

研 究 報 告 書

「流体による1細胞解析から1個体解析への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 27 年 10 月～平成 31 年 3 月

研 究 者: 猪股 秀彦

1. 研究のねらい

発生過程において、様々な組織が適切な時期に適切な場所に形成されることが知られている。このような、組織パターン形成を時空間的に制御している分子の一つにモルフォゲンがある。モルフォゲンは胚の局所から産生され、細胞外に分泌された後、胚内を拡散することにより濃度勾配を形成する。胚を構成する細胞は、この異なるモルフォゲン濃度を感知し様々な組織に分化する。このように、モルフォゲンは胚に空間情報を付与する中心的な役割を担っている。

従って、濃度勾配の形状は発生過程において厳密に制御されていることが知られている。例えば、アフリカツメガエルの初期胚を人為的に半割にすると、濃度勾配の形状が胚サイズに応じて適切に制御され、半分のサイズの相似形を保ったオタマジャクシが発生することが知られている(スケーリング)。モルフォゲン濃度勾配の形成過程において、最も受け入れられているモデルとして Synthesis-Diffusion-Clearance モデル(SDC モデル)がある。このモデルでは、胚の局所に存在する細胞がモルフォゲンを産生(Synthesis)し、モルフォゲンは細胞間隙を拡散(Diffusion)しながら濃度勾配を形成する。しかし、発生過程において初期胚は成体とは異なり、タンパク質を胚と胚外でやり取りする器官(消化管など)が発達していないため、初期胚は閉鎖的な空間として機能すると考えられる。このような、閉鎖的な初期胚で安定な濃度勾配を維持するには、持続的な産生とともに、持続的なモルフォゲンの排除(Clearance)が必要となる。このように、濃度勾配の形状は主にモルフォゲンの産生・拡散・排除の3要素によって制御されており、これらを導入した反応拡散方程式により数理的にモルフォゲン依存的な組織パターン形成の研究も行われている。

しかし、モルフォゲンが溶解する細胞外体液の動態がモルフォゲンの分布にどのような影響を与えるかは明らかにされていない。本研究では、細胞外体液とモルフォゲン分布の関係性に注目して研究を行い、細胞外体液の動態を介した発生システムの新たな側面の解明を目指している。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、発生過程において組織パターン形成の中心的な役割を果たしているモルフォゲン濃度勾配と、モルフォゲンが溶解する細胞外体液の動態に注目して研究を行った。アフリカツメガエル胚の細胞外体液の動態を直接観察するために、細胞外体液で満たされた胞胚腔内に蛍光色素を注入しタイムラプスイメージングを行った。その結果、細胞外体液は胞胚腔から原腸へと移行し、最終的に原口を介して胚外に排出されることを明らかにした。そこで、細胞外体液に含まれる分泌タンパク質が、胚外に排出されるのかナノルシフェラーゼを用いて定量的に解析した。その結果、分泌タンパク質の大部分が胚外に排出されることを明らか

にした。これらの結果は、従来考えられていたように初期発生場が分泌タンパク質にとって閉鎖的な空間として機能するのではなく、開放的な空間として機能することを示している。

分泌タンパク質の排出過程をより詳細に解析したところ、細胞外体液の一方向性の流れが排出を制御していることを明らかにした。排出過程は大きく二つの過程に分けることができる。一つ目は、胞胚腔から原腸への移行である。この移行時には、胞胚腔内に存在する細胞外体液が原腸の表面に存在する小さな孔 (Archenteron Blastocoel Connecting pore ; ABC-pore) を通じて移動することを新たに発見した。二つ目は、原腸内の体液が原口を通じて胚外に排出される過程である。蛍光ビーズを用いた実験から、いずれの場合も「胞胚腔から原腸」、「原腸から胚外」への一方向性の細胞外体液の流れが存在することを示した。

さらに、モルフォゲンと細胞外体液の動態を解析したところ、胞胚腔はモルフォゲンを取り込み抑制する“Sink”として機能することを明らかにした。この Sink を誘起する機構として、胞胚腔体液によるモルフォゲンの希釈、及び胞胚腔内に存在するモルフォゲン阻害因子／分解酵素による抑制の二つが協働して制御していることを明らかにした。以上の結果は、これまでに知られていなかった細胞外体液動態を介した発生システムの新たな側面を示しており、1細胞レベルの ABC-pore の開閉が個体発生を制御していることを明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマ 1. 「細胞外体液の動態と分泌タンパク質の分布」

