

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07077

研究課題名(和文)細胞のキラリティが内臓の左右非対称な捻転を引き起こす機構の解明

研究課題名(英文)Cell chirality induced left-right asymmetric rotation of internal organs

研究代表者

稲木 美紀子 (Inaki, Mikiko)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：10747679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの消化管の一部である後腸は、初め左右対称な構造として形成された後、左ネジ回りに90度捻転し、左右非対称な形になる。後腸の細胞は、捻転前は左に傾いた左右非対称な形をしており、捻転後には左右対称になることが知られており、後腸捻転との関連が示唆されていた。しかし、細胞のどのような動きによって、左右非対称な内臓形態がつくられるかについては解明されていなかった。本研究で、ショウジョウバエ胚の後腸捻転のライブイメージングとコンピューターシミュレーションを行うことにより、内臓器官が左右非対称な形に変化するのに「細胞スライド」と名付けた新規の細胞挙動が重要であることを解明した。

研究成果の概要(英文)：The *Drosophila* hindgut, which is a part of the digestive tract, is firstly formed as a symmetric structure, then rotates 90 degrees around the left screw, resulting in a left-right asymmetric shape. It is known that the hindgut cells are left-right asymmetric inclining to the left before the rotation, and they become symmetric after the rotation, suggesting a relationship with the hindgut rotation. However, it has not been elucidated what kind of cellular movement generates the asymmetric morphology of the hindgut. In this study, we found that the novel cell behavior named "cell slide" is important for changing internal organs to asymmetrical form by performing live imaging and computer simulation of the *Drosophila* embryonic hindgut rotation.

研究分野：発生生物学

キーワード：器官形成 シミュレーション 左右非対称性 細胞キラリティ 細胞移動 ライブイメージング コンピューターシミュレーション

1. 研究開始当初の背景

左右非対称性は、生物の形態の基本的な属性の一つであり、多くの内臓器官が左右非対称性を示す。その形成機構の解明は、臓器の再生などの応用に重要である。しかし、脊椎動物などでよく解析されている発生初期に形成される胚の左右軸極性が、どのように内臓の左右非対称性に受け継がれているのかや、胚の左右軸とは独立に決定される内臓の左右非対称性の形成機構(Noel et al., 2013)は未知な部分が多い。研究代表者は、ショウジョウバエ胚の後腸をモデルとして、内臓の左右非対称性の形成機構を解析している。ショウジョウバエ胚の後腸は、上皮細胞の管状の構造ができた後、胚の後側から見て左ネジ回りに 90°捻転し左右非対称な形態をとる。この捻転に腸上皮細胞の頂端面が左に傾いているという平面キラリティ(鏡像と重ならない性質)が重要な役割を持つ可能性を示してきた(Taniguchi et al., 2011)。しかしながら、細胞レベルの偏りが臓器全体の左右非対称な捻転を生み出す機構はまったくわかっていない。I型ミオシンである Myo31DF や接着分子 E-カドヘリンをコードする遺伝子の変異体では、細胞の偏りおよび後腸の左右性に異常がみられるがその捻転に及ぼす役割は明らかになっていない。また、コンピューターシミュレーションでは、モデル上皮細胞で左肩上がりの細胞境界を収縮させ、左に傾いた細胞を作り、その収縮をなくすと組織全体の捻転を説明できることが示されているが、実験的には証明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞レベルの変化が内臓の捻転を生み出す機構を解明するため、(1)上皮細胞のライブイメージングにより捻転の基となる細胞挙動を予測し、(2)その挙動をライブイメージングにより生体内で検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) コンピューターシミュレーション

細胞の頂端面を多角形で表す 3次元パーテックスダイナミクスモデル(Honda and Nagai, 2015)を用いて、後腸捻転のシミュレーションを行った。まず、ランダムな多角形を用いて、後腸の頂端面を表し、右に傾いた細胞境界を強く収縮させることで、捻転前の細胞キラリティを再現した。その後、収縮力の偏りをなくすことで、キラリティを解消させ、細胞キラリティにより誘導される細胞の動きを予測した。

