

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04378

研究課題名(和文) 左右非対称な機械的力を定量的表現型としたその発生機構と左右性形成での機能の解析

研究課題名(英文) Measurement and functional analysis of left-right asymmetric mechanical force driving left-right asymmetric morphogenesis in *Drosophila*

研究代表者

松野 健治 (Matsuno, Kenji)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：60318227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：動物の発生過程で起こる組織形態の変形は、組織が生み出す機械的力によって駆動される場合が多い。機械的力に依存する組織変形を解析するためには、組織が発生する機械的力を *in vivo* で定量する必要がある。ショウジョウバエ胚後腸は、先端が腹側に屈曲した傘の柄のような構造をしており、後方から見て反時計回りに捻転することで左右非対称化する。

胚後腸の先端に磁気ビーズを注入し、外部から磁石でけん引して後腸の捻転を止める。この時の磁力は実験で算出できるので、後腸が捻転を駆動する機械的力を実測できる。磁性体の顕微注入、磁力の算出の実験手法を確立することに成功した。今後、この実験系を用いた計測を実施する。

研究成果の概要(英文)：To explore the genetic pathway that generates mechanical force, we first need to quantify the force. The hindgut epithelial tube makes a 90 degree counterclockwise rotation in *Drosophila*. We tried to develop a novel method to measure the torque of the hindgut counterclockwise rotation, which applies the magnetic beads.

Before the rotation of the hindgut, magnetic beads were injected into the lumen of the hindgut anterior end, which curves towards the ventral side. Using neodymium magnets, we induced counterbalancing magnetic force against the twisting of the hindgut. As a reference of how much force this counterbalancing created, we measure the magnetic force between the magnetic beads and the neodymium magnet in viscous fluid using Stokes' law. We developed a basic system to quantify the magnetic force required to stop the contortion of the hindgut, which is equivalent to the force generated by the hindgut for the twisting.

研究分野：発生生物学

キーワード：機械的力 組織変形 左右非対称性 ショウジョウバエ 磁気ビーズ 力の計測 消化管

1. 研究開始当初の背景

(1) 左右非対称な形態形成を理解するためには、機械的力の向きと大きさが制御される仕組みを明らかにする必要がある

からだの左右非対称性は、動物形態の基本的性質の一つであり、左右非対称性形成が発生プログラムの必須な要素になっていることも多い。したがって、左右非対称性の形成機構を明らかにすることは、発生学の重要な課題の一つである。

からだは左右非対称になる過程では、一般に、まず左右軸が形成される。左右軸形成に関する研究は、浜田博教授や廣川信隆教授らの日本人研究者によるノード流モデルの確立を発端として、脊椎動物で進展している。しかし、最近の知見から、このモデルがあてはまるのは、脊椎動物の一部(哺乳類や魚類)のみであり、両生類や鳥類では異なった機構で左右非対称性が形成されることがわかった。さらに、巻貝や線虫では、脊椎動物とは異なる、細胞極性を中心とした未知の左右非対称性形成機構が機能している。これらの事実から、左右非対称性の形成機構は進化的に多様であることがわかる。しかし、多くの動物種において、左右非対称性形成の機構については不明な点が多く、左右非対称性のこれまでに知られていない形成機構が存在すると考えられている。

研究代表者は、このような未知の左右非対

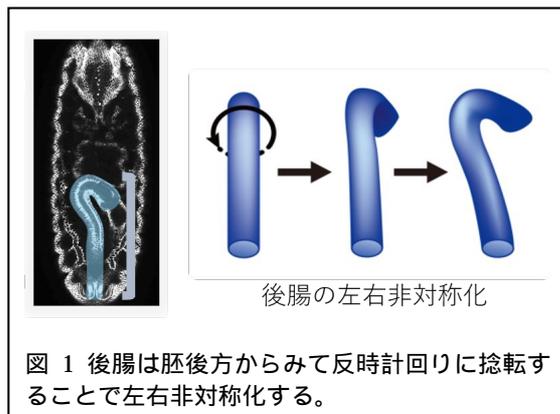


図1 後腸は胚後方からみて反時計回りに捻転することで左右非対称化する。

称性形成機構を明らかにするために、遺伝学的手法が駆使できる利点をいかして、ショウジョウバエの左右非対称性形成の遺伝的機構を世界に先駆けて解析してきた(Nature, 2006)。ショウジョウバエでは、消化管などの多くの器官で、明瞭でステレオタイプな左右非対称性が観察される。その中でも、構造が単純な胚後腸は、形態変形の解析に適している。

