

# 原索動物の尾の形成過程にみる新しい形づくりの原理の解明

## New principles in tissue shaping in light of tail formation processes in primitive chordates

(日本発生生物学会推薦)

代表研究者 東北大学 熊野 岳 Tohoku University Gaku Kumano

Understanding how tissues become shaped is a fundamental issue in the field of developmental biology. We are interested in understanding molecular and cellular mechanisms by which the tail of the ascidian embryo is formed. In the ascidian late neurula embryo, the boundary between the trunk and tail regions can be first recognized morphologically as a bending of the epithelial layer, which we call “KUBIRE”. We report here that we have successfully identified a factor that regulates “KUBIRE” formation and obtained a functional data that supports our model. We have proposed a model in which epithelial cell divisions with different division orientations (i.e. around the circumference of the embryo in the future trunk region vs. along the anterior-posterior axis in the future tail region) is involved in the “KUBIRE” formation. In this study, we used chemical inhibitors to block the function of dynein and observed abrogation of spindle rotation before the cell divisions in the future tail region causing the similar division orientation pattern between the two regions, and, eventually, of “KUBIRE” formation. Therefore, with the identification of a regulatory factor dynein, we show that cell divisions with different division orientations contribute to the tissue shaping in the ascidian embryo.

### 研究目的

発生過程において、「形をつくる」現象は長い間研究者を魅了してきた。本研究では、構成する細胞数が少ないホヤ胚を用いて個々の細胞の動きに着目しつつ、全体としてどのような制御のもとで個々の細胞が運動し、その結果新しい形が作られていくのかを明らかにすることを目的とした。具体的には、ホヤ胚発生における最も顕著な形づくりの1つである尾の形成に着目し、胴部と尾部の境界である「くびれ」の形成にはじまり尾部の伸長に至る一連の尾の形づくりがどのように制御され進行しているのかを明らかにするために、以下の4つの計画を持って臨んだ。すなわち、1)「くびれ」形成に関わる分子の同定、2) 明快な境界を持って異方向に分裂する細胞分裂が「くびれ」形成をもたらすか、3) 胚の前後に沿った「くび

れ」の位置がどう決まるのか、4) 尾が伸長する際の表皮細胞の形態形成運動の記載とその分子機構の解析、である。このうち、1)と2)について特筆すべき成果をあげることができたのでここで報告する。

ホヤは我々ヒトを含む脊椎動物と同じ脊索動物門に属す。他の脊索動物、特に脊椎動物の尾の成り方は、後期神経胚の後端に存在する尾芽と呼ばれる細胞群の後方への増殖によることが知られる。一方で、ホヤ胚における尾の成り方は、これとは著しく異なる。ホヤ胚では後期神経胚になると尾を作る初期段階として、体の前後半分あたりの場所に「くびれ」ができ(次ページ、図1白矢頭)、はじめて胴部と尾部の境界が目に見えて形成される。その後尾部のみが、増殖を伴わず、尾部全体で前後に沿って著しく伸長し、最終的には胴部の

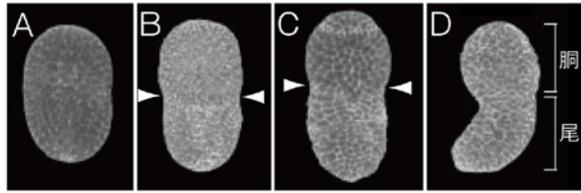


Fig. 1. The formation of “KUBIRE” (white arrowheads in B and C). Images of the late neurula (A) and the early tailbud (B-D) embryos. Ventral views (A-C) and a lateral view (D) with anterior to the top. From Hotta et al., 2007.

4～5倍の長さまで達する。このような他では見られないホヤに特徴的な尾づくりの様式には、新規な形づくりの原理が働いているはずだと考えた。実際我々は、これまでにマボヤ胚において「くびれ」形成時の個々の表皮細胞の動きに着目することで、胚の前後で明快な境界を持って異方向に分裂する細胞分裂が生じ、「くびれ」の形成をもたらすという、これまでにない新しい形づくり機構のモデル(図2)を提唱するに至った。すなわち、神経胚の前方部では胚の周囲に沿った方向に表皮細胞は分裂し、後方部は胚の前後に沿った方向に分裂する。これら細胞分裂の結果、胚の周囲の細胞数/長さが後方部では前方部より少なく/短くなるため「くびれ」が生じると考えた。また、さらに興味深いことに、「くびれ」形成前の表皮細胞の分裂装置は、前方部後方部に関わらず全て胚の周囲に沿った方向を向くなかで、後方表皮細胞でのみ分裂直前に分裂装置が90°回転し、前後で異なる方向の細胞分裂をすることがわかった。