(1) 細胞核のライブイメージングによる細胞移動の解析

ショウジョウバエ胚の後腸特異的に発現するドライバー *byn-Gal4* を用いて、核局在マーカーである *UAS-redstinger* を発現させた。後腸が捻転し始めるステージ 1 2 後期の胚をマウントし、走査型レーザー共焦点顕微鏡

(LSM700, Zeiss)を用いて、23 - 25 で、5分おき2時間ライブイメージングを行った。細胞核の位置を指標に細胞を追跡し、30分ごとの座標位置を計測し、下(胚の後方)に位置する細胞に対する相対的移動度を算出した。腸管の腹側に位置する細胞については、核局在マーカーとして *UAS-stinger*、あるいは *UAS-NLS tdTomato* を発現させ、二光子共焦点顕微鏡(A1, Nikon)で観察した。同様の方法で、細胞の相対的移動度を算出した。対象として、左右方向の移動を示さない、*rectum* に位置する細胞についても移動度を算出した。この解析を、逆位の突然変異体 *Myosin31DF* (Hozumi et al., 2006)についても行った。

(2) 細胞境界のライブイメージングによる細胞変形の解析

細胞核と同様に、*byn-Gal4* を用いて、膜局在マーカーである *UAS-myrGFP* を後腸特異的に発現させ、その経時変化を走査型レーザー共焦点顕微鏡(LSM700, Zeiss)を用いて、23 - 25 で、5分おきに2時間観察した。

4. 研究成果

(1) モデル腸管の細胞キラリティを消失させると、細胞は捻転方向にスライドするように動く

パーテックスダイナミクスモデルを用いたシミュレーションにより、偏りのある細胞境界収縮を中立にすると、まず、左に傾いていた細胞の軸が比較的ランダムな形状になり($t = 1.0$)、その後、細胞が相対的位置を変え、捻転方向にスライドするように動く($t = 80.0$)ことが分かった(図1、淡青色の細胞に注目)。

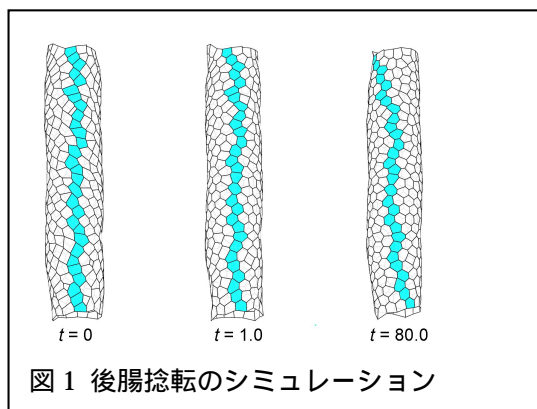


図1 後腸捻転のシミュレーション

(2) 野生型の捻転では、細胞は左方向にスライドする

シミュレーションで予測された細胞の動きが、生体内で見られるか確認するため、ライブイメージングを行い、細胞核の位置を指標に細胞を追跡した。その結果、細胞は、下(胚の後方)に位置する細胞に対して、左方向に有意にスライドすることが分かった(図2左)。また、腸管の腹側に位置する細胞は、有意に右方向に動き、全体として、捻転方向にスライドしていることが確かめられた(図2右)。

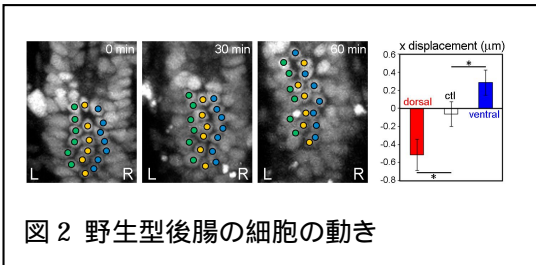


図 2 野生型後腸の細胞の動き

(3) *Myosin31* 突然変異体を用いた逆位の捻転では、細胞は逆向きにスライドした

逆位の突然変異体 *Myosin31* を用いた、逆位の後腸捻転では、腸管の背側に位置する細胞は右方向に有意にスライドしていた (図 3 左)。また、腸管の腹側に位置する細胞は、有意に左方向に動き、全体として、逆位の捻転方向にスライドしていることが確かめられた (図 3 右)。

