

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21687004

研究課題名（和文） 生体イメージングにより解析する体軸調律の細胞機能メカニズム

研究課題名（英文） in vivo imaging analysis for cellular and molecular mechanisms of body axis tuning

研究代表者

倉永 英里奈 (KURANAGA ERINA)

独立行政法人理化学研究所・組織形成ダイナミクス研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90376591

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエ雄性生殖器は発生過程で時計回りに1回転することが知られており、回転が不十分な個体は外生殖器の軸がみだれる。生体イメージングの結果、1回転には外生殖器を取り囲む単層上皮シートが2つに分離して2段階で回転することが必要であることを明らかにした。アポトーシスによって開始される2段階目の回転は、最初の回転を加速していることを見出し、発生の時間軸に沿った左右軸調律のメカニズムの一旦を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In *Drosophila* development, male genitalia performs 360° clockwise rotation as it forms, but L/R axis of genitalia is deformed if the rotation is incompletely stopped. Imaging analysis reveals that full rotation of genitalia is required the two steps movement of collective cells in epithelial sheet surrounding genitalia. We found that the secondary rotation that was initiated by apoptosis accelerated the primary rotation to adjust the speed of morphogenesis for the developmental time window.

交付決定額（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
総計	20,900,000	6,270,000	27,170,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：イメージング・組織形成・細胞死・細胞移動・ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

発生過程にはたくさんの細胞が、増殖・分化・接着・移動・死などの個性的なイベントを積み重ねて個体形成を成立させている。なかでもプログラム細胞死は、増殖や分化と同様に普遍的なイベントであるにもかかわらず、発生過程におけるその生理的役割に関し

て、細胞死シグナル異常変異体が胚性致死であるという大まかな表現型以外は未だ解析が進んでいない。その上最近の報告では、細胞死の役割として細胞を除去するだけでなく、周辺細胞に対する増殖や細胞移動制御など、多彩な細胞機能に関与することが明らかになり、その生理的役割の解明が注目され

ている (Kuranaga and Miura, 2007)。そこで我々は、発生における細胞死の役割を明らかにするため、発生学の研究に有用でかつ遺伝学的知見が豊富なショウジョウバエを解析するモデルとして選択した。線虫からほ乳類まで保存された共通のメカニズムとして、カスパーゼと呼ばれるシステインプロテアーゼが細胞死の実行に中心的な役割を果たすことが知られている。我々がこれまでにカスパーゼ阻害因子の強制発現における成虫の表現型を解析したところ、胸部背側外感覚器 (Kuranaga et al. 2006) や雄性外生殖器 (本研究課題: Kuranaga et al. 2011) などにおいて多様な異常が観察された。特に雄性外生殖器の異常表現型に注目すると、外生殖器自身の形体は正常であるにもかかわらず、外生殖器の軸が異常になる。その理由として、発生過程における回転を伴う組織軸形成が不十分であることが挙げられる。つまり、細胞死が発生過程における体軸の維持に必要であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

多細胞生物の発生過程では無数の細胞が、それぞれに個性的なイベントを積み重ねて個体形成を成立させる。器官形成は、体軸(前後、背腹、左右)の決定と共に進行し、個体に最も適合した「かたち」となる。発生過程において体軸形成が正しく行われないと、その軸に沿った形態形成が異常となるため、前後軸や背腹軸異常では胎生致死に、左右軸の異常では心臓など組織の逆位が観察される。体軸の形成は一見秩序立った厳密なプログラムだけで進行しているようにみられるが、生物を取り囲む外的環境の変化やストレスなどによる体軸のみだれに対して臨機応変に対応し、決められた時間の中で修正することが、個体発生を無事に成し遂げるために必要なシステムであると考えられる。つまりそこには、個体軸のみだれを感知して時間内に体軸を形成するための「タイムキーパー」の存在が示唆されるが、器官発生を生きた個体で詳細に解析した研究は少ないため、その実体は明らかではない。発生の自律的プログラムの中で個体がもつ、「みだれ→調律」による時間調整メカニズムを解析するには、発生の時間軸を明確にとらえた研究手法が必要である。そこで本研究では、時間軸の解析に極めて有効な生体イメージングの手法を駆使して、発生の体軸形成を時間軸に沿って調律するシステムの実体を明らかにし、さらに遺伝学を融合させてそのメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

