

氏 名 林 健太郎

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2015 号

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Analysis of intracellular calcium dynamics and its functional
implication at the leading edge mesoderm during *Xenopus*
gastrulation

論文審査委員 主 査 教授 藤森 俊彦
教授 上野 直人
教授 青木 一洋
教授 福井 彰雅 中央大学 理工学部

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Gastrulation is one of the most dynamic events in early development. In vertebrates, gastrulation movements direct coordinately regulated remodeling of three germ layers (ectoderm, mesoderm and endoderm) through cell shape change as well as cellular migration and then precisely determine the position of the layers for future organ formation. Therefore, clarification of cellular dynamics and its control mechanism are essential for the understanding of gastrulation.

The process of gastrulation consists of several kinds of cell movements such as emboly, epiboly and convergent extension. It is initiated by emboly, the vegetal rotation of mesodermal sheet. During vegetal rotation, leading edge mesoderm (LEM), the most vegetal region of mesoderm, attaches to the inner side of blastocoel roof (BCR) by bottle cell formation of endoderm. After LEM touches to BCR, the mesodermal sheet starts collective migration toward the anterior end on the fibronectin-rich surface of BCR. Following LEM, axial mesoderm shows convergent extension movement that elongates body length along anterior-posterior axis by mediolateral intercalation of axial mesoderm. LEM cells have a unique property showing higher motilities compared to axial mesoderm cells when they are isolated in culture, which suggest specific roles of LEM in mesodermal migration. Interestingly, this LEM migration is thought to be controlled by at least two distinct mechanisms. First is the chemoattractant system in which LEM senses a chemoattractant (SDF-1) via its receptor (CXCR-4). Second is the mechanical system in which pulling forces by cell-cell interaction confer LEM cells a directional cue for the migration.

Recently, Ca^{2+} signaling has been shown to be important for mesodermal movement during gastrulation based on the finding that Ca^{2+} signaling inhibitors arrested mesodermal migration including LEM. This notion shed new light on the cellular mechanisms of LEM migration. Generally, Ca^{2+} signaling is regulated by intracellular Ca^{2+} concentration. To understand the physiological significance of Ca^{2+} signaling in LEM migration, characterization of intracellular Ca^{2+} dynamics is essential. However, the detail of Ca^{2+} dynamics in migrating mesoderm was totally unknown. In this study, I revealed the Ca^{2+} dynamics in migrating LEM by using a high sensitive Ca^{2+} indicator, YC-nano and elucidated the Ca^{2+} function in LEM migration.

Firstly, I tried to observe Ca^{2+} dynamics of migrating LEM by using explants with a semi-in-vivo condition. In this observation, I discovered transiently elevated intracellular Ca^{2+} (Ca^{2+} transient) in LEM. A subset of LEM cells showed Ca^{2+} transients with propagative patterns at the sub-cellular level over 3 min.

Secondly, I analyzed the spatial localization of Ca^{2+} transients within tissue.

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

Interestingly, the Ca^{2+} transients displayed specific patterns. The frequency of Ca^{2+} transients at leader cells showed the highest frequency in LEM sheet. I also observed its calcium frequency and LEM migrations. The frequency of Ca^{2+} transients was reduced after cell migration stopping, which results indicate that Ca^{2+} transients at leader cells is closely linked to cellular migration mechanism.

Thirdly, to test the function of Ca^{2+} transients, I depleted Ca^{2+} transients by the treatment of intracellular Ca^{2+} specific chelator, BAPTA-AM. The result showed that LEM treated with BAPTA-AM hardly displayed calcium transients at leader cells and reduced their migratory activity. These results suggest that Ca^{2+} signaling is required for LEM migration. I also induced Ca^{2+} elevation by the treatment with an ionophore, Ionomycin. As expected, this treatment increased the migratory activity of LEM cells. In addition, Ionomycin-treated whole embryos showed an enhanced advancement of mesodermal sheet toward the anterior side, which again indicated that LEM's migratory activity was accelerated. Together, these results demonstrate that intracellular Ca^{2+} signaling positively regulates LEM migration.