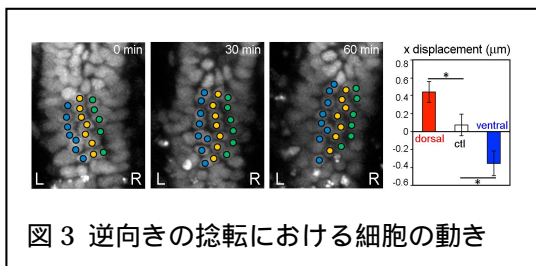


図 3 逆向きの捻転における細胞の動き

(4) 細胞スライド時に細胞境界は維持される

細胞境界の追跡により、細胞境界の組み換えが起こるかを調べたところ、9 割以上で、細胞境界が維持されることがわかり、細胞スライドに細胞境界の組み換えが必須ではないことが示唆された。細胞境界の動きを定量化すると、野生型では反時計回りに回転するように動く細胞境界が有意に多く、逆位の突然変異体では、時計回りに回転するように動く細胞境界が有意に多いことが分かった (図 4)。

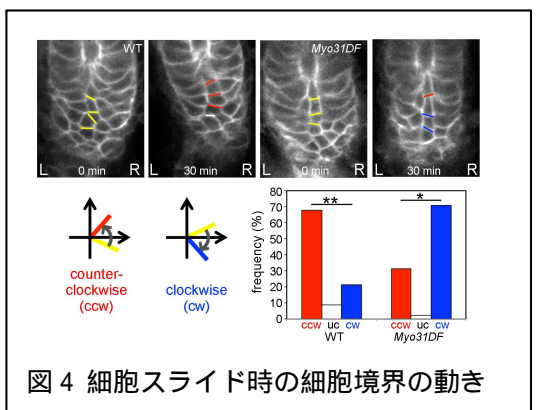


図 4 細胞スライド時の細胞境界の動き

(5) 細胞インターカレーションは左右非対称な捻転には寄与しない

左右非対称な細胞インターカレーションが、ショウジョウバエのオス外部生殖器の回転に重要であることが示されているため (Sato et al., 2015) 後腸の捻転に寄与する可能性を検証した。細胞インターカレーションが

起きた時、挿入した細胞が来た方向を調べたところ、左右差はみられなかった。また、消失した細胞境界の角度を計測したところ、顕著な左右差はみられなかった。これらの結果から、細胞インターカレーションは後腸の左右非対称な内臓捻転には寄与しないことが示唆された。

(6) 組換えを禁止したシミュレーションでも後腸の捻転が再現できた

細胞インターカレーションは細胞境界の組み換えを伴う細胞の動きであるため、上述の結果は後腸捻転に細胞境界の組み換えが必要ない可能性を示唆している。コンピューターシミュレーションを用いて、細胞境界の組み換えを禁止しても、腸管が捻転するか調べたところ、組み換えを許したのと同程度 ($t = 80.0$ で 83.1° 、組み換えありは 88.5°) 捻転することがわかり、観察結果からの予測が支持された。

(7) シミュレーションにより、逆向きのスライドを再現できた

シミュレーションにおいて、ランダムな形状の多角形の左に傾いた細胞境界を強く収縮させ、右に傾いた逆位のキラリティを導入し、その後細胞境界収縮を中立にさせた。その結果、野生型とは逆向きの、*Myosin31* 突然変異体で見られた細胞スライドを再現でき、後腸も逆向きに捻転した。

以上の結果から、細胞キラリティは、細胞スライドと名付けた、細胞が後方に位置する細胞に対して相対的位置を捻転方向にスライドさせるという新規の細胞挙動により、後腸の左右非対称な捻転を誘導することが示された。

< 引用文献 >

Noël, E.S., Verhoeven, M., Lagendijk, A.K., Tessadori, F., Smith, K., Choorapoikayil, S., den Hertog, J., and Bakkers, J. (2013). A Nodal-independent and tissue-intrinsic mechanism controls heart-looping chirality. *Nat Commun* 4, 2754.

Taniguchi, K., Maeda, R., Ando, T., Okumura, T., Nakazawa, N., Hatori, R., Nakamura, M., Hozumi, S., Fujiwara, H., and Matsuno, K. (2011). Chirality in planar cell shape contributes to left-right asymmetric epithelial morphogenesis. *Science* 333, 339-341.

