

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370092

研究課題名(和文)形態形成における低分子量ケミカルシグナルの意義解明

研究課題名(英文)Identification of the biological significance of small chemicals for morphogenesis

研究代表者

上野 直人(Ueno, Naoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・教授

研究者番号：40221105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウムやATPの動態をライブイメージングによって解析し、それら低分子化合物が組織リモデリング、ひいては初期発生の形態形成にどのような影響を及ぼしているかについて研究を行った。モデル動物としては胚操作が容易なアフリカツメガエルを用い、カルシウムは蛍光プローブGECO、およびFRETプローブYC-Nano、細胞外ATPについてはFRETプローブATeamを用いた。その結果、細胞内カルシウムのスパイク状の一過的上昇は頂端収縮に重要であることがわかった一方、基礎値レベルのカルシウムは細胞移動を調節していること、また細胞外ATPは組織内でのカルシウムの伝播に必要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We conducted a research to unveil the importance of small chemicals such as calcium and ATP for tissue remodeling and morphogenesis during development by employing live-imaging. We used *Xenopus laevis* as a model organism that allows to surgically manipulate embryos and fluorescent probes GECO and YC-Nano (FRET) for calcium and ATeam (FRET) for extracellular ATP. As results, we demonstrated that calcium spikes that oscillates are important for cellular morphogenesis such as apical constriction, while basal-level calcium is essential for cell migration. We also found that extracellular ATP that accumulates at the intercellular spaces (cell-cell boundary) is required for the propagation of calcium waves across tissues.

研究分野：発生生物学

キーワード：胚葉形成 原腸形成

1. 研究開始当初の背景

発生におけるケミカルシグナルの重要性が認識されつつある

生物学におけるケミカルシグナルとしてカルシウム (Ca^{2+}) がある。受精において精子侵入後に惹起されるカルシウム波は発生プログラムの開始シグナルとしてよく知られ、アフリカツメガエルを用いた研究からは、このカルシウム波が背側細胞における微小管アレイ形成の引き金となっていることが示唆されている。また神経細胞においてカルシウム発火は神経細胞の活動性の指標として観察・解析に用いられる。一方、ATP はエネルギー通過としてばかりでなく、多細胞の細胞間コミュニケーションの手段として用いられていることが明らかにされつつある。授乳時に乳腺筋上皮細胞が吸引 (suckling) による機械刺激に応答して ATP を放出し、その後 Ca^{2+} シグナルが伝播することはよく知られており、ATP 受容体候補も同定されている。最近では転写調節にケミカルシグナルの存在やその機能的な重要性が幅広く認知されているが、発生生物学分野では初期胚においてその動態解析は十分になされておらず、生物学的意義については不明な点が多い。

プローブ開発の進歩と発生生物学への応用

これは、いままでに生体に存在する微量なケミカルシグナルを感度良く、また高分解能で検出する化学プローブ、あるいは遺伝子コード型 (genetically-encoded) 蛍光プローブが開発されていなかったこと、また同分野に十分に普及していなかったことによるものが大きい。しかしながら、発生生物学でもこれらケミカルシグナルの重要性を認識され、近年開発された、とくに我が国で開発された優れた検出プローブが急速に国内に普及しており、新しい切り口で形態形成現象を理解することが可能になりつつある。

細胞間相互作用、細胞形態形成におけるケミカルシグナルの役割

我々はアフリカツメガエルを主なモデルとして形態形成のなかでも、とくに「原腸形成」および「神経管形成」に焦点を当てて、その分子細胞メカニズムについて明らかにしてきた。そして、収斂と伸長 (Convergent Extension) によってダイナミックな組織変形を伴う原腸形成において、中軸中胚葉細胞の平面内極性化には側方中胚葉との細胞間相互作用が重要であり、膜 ATP 受容体 (P2Y11) を介した中胚葉細胞内の Ca^{2+} シグナルの上昇が必要であることをライブイメージングによって明らかにした (Shindo, A. et al. PLoS ONE 2008 & 2010)。しかし、どの細胞で、何によって ATP 放出が刺激され Ca^{2+} シグナルを活性化するのか現在のところ不明である。一方、神経管は神経板という平板としての細胞シートが管形成を行うダイナミックな形態形成で、神経板の細胞にコラム (円柱) 状からくさび状への大きな形態変化が起こることがその原動力となると考えられている。我々は、その過程でネクチン 2 を介したカドヘリン-アクチン複合体の頂端側への動員 (Morita, H. et al. Development, 2010) が重要であることを明らかにした。また、先行研究で神経管が形成される胚の背側に Ca^{2+} シグナルがより高頻度に観察されることが報告されている (Wallingford J. et al. Curr. Biol., 2001) ことなどから、 Ca^{2+} がアクチン・微小管といった細胞骨格の再編成を介して細胞形態形成に寄与している可能性について検証する研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