ショウジョウバエ胚後腸は、初め、胚の正中線にそって左右対称に形成される。このとき、胚後腸の先端側(中腸と連結している)が、胚の腹側方向に屈曲している。その後、後腸は後方からみて左ネジ方向に90度捻転する(図1)。その結果、腹側に屈曲していた先端部が右方向に向くため、後腸は、前方が右にまがった構造をとる(図1)。この捻転は、後腸上皮組織の管によって駆動され、この過

程に細胞死や細胞増殖は関与しない。研究代表者は、上皮細胞の頂端面(上皮の管の内側)の形状が左右に歪んだ後、これが左右対称化することで捻転が誘発されることを示唆している(Science, 2011)。つまり、後腸の左右非対称性の形成は、上皮組織が発生する左右の方向性をもった機械的力によって誘発されると考えられる(図1)。このことから、左右非対称形成の機構を理解するためには、左や右の向きをもった機械的力が発生する遺伝的機構を明らかにしていく必要があると考えた(図1)。

(2) 発生における機械的力の理解は不十分である

これまでの組織形態の形成に関する研究の多くでは、パターン形成や細胞シグナルなどに主眼が置かれてきた。これらに加え、近年、組織が発生する機械的力による組織変形が注目されている。機械的力の発生に関するこれまでの研究の多くは、培養細胞を用いた細胞レベルでの解析に限定されてきた。一方、細胞が集まって組織レベルで生み出す機械的力については、機械的力が発生する機構に関する一部の先駆的研究を除けば、あまり理解が進んでいない。これは、組織が発生する機械的力を *in vivo* で測定するのは容易ではないことに起因する。一般に、組織の形態形成に関与する遺伝子の同定やその機能解析では、突然変異体や遺伝子ノックダウンで誘

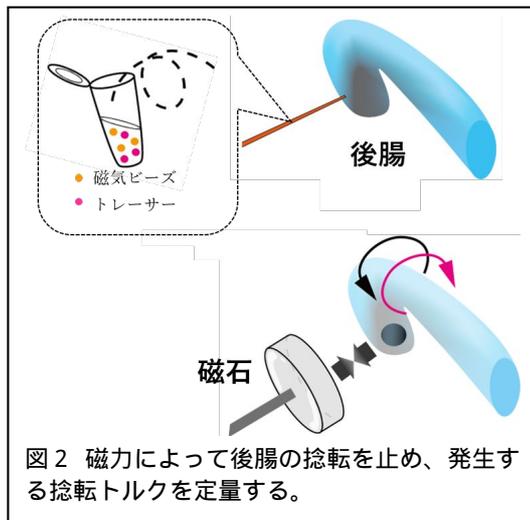


図2 磁力によって後腸の捻転を止め、発生する捻転トルクを定量する。

発される表現型を指標とした解析が行われる。しかし、このような表現型の程度と機械的力の大きさの間に線型的な関係が成立しないため、組織形態を表現型の指標とした従来の遺伝学では、機械的力の発生機構やその機能を遺伝学的に解析することは困難である。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでの研究で、後腸の左右非対称性に影響を与える突然変異体を網羅的に同定し、それらの責任遺伝子を決定してきた。これらの遺伝子の機能を理解することで、後腸上皮の管が発生する機械的力の向きと大きさを決める遺伝的機構を理解で

きると考えられる。しかしながら、後腸上皮の管の発生する機械的力の向きや大きさ、突然変異体の表現型（左右非対称性異常）の間に存在する関係を予見することは極めて困難である。研究代表者は、磁性ビーズとネオジム磁石を使って、後腸の捻転トルクを測定する方法を確立している（磁性ビーズ法）（図2）。

そこで、本研究では、磁性ビーズや、新規に開発する非侵襲的機械的力プローブを用いて、これらの突然変異体や遺伝子改変個体の後腸上皮の管が *in vivo* で発生する機械的力を計測する。得られた機械的力の測定値を表現型として、機械的力の発生や向きの決定で機能する遺伝的な経路を定量的に理解するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 機械的力を表現型とする遺伝学により機械的力の発生や向きの決定の遺伝的機構を明らかにする

磁性ビーズ法を用いて、これまでに同定した後腸の捻転の方向や程度に影響を与える突然変異体において、捻転トルクの方向と強さを *in vivo* で計測する（図2）。これらの実測値にもとづいて、捻転トルクの誘発や向きの決定における各遺伝子の機能を定量的に明らかにする。