Lastly, I addressed the question of how Ca^{2+} transients regulate cell migratory activity. Generally, cell migration is driven by repeated cycling of the protrusion formation and tail retraction. I observed reduced protrusion activities in LEM cells treated with BAPTA-AM. This result further indicates that Ca^{2+} signaling regulates cell protrusion formation. I also analyzed the activity of Rac1, an upstream regulator of protrusion formation, after the Ca^{2+} elevation by Ionomycin treatment. After Ca^{2+} elevation, Rac1 activity was significantly upregulated. These results suggest that Ca^{2+} transient correlate to cellular protrusion formation via Rac1.

Most studies on Ca^{2+} signaling during *Xenopus* gastrulation so far published focused on ectoderm and axial mesoderm. This study is the first description of a unique profile of Ca^{2+} transients showing a biased distribution only to a few front rows of LEM sheet which is implicated in the regulation for the collective migration of LEM cells.

初期発生における最も重要な形態形成運動のひとつである原腸形成運動は、先端の中胚葉細胞（先行中胚葉:leading edge mesoderm, LEM）が中軸中胚葉を牽引して移動すると同時に、中胚葉組織が収斂・伸長することによって生じるダイナミックな組織リモデリングで、この形態形成運動により臓器が形成される位置が決定される。この細胞および組織ダイナミクスについては、胚のサイズが大きいアフリカツメガエルを用いて、シグナル伝達や組織メカニクスの観点から精力的に研究が進められている。申請者林健太郎氏は、このアフリカツメガエル原腸形成運動時におけるLEM細胞群における細胞内カルシウムの動態に着目し、本学位論文の研究を行った。まず、細胞内カルシウム変動を可視化するために適した蛍光プローブを複数検討し、LEMにおけるカルシウム動態解析にはFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）プローブのひとつYC-Nanoが細胞内カルシウム濃度変化を最も感度良く検出できることを見出した。同プローブを用い、胚組織から外胚葉の一部を切除しそのまま培養する観察系（キャップレス胚）、および切除したLEM細胞集団のみを培養する観察系の両観察系におけるカルシウム動態のライブイメージング観察を行なった。そして、LEM細胞集団に散発的に細胞内カルシウムが上昇することを見出した。また、この一過的な細胞内カルシウム上昇頻度の定量的な解析により、組織移動時にはLEMの先端の細胞集団に集中して細胞内カルシウム上昇が観察されることを確認した。同時に、1細胞レベルでの観察から細胞内で時間経過とともにカルシウム波が一定方向に伝播する様子も確認した。これらの知見をもとに、細胞・組織移動における細胞内カルシウム上昇の意義について検討し、以下の知見を得た。1) アクチン重合阻害剤サイトカラシンで細胞移動を阻害してもLEMにおける細胞内カルシウムの上昇は起こることから、カルシウム発火は細胞・組織移動の結果起こるものではなく、おそらくLEM細胞の自発的な活動あるいは細胞移動とは独立した細胞外刺激によるものである。2) カルシウムキレート剤BAPTA-AM処理によって細胞・組織移動は阻害されることから、細胞内カルシウムは細胞・組織移動に必須である。3) イオノマイシン処理によって細胞内カルシウム濃度を上昇させると培養LEM細胞集団の移動は促進され、侵襲度の低いキャップレス胚においても同様な結果が観察されたことから、細胞内カルシウム上昇は細胞・組織移動を顕著に促進する。4) BAPTA-AM処理によって膜突起（ラメリポディア）の形成が阻害されたことから、細胞内カルシウムの上昇は膜突起の形成を介して細胞移動に関与している。5) 細胞内カルシウムが上昇することによって低分子量Gタンパク質Rac1が活性化されることから、カルシウムによって惹起されるシグナル伝達系がRac1を活性化し膜突起形成を促進している。6) 光依存的に活性化するケージドIP3とUV照射系を用いて人為的にカルシウムを短時間（3分間）上昇させた実験では、細胞・組織移動を促進できなかったことから、繰り返しのカルシウム上昇が細胞・組織移動に必要な可能性を示唆している。

細胞移動とカルシウムの関係については既報が多数あるものの、本研究は原腸形成という初期発生における形態形成の基盤となる細胞ダイナミクスの背景となるメカニズムについて、カルシウム動態という新しい切り口で迫ったものであり、とくに蛍光プローブとライブイメージング、画像解析を駆使して移動先端の一部の細胞が細胞内カルシウム上昇を

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

繰り返す姿を捉え、定量的解析によってカルシウムの機能的な重要性について多くの新しい知見を得た本研究は学位論文にふさわしいと審査員一同が判断した。