を発生段階と比較するために筋発生マーカーでの免疫染色が必要となるため、MyoD と Myogenin 抗体を作製する。

### パラフィン切片を用いた形態解析

体節形成初期から中期 (HH8-25) のニワトリ胚を 4%PFA で固定し、発生段階ごとにパラフィン切片を作製する。作製した切片を用いて HE 染色および免疫染色を行い、myoseptum 消失時期を同定する。

(2) 光照射色変換タンパク質 Kaede を用いた myoseptum 消失検出系の作製

紫外光照射条件の検討: 遺伝子導入 18 時間後のニワトリ胚体節の一部に、紫外光 (405nm) を照射し緑色蛍光から赤色蛍光に色変換を行う。紫外光の波長、照射時間を詳細に検討する。

ニワトリ胚 *ex ovo* 培養系の樹立: ニワトリ胚を卵黄膜ごと濾紙で挟むようにして切り出し、シャーレ内で培養する。

myoseptum 消失の検出: 隣り合った筋節由来の筋細胞が融合する過程をライブイメージング法により共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。隣り合った筋節由来の細胞が融合すると、蛍光顕微鏡下で黄色に光った像が確認できる (図 3B)

### 4. 研究成果

(1) ニワトリ胚を用いた myoseptum 消失時期の同定

### 筋発生マーカー抗体の作製

発生ステージを分けるために必要な MyoD、Myogenin、Myosin heavy chain などの筋発生マーカーのうち、MyoD、Myogenin のニワトリ胚に適した抗体が市販されていなかったため、抗体作製することとした。当研究室で購入しているニワトリ胚より遺伝子全長のクローニングを行い、蛋白質精製を行ったが十分な結果が得られなかったため、現在は遺伝子の一部の配列を用いた抗体精製を実施している。

### パラフィン切片を用いた形態解析

におけるマーカー作製に時間を要しているため発生ステージ分類は実施できていないが、HE 染色による形態解析はできている。

(2) 光照射色変換タンパク質 Kaede を用いた myoseptum 消失検出系の作製

### 紫外光照射条件の検討

本研究では pEF1 プラスミドを用い、pEF1-Kaede を作製した。現在、作製したプラスミドを用いて照射条件の検討を進めているが、卵殻内での紫外光照射は現状のシステムでは困難であるため、*ex ovo* 培養系を用いて遺伝子導入することが必須となってくる。*ex ovo* 培養系を長寿命化させて長期間の培養を実現するには、ニワトリ胚を囲む膜の安定性が必須である (図 4A) にも関わらず、ニワトリ胚への遺伝子導入のためには胚周囲の膜を破り電極を差し込む必要があるため、遺伝子導入後の生存率が著しく低くなるという結果が得られている。今後、膜を破らずに遺伝子導入する方法か、破った膜を人工膜で補強する方法 (図 4B) を試すことで、*ex ovo* 培養系での遺伝子導入を可能とすることを目指す。

### ニワトリ胚 *ex ovo* 培養系の樹立

Darnell 16 らの報告を参考に *ex ovo* 培養系を作製したところ、HH15 まで安定したの胚発生が確認できた。これにより、胚発生ステージに関わらず培養開始 24 時間程度の発生過程の観察は可能となり、24 時間のタイムラプス撮影にも成功した (若手研究、2020-2021 年度)。さらに、青野祐美教授 (鹿児島大学工学部) の下で行った炭素コーティングを施した