発生における複雑でダイナミックな形態形成現象の制御には、遺伝子・タンパク質レベル、細胞・組織レベルでの制御に加え、力学的制御などが必要であることは明らかで

あるが、これらの現象の間をつなぐ分子細胞メカニズムについては不明な点が多い。とくに液性因子シグナルや力学刺激に応答する低分子化学物質シグナル（『ケミカルシグナル』と呼ぶ）は、細胞間相互作用、および自律的な細胞形態形成に重要な役割を担っていることが明らかになりつつあるが、それらの動態などについては十分に解析されていない。そこで本研究では、形態形成現象を司ると予想されるカルシウムなどケミカルシグナルに焦点を当てて、その動態解析から形態形成における機能を解析することによって、形態形成における重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

アフリカツメガエル胚での人為的発現が容易な遺伝子コード型蛍光プローブを用いて、形態形成（原腸形成、神経管形成）におけるカルシウム、ATP などケミカルシグナルの動態をライブイメージングすることにより、細胞形態形成、組織リモデリングにおけるケミカルシグナルの機能を細胞骨格の再編成という視点から明らかにする。ライブイメージングで得られたカルシウム発火、オシレーションの動画は自動輪郭抽出法などを用いて、細胞の頂端収縮との相関について定量的解析を行い、さらに伝播、オシレーションの時空間的解析から、多細胞間の連絡（相互作用）のモデルを構築し、シミュレーション、細胞レベルでのシグナルのマニピュレーションを行うことによってモデルの妥当性について検証する。また、ケミカルシグナルを惹起する分子細胞機構についても明らかにする。

4. 研究成果

H24 年度、H25 年度では

カルシウム結合時の蛍光変化が大きい遺伝子コード型プローブ GECO を用いて、脊椎動物のモデルとしてのアフリカツメガエル

神経管閉鎖時の細胞内カルシウム動態を観察し、その動態と閉鎖運動に大きく寄与する神経上皮細胞の変形（細胞形態形成）との関連について研究した。その結果、細胞内カルシウム上昇と頂端側の細胞辺が短くなり頂端側の細胞表面積が縮小する頂端収縮の間には時空間的に密接な相互相関があることがわかった。また、ケージド IP3 を胚細胞内に注入し、その後紫外線（UV）照射によるアンケーシングで IP3 を活性化させ、局所的に細胞内カルシウムを上昇させることによって、人為的に細胞表面積を縮小させることができることを確認した。これらの結果より、カルシウム動態は神経管閉鎖時の細胞変形と機能的連関があることを示すことができた。H24 年度はヴァーテックスモデルを用いてカルシウムによる細胞辺変形の数理的な力学モデルを構築することに注力し、細胞辺の長さに「ゆらぎ」を生じさせることによって、安定的に表面積が小さくなることがわかった。また、実際の神経上皮細胞の観察においてもショウジョウバエの原腸形成で観察されているような細胞辺長のゆらぎと細胞表面積の一方向性の縮小を確認した。加えて、同じくアフリカツメガエル胚を用いて原腸形成において組織間に生じる力の定量化に成功し、陥入する中胚葉を先導する細胞集団が後方に連結する中軸中胚葉を牽引し、中胚葉内に引張力を生んでいること、この引張力は正常な脊索形成に必須であることなどが明らかになった。

H25 年度は、神経板内における細胞内カルシウム上昇にはひとつの細胞内でのみ見られるものと、周囲の数十細胞に伝搬するものがあることが明らかになった。細胞外 ATP の枯渇実験から、この伝搬のメカニズムには細胞外 ATP が必要であることを明らかにした。さらに、ATP で組織を刺激し、頂端収縮を誘導する実験系において、細胞-細胞間を物理的に連結する細胞接着の重要性について検

討した。神経管上皮細胞で発現する主な細胞接着因子カドヘリン (N-Cad) タンパク質をモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) による翻訳阻害で減少させると、カルシウム伝播や細胞及び頂端収縮を伴う組織変形が阻害されるとの予備実験結果を得ている。このことは、組織変形の統合性の維持には細胞接着が重要な役割を担っていることを示唆している。

