

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770188

研究課題名(和文)形のばらつきがもたらす新しい細胞制御機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of shape-dependent stochastic asymmetric cell division

研究代表者

赤沼 啓志 (Akanuma, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50450721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：近年、遺伝子発現等に偶然生じるばらつきが、将来の細胞挙動の決定に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。本研究ではさらに、たまたま起きる細胞の形の違いが、細胞挙動に影響を与えることを明らかにした。すなわち、ゼブラフィッシュ胚神経形成での確率論的な非対称分裂において、前駆細胞の形とその後の振る舞い(分裂方向と二者択一の発生運命の選択)との関係をライブイメージングと統計解析を用いて明らかにした。また、コンピュータシミュレーションによって形による非対称分裂の制御機構を解析し、パラメータを変化させた時の振る舞いの変化を実験で検証することによりシミュレーションモデルの妥当性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Cell-to-cell variability is increasingly appreciated as an integral part of biological systems. In this project, we explored how difference in cell shape affects the determination of future cell behavior. In zebrafish embryos, two kinds of V2 interneurons, V2a and V2b are generated from common V2 progenitor cells. It has been suggested that V2 progenitor cells divide along quasi-random directions and there is no cell fate bias at the time of cell division. However we found that varied shapes of V2 progenitor cells are coupled not only to the cell division orientation but also to the binary cell fate determination in a probabilistic manner. We also established an abstract model for shape-dependent stochastic V2 cells' asymmetric division. We analyzed this model by mathematical simulation in silico, and inspected it by manipulating the zebrafish embryos. Our interdisciplinary approach revealed the design principle for the shape-dependent stochastic asymmetric cell division.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：形 ばらつき 非対称分裂 拡散

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞集団内には、生化学反応に伴うゆらぎにより、細胞の表現型(形や大きさなど)に違いが生じる。近年の研究から、このような偶然生じる細胞間の違いが生体システムの重要な構成要素であると考えられるようになった。それにも関わらず、細胞の形のばらつきに関しては、未だ十分な研究がなされていない。細胞の形は、分裂面の位置決定のような細胞挙動と深く関わっている。そこで、たまたま生じる形の違いが細胞挙動に影響を与えるのか、与えたとしたら、どのような影響なのか、という疑問は、生体システムの本質につながる興味深い問題であると考えられた。

(2) 偶然生じる細胞の形の違いが、どのようにその後の細胞挙動に反映されるのかを明らかにするため、本研究では、ゼブラフィッシュ胚の V2 介在神経の分化過程で、前駆細胞の形と細胞運命の関係に注目した。脊椎動物に見られる V2a と V2b の二種類の V2 介在神経は、共通の前駆細胞 (V2 細胞) に由来する。ゼブラフィッシュ胚の V2 細胞は、体節形成期(受精後 14 時間)頃から、ホメオボックス転写因子をコードする *vsx1* を発現する細胞として認められる。個々の V2 細胞は、その後一回だけ非対称分裂し、一組の V2a と V2b に分化する。中枢神経系での非対称分裂の制御機構は、これまで様々なモデル生物で非常によく研究されている。例えば、ショウジョウバエの中枢神経系で見られる非対称分裂では、分裂方向や分裂後の二者択一の運命決定は、正確に制御されており、分裂方向、及び細胞運命の選択の仕方は予測可能である。一方、ゼブラフィッシュ胚での V2 細胞の非対称分裂では、分裂方向に統一性はなく、細胞運命の選択は、ランダムに決定されているように見られた。そこで本研究では、たまたま生じる V2 細胞の形の違いが、分裂方向や娘細胞間での二者択一の運命選択の仕方に関係するのではないかと考え、その可能性を検証した。

2. 研究の目的

(1) たまたま生じる形の違いが、確率論的な V2 細胞の非対称分裂に影響することを明らかにする。

1 V2 細胞の形の違いによって、分裂方向の傾向と、どちら側の娘細胞が V2a、または V2b になる頻度が変わることを明らかにする。

2 V2 細胞の形の違いが、分裂方向と娘細胞間の V2a/b 選択の傾向の違いの原因であることを示す。

(2) 形の違いによる確率論的な V2 細胞の非対称分裂の動作原理を明らかにする。

1 V2 細胞の形が、分裂方向と娘細胞間の V2a/b の選択に対して影響を与える機構を、数理モデルと検証実験によって示す。

3. 研究の方法

(1) 「V2 細胞の形と、分裂方向、及び娘細胞間の V2a/b の選択の仕方に相関がある」という仮説の検証

V2 細胞特異的に蛍光タンパク質である GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ胚、*Tg(vsxl:gfp)*胚を用いて、V2 細胞の非対称分裂から V2a と V2b の二種類の介在神経が形成される過程をコンフォーカル顕微鏡にて経時記録した。そして、三次元再構築画像から、非対称分裂直前の V2 細胞の形と、分裂方向、及びどちら側の娘細胞が V2a、または V2b になるのかを、V2 細胞一つ一つについて調べた。傾向の違いは、統計的に検定した。