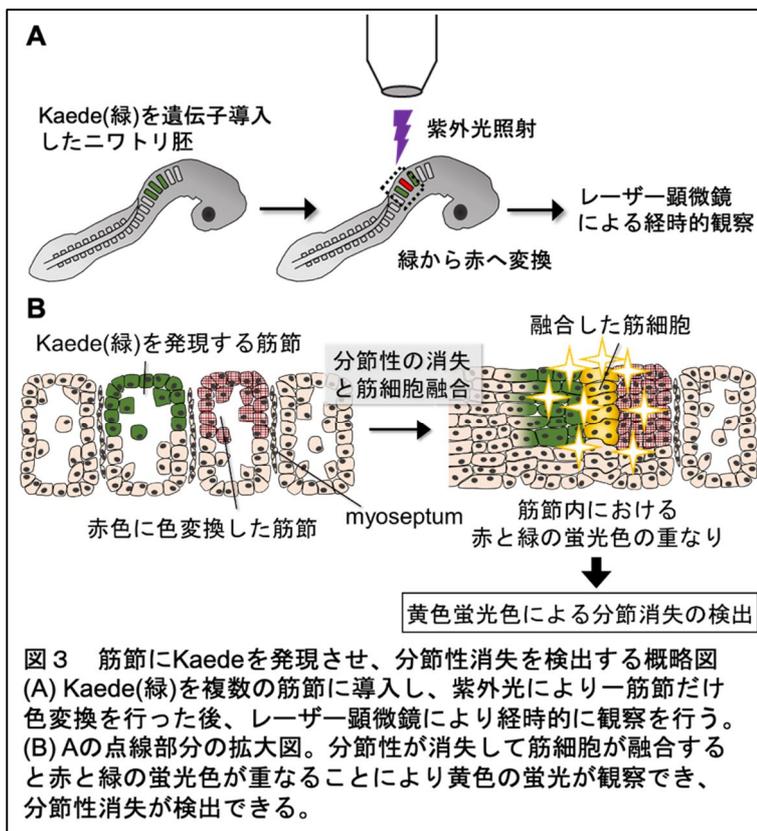


図3 筋節にKaedeを発現させ、分節性消失を検出する概略図 (A) Kaede(緑)を複数の筋節に導入し、紫外光により一筋節だけ色変換を行った後、レーザー顕微鏡により経時的に観察を行う。(B) Aの点線部分の拡大図。分節性が消失して筋細胞が融合すると赤と緑の蛍光色が重なることにより黄色の蛍光が観察でき、分節性消失が検出できる。

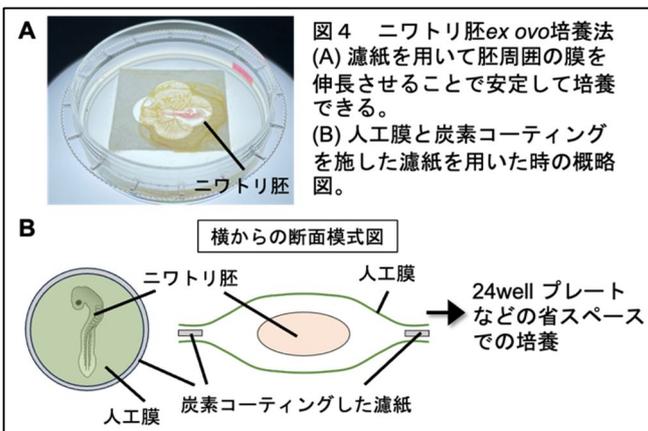


図4 ニワトリ胚*ex ovo*培養法 (A) 濾紙を用いて胚周囲の膜を伸長させることで安定して培養できる。(B) 人工膜と炭素コーティングを施した濾紙を用いた時の概略図。

濾紙を用いたところ、濾紙への接着率が増加した傾向が見られた。今後、人工膜とともに炭素コーティングの条件検討を進めつつ、作製した検出系と組み合わせることによりこれまで観察することのできなかつた myoseptum 消失の瞬間を捉えることができると考えている。

新学術領域研究「哺乳類初期発生の細胞コミュニティー」(2009~2013年度)、「生物の3D形態を構築するロジック」(2015~2019年度)のように、発生学を基盤とした新たな研究分野の創出が行われ、発生学研究の重要性が周知され続け、発生学全体への理解が進んでいる。このような中で、筋発生・筋分化過程の詳細なメカニズムが明らかになりつつある(Berti et al., J. Anat. 2015. Mok et al., J. Anat. 2015)。ただ、体節期に形成される myoseptum は一時的にしか観察できないため、解析は困難であり、体節を越えた筋形成過程についてはほとんど分かっていない。しかし近年、魚類において myoseptum の一部形成に関わる遺伝子が国内外のグループによって同定された(Meyers et al. Dev. Biol. 2013. Bricard et al., PLoS One 2014. Abe et al., Cell Rep. 2019)。このように、myoseptum の形成過程に関わる遺伝子が同定されたものの、依然、分節性崩壊のような瞬間的に生じる現象を捉えることは難しく、未だ完全な理解には至っていない。

また、先端技術基盤支援プログラム「先端バイオイメージング支援プラットフォーム」(2022~2027年度)の実施からも明らかなように、近年、イメージング技術の発展が著しい。ニワトリ胚においても胚をシャーレ上で培養する *ex ovo* 技術が開発されているが(Schmitz et al. JoVE. 2016)。その対象は神経のイメージングが多く(Morrison et al. Dev. Dyn. 2015. Tang et al. Nat. Commun. 2021)。筋骨格系におけるイメージング解析は行われていない。

本研究はその現象の瞬間をイメージングにより可視化することを目標としているため、非常に高い挑戦性を有している。また、本研究で用いる新規培養システムの確立は、極めてオリジナリティーが高く、国内外のラボの追従は容易ではない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------