

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K17781

研究課題名(和文)再生ヒドラの揺らぎの全モード解析

研究課題名(英文) Mode analysis of morphological fluctuation during Hydra regeneration

研究代表者

鈴木 量 (Suzuki, Ryo)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：10768071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：発生の初期過程において、球状の胚が体軸を決定する過程は極めて重要である。この体軸の決定という「対称性の破れ」を、発生過程のモデル実験系の一つであるヒドラに着目し、非平衡形状揺らぎの全モード解析を行った。研究成果として、初期条件の異なるヒドラ切片と単離細胞を再凝集した塊の再生過程における形状揺らぎの全モード解析を行い、どちらの条件でもモード0(平均サイズ)と2(軸方向伸縮)が逆位相になるという共通点を突き止め、これを「対称性の破れ」と定義し、体軸形成に重要であるWntシグナル経路の促進・抑制によって、対称性の破れだけでなく、再生速度や初期口の生成が著しく変化することを定量的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生生物学の分野では再生過程によって初期の等方的な胚が成体になる要因に注目した研究は数多く報告されてきたが、それらの多くは分子レベルでの操作による要素還元的な手法を用いた記述にとどまり、組織をシステムとして統合的に捉え、対称性の破れの本質を定量的な物理的リードアウトを用いて定量解析する試みはこれまでになかった。そのため、本研究で得られた成果は学術的に非常に重要である。また社会的意義として、本研究で扱った対称性の破れは再生に限らず原腸胚形成やがん転移などといった細胞極性が大きく変化する過程の理解にも展開可能であり、特に疾患における対称性の破れの本質を理解する上で重要である。

研究成果の概要(英文)：Body axis formation of an embryo from its initial spherical shape is an important process during the early phases of development. Using a model experimental system Hydra that is frequently used for understanding developmental processes, we studied the "symmetry breaking" phenomenon of body axis formation via mode analysis of morphological fluctuations. The main results obtained were; (1) we performed mode analysis for regeneration processes of two completely different initial conditions - cut tissue piece and cluster formed by reaggregation of dissociated single cells - and found that there was a common feature for both conditions where mode 0 (mean size) and 2 (axial deformation) became anti-phasic. We defined this attribute as the point of "symmetry breaking". (2) Activation/inhibition of Wnt signalling pathway, a pathway vital for axis formation in Hydra, significantly influenced not only the point of symmetry breaking but also the speed of regeneration and early mouth formation.

研究分野：非平衡物理・生物物理

キーワード：再生組織の物理 非平衡形状揺らぎ 対称性の破れ 自己駆動型粒子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の個体の発生において形態形成は最も重要な過程の一つである。ここでは細胞同士の相互作用に加えて、それらを取り巻く環境との相互作用によって秩序的な高次構造を自発的に生み出し、個別細胞の単なる総和とは異なる機能を生み出す。なかでも、等方的な胚が体軸を決定する過程は発生の初期過程において極めて重要であり、発生生物学の分野では細胞極性の変化という現象論的な意味でこれを「対称性の破れ」と記述してきた。

発生過程を理解するためにモデル実験系として頻繁に用いられているのがヒドラである。ヒドラの体の構造は極めて単純ながら、ほぼ無限で強力な再生能力をもち、体をいくつかに切っても1週間ほどで完全なヒドラとして再生する。これまで国内では発生・遺伝子学および非線形科学の分野から先導的な研究を行ってきた。一方、海外では Wnt シグナリングに着目した研究を行ってきた。近年物理学の分野ではヒドラの再生過程における組織の膨張・収縮の周期が突然ある時刻で短くなるという興味深い現象を見つけ、この周期変化の時点をも「対称性の破れ」と定義した。しかしながら、異方的な軸方向への変形(モード2)はその時点で増大していないなど、対称性そのものの破れの定義が曖昧である。これは、アガロースゲルにヒドラを埋め込むといった空間的束縛がヒドラの非平衡揺らぎを阻害しているという根本的な問題があった。そのため、ヒドラの非平衡形状揺らぎの全モード解析という物理的リードアウトによって、「対称性の破れ」を定量的に解析することは発生過程の本質を理解するために非常に重要であり、このような試みはこれまでになかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ほぼ無限の再生能力をもつことで知られる淡水産刺胞動物のヒドラを用いて成体再生過程で起きる体軸の決定という「対称性の破れ」を非平衡形状揺らぎの全モード解析という物理的リードアウトによって定量的に解析する。具体的には、(1) 再生組織の非平衡形状揺らぎのモードの時間発展から、これまで観測に基づく形や細胞の極性の変化として現象論的に理解されていた「体軸の形成」を「対称性の破れ」として物理的な視点から厳密に再定義し、(2) 組織の再生過程における環境因子(外的摂動)の与える影響を定量解析することによって、組織再生の本質を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### ① 再生ヒドラの非平衡形状揺らぎの全モード解析