(2) 「V2 細胞の形を変えると、分裂方向、及び娘細胞間の V2a/b 選択の傾向も変わる」という仮説の検証

*Tg(vsxl:gfp)*胚を用いて超短パルスレーザーを V2 細胞の末端に弱く照射し、V2 細胞を殺さずに形を変えて、変更後の形と、分裂方向、及び娘細胞間の V2a/b の選択の仕方の関係を調べた。そして、分裂方向と運命選択の傾向が、変更後の形にしたがっていることを統計的に明らかにした。

(3) 「V2 細胞の形から、分裂方向、及び娘細胞間の V2a/b 選択の傾向を再現する」ことの検証

1 形の違いが影響する確率論的な V2 細胞の非対称分裂を数理モデル化した。そして、cellular Potts モデル(CPM)を用いてコンピュータシミュレーションすることにより *in silico* で再現することを試みた。

2 コンピュータシミュレーションでパラメータを変化させた時の振る舞いの変化を、実際に *Tg(vsxl:gfp)*胚を処理することにより、生

きた胚で再現できるかと検証した。これにより、形の違いがもたらす確率論的な V2 細胞の非対称分裂の数理モデルの妥当性を検討した。

4. 研究成果

(1) 「V2 細胞の形と、分裂方向、及び娘細胞間の V2a/b の選択の仕方に相関がある」という仮説の検証

培養細胞や植物細胞では、細胞の分裂方向は、細胞の長軸方向に偏ることが知られている(“long axis rule”)。しかしながら、刻一刻と細胞が形を変えていく動物胚の胚発生過程では、“long axis rule”が当てはまるかどうかは検証されていなかった。今回、V2 細胞の長軸方向と非対称分裂時の分裂方向とを比較した結果、およそ半数の V2 細胞が長軸方向に分裂することが分かった(長軸方向:54%、中間軸方向:29%、短軸方向:17%、 $n=314$, $\alpha < 0.01$)。このことから、胚発生過程における一時的な細胞の形でも、“long axis rule”が確率論的に適応できることが明らかになった。

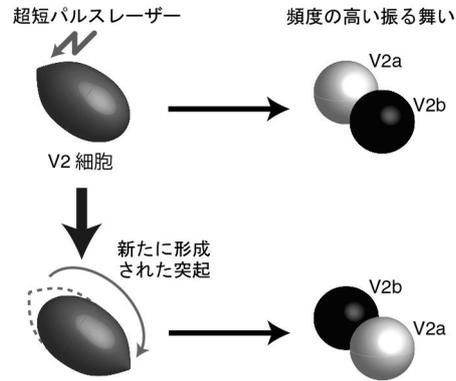
一方、娘細胞間の運命選択は、長軸方向の非対称性に影響されることが明らかになった。半数近くの V2 細胞は、長軸方向の一端に尖った構造を有しており、非対称な形をしている。このような非対称な形をした V2 細胞では、分裂後、突起側の娘細胞が V2a の運命を選択する可能性が高かった(61%, $n=123$, $\alpha=0.015$)。一方、対称な形をした V2 細胞では、娘細胞間での V2a と V2b の運命選択の仕方に偏りは見られなかった(V2a/V2b=50%/50%, $n=191$, $\alpha=0.94$)。

