

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870040

研究課題名（和文） 生体内力学による細胞の形態、増殖、自殺の調整機構

研究課題名（英文） Biomechanical regulation of cell shape, proliferation and cell death

研究代表者

林 貴史 (HAYASHI TAKASHI)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：50553765

研究成果の概要（和文）：発生過程において生体内力学が細胞の形態や増殖速度、細胞死といった生命現象に対してどのような影響を与えるのかをショウジョウバエをモデルシステムとして用いて解析した。Rho、Rac やミオシン変異体の表現型の解析などから、細胞の形態は細胞骨格の機能に依存した張力の影響を受けて決定されていることが明らかになった。また物理力と組織の増殖や細胞死との関係を調べるための実験系を確立した。

研究成果の概要（英文）：The roles of biomechanics on cell shape control, proliferation and cell death were studied using *Drosophila melanogaster* as the model system. It has been shown that the shape of cells is under the control of surface tension, which is produced by cytoskeletons, by studying the effects of manipulating the function of Rho, Rac or non-muscle Myosin in vivo. An experimental system for studying the roles of biomechanics on proliferation or cell death has also been established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：発生 形態 成長 細胞死

1. 研究開始当初の背景

生物の形態は長年にわたり生物学の中心的課題として位置づけられ、そのメカニズムの探求は今なお生物学の最先端の学問分野として発展を続けている。しかしながらこの問題に関する我々の理解は今なお本質的な回答からはほど遠い状態にある。例えば動物個体の形態を考えると、簡単な理論的考察から、体の大きな生物ほど相対的に太い手足を持つという仮説が導き出される。そして実際にゾウやライオンのような体の大きな動物

はネズミやネコのような小さな動物と比較して不釣り合いに太い手足を持っている。このような形態的な特徴は現在までのところどのようなメカニズムのもとに生じるのか、その具体的な分子機構はほとんど何もわかっていない。また同様に、より微視的な視点、すなわち個々の細胞レベルにおいても形態の問題は多くの未解決な疑問を提供している。例えば種々の組織は特徴的な形態を持つ様々な細胞により構成されているが、このような個々の細胞の形態を決定するメカニズ

ムもまた、個体の形態の場合と同様、ほとんど何もわかっていない。これら生物の形態という問題に関しては、一般的には恐らく何らかの生物学的（生理的）な作用、すなわちホルモンや成長因子、を介した細胞間のシグナル伝達により制御されていると予想されているが、私は生物の形態は細胞間シグナルに加え、力のやり取りという物理学的作用もまた決定的な役割を果たしているのではないかと予想している。

物理学的な作用と生物学的な形態との間の関係は古くから議論されており、特に19世紀末から20世紀初頭にかけての発生機構学の黎明期においては、生物の作り出すパターンと非生物学的なパターン（泡の形態や泥のひび割れパターン等）との相似点を根拠に、有機的な形態が物理学的な作用の基に生じている可能性が指摘されていた。しかしながら近年、分子生物学の急速な発展の結果、生物学の各領域において遺伝子／蛋白質の機能に基づいた研究が主流となるに伴い、発生生物学の領域においても物理的な視点が脇へと追いやられてしまった。

ところでこのような学問分野の趨勢は決して力と形態の関係を否定するものではない。無重力下で長い期間を過ごした宇宙飛行士の骨や筋肉が衰え、また草木が重力に抗して成長する事実を考えると、物理的な力が生物の成長や形態に影響を与える重要な因子であることは明白である。そして実際に私は、組織内の表面力学が細胞の形態や組織の成長速度を決定する際に本質的な役割を果たしているということを示した(Hayashi and Carthew, 2004, Kafer et al., 2007)。また他の研究グループからもそれに関係した研究結果は発表されています(例えば Bertet et al., 2004)。しかしながらこの力と形態の関係という学問分野はまだ誕生して間もない分野であり、従って更なる発展の見込める研究領域である。そこで本研究においては現在までに得られた知見を基に、力と形態との間の関係をさらに詳しく解明するための研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では生物の形態決定過程に関わる現象のうち、とくに細胞の形態決定および組織の成長速度と細胞力学との関係について注目して研究を行う。

細胞の形態に関しては、私は以前にショウジョウバエ複眼において視細胞の形態が細胞膜の張力と接着力という相反する効果を持つ二つの力によって決定される自由エネルギーの最少状態として規定されているというモデルを提唱し、実際に細胞の接着性が組織内の細胞パターンと密接に関係していることを実験的に証明した。そこで本研究で