発生過程におけるモルフォゲン依存的なパターン形成に関しては多くの知見があるが^{1, 2, 3, 4}、モルフォゲンが溶解している細胞外体液の動態に関しては不明な点が多い。アフリカツメガエル胚の細胞外体液動態に関しては P. H. Tuft (1962) が浮沈子を用いて研究を行っており、神経胚後期に細胞外体液が急激に減少する“Collapse of the archenteron”を報告している。そこで、発生過程における細胞外体液の動態を直接観察するために、細胞外体液で満たされた胞胚腔に蛍光色素を注入しタイムラプスイメージングを行った。その結果、細胞外体液は胞胚腔から原腸へと移行し、神経胚後期に原口を通じて胚外に排出されることを明らかにした。この胚外への排出過程は、Tuft が観察した Collapse of the archenteron と合致していた。そこで、細胞外体液が排出する過程において、分泌タンパク質も胚外に排出されるかより詳細に解析を行った。定量的に細胞内タンパク質及び分泌タンパク質の分布を解析するために、ナノルシフェラーゼ (Nluc) 及び分泌型ナノルシフェラーゼ (secNluc) を各々用いた。胚外への排出を解析するために、胚及び培地 (胚外に相当) 中のナノルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、細胞内タンパク質 Nluc の活性は培地画分に検出されなかったが、secNluc 活性の 92% が培地画分に検出された。さらに、ナノルシフェラーゼの基質であるフリマジン培地に添加することにより、直接 secNluc の排出過程をタイムラプスイメージングで検出することに成功した。以上の結果は、閉鎖的な場として機能すると考えられてきた初期発生場が分泌タンパク質にとって開放的な空間として機能し得ることを示している。

以上の観察結果は、細胞間隙に分泌されたタンパク質が Collapse of the archenteron が生じる以前に原腸内に移行する必要性を示している。そこで、細胞間隙に存在する分泌タンパク質が胞胚腔及び原腸内に自由に移行できるか解析した。具体的には、蛍光色素を胞胚腔あるいは原腸に注入し培養後、細胞間隙に蛍光色素が検出されるか調べた (Paracellular flux

assay)。その結果、胞胚腔内に注入した蛍光色素は細胞間隙に移行したが、原腸内に注入した蛍光色素は細胞間隙に検出されなかった。これらの結果は、胞胚腔と原腸は分泌タンパク質に対して異なる透過性を有していることを示している。そこで、傍細胞透過性を制御しているタイトジャンクションの有無に関して解析を進めた。タイトジャンクションの構成成分の一つである ZO-1 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、原腸及び胚の表面に存在する上皮では ZO-1 の強い染色が認められたが、胞胚腔では ZO-1 の存在は認められなかった。さらに、タイトジャンクションの Kissing point を透過型電子顕微鏡により解析したところ、同様の結果を得た。以上の結果から、細胞間隙の分泌タンパク質は胞胚腔内に拡散し、原腸に移行した後に胚外に排出されることが想定された。

しかし、タイトジャンクションで囲われた原腸内にどのようにして細胞外体液及び分泌タンパク質が移行するのか明らかにされていない。この疑問点を調べるために、原腸の表面を走査型電子顕微鏡により解析したところ、タイトジャンクションバリアーの間に 10~20 μm 程度の小さな孔が数個あいていることを発見した。さらに、胞胚腔内に蛍光ビーズを注入すると、一方向性の流れにのって蛍光ビーズが胞胚腔から原腸へとこの孔を介して移行する様子がタイムラプスイメージングにより検出された。以上の結果から、我々はこの新規の孔を Archenteron Blastocoel Connecting pore (ABC-pore) と命名した。さらに、ABC-pore の形成過程を観察したところ、ABC-pore の開閉は発生過程において1細胞レベルで動的に制御されていることが明らかとなった。

研究テーマ 2. 「胞胚腔とモルフォゲン依存的なパターン形成」

以上の結果は、細胞間隙に存在する分泌タンパク質が胞胚腔内に拡散し、その後 ABC-pore を介して原腸に移行した後、原口を通じて細胞外体液とともに胚外に排出されることを示している。従って、胞胚腔は細胞間隙に存在するモルフォゲンを取り込み最終的に胚外に排出する空間として機能する可能性が考えられる。この可能性を解析するために、異なる二つの方法を用いて胞胚腔を人為的に消失させ発生への影響を調べた。その結果、いずれの場合においても胞胚腔の消失によりアニマルキャップ細胞全体が中胚葉に分化することを明らかにした。アフリカツメガエルでは、Tgf β ファミリーである Nodal などが中胚葉を誘導することが知られている。そこで、Nodal の特異的な阻害因子である Cerberus-short を胚に過剰発現させると、胞胚腔消失による中胚葉誘導が完全に抑制された。以上の結果から、胞胚腔は Nodal を取り込むことにより中胚葉誘導に寄与している可能性が考えられた。実際に、Nodal の分布を定量的に解析するために、Nluc を付加した Nodal (Nluc-Xnr2) を胚に発現させると、約 56% の Nodal が原腸胚初期に胞胚腔に移行し、約 82% の Nodal が尾芽胚期に胚外に排出されることを明らかにした。

胞胚腔内に取り込まれた Nodal の役割として、二つの可能性が考えられる。一つ目は、胞胚腔内の Nodal は濃度勾配を形成し活性を維持している可能性である (Intracavitary gradient model)。もう一つは、胞胚腔内に移行した Nodal は不活化している可能性である (Blastocoel sink model)。これらの可能性を検証するために、人為的に胞胚腔内の体液交換を行うことによって、胞胚腔内の Nodal の分布・濃度に摂動を与え発生への影響を解析した。具体的には、胞胚腔内の体液をガラス針により吸出した後、LCMR バッファーを注入した。この過程を 5