これらの結果より、非対称分裂直前の V2 細胞の形が、確率論的な非対称分裂に影響を与えている可能性が示唆された。

(2) 「V2 細胞の形を変えると、分裂方向、及び娘細胞間の V2a/b 選択の傾向も変わる」という仮説の検証

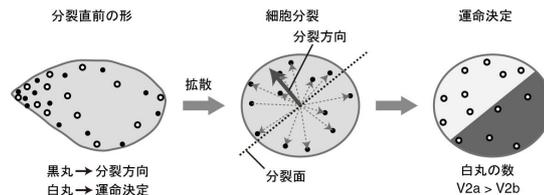
超短パルスレーザーを、尖った V2 細胞の長軸の一端に照射すると、V2 細胞は新しい方向に長軸を伸ばし、突起様の構造を形成した。このような V2 細胞がどの方向に分裂し、どちら側の娘細胞が V2a、または V2b の運命を選択したかを明らかにしたところ、分裂方向は、変形前ではなく、変形後の長軸方向に有意に偏ることが分かった(長軸方向:60%、中間軸方向:27%、短軸方向:13%、 $n=63$, $\alpha < 0.01$)。また、娘細胞間の運命選択の仕方も、新しい突起側の娘細胞が V2a の運命を選択する傾向が見られた(65%, $n=63$, $\alpha=0.016$)。

以上の結果から、V2 細胞の確率論的な非対称分裂では、分裂直前のたまたま起きる細胞の形により、分裂方向や娘細胞間の運命選択の仕方に傾向が与えられることが明らかになった。



(3) 「V2 細胞の形から、分裂方向、及び娘細胞間の V2a/b 選択の傾向を再現する」ことの検証

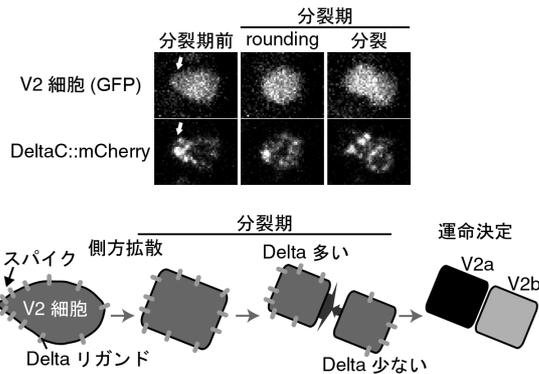
1 一般に細胞分裂の方向は、細胞膜にアンカーされる“cortical force generator”と呼ばれる活性により制御されることが知られている。また、ゼブラフィッシュ胚の V2 介在神経(V2a, V2b)の運命は、膜蛋白質である Delta リガンドを介したシグナルによって決定されることが分かっている。そこで申請者は、上記のことを踏まえて、分裂直前の V2 細胞の形にしたがって局在し、分裂期に細胞膜上を拡散する因子の分布が、分裂方向と娘細胞間の V2a/b の運命選択を決定するというモデルを構築した。そして、CPM を用いて、このモデルのコンピュータシミュレーションを行うことにより、形によって傾向が与えられる V2 細胞の確率論的な非対称分裂を再現できることを明らかにした。



2 コンピュータシミュレーションの結果より、細胞膜上の因子の数を減少されると確率論的な V2 細胞の非対称分裂で見られる傾向が小さくなることが予想された。そこで、V2a と V2b の運命選択を担う deltaC をロックダウンし、DeltaC タンパク質の数を減少させたところ、予想通り長軸の尖った側の娘細胞が V2a の運命を選択する傾向が弱まった(54%, $n=54$, $\alpha=0.27$)。また、環境温度を上げ(25 → 31 °C)、拡散速度を速めても突起側に偏った V2a の運命の傾向は、弱まった(49%, $n=68$, $\alpha=0.81$)。反対に環境温度を下げ(25 → 22 °C)、拡散速度を遅くすると V2a の運命の尖った側の娘細胞への偏りは、より大きくなった(68%, $n=56$, $\alpha < 0.01$)。これらの結果は、コンピュータシミュレーションの結果と一致しており、確率論的な非対称分裂モデルの妥当性が確認されたと考えられる。

さらに、V2 細胞の確率論的な非対称分裂における DeltaC タンパク質の動態を確認す

るため、mCherry 蛍光タンパク質と融合させた *deltaC* を Tg(*vsx1:gfp*)胚に導入したところ、分裂直前の V2 細胞では、長軸の突起周辺により多く DeltaC タンパク質が存在することが観察された。また、この偏った分布は、分裂期になると、細胞全体へ広がっていく傾向があることを見出した。これらの結果より、DeltaC タンパク質の偏った分布と拡散により、V2 細胞の非対称分裂における確率論的な V2a と V2b の運命決定がもたらされると考えられた。



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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 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 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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

赤沼啓志 (Akanuma, Takashi)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教
研究者番号 : 50450721

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

細川 陽一郎 (Hosokawa, Yoichiroh)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・准教授
研究者番号 : 20448088

Roeland M. H. Merks
Centrum Wiskunde & Informatica (the
Netherlands), Life Sciences, Professor