はこの2つの力のうち、残されたもう一方の力である張力に関して、その細胞形態との間の関係を調べる予定である。より具体的には細胞表面に存在する細胞骨格の収縮により産み出される膜の張力が複眼細胞の形態決定にどのように関わっているかを明らかにする。またあわせて細胞間の相対的なサイズと細胞パターン間の関係についても調べる。

組織の成長速度と組織内の力学との間の関係については特に組織内に発生する張力が実際に細胞の成長を促す作用があるかどうかについて調べる。成長中の組織の内部においてその成長に伴いひずみが生じ、その結果として張力や圧縮力等の物理力が発生します。そして理論的な研究から、圧縮力は組織の成長を抑制し、その一方で適度な張力は成長を亢進する可能性も示唆されている。そこで本研究では組織内の圧縮力と張力が成長速度にどのような影響を与えるのかについて詳しく調べる予定である。

3. 研究の方法

(1)細胞の形態の問題に対しては、非筋肉性 Myosin や Myosin phosphatase、さらには Rac や Rho 等の small G protein の機能を活性化型／ドミナントネガティブ型コンストラクト、あるいは RNAi コンストラクトを Flip-out GAL4 テクニックを用いて複眼の一部の細胞において強制発現させることにより細胞膜の張力を変化させ、その結果生ずる細胞パターンの変化を観察する。その際に細胞の形態は抗 β -Catenin(Armadillo) 抗体を用いて可視化する。細胞の形態決定の過程においては膜の収縮力は接着力とは反対の作用を有すると予想されるため、膜の収縮性を増強した場合には細胞は通常に比べより円に近い形態を取ることが予想され、反対に収縮性を弱めた場合は、細胞はその体積に対して表面積を増大させると予想されることから、細胞は周囲の細胞との間の接着面を広げる方向に形態を変化させることが予想される。

(2)また細胞の相対的なサイズと細胞パターンとの関係に関しては、インシュリンリセプターを介したシグナルを、ドミナントネガティブ型受容体または活性化型受容体を視細胞において強制発現することにより活性化／不活性化させ、細胞のサイズを変化させる。そして細胞のパターンの変化を調べ、相対サイズとパターンニングとの関係を明らかにする。

(3)次に力と成長に関しては、まずは現在進行中である組織中の物理力と成長速度の関係を更に詳しく解析する予定である。組織内には張力と圧縮力が存在するが、圧縮力の作用に関しては現在までに既にある程度の成果が得られているので、もう一方の物理力で

ある張力の作用に興味を集中して研究を行う。

成長中の組織において増殖速度の早い細胞集団と遅い集団が隣接して存在すると、細胞の接着性により、増殖速度の遅い集団は増殖速度の早い集団に引っ張られ、張力を受ける。この張力の増殖に関する役割を調べるためには直接的に組織に張力を与え、その効果を調べる方法が考えられるが、現実問題としては技術的に困難であると考えられるため、本研究においては組織内に早く増殖する細胞集団を作り、この増殖集団が周囲に及ぼす影響を間接的に調べる予定である。そのためにハエの生体内において活性化型インシュリン受容体や Dpp(TGF- β ホモログ)受容体、あるいは Myc 等、細胞増殖を亢進する因子を Flip-out GAL4 テクニックを用い、翅原基上の一部の領域で発現させ、組織内に増殖速度の早い細胞集団(クローン)を作り、クローンの周囲の野生型細胞を伸張させることにより、野生型細胞に張力を与える。そしてそれらの細胞の増殖速度を調べることで張力の増殖に及ぼす影響を調べます。この際に細胞の増殖を様々な異なった方法で活性化させることにより、この「増殖依存的な増殖」が、ある特定のシグナル伝達系に特異的な反応ではなく、増殖一般に共通する性質であることを示したい。

細胞死に関しては、Hufnagel らのモデルにおいては張力と圧縮力の両方に細胞を殺す作用があると仮定されている。そこでまずはこれら2つの力が共に細胞死を引き起こす作用があるかどうかを調べる。その際に張力に関しては「張力と組織の成長」の研究で用いる実験系をそのまま利用し、細胞死の頻度を調べ、また圧縮力に関しては既にその作用を増大させる実験系を確立しているため、それをそのまま利用し、細胞死の頻度を測定する。