(2) 非侵襲的「力」プローブを開発して機械的力の発生を組織・細胞レベルで調べる

磁性ビーズ法は、磁性ビーズの顕微注入を必要とするので、侵襲的であり、実験操作に時間がかかる。そこで、FRET法を用いた非侵襲的機械的力プローブ（蛍光「力」プローブ）を開発する。磁性ビーズ法によって測定した捻転トルクと、FRET法で測定したずり応力（せん断応力）の間に正の相関があるかを調べ、「力」プローブの性能を評価する。この「力」プローブを用いて、それぞれの突然変異体の後腸上皮組織内でのずり応力の分布や時間変化の異常を調べる。さらに、単一の上皮細胞内でのずり応力の分布を、特に、その左右非対称性に着目して解析する。

4. 研究成果

(1) 機械的力を表現型とする遺伝学により機械的力の発生や向きの決定の遺伝的機構を明らかにする

本研究では、組織が発生する機械的力を測定するための解析系として胚後腸に着目した。胚後腸は、先端が腹側に屈曲した傘の柄のような構造をしている。次に、後腸は、後方から見て反時計回りに捻転することで、左右非対称な構造へと変化する。後腸のみを切り出して器官培養しても捻転は起こるため、捻転を駆動する力は後腸自身が発生させていると考えられる。

胚後腸の先端に磁性ビーズを注入し、外部から磁石で後腸が捻転すると逆方向にけん引した場合、磁力と後腸捻転トルクが等し

ければ、後腸の捻転は止まる。この時の磁力は実験で算出できるので、後腸が捻転を駆動する機械的力を実測できるはずである。実験開始時において、基本的、予備的な実験手法ができていたが、後腸への磁気ビーズ注入の成功率（数%）、注入した胚の後腸捻転までの成功率（10%以下）に大きな問題があった。そこで、以下のように、これらの問題点を解決した。

磁気ビーズ注入方法の検討

微小ガラス針（フェムトチップII、エッペンドルフジャパン社）を用いた磁気ビーズの顕微注入を効率的に実施するために、Gal4-UASシステムにより後腸上皮で特異的にGFPを発現する、NP2432/NP2432; myrGFP/myrGFPシステムを用いることとした。また、磁気ビーズとしては、予備的な実験で使用していたTherma-Max（直径100nm以下の微小磁石の表面に熱応答性高分子をコーティングしてある）を引き続き用いることとした。Therma-Maxに含まれる磁気ビーズは、熱応答性高分子の性質により、20°C以下では分散し、20°C以上では互いに凝集し大きな塊を形成する。胚後腸への顕微注入を18°Cで行うことで、ガラス針が詰まるのを防止できる。本研究でテストした他の磁気ビーズは、ガラス針に詰まることがわかった。磁気ビーズが注入されたことを顕微鏡下で確認するため、蛍光色素を混合して注入する。ガラス針がつまりにくい蛍光色素を検討した結果、HaloTag TMR Ligand (555Ex/585Em) (Promega)を用いることとした。これらの改善によって、後腸への磁気ビーズ注入成功率は50%以上に向上し、実験が実施可能な状態になった。

注入した磁気ビーズの定量方法

後腸に顕微注入した磁気ビーズと、外部から近づける磁石の間の磁力を算出するには、注入した磁気ビーズの量（重さ）を算出する必要がある。磁気ビーズの重量濃度は既知なので、顕微注入した磁気ビーズ混合液の容積がわかればこれを算出できる。そこで、磁気ビーズ懸濁液に各種蛍光物質を混同し、顕微注入した胚一つごとに破碎液を調整し、蛍光強度を計測した。TransFluoSphres™ Polystyrene Microspheres, orange fluorescent (540/560) (Thermo Fisher Scientific)を、540nm励起フィルター、560nm検出フィルターで測定したところ、1-0.1nlにおいて直線性のある検量線が得られた。しかし、TransFluoSphres™を用いた場合、キャピラリーが詰まってしまう、胚後腸への注入が非常に難しいことがわかった。また、その他の蛍光色素では、蛍光強度が不十分であった。

この問題を解決するために、 γ -[p32]ATPを用いることとした。液体シンチレーションカウンターを用いて放射線量を計測することで、注入された磁気ビーズ混合液の容積を算出できることがわかった。

磁力のキャリブレーション

あらかじめ、実験に用いる磁石と磁気ビーズの間に生じる磁力の関係を調べておき、それを参照して後腸捻転を止める磁力を算出する。この実験では、「磁気ビーズの重量」と「磁石間の距離」の2つの要素によってのみ磁力が変化する。そのため、この二つの要素によって磁力がどのように変化するかを調べる必要がある。