ここでは、顕微鏡を用いてヒドラ切片の成体再生過程を撮影し、非平衡形状揺らぎのモードの時間発展を追う。そうすることにより、再生過程における非平衡形状揺らぎと対称性の破れの関係性を明らかにする。

本研究独自のアプローチとして、より自然な状況下で再生過程の物理を理解するため、従来のヒドラをアガロースゲルに埋め込ませる方法ではなく、自由に變形し運ける、浮遊するヒドラの実験系(non-invasive系)を確立する。この方法は、ヒドラ組織切片の能動的揺らぎやその情報を全く損なうことがないため、本研究において大変重要な工夫となる。

また、体をいくつかに切ったヒドラ切片と異なり、細胞を単離し、再凝集させた塊も成体再生することが知られている。このように初期条件が全く異なるが同じ成体に再生する系を用いることで体軸の決定の本質に迫る。

#### ② 環境因子の影響

第二段階では、ヒドラの再生過程における環境因子(外的摂動)の与える影響を定量的に解析する。ここでは外部摂動として、体軸形成に影響を及ぼす(ヒドラの頭の数を変えるなど) Wnt や  $\beta$ -catenin を用いる。このように環境因子を変えた際の形状揺らぎの全モードの解析を通じて、環境因子が形態形成および対称性の破れに与える影響を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### ① 再生ヒドラの非平衡形状揺らぎの全モード解析

形状の非平衡揺らぎを定量化するために、モード解析を行った。実験で得られた画像から半径  $r$  を極座標表示し、一周分の半径データを取り、これをフーリエ変換することによりモード  $m$

$$\tilde{r}(m, t) = \left| \frac{2}{N} \sum_{\theta=0}^{N-1} r(\theta, t) \cdot e^{\frac{2\pi i m \theta}{N}} \right|$$

を計算した。ここでは等方な伸縮、即ち組織切片の大きさの変化を表すモード0 ( $m=0$ ) と体軸形成の指標として用いることができる軸方向伸縮を表すモード2 ( $m=2$ ) に着目した。図1にはヒドラ切片の再生過程における各モードの時間変化を示す。モードを計算した結果、モード0はヒドラの再生過程に特徴的な pump-burst cycle が見られ、モード2はモード0と逆位相になることがわかった。また、楕円変形(モード2の急な増加)したのち、モード2が元の値に戻らず、緩やかに減少することから、ヒドラ組織切片はこの時点で軸を形成したと考えられ、モード0と2が逆位相になるところを「対称性の破れ」が起きた時点と定義した。この定義の妥当性を調べるために、初期条件が全く異なるが同じ成体に再生する単離細胞を再凝集した塊を用いた結果、現れる時間帯は切片組織より遅かったものの、同じ逆位相を示した。切片の系と再凝集系で共通するモード0と2の逆位相を理解するために変形する組織の理論構築を目指した。ここでは変形する自己駆動型粒子のモデルをベースにし、モードの時間変化と張力や弾性といった物理的制約の関係式を用いたところ、全モード解析で得られたモード0と2が逆位相になるという現象を準定量的に再現することに成功した。