4. 研究成果

(1)細胞の形態と細胞膜の張力との間の関係に関しては non-muscle myosin や small G-protein である Rho, Racの機能を操作し、その細胞形態に及ぼす影響を解析した。non-muscle myosin の機能を喪失した色素細胞は膜の張力が減少した結果、細胞の接着角に変化が見られ、また同時に adherens junction のレベルにおいて、細胞の面積が著しく増大した。特に後者の表現型は非常に顕著であった。この2つの表現型は膜の張力の減少から理論的に予想される表現型であり、また dominant-negative 型の Rho や Rac の発現を誘導した際にも同様の表現型が観察された。これらの結果は細胞の形態が細胞膜の張力と接着性によって決定されるというモデルを支持しており、非常に重要であると考えている。ところが残念なことに、同様

の結果が2009年に他のグループにより発表されたため、(Warner S. J. and Longmore G. D. J. Cell Biol. 185(6):1111-1125, 2009)、この現象に関してはさらに深く追求することはやめ、研究を終了することとした。

(2)また複眼のパターン形成に関しては細胞の相対サイズと細胞パターンの関係を明らかにすることを目指し、実験をおこなった。そのためにドミナントネガティブ型および活性化型のインシュリン受容体を複眼の一部の細胞で強制発現させ、細胞のサイズを変化させることを試みた。しかしながら予想に反し、複眼においてドミナントネガティブ型のインシュリン受容体を誘導しても、細胞サイズには全く変化が見られなかった。同様の操作を翅などの複眼以外の組織に施した際には組織サイズの顕著な減少が見られたことから、この実験系自体は正常に機能していることが示された。そこでさらに変異型インシュリン受容体のコピー数を増やすなどして、同様の実験を再度試みたが、残念ながらやはり複眼細胞のサイズに変化は見られなかった。また活性化型インシュリン受容体を発現させた場合は、ほぼ全ての個体が死んでしまい、表現型の解析を行うことが出来なかった。今回、複眼においてこの系が機能しなかった理由は不明であるが、今後は Hippo pathway などの他の増殖シグナル伝達系を操作することにより細胞サイズを変化させる実験を試みたい。

(3)組織内の張力/圧縮力に関しては、当初はその影響を間接的に調べる予定であった。しかしながらこの間接的な方法では、予想通りの結果が得られたとしても、最終的な解釈に曖昧さが残ってしまい、明確な結論を引き出すことが困難であるため、方針を転換し、直接的な方法で影響を調べることにした。この直接的な方法では成虫原基を張力を加えながら培養する必要がある。そこでそのような実験系を確立するために、さまざまな条件で実験を試みていたところ、2009年の生物物理学会年会において、理化学研究所の杉村薫博士(現京都大学 iCeMS)が類似の実験を試み、既に優れた系を確立していることを知った。そこで杉村博士と連絡をとり、その実験系を参考に、さらに改良を重ねることにより、最終的にアッセイシステムを構築することができた。この条件下で発生中の翅原基におけるS期の細胞の分布を調べたところ、張力を与えたサンプルではコントロールと比較して細胞分裂が誘導されていると見られるサンプルも少数ながら存在した。しかしながら現時点ではまだ標本間のブレが大きく結果の再現性に問題があるため、今後さらに実験条件を詳しく検討する必要がある。特に問題となるのは組織培養のための培地の組成である。現在、ショウジョウバエ成虫原

基の培養で一般的に用いられている培地条件では原基細胞は増殖を停止してしまうことが知られている。実際、培養開始後8時間の時点でS期の細胞はほとんど観察されなかった。そこで今後はさらに培養条件を検討し、細胞増殖が阻害されないような条件で張力の増殖促進作用の有無を検討したい。また、増殖が阻害されている条件下においても、物理力による ds や fj といった遺伝子の発現制御機構は正常にされている可能性がある。そこで今後はS期の細胞数を調べるだけでなく、ds や fj の発現を調べる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

① 林貴史、ショウジョウバエ視細胞の形態決定過程を支配する分子メカニズムとその数理モデル

生物物理、査読有、Vol.49、 No.6、2009、
pp.290-291、

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/DevGen/hiromi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林貴史 (HAYASHI TAKASHI)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：50553765