

Title	ホヤ変態開始におけるセカンドメッセンジャーの役割
Sub Title	The role of the second-messenger in the beginning of Ciona metamorphosis
Author	堀田, 耕司(Hotta, Kohji)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	令和5年度はセカンドメッセンジャーと変態の関係を調べるため、以下の実験を行った。 1．変態開始シグナルリソースの解明 これまでの研究で、ホヤ変態時に間充細胞が表皮を越えて体外に出る（溢出する）ことを見出した。この溢出現象は脊椎動物の血球細胞や癌細胞の浸潤とよく似た現象であり、進化的に保存された細胞移動の仕組みを理解できる(Totsuka et al., 2023)。この溢出現象のトリガーとなるセカンドメッセンジャーのリソースを明らかにするためCa²⁺伝搬の時間逆解析を行ったところ、眼点直上の神経細胞(aATEN)付近の表皮からCa²⁺伝播が開始されることが示唆された。そこでaATENが変態のトリガーとなる重要なニューロンであることをオプトジェネティクスを用いた機能破壊実験および人工刺激実験により検証実験を遂行している。溢出誘導がcAMPを介している可能性を検討するため、cAMPセンサーを用いたライブイメージングを行った。 2．cAMPの変態開始における動態解明 変態の駆動にはcAMPが関与することが薬剤添加により示唆されていたが、cAMPが変態に直接かわることを示した時空間的解析報告はない。そこで付着器の表皮細胞におけるCa²⁺濃度上昇とcAMP動態の関係を明らかにした。cAMPの動態を可視化するためにcAMP遺伝的センサーpinkFlamindoをホヤ幼生に導入し、変態前後の付着器における動態を調べたところ、驚くべきことに変態誘導のための機械刺激を与えた直後、cAMPは一時的に低下し、その後徐々に濃度が上昇することがわかった。ホヤ幼生は変態するのに適した場所で付着による機械刺激を感知し、変態するが自然界では流水や一時的な接触刺激では変態しないようしくみが必要であるが今回の計測結果からcAMPの蓄積が変態のトリガーとなると考えられることから、付着器によるcAMP蓄積がある一定濃度に達した時に変態のスイッチが入る機構が働くことでこれらの機械刺激をわけて認識していると考えられる（投稿準備中）。 In FY2023, I conducted the following experiments to investigate the relationship between second messenger and metamorphosis. 1. Elucidation of metamorphosis initiation signal resources Previous research has found that mesenchymal cells cross the epidermis and spill out of the body during ascidian metamorphosis. This extravasation phenomenon is similar to the invasion of blood cells and cancer cells in vertebrates, and allows us to understand the evolutionarily conserved mechanism of cell migration (Totsuka et al., 2023). In order to clarify the second messenger resource that triggers this extravasation phenomenon, I performed a time inverse analysis of Ca²⁺ propagation, which suggested that Ca²⁺ propagation starts from the epidermis near the nerve cells (aATEN) directly above the ocellus. Therefore, I am carrying out experiments to verify that aATEN is an important neuron that triggers metamorphosis through functional destruction experiments using optogenetics and artificial stimulation experiments. To examine the possibility that extravasation induction is mediated by cAMP, I performed live imaging using a cAMP sensor. 2. Elucidation of the dynamics of cAMP in the initiation of metamorphosis Although drug addition has suggested that cAMP is involved in driving metamorphosis, there have been no spatiotemporal analysis reports showing that cAMP is directly involved in metamorphosis. Therefore, I clarified the relationship between the increase in Ca²⁺ concentration and cAMP dynamics in the epidermal cells of the appressorium. In order to visualize the dynamics of cAMP, I introduced the cAMP genetic sensor pinkFlamindo into ascidian larvae and investigated the dynamics in the palp before and after metamorphosis. It was found that, surprisingly, immediately after applying mechanical stimulation to induce metamorphosis, cAMP concentration decreased temporarily and then gradually increased. Ascidian larvae detect mechanical stimulation caused by attachment in a suitable place for metamorphosis and undergo metamorphosis in natural conditions, but in the natural world they must have a mechanism that prevents them from metamorphosing when exposed to running water or temporary contact stimulation. So it is thought that these mechanical stimuli are recognized separately by a mechanism that activates a switch for metamorphosis when cAMP accumulation in the palp reaches a certain concentration (in preparation).
Notes	

Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230064

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2023年度 学事振興資金（個人研究） 研究成果実績報告書

