

## 平成22年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	生体内上皮構造の細胞学的解析とセカンドメッセンジャーシグナル
応募事業区分	事業枠②「若手研究者支援」
申請代表者氏名	鈴木 誠

## ○ 研究状況報告

**背景と目的：生体内上皮構造の形成機構を細胞の挙動とその調節機構から理解する**

上皮は生体内構造の基本単位であり、隣接する細胞との間に安定した接着構造を形成することで外界と体内の間の境界や複雑な立体構造をもつ器官を創り出す。脊椎動物の胚発生過程では様々な器官が上皮構造として形成されるが、その中でも神経管は中枢神経系（脳や脊髄）の原基になる重要な上皮性管構造であり、ヒト胚における神経管の異常は無脳症や二分脊椎などの先天異常（神経管閉鎖障害）を引き起こすことが知られている。本研究では、小型魚類のゼブラフィッシュの神経管をモデルとし、神経板（管）を構成する細胞が示すダイナミックな動態（形態・極性・運動性の変化）の基盤となる細胞内分子機構を明らかにすべく、以下の2つの解析を行った。

**解析1：神経管形成に関わるセカンドメッセンジャーの同定**

セカンドメッセンジャーは細胞外からの化学的・物理的刺激に応答して細胞内で産生される情報伝達物質のことで、限られた時間で細胞外からの刺激を増幅し種々の細胞応答を引き起こすことができる。Ca<sup>2+</sup>、cAMP、cGMP、IP<sub>3</sub>、DAGが主な例であるが、これらの生体内上皮構造の制御に対する寄与は詳しく分かっていない。本解析ではセカンドメッセンジャーを始めとする低分子量因子が神経管の形成過程に関わる可能性を検討した。

最初に、神経管形成に関わるセカンドメッセンジャーを同定するための簡易スクリーニングを行った。受精後10-13時間の胚における神経管の形成速度を *in situ hybridization* 法を利用して決定した上で、セカンドメッセンジャーが関連する分子経路の阻害剤を処理したゼブラフィッシュ胚における神経管の形成速度を測定し、それらの阻害剤が神経管の形成速度に与える影響を定量的に解析した。解析を終えた15種類の化合物のうち、明らかな阻害効果が検出されたのは細胞内Ca<sup>2+</sup>経路、cAMP/PKA経路、cGMP/PKG経路、ATP代謝経路に対する阻害剤であった。効果が見られた阻害剤を処理した胚のF-actinをファロイジンにて染色し、細胞・組織の形態を解析したところ、cGMP/PKG経路の阻害剤(ODQ: グアニル酸シクラーゼの阻害剤)を処理した胚で細胞の伸長が阻害されている傾向が検出された。更にcGMP/PKG経路の機能を細胞レベルで明らかにするため、細胞膜を蛍光標識したゼブラフィッシュ胚にODQを処理しタイムラプス観察を行った結果、正常胚で細胞の伸長が起こる時期にODQ処理胚では伸長が起これば細胞が丸くなる異常が起こることが明らかになった。この現象は別のグアニル酸シクラーゼの阻害剤であるLY-83583の処理でも観察されたことから、cGMP/PKG経路が神経上皮細胞の形態形成運動を制御している

可能性が示唆された。

## 研究2：神経管形成における細胞骨格の制御機構の解明

非筋ミオシンは細胞内に物理的な力を生じさせる分子モーターの1種であり、1種類の重鎖と2種類の軽鎖（必須・調節軽鎖）からなるヘテロ6量体を形成している。ATPase活性を持つ重鎖はATPをエネルギーとして細胞骨格のアクチンフィラメント上を移動するが、その際に2本のアクチンフィラメントの間に生じる収縮力は様々な細胞の挙動の変化に繋がることが知られている。また、非筋ミオシンのATPase活性は主に調節軽鎖のThr-18とSer-19のリン酸化によって調節されていることが知られており、Thr-18とSer-19をAspに置換した変異型調節軽鎖は内在性のリン酸化型（活性化型）調節軽鎖と似た特性を持つことが報告されている。本解析では、GFPと変異型調節軽鎖の融合遺伝子をゼブラフィッシュに導入した上でタイムラプス観察を行うことにより、調節軽鎖のリン酸化状態、すなわち非筋ミオシンの活性化状態の時間空間的なパターンを明らかにすることを試みた（調節軽鎖遺伝子は広島大学の細谷浩史博士より供与されたものを用いた）。その結果、最も活性が高い二重リン酸化型調節軽鎖は神経管が形成される過程で神経細胞の周囲に強く局在し、そのパターンが初期から後期にかけて点状から線状に変化することが明らかになった。一方で活性が低い非リン酸化型タンパクは細胞内に均一に存在したことから、非筋ミオシンは神経管が形成される過程で細胞の周縁部で活性化し、細胞の挙動を調節している可能性が示唆された。また、活性化した調節軽鎖が局在する場所の性質を明らかにするため、変異型タンパクと他の機能分子の局在を比較した結果、二重リン酸化型タンパクはアクチンフィラメントに富んだ細胞突起の先端から除外される一方、細胞間接着因子のZO-1やN-cadherinと共局在していた。更に神経管の形成過程における非筋ミオシンの機能を明らかにするため、細胞膜を蛍光標識したゼブラフィッシュ胚に非筋ミオシンの阻害剤であるBlebbistatinを処理しライブイメージングを行った結果、正常な神経管形成過程で起こる細胞の伸長と嵌合運動が異常になることが明らかになった。以上の結果から、非筋ミオシンはゼブラフィッシュの神経管形成過程において細胞接着構造に集積し、細胞の伸長と嵌合運動を制御している可能性が示唆された。

### ○ 当該事業年度において達成された研究成果

解析1より、ゼブラフィッシュ胚の神経管の形成異常を効率的に検出する方法を確立し、低分子化合物を活用した解析から細胞内Ca<sup>2+</sup>経路、cAMP/PKA経路、cGMP/PKG経路、ATP代謝経路が神経管の形成過程で機能している可能性を示すことが出来た。中でもcGMP/PKG経路は上皮細胞の伸長過程に必須であったことから、解析2で明らかにした非筋ミオシンの機能と関連している可能性が高い。解析2では非筋ミオシン調節軽鎖のライブイメージング解析法と低分子阻害剤を活用した解析から、非筋ミオシンがゼブラフィッシュの神経管形成過程において細胞接着構造に集積し、細胞の伸長と嵌合運動を制御して

(様式 3)

平成22年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

いる可能性を示唆することが出来た。今後は、本研究で確立した手法を更に改良して機能分子の効率的な同定法へと発展させると共に、同定したセカンドメッセンジャー経路が神経管の形成過程で果たす役割を更に検討したい。特に cGMP/PKG 経路については非筋ミオシンとの機能的関連性について詳細な検証を進め、神経管を始めとする上皮性構造の形成過程に必須な細胞骨格の新たな制御機構の同定に繋げたい。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)

無し