回繰り返すことにより、胞胚腔体液を LCMR バッファーに置換した。置換効率に関しては胞胚腔内に蛍光色素を注入して検証を行い、胞胚腔体液が LCMR バッファーに効率的に置換されていることを確認した。しかし、体液交換は発生に影響を与えなかったため、腔内の Nodal が活性状態にある Intracavitary gradient model はアフリカツメガエル胚には合致しないと判断した。

次に、Blastocoel sink model に関して検証を行った。胞胚腔内の Nodal が不活化するメカニズムとして大量の胞胚腔体液による Nodal の希釈、及び胞胚腔内の Nodal 阻害因子による抑制の二通りが考えられる。希釈による効果を検証するために、シリコンオイルを胞胚腔内に注入して胚の形状を保ったまま胞胚腔の体液量を減らした。その結果、Nodal の希釈効果が抑制され中胚葉が大きく拡大することを確認した。さらに、胞胚腔体液の構成成分を LC-MS を用いて解析したところ、胞胚腔体液には Nodal の阻害因子である Cerberus 及び DAN5 が含まれことが明らかとなった。以上の結果から、胞胚腔は希釈および阻害因子により Nodal の活性を抑制する Sink として機能することを明らかにした (Blastocoel sink model)。さらに、胞胚腔は Nodal だけでなく他のモルフォゲンに関しても Sink として機能していることを体液交換により確認した。

以上の結果をまとめると、(1) 胞胚腔はモルフォゲンを不活化 (希釈および阻害因子) する Sink として機能する、(2) 原腸胚後期になると、モルフォゲンを含む胞胚腔体液は ABC-pore を介して原腸に移行する (原腸はタイトジャンクションで覆われているため、この移行により Sink は胚から消失する)、(3) 神経胚後期になると、原腸に存在するモルフォゲンは細胞外体液と共に原口から胚外に排出される、ことを明らかにした。これらの結果は、1 細胞レベルで制御されている ABC-pore の開閉 (ミクロな制御) が、細胞外体液の流れ、モルフォゲンの移動、モルフォゲン依存的なパターン形成など個体レベルの発生を制御 (マクロな制御) していることを示している。本研究成果は、細胞外体液の動態に注目することにより、発生システムの新たな側面を明らかにしたと考えている。

3. 今後の展開

本研究成果により、ABC-pore および原口の二つの孔の開閉が細胞外体液およびモルフォゲンの排出を制御していることを明らかにした。特に、ABC-pore の開閉は細胞と細胞の間隙の非常に微小な空間に形成されるため、1 細胞レベルでのさらなる解析を進める必要がある。また、二つの孔の開閉駆動力として、細胞外体液の圧力が寄与している可能性が考えられる。今後さらに研究を進展させることにより、圧力と発生システムの新たな側面を明らかにすることができると考えている。

本研究では、大きな空間である胞胚腔がモルフォゲンの Sink として機能することを明らかにした。発生過程において、アフリカツメガエルだけでなく多くの胚 (ヒト、マウス、サメ、ウニなど) が胞胚腔を形成することが知られている。今後、我々が提唱した Blastocoel sink model が、多くの動物胚共通の普遍的発生システムとして機能しているか更なる検証が必要である。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究期間中に、目標とする細胞外体液の動態とモルフォゲン依存的なパターン形成の関

係性を明らかにすることができた。本研究で導入した共焦点顕微鏡システムにより、細胞外体液の動態を解析することが可能となり重要な知見を得ることができた。本研究成果は、アフリカツメガエル胚だけでなくヒトを含む他の多くの動物胚でも観察される現象であるため、研究の更なる進展が発生システムの普遍的な原理の解明に繋がると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

アフリカツメガエルを用いて、胞胚腔はモルフォゲンを希釈および阻害因子によって活性化する Sink として機能すること、原腸胚後期になるとこの胞胚腔体液は本研究で見出した ABC-pore を介して原腸に移行すること、さらに神経胚後期になると原腸のモルフォゲンは細胞外体液と共に原口から胚外に排出されることを明らかにしました。ABC-pore の発見とともに、この開閉制御が、初期胚の細胞外体液の流れ、モルフォゲンの移動、ひいてはモルフォゲン依存的なパターン形成など個体レベルの発生に関連していることを明らかにしており、いずれも画期的な成果であると高く評価できます。

今後は、これらの研究成果を quality の高い論文として世界に発信するとともに、初期発生システムを統御する普遍的な原理の解明をさらに発展させてゆくことを期待します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hidehiko Inomata. Scaling of pattern formations and morphogen gradients. Dev Growth Differ. 2017, 59, 41-51.

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. CDB symposium 2016 シンポジウム(招待講演)
2. 第 11 回日本ツメガエル研究集会(2017) (招待講演)
3. 第 50 回日本発生生物学会大会(2017) シンポジウム(招待講演)
4. 第 91 回日本生化学会大会(2018) シンポジウム(招待講演)
5. 第 41 回日本分子生物学会年会(2018) シンポジウム(招待講演)