上記モデルは、現時点では、細胞の動きの記載のみを基に提唱された不完全なものであり、実験的に検証する必要がある。したがって、分裂方向の違いを生み出す過程に関わる分子を同定し、その機能を阻害することで分裂方向を乱した際に、「くびれ」の形成にどのような影響を与えるのかを観察することを具体的な目的とし(上記計画の1)と2))、「くびれ」形成に関わる新しい形づくりの原理の解明に挑んだ。

## 研究経過

分裂方向の違いを生み出す過程に関わる分子の候補として、他の系で明らかになっている分裂装置の方向を制御する因子群に着目した。分裂装置の方向

の制御には、細胞膜直下に局在する Pins/G $\alpha$ i/Mud と呼ばれるタンパク質複合体か、Dsh と呼ばれるタンパク質が関わる2つの系が主に知られる<sup>(1)</sup>。どちらの系においても、それぞれの細胞膜直下局在タンパク質(複合体)と結合したダイニンと呼ばれるモータータンパク質が、中心体から伸びる微小管を局在地点に引き寄せて分裂装置自体を回転させる動力となっていることが示されている。そこで2つの系に共通するダイニンに着目し、ホヤ神経胚表皮細胞の後方部で起こる分裂前の分裂装置の回転を阻害することを試みた。

ダイニンは細胞分裂等の細胞の基本的な活動に必要なタンパク質であると考えられたので、影響を観察したい時期以前の機能阻害による影響を避けるため、市販の阻害剤2種(Ciliobrevin DとEHNA)を用いて、特定の発生時期から阻害剤処理をすることでダイニンの機能を阻害することにした。阻害剤処理開始の時期と処理濃度の2つについて様々な条件を検討した結果、神経胚回転(神経胚全体が頭から見て時計回りに90度回転して胚の左側面を下にする現象)後1時間後から30  $\mu$ M Ciliobrevin D処理を1時間した場合と、同じく神経胚回転後1時間後から2 mM EHNA処理を1時間、その後1 mM EHNA処理を30分間した場合に、細胞分裂を阻害することなく分裂装置の回転、すなわち胚後方部での前後軸に沿った回転を抑制することに成功した(5つの正常胚における72個の細胞で分裂方向を測定;7つの

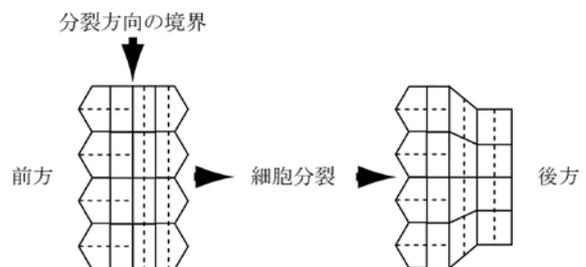


Fig. 2. A model for “KUBIRE” formation by different cell division orientations. A schematic diagram of epithelial cells of the ascidian neurula embryo. The difference in cell division orientation (dotted lines for division plans) between the anterior and posterior regions makes the length and the number of cells around the circumference of the embryo shorter and smaller, respectively, in the posterior region, leading to the “KUBIRE” formation.

Ciliobrevin D 処理胚における 105 個の細胞で分裂方向を測定)。そしてこれらの阻害剤処理胚では、「くびれ」の形成が著しく抑えられることが明らかになった。「くびれ」の形成度合は、2つの独立した定量的測定方法を用い、両者で統計的に優位な差を示した(正常胚 n = 10 ; Ciliobrevin D 処理胚 n = 19)。

しかしながら、上記 Ciliobrevin D 処理の場合、表皮細胞の分裂の開始時期が正常胚に比べ 1 時間ほど(平均 59 分、n = 20)遅れ、さらに表皮細胞分裂の開始から終了(表皮細胞のうち最初に分裂する細胞の分裂時期から最後に分裂する細胞の分裂時期の間)までにかかる時間が、正常胚に比べて 1 時間ほど(平均 49 分、n = 20)伸びた。したがって、上記処理濃度より低い 10  $\mu$ M Ciliobrevin D 処理をその他の条件は同じにして行ったところ、同程度の分裂開始のタイミングの遅延(平均 78 分、n = 8)と分裂の開始から終了にかかる時間の延長(平均 48 分、n = 8)が同様に観察されたが、「くびれ」の形成に異常は見られなかった。よって、阻害剤処理による細胞分裂のタイミングのずれは「くびれ」形成には影響を与えないと考えられる。