H26年度

当該年度 (最終年度) は、細胞内カルシウム動態変化による頂端収縮 (apical constriction) や細胞移動の駆動メカニズムを解明するための研究を行った。昨年度までに新規蛍光カルシウム検出プローブ GECO を用いて、蛍光強度と細胞収縮率との相関、カルシウムの伝播と細胞収縮との時空間的相関およびオシレーションパターン (振動数/波長) と細胞頂端収縮との関連などについても明らかにした。また、カルシウム阻害剤を用いた実験から粗面小胞体 (ER) から細胞質へのカルシウムの放出、細胞外から電位依存性チャンネルを介したカルシウム流入の両者の関与が示唆された。とくに数十細胞にも広がる伝播性のカルシウム上昇には細胞外 ATP を必要とすることも明らかになった。細胞外 ATP は ATP 受容体である P2Y ファミリー受容体を介して ER からの放出を制御しているものと予想される。当該年度は細胞内で上昇したカルシウムが、どのようなメカニズムで頂端収縮を引き起こすのか、その細胞メカニズムを分子レベルで解き明かすために、アフリカツメガエル胚内に顕微注入したケージド ATP を UV 照射によってアンケージすることによって、細胞内カルシウム上昇を時空間制御可能な誘導系を確立した。限られた細胞、あるいは細胞集団だけに頂端収縮を誘導することで、周囲の細胞への影響をカルシウム伝播、頂端収縮の観点から解析し、細胞変形 (頂端収縮) と細胞骨格ダイナミクスにも着目し

た観察を行った。また、FRET プローブ YC-Nano を用いた基礎値レベルのカルシウムの生物学的意義についても解析し、高レベルのスパイク様カルシウムが細胞形態形成に重要な役割を担っているのに対し、基礎値レベルのカルシウムは原腸形成時の中胚葉性細胞の移動に必要なことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kai, M., Ueno, N. and Kinoshita, N. Phosphorylation-dependent ubiquitination of paraxial protocadherin (PAPC) controls gastrulation cell movements. *PLoS One* 10, e0115111 (2015) 査読有
DDI:10.1371/journal.pone.0115111
- ② Hashimoto, M., Morita, H. and Ueno, N. Molecular and cellular mechanisms of development underlying congenital diseases. *Congenit. Anom.* 54,1-7 (2014) 査読有
DDI:10.1111/cga.12039
- ③ Yajima, H., Suzuki, M., Ochi, H., Ikeda, K., Sato, S., Yamamura, K., Ogino, H., Ueno, N. and Kawakami, K. Six1 is a key regulator of the developmental and evolutionary architecture of sensory neurons in craniates. *BMC Biol.* 12-40 (2014) 査読有
DOI:10.1186/1741-7007-12-40
- ④ Hara, Y., Nagayama, K., Yamamoto, TS., Matsumoto, T., Suzuki, M. and Ueno, N. Directional migration of leading-edge mesoderm generates physical forces: Implication in *Xenopus* notochord formation during gastrulation. *Dev. Biol.* 382, 482-495 (2013) 査読有
DOI:10.1016/j.ydbio.2013.07.023
- ⑤ Takagi, C., Sakamaki, K., Morita, H.,

Hara, Y., Suzuki, M., Kinoshita, N. and Ueno, N. Transgenic *Xenopus laevis* for live imaging in cell and developmental biology. *Dev. Growth Differ.* 55, 422-433 (2013) 査読有
DOI:10.1111/dgd.12042

⑥ Suzuki, M., Morita, H. and Ueno, N. Molecular mechanisms of cell shape changes that contribute to vertebrate neural tube closure. *Dev. Growth Differ.* 54, 266-276 (2012) 査読有
DOI:10.1111/j.1440-169X

⑦ Tao, H., Inoue, K., Kiyonari, H., Bassuk, A.G., Axelrod, J.D., Sasaki, H., Aizawa, S. and Ueno, N. Nuclear localization of Prickle2 is required to establish cell polarity during early mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* 364, 138-148 (2012) 査読有
DOI:10.1016/j.ydbio.2012.01.025

⑧ Morita, H., Kajiura-Kobayashi, H., Takagi, C., Yamamoto, T.S., Nonaka, S. and Ueno, N. Cell movements of the deep layer of non-neural ectoderm underlie complete neural tube closure in *Xenopus*. *Development* 139, 1417-1426 (2012) 査読有
DOI:10.1242/dev.073239

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 直人 (UENO, Naoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・
教授

研究者番号 : 40221105

(2) 研究分担者

鈴木 誠 (SUZUKI, Makoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・
助教

研究者番号 : 10533193

(3) 連携研究者

永井 健治 (NAGAI, Takeharu)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号 : 20311350