磁力の定量には、ストークスの式を用いる。ストークスの式により、流体中を移動する微小粒子に加わる力を実験的に導出することができる。粘度既知の液体中で、磁気ビーズを外部磁石により牽引する様子を撮影する。流体の粘度 η 、微小粒子の半径 r 、微小粒子の速度 v から、微小粒子に加わる力 F を計算できる。粘度標準溶液はシリコンオイルなので、磁気ビーズが懸濁された水系溶媒は、その中で球体となる。シャーレを倒立顕微鏡に置き、ネオジウム磁石を磁石用マニピュレーターに設置した。角度は 30° に、高さはネオジウム磁石の下端が溶液中の磁気ビーズと同じ高さに来るように調節した。タイムラプス撮影を開始してから、Therma-Max が牽引される距離まで、ネオジウム磁石を少しずつ近づけた。外部磁石として、 $\phi 8\text{mm} \times 10\text{mm}$ の円柱状のネオジウム磁石 (MAGFINE) を用いて、磁石間の距離 $500\mu\text{m}$ 、 $750\mu\text{m}$ 、 $1000\mu\text{m}$ の各距離の磁気ビーズの量と力の関係のグラフを作成することができた。これによって、特定の位置に磁石をセットした場合に発生する磁力を算出できた。これら成果によって、後腸の捻転トルクを計測する実験系ができたと判断した。

(iv) 後腸が発生する捻転トルクの計測

直径 $20\text{mm} \times$ 高さ 5mm のネオジウム磁石 (Magfine) を用いて実験を行った。後腸が異常な発生を示した一回を除き、12回で後腸が正常に捻転した。残念ながら、現在のところ、後腸が磁力により停止した様子は観察できていない。これらの実験では、外部磁石を限界まで近づけ、可能な限り大きな磁力で後腸を牽引している。したがって、後腸の捻転を停止させるのに十分な大きさの磁力を発生させることができていないと判断できる。したがって、より大きな磁力を発生させる必要がある。磁石の先端をとがらせることで磁力線密度を高めることができ、強い磁力が得られるので、この方針で実験系を改良する。また、電磁石を用いることで、より強い磁力を得ることも計画している。野生型胚での捻転トルクの計測に成功したら、後腸捻転に異常を示す突然変異体についても順次計測していく。

(2) 非侵襲的「力」プローブを開発して「力」の発生を組織・細胞レベルで調べる

本研究を開始する時点においては、後腸捻転を誘発する機械的力は、後腸上皮細胞の頂端領域の収縮力の異方性に依存して生じると考えられていた。その後の研究によって、後腸捻転は、後腸上皮細胞の頂端-基底軸を

中心とするねじれによって起こっている可能性が示唆された。そこで、細胞膜での機械的力はなく、細胞のねじれを検出する方法の開発を試みた。ショウジョウバエ胚が多核性胞胚の時期に、将来後腸を形成する領域に蛍光ビーズ (FluoSpheres™, Carboxylate-modified Microspheres, red fluorescent, 直径 $0.2\mu\text{m}$) を顕微注入する。これらの胚後腸の上皮細胞の一部は、蛍光ビーズを取り込んでいる。捻転中の後腸をタイムラプス撮影し、このビーズの動きを追跡できる系を確立した。現在、蛍光ビーズの動きに頂端-基底軸を中心とした回転が検出できるかどうかを検討している。

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 11 件)

Inaki, M., Hatori, R., Nakazawa, N., Okumura, T., Ishibashi, T., Kikuta, J., Ishii, M., *Matsuno, K., and *Honda, H. (* equal contribution as lead correspondence) Chiral cell sliding drives left-right asymmetric organ twisting. *eLife* 査読有 in press (2018).

Lai, Y.-T., Maeda, C., and Matsuno, K. *Drosophila* flies high over the Asia-Pacific: report on the Fourth Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference. *Genes to Cells* 査読有 in press (2018).

Yamakawa, T., Atsumi, Y., Kubo, S., Yamagishi, A., Morita, I., and Matsuno, K. Insight into Steps in Notch Signaling that Involve *pecanex* from Dominant-Modifier Screens in *Drosophila*. *Genetics* 査読有 in press (2018).

Inaki, M., Sasamura, T., and Matsuno, K. Cell chirality drives left-right asymmetric morphogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* 査読有 (2018).