以上のことより、本実験の結果、「くびれ」形成に関して 2 つの重要なことを明らかにすることができた。1 つ目は、「くびれ」形成に関わる分子を同定することができたこと、すなわち、ダイニンが分裂装置の回転を介した表皮細胞後方部の細胞分裂方向を制御することで、「くびれ」形成に関与することが明らかになった。2 つ目は、上記分子の機能阻害実験により、明快な境界を持って異方向に分裂する細胞分裂が、確かに「くびれ」形成をもたらすであろうことを支持する実験的証拠を掴んだことである。

現在は、さらに上記モデルをより強固なものとするために、ダイニンの細胞内局在を、ダイニンに対する抗体を用いた抗体染色により明らかにしようとしている。モデルが正しいとするならば、ダイニン(及びそれに結合する Pins/G $\alpha$ i/Mud 複合体、または、Dsh)は、分裂装置が回転する表皮細胞内において前方部または後方に局在し、局在方向へと中心体の一方を引っ張り、分裂装置の向きを前後軸に沿っ

た方向に向かせると考えられる。実際、分裂が起こる前後の胚後方部の表皮細胞において、細胞同士が前後に接する境界面にダイニンの強いシグナルが観察される結果を得ている。ただし、このシグナルが個々の細胞の前側に局在するのか後側に局在するのかは、現時点では特定できておらず今後の課題といえる。

## 考察

ここで紹介した「くびれ」のような上皮層が湾曲した構造は、これまでショウジョウバエを中心としたモデル動物における研究により、apical constriction<sup>(2)</sup>、細胞分裂による細胞の球状化<sup>(3)</sup>、細胞死<sup>(4)</sup>等によって引き起こされることがわかっていた。今回、多くの動物種で見られる尾の形成機構とは異なる様式を採るホヤの尾の形成に着目したことで、これまで知られていなかった異方向細胞分裂による形づくりという新しい形作りの原理の証拠を得ることができた。

しかしながら、本結果をもってしても、「くびれ」形成機構の全容解明には程遠いと言わざるを得ない。実際、ダイニン阻害剤処理胚においては、「くびれ」形成が著しく抑制されるものの、いまだ「くびれ」構造を見て取ることができる。すなわち分裂方向の制御以外に別の機構が存在する可能性が考えられる。一つの可能性は、中胚葉性の内部組織からの作用である。教科書的には、体や組織の形づくりは上皮細胞層の変形により起こるよう記載されているが、内部組織からの影響があるのは間違いないことと思われる。幸い、ホヤ胚はその大きさゆえ顕微胚操作に優れ、上皮細胞層だけを単離することが可能かもしれない。また、上皮層と内部組織を構成する細胞系譜は発生の非常に早い時期に分かれる(8 細胞期)ため、どちらかの系譜の細胞にだけ阻害剤顕微注入等による機能阻害のための実験操作を加えて、「くびれ」形成への影響を見ることも可能である。したがって、このような教科書的な常識を超えて、新しい現象を解明するうえでもホヤは良い実験動物といえる。

最後に、今後は、当初本研究の目的としていた「くびれ」形成以降の尾部の伸長過程（上記計画の4）についてもその仕組みを解明することで、ある特定の動物胚において、尾という形がどのように形成されるのかその全体像を明らかにしていきたいと考えている。

### 参考文献

- (1) Li, M. S. and Johnston, C. A. (2013) Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development* 140, 1843-1856.
- (2) Martin, A. C., Kaschube, M. and Wieschaus, E. F. (2009) Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature* 457, 495-499.
- (3) Kondo, T. and Hayashi, S. (2013) Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination. *Nature* 494, 125-129.
- (4) Monier, B., Gettings, M., Gay, G., Mangeat, T.,

Schott, S., Guarner, A. and Suzanne, M. Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature* 518, 245-248.

### 研究の発表

#### 口頭発表

1. 熊野岳、中本章貴：ホヤ胚における形づくりの仕組みの理解へ向けて、シンポジウム「海鮮無脊椎動物 ー生命情報の宝の山 IIー」、第85回日本動物学会、仙台、2014年9月11～13日。
2. Kumano, G. and Nakamoto, A. Mechanisms of the “KUBIRE” formation in the neurula embryo of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. 8th International Tunicate Meeting, Aomori. July 13-17, 2015.

#### ポスター発表

1. Nakamoto A. and Kumano, G. Analyses of the mechanisms of epithelial morphogenesis during the tail formation in the embryos of ascidian *Halocynthia roretzi*. 8th International Tunicate Meeting, Aomori. July 13-17, 2015.