本研究の到達目標の一つである体軸の調律機構探索のためには、体軸形成の異常を示

す個体を詳細に解析する必要があるため、ある組織軸に異常があるが個体が生存している、というモデルが最も望ましい。この条件を満たすモデルが、前述のショウジョウバエ雄性外生殖器の軸異常形成である。ショウジョウバエの雄性外生殖器は、蛹期、その発生過程に360度時計回りに回転することが知られており、左右非対称な器官形成を行うためその回転異常は左右軸異常のモデルとして解析されてきた (Speder et al., *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 2007)。これまでに外生殖器の左右軸異常を指標にスクリーニングがなされ、多くの制御因子が同定されているが、その制御因子は細胞移動・増殖・細胞死などの多様なシグナル分子であり、どの細胞機能がどのようにして体軸異常を示しているのか全く不明であった。その理由としてこれまでに、外生殖器の回転する器官形成過程を観察した研究は無く、どのようにして回転するのか、どんな細胞機能により制御されているのか、解析が困難だったためである。我々は、これまで報告が無かった回転する器官形成過程を、1細胞レベルでライブイメージングすることに成功した。これまでの報告や我々の解析から、外生殖器の軸形成には増殖・移動・細胞死が関与することが明らかになっている。すでに我々は、生きた個体レベルで可視化可能なシグナルプローブの一つである、細胞死シグナル(カスパーゼ活性)可視化プローブを用いた生体イメージングに成功している (Takemoto and Kuranaga et al. *PNAS* 2007)。このプローブを用いて、外生殖器器官形成時における体軸の維持に、細胞死が「どこで」「どのようにして」関与するのか解析する。

## 4. 研究成果

左右非対称に器官形成を行う外生殖器の回転運動という、器官形成過程で詳細な記載の難しい制御メカニズムにどのようにして迫るのが重要なポイントである。イメージング解析の結果、360度の正常回転の際に外生殖器を取り囲む細胞集団であるA8体節細胞において、発生の決まったタイミングで時計回りに一部の細胞集団が移動を開始し、一定のスピードで回転運動を行ったのちに、ちょうど12時間後に360度の回転を終えて停止することが明らかになった。一方、細胞死を抑制した場合、回転開始と停止は野生型と同様のタイミングでおこるにも関わらず、回転が不十分のまま止まってしまった。そこで、回転速度を定量的に解析すると、正常な回転は4つのステップ、すなわち開始、加速、減速、停止で進行しており、細胞死を抑制した場合は加速出来ずに不十分に停止することが明らかになった。

さらに詳細な解析を行った結果、外生殖器の周りを取り囲むリング状の細胞集団（A8背板）が、内側と外側の2つに分かれて、回転開始の2時間までは内側のリングだけが回転し、加速のタイミングで外側のリングが回転したことから、加速が外側のリング回転によって引き起こされると予測された。

細胞死シグナル（カスパーゼ）可視化プローブを用いて、「いつ」「どこで」細胞死が起こるか解析を行った結果、細胞死はA8背板が回転を開始するタイミングで起こり、その頻度はA8背板の「加速度」が上昇するタイミングと相関することが明らかになった。実際、細胞死シグナルを抑制した個体では外側のリングが回転出来ず、内側のリングだけが回転していたことから、細胞死が外側のリングの回転を開始し、全体の回転のスピードを調整していることが明らかになった（Kuranaga et al., 2011）。つまり、外生殖器の正常な回転（軸形成）には、A8背板の細胞が2つの部位に分かれてそれぞれが180°回転することが必要であり、外側のリングが細胞死によって回転開始することで、外生殖器全体の回転速度が調節され、最終的な軸形成が保たれることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計7件）