研究代表者	所属	理工学部	職名	准教授	補助額	500千円 (特B)
	氏名	堀田 耕司	氏名(英語)	Kohji Hotta		
研究課題(日本語)						
ホヤ変態開始におけるセカンドメッセンジャーの役割						
研究課題(英訳)						
The role of the second-messenger in the beginning of Ciona metamorphosis						
1. 研究成果実績の概要						
令和5年度はセカンドメッセンジャーと変態の関係を調べるため、以下の実験を行った。 1. 変態開始シグナルリソースの解明 これまでの研究で、ホヤ変態時に間充細胞が表皮を越えて体外に出る(溢出する)ことを見出した。この溢出現象は脊椎動物の血球細胞や癌細胞の浸潤とよく似た現象であり、進化的に保存された細胞移動の仕組みを理解できる(Totsuka et al., 2023)。この溢出現象のトリガーとなるセカンドメッセンジャーのリソースを明らかにするためCa²⁺伝搬の時間逆解析を行ったところ、眼点直上の神経細胞(aATEN)付近の表皮からCa²⁺伝播が開始されることが示唆された。そこでaATENが変態のトリガーとなる重要なニューロンであることをオプトジェネティクスを用いた機能破壊実験および人工刺激実験により検証実験を遂行している。溢出誘導がcAMPを介している可能性を検討するため、cAMPセンサーを用いたライブイメージングを行った。 2. cAMPの変態開始における動態解明 変態の駆動にはcAMPが関与することが薬剤添加により示唆されていたが、cAMPが変態に直接かかわることを示した時空間的解析報告はない。そこで付着器の表皮細胞におけるCa²⁺濃度上昇とcAMP動態の関係を明らかにした。cAMPの動態を可視化するためにcAMP遺伝的センサーpinkFlamindoをホヤ幼生に導入し、変態前後の付着器における動態を調べたところ、驚くべきことに変態誘導のための機械刺激を与えた直後、cAMPは一時的に低下し、その後徐々に濃度が上昇することがわかった。ホヤ幼生は変態するのに適した場所で付着による機械刺激を感知し、変態するが自然界では流水や一時的な接触刺激では変態しないようにしくみが必要であるが今回の計測結果からcAMPの蓄積が変態のトリガーとなると考えられることから、付着器によるcAMP蓄積がある一定濃度に達した時に変態のスイッチが入る機構が働くことでこれらの機械刺激をわけて認識していると考えられる(投稿準備中)。						
2. 研究成果実績の概要(英訳)						
In FY2023, I conducted the following experiments to investigate the relationship between second messenger and metamorphosis. 1. Elucidation of metamorphosis initiation signal resources Previous research has found that mesenchymal cells cross the epidermis and spill out of the body during ascidian metamorphosis. This extravasation phenomenon is similar to the invasion of blood cells and cancer cells in vertebrates, and allows us to understand the evolutionarily conserved mechanism of cell migration (Totsuka et al., 2023). In order to clarify the second messenger resource that triggers this extravasation phenomenon, I performed a time inverse analysis of Ca²⁺ propagation, which suggested that Ca²⁺ propagation starts from the epidermis near the nerve cells (aATEN) directly above the ocellus. Therefore, I am carrying out experiments to verify that aATEN is an important neuron that triggers metamorphosis through functional destruction experiments using optogenetics and artificial stimulation experiments. To examine the possibility that extravasation induction is mediated by cAMP, I performed live imaging using a cAMP sensor. 2. Elucidation of the dynamics of cAMP in the initiation of metamorphosis Although drug addition has suggested that cAMP is involved in driving metamorphosis, there have been no spatiotemporal analysis reports showing that cAMP is directly involved in metamorphosis. Therefore, I clarified the relationship between the increase in Ca²⁺ concentration and cAMP dynamics in the epidermal cells of the appressorium. In order to visualize the dynamics of cAMP, I introduced the cAMP genetic sensor pinkFlamindo into ascidian larvae and investigated the dynamics in the palp before and after metamorphosis. It was found that, surprisingly, immediately after applying mechanical stimulation to induce metamorphosis, cAMP concentration decreased temporarily and then gradually increased. Ascidian larvae detect mechanical stimulation caused by attachment in a suitable place for metamorphosis and undergo metamorphosis in natural conditions, but in the natural world they must have a mechanism that prevents them from metamorphosing when exposed to running water or temporary contact stimulation. So it is thought that these mechanical stimuli are recognized separately by a mechanism that activates a switch for metamorphosis when cAMP accumulation in the palp reaches a certain concentration (in preparation).						
3. 本研究課題に関する発表						

発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)
Nozomu M. Totsuka, Satoshi Kuwana, Satoshi Sawai, Kotaro Oka, Yasunori Sasakura and Kohji Hotta	Distribution changes of non-self- test cells and self-tunic cells surrounding the outer body during Ciona metamorphosis	Developmental dynamics	2023 Jun 21
Nozomu M. Totsuka, Go Shioi, Tomonobu M. Watanabe, Kotaro Oka, Yasunori Sasakura and Kohji Hotta	Epithelial Conduction of Ca ²⁺ and Mesenchymal Cell Migration During Ciona Metamorphosis Induced by Mechanical Stimulation	82nd annual meeting (Society for developmental biology)	7/20, 2023
戸塚望, 土方希, 塩井剛, 渡邊朋信, 岡浩太郎, 笹倉 靖徳, 堀田耕司	ホヤ変態時に観察されたCa ²⁺ シ グナル表皮伝搬および非自己テス ト細胞と自己被嚥細胞の体外にお ける置き換わり	日本比較免疫学会第34回学術集 会	9/10,2023