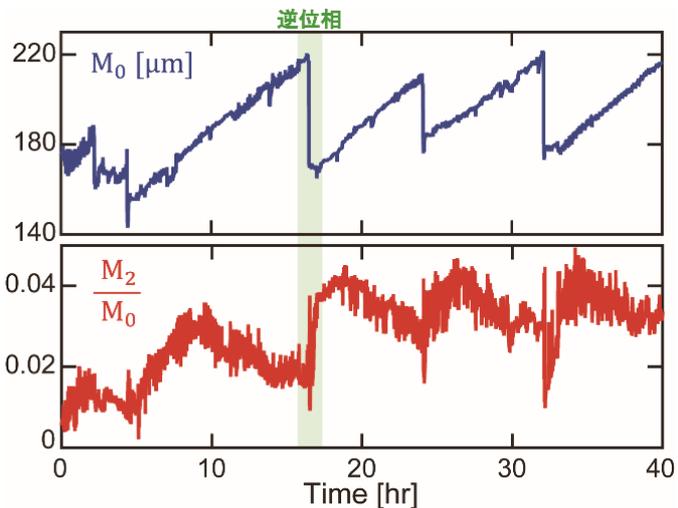


図1 ヒドラ切片の再生過程におけるモード0と2の時間変化。

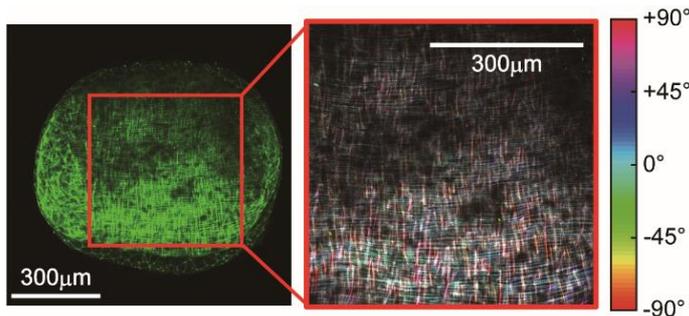


図2 ヒドラ切片の再生過程初期における細胞骨格(アクチン)の格子構造。

一方、切片と再凝集塊の再生過程におけるモードの時間発展は類似しているものの運動(並進・回転)が全く異なることを明らかにした。その理由に迫るため、組織の変形や運動を可能とする細胞骨格構造の時間発展の定量に取り組んだ。再生過程における様々な時点でサンプルを固定しアクチンを蛍光染色した結果、ヒドラ切片では成体へと再生する間、常にヒドラの成体に特有な格子状のアクチン構造が見られる(図2)が、再凝集系ではランダムなアクチン配列から始まり、再生する過程で局所的に格子構造が生じ、やがて一様な格子構造を形成する、という異なる時間発展プロセスを明らかにした。この結果は、再凝集系に特徴的な、形状の対称性の破れがヒドラ切片に比べて遅くかつ運動が見られないという結果を説明する上で大変興味深い。実際、細胞骨格を駆動している分子モーターを阻害した系ではモードの逆位相が確認できず、成体への再生も見られなかった。

## ② 環境因子の影響

ここではヒドラの再生過程における環境因子(外的摂動)の与える影響を解析した。特に、体軸形成に影響を及ぼす Wnt シグナル経路はヒドラの再生過程において大変重要な要素であり、再生過程における組織の変形とこのシグナル経路の関係を探るため、Wnt シグナル経路の活動を促進・抑制した遺伝子的摂動下での形状揺らぎのモード解析を行った。Wnt シグナル経路の活動を促進したヒドラ切片組織では再生が早まり、ヒドラの再生過程に特徴的な pump-burst cycle(図1: 大きさ  $M_0$  が徐々に増加し、破裂するサイクル)の回数が減った。これはより少ない変形で、より効率良く再