1. Kuranaga E.  
Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions *in vivo*  
Genes Cells. 17, 83-97, 2012
2. Kuranaga E., Matsunuma T, Kanuka H, Takemoto K, Koto A, Kimura K, Miura M.  
Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia.  
Development 138, 1493-9, 2011
3. Nakajima Y, Kuranaga E., Sugimura K, Miyawaki A, Miura M.  
Nonautonomous apoptosis is triggered by local cell cycle progression during epithelial replacement in *Drosophila*.  
Mol Cell Biol. 31, 2499-512, 2011
4. Kuranaga E.  
Caspase signaling in animal development.  
Dev Growth Differ. 53, 137-48, 2011

5. Koto A, Kuranaga E., Miura M.  
Apoptosis ensures spacing pattern formation of *Drosophila* sensory organs.  
Curr Biol. 21, 278-87, 2011

6. 倉永 英里奈  
生き物の「形」をつくる細胞死  
実験医学 増刊 28, 1062-8, 2010

7. Koto A, Kuranaga E., Miura M.  
Temporal regulation of *Drosophila* IAP1 determines caspase functions in sensory organ development.  
J. Cell Biol. 187, 219-31,

〔学会発表〕（計13件）

1. Kuranaga E.  
*In vivo* analysis of apoptosis during looping morphogenesis of *Drosophila*  
Kobe-Barcelona Joint Meeting  
2012. 3. 29 Kobe

2. 倉永 英里奈  
器官発生を支えるアポトーシスのイメージング解析  
加齢研シンポジウムー発生物学の適応放散ー 2011年10月21日 仙台

3. 倉永 英里奈  
器官形成を支える細胞死の動的解析  
NAIST-GCOE セミナー  
2011年10月6日 奈良

4. 倉永 英里奈  
Imaging analysis of cellular dynamics for organogenesis  
第49回日本生物物理学会年会  
2011年9月17日 姫路

5. Kuranaga E.  
Imaging Analysis of Cellular Dynamics Involved in Organogenesis  
RIKEN CDB-QBiC Joint Symposium -Towards Innovation in Developmental Cell Biology: The Impact of Emerging Technologies  
2011年6月30日 神戸

6. Kuranaga E.  
Imaging analysis of apoptosis in looping morphogenesis  
KAIST-RIKEN Joint symposium on Cell and Developmental Biology  
2011年11月30日 Daejeon, Korea

7. 倉永 英里奈  
小さな生き物から学ぶーからだの形づくり

と病気のしくみ  
BMB2010 市民公開講座「広がる生命科学の世界-からだの形づくりから病気の克服まで-」  
2010.12.11 東京

8. Kuranaga, E., Miura, M.  
Deciphering the physiological roles of caspase *in vivo*.  
BMB2010 2010.12.7-10 神戸

9. Kuranaga, E., Miura, M.  
*In vivo* analysis of cell death during organogenesis.  
APRU Research Symposium 2010  
2010.11.24-26 京都

10. Kuranaga, E., Miura, M.  
Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia.  
Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting 2010.8.5-9 Albuquerque, New Mexico

11. Kuranaga E.  
In vivo analysis of apoptosis during reproductive organ development in *Drosophila*  
International Joint Symposium on “Cell Fate Regulation Research: Molecular Basis and Therapeutic Potential” 2009.4.9-10 熊本

12. 倉永 英里奈  
器官形成に關与する細胞死の生理機能  
Imaging Analysis of Cell Death During Organogenesis  
高遠シンポジウム 2009.8.27-28 長野

13. 倉永 英里奈  
生体イメージングにより解析する器官形成における細胞死の役割  
第 50 回日本組織細胞科学会総会シンポジウム  
2009.9.26-27 滋賀

〔図書〕 (計 1 件)

倉永 英里奈 他  
series モデル動物利用マニュアル 生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール  
「ショウジョウバエを用いた生体イメージング」  
株式会社 エル・アイ・シー 2011

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.cdb.riken.jp/jp/02\\_research/0202\\_creative27.html](http://www.cdb.riken.jp/jp/02_research/0202_creative27.html)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
倉永 英里奈 (KURANAGA ERINA)  
独立行政法人理化学研究所・組織形成ダイナミクス研究チーム・チームリーダー  
研究者番号：90376591