Honda, H., and Nagai, T. (2015). Cell models lead to understanding of multi-cellular morphogenesis consisting of successive self-construction of cells. *J Biochem* 157, 129-136.

Hozumi, S., Maeda, R., Taniguchi, K., Kanai, M., Shirakabe, S., Sasamura, T., Spéder, P., Noselli, S., Aigaki, T., Murakami, R., et al. (2006). An unconventional myosin in *Drosophila* reverses the default handedness in

visceral organs. Nature 440, 798-802.

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 4件)

Inaki M, Hatori R, Nakazawa N, Okumura R, Ishibashi T, Kikuta J, Ishii M, Matsuno K, Honda H
Cell chirality drives left-right asymmetric organ twisting.
eLife (2018, in press) 査読有
DOI:10.7554/eLife.32506

Inaki M, Sasamura T, Matsuno K
Cell chirality drives left-right asymmetric morphogenesis.
Frontiers in Cell and Developmental Biology 6: Article 34 (2018) 査読有
DOI:10.3389/fcell.2018.00034

Inaki M, Liu J, Matsuno K
Left-right asymmetric morphogenesis in Drosophila and other invertebrates: the discovery of intrinsic cell chirality and its functions.
Cell Biology and Molecular Medicine 3: 201700003 (2017) 査読有

Inaki M, Liu J, Matsuno K
Cell chirality: its origin and roles in left-right asymmetric development.
Philosophical Transaction of the Royal Society B 371: 20150403-12 (2016) 査読有
DOI:10.1098/rstb.2015.0403

[学会発表](計 11件)

稲木美紀子、大久保明野、須志田隆道、秋山正和、井上康博、松野健治
上皮細胞組織変形の三次元シミュレーションを用いたショウジョウバエ消化管の左右非対称な捻転を引き起こす細胞変形の素過程の同定
日本分子生物学会、神戸(2017)

稲木美紀子、本多久夫、松野健治
Chiral cell sliding drives left-right asymmetric organ twisting.
European Drosophila Research Conference、ロンドン、イギリス(2017)

Inaki M, Honda H, Matsuno K
Chiral cell sliding drives left-right asymmetric organ twisting.
Mechanical forces in biology、ハイデルベルグベルグ、ドイツ(2017)

稲木美紀子、大久保明野、須志田隆道、秋山正和、井上康博、松野健治
上皮細胞組織変形の三次元シミュレーションを用いたショウジョウバエ消化管の左右非対称な捻転を引き起こす細胞変形の素過程の同定
日本細胞生物学会、仙台(2017)

稲木美紀子、本多久夫、松野健治
キラルな細胞スライドが左右非対称な内臓捻転を駆動する
第39回 分子生物学会年会、横浜(2016)

稲木美紀子、本多久夫、松野健治
Analysis of chiral cellular dynamics in left-right asymmetric rotation of Drosophila hindgut.
Annual Drosophila Research Conference、オランダ、アメリカ(2016)

稲木美紀子、本多久夫、松野健治
Analysis of chiral cellular dynamics in left-right asymmetric rotation of Drosophila hindgut.
Mechanobiology meeting、クイニオン、ベトナム(2016)

稲木美紀子、本多久夫、松野健治
左右非対称な内臓捻転におけるキラルな細胞挙動の解明
第68回 日本細胞生物学会年会、京都(2016)

稲木美紀子、本多久夫、松野健治
左右非対称な内臓捻転における細胞挙動の解明
第38回 分子生物学会年会、神戸(2015)

稲木美紀子、本多久夫、松野健治
Analysis of cellular dynamics in left-right asymmetric rotation of Drosophila hindgut.
第5回 モデル生物丸ごと一匹学会、大阪(2015)

稲木美紀子、本多久夫、松野健治
Analysis of cellular dynamics in left-right asymmetric rotation of Drosophila hindgut.
第26回 CDB ミーティング、神戸(2015)

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲木 美紀子 (INAKI, Mikiko)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 10747679

(2)連携研究者

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

(4)研究協力者

本多 久夫 (HONDA Hisao)

神戸大学・大学院医学研究科・客員教授

研究者番号：10289118