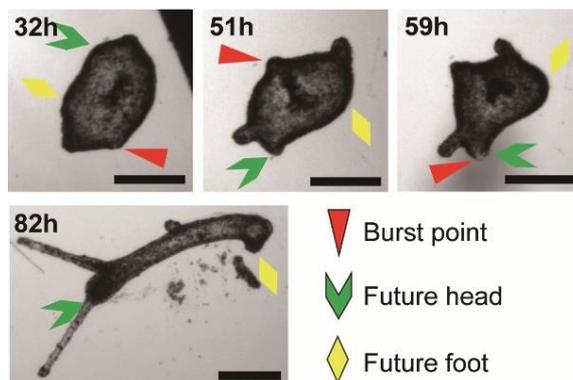


図3 野生型のヒドラにおける初期の口の生成。59時間までは破裂箇所がランダムだが、それ以降は破裂箇所が固定され、将来的に成体の口になる。

生していることを示唆している。また、成体への再生スピードだけでなく、初期の口の生成時期 (図3:野生型のヒドラ)、即ち体軸決定に伴い、細胞が分化し起こる現象、が野生型のヒドラに比べて約半分の時間で起こることを突き止めた。一方、Wntシグナル経路の活動を抑制した場合には再生することなく、**pump-burst cycle** 及びモード0と2の逆位相現象も見られなかった。ここでは変形を可能とする細胞骨格・分子モーターは正常に働いている状態にも関わらず再生能を失うことを明らかにした。遺伝子的摂動によるWntシグナル経路の活動を促進したヒドラ切片の結果の妥当性を確認するため、Wntシグナル経路を外部から促進可能な分子を用いた実験を行った。その結果、同じ傾向が見られ、Wntシグナル経路・変形・対称性の破れが密接に関わっていることを明らかにした。

さらに、Wntシグナル経路の活性化と対称性の破れのタイミングについて調べた。ここでは再生過程のさまざまな時点でWntの発現量を測定したところ、形状の対称性が破れる前に発現が開始していることを解明した(図4)。これらの結果から、Wntシグナリングが対称性の破れのタイミングを制御していることがわかった。

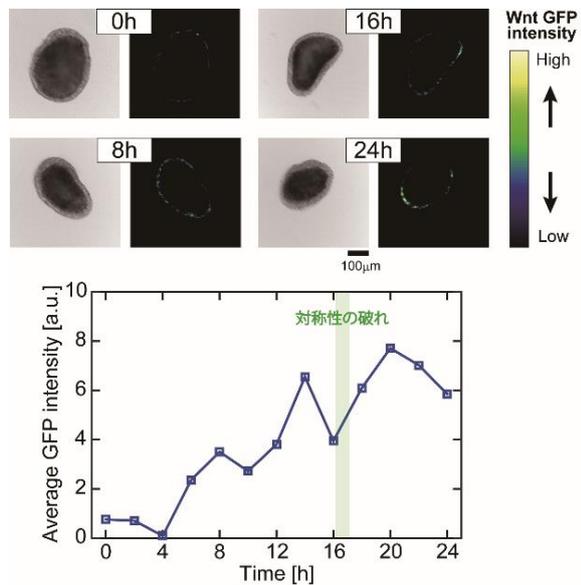


図4 再生過程におけるWntの発現量。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 M. Veschgini, F. Gebert, N. Khangai, H. Ito, R. Suzuki, T. W. Holstein, Y. Mae, T. Arai, M. Tanaka	4. 巻 108
2. 論文標題 Tracking mechanical and morphological dynamics of regenerating Hydra tissue fragments using a two fingered micro-robotic hand	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Applied Physics Letters	6. 最初と最後の頁 103702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.4943402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ryo Suzuki
2. 発表標題 Deformation as a Quantitative Tool to Understanding Self-Organisation in Multi-cellular Organisms
3. 学会等名 Kyoto Winter School 2019 "Quantifying Dynamics of Life"（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Suzuki, Mariam Veschgini, Thomas W. Holstein and Motomu Tanaka
2. 発表標題 Symmetry Breaking of Regenerating Hydra Tissues
3. 学会等名 The 4th Research Area Meeting (MEXT Project: Fluctuation and Structure)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryo Suzuki, Mariam Veschgini, Thomas W. Holstein and Motomu Tanaka
2. 発表標題 Symmetry Breaking of Regenerating Hydra Tissues
3. 学会等名 International Workshop "The diversification of early emerging metazoans: A window into animal evolution"（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryo Suzuki, Mariam Veschgini, Thomas W. Holstein and Motomu Tanaka
2. 発表標題 Active deformation and symmetry breaking in regenerating Hydra tissues
3. 学会等名 MIMS workshop “Modeling and Numerical Analysis of Nonlinear Phenomena: Fluid Dynamics, Motion of Interfaces, and Cell Biology” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 R. Suzuki
2. 発表標題 Morphological Dynamics and Mechanics of Regenerating Hydra Tissues
3. 学会等名 The 3rd Research Area Meeting (MEXT Project: Fluctuation and Structure)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 R. Suzuki
2. 発表標題 Experimental investigation of polar pattern formation in driven filament systems through collisions
3. 学会等名 International Symposium: Current and Future Perspectives in Active Matter (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 R. Suzuki
2. 発表標題 Quantification of Morphological Dynamics and Symmetry Break in Regenerating Hydra Tissues
3. 学会等名 The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----