Inaki, M., Yang L. J., and Matsuno, K. Left-right asymmetric morphogenesis in *Drosophila* and other invertebrates: the discovery of intrinsic cell chirality and its functions. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine* 査読有 10.1002/3527600906.mcb.201700003 (2017).

Inaki, M., Yang L. J., and Matsuno, K. Cell chirality: its origin and roles in left-right asymmetric development. *Phil Trans B* 査読有 371, 20150403 (2016).

Matsumoto, K., Ayukawa, T., Ishio, A., Sasamura, T., Yamakawa, T. and Matsuno, K. Dual roles of *O*-glucose glycans redundant with monosaccharide *O*-fucose on Notch in Notch Trafficking. *J. Biol. Chem.* 査読有 291, 13743-13752 (2016).

山川智子、松本顕治郎、松野健治 暁の

Notch シグナル - 無脊椎モデル動物の役割の過去と未来 **実験医学** 査読有 34 (3), 390-396 (2016).

Okumura, T., Sasamura, T., Inatomi, M., Hozumi, S., Nakamura, M., Hatori, R., Taniguchi, K., Nakazawa, N., Suzuki, E., Maeda, R., Yamakawa, T., and Matsuno, K. Class I myosins have overlapping and specialized functions in left-right asymmetric development in *Drosophila*. **Genetics** 査読有 199 (4) 1183-1199 (2015).

Ishio, A., Sasamura, T., Ayukawa, T., Kuroda, J., Ishikawa, H. O., Aoyama, N., Matsumoto, K., Gushiken, T., Okajima, T., Yamakawa, T., and Matsuno, K. *O*-fucose monosaccharide of *Drosophila* Notch has a temperature-sensitive function and cooperates with *O*-glucose glycan in Notch transport and Notch signaling activation. **J. Biol. Chem.** 査読有 290, 505-519 (2015).
羽鳥僚, 松野健治 ねじれる 細胞のキラリティの普遍性と機能 **実験医学** 査読無 33 (3), 423-428 (2015).

〔学会発表〕(計 12 件)

Dongsun Shin, Left-right asymmetric migration of nuclei in the visceral muscles is a first cue for the laterality formation of the embryonic gut in *Drosophila*. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017
磯貝拓己, ショウジョウバエ卵巣での RNAi を用いた左右非対称性形成に関わるアクチン制御因子の探索. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017

Puspa Das, Roles of *Drosophila* Almondex in endocytic trafficking of Notch and its ligand Delta for activation of the Notch signaling Pathway. The 4th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2017
Dongsun Shin, 3-dimensional visualization of morphogenesis reveals novel contribution of visceral muscles to the left-right asymmetric development in *Drosophila*.

The 4th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2017

Takumi Isigai, An RNAi-based screen searching for genes encoding actin regulators required for LR-asymmetric development of the testis in *Drosophila*. The 4th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2017

Dongsun Shin, 3-dimensional visualization of morphogenesis revealed novel contribution of visceral muscles to the left-right asymmetric development in *Drosophila*. Annula meeting of Japanese Society of Developmental Biology, 2017
稲木美紀子, キラルな細胞スライドが左右非対称性な内臓捻転を駆動する. 第

39 回日本分子生物学会, 2016

亀井勇亮, ショウジョウバエの左右非対称性を反転させるミオシン ID 相互作用因子の BioID 法を用いた探索. 第 39 回日本分子生物学会, 2016

森下義高, dally-like に依存する Wnt シグナルはショウジョウバエの左右非対称性形成に必要である. 第 39 回日本分子生物学会, 2016

Tomoki Ishibashi, Transcription analysis to identify genes responding to mechanical force in *Drosophila*. 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016

森下義高, グリピカンに依存する Wnt シグナルはショウジョウバエの左右非対称性形成に必要である. 第 34 回日本糖質学会, 2015

稲木美紀子, 左右非対称性な内臓捻転における細胞挙動の解明. 第 38 回日本分子生物学会, 2015

〔図書〕(計 2 件)

(1) 稲木美紀子, 山川智子, 笹村剛司, 松野健治 **遺伝子発現制御機構** P133-139 東京化学同人 (2017)

(2) 松本顕治郎, 石尾彬, 松野健治 “細胞間情報伝達 Notch 情報伝達” **糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック** P91-96 エヌ・ティー・エス (2015).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/matsuno/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者
松野 健治 (MATSUNO, Kenji)

大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：60318227

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

笹村 剛司 (SASAMURA, Takeshi)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：70647487 ()

山川 智子 (YAMAKAWA, Tomoko)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：20645402

(4)研究協力者

()