

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26711009

研究課題名(和文)細胞系譜の後成的メカノケミカル制御機構を初期胚の顕微力学操作によって検証する

研究課題名(英文) Probing the epigenetic mechano-chemical regulatory mechanism in the cell lineage by micromechanical manipulation of the early embryo

研究代表者

板橋 岳志 (ITABASHI, Takeshi)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：20434384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：発生や増殖過程を通じて、分裂期の細胞をとりまく物理的な環境は、細胞形態の変形や分裂方向の決定などの細胞機能や制御機構に非常に重要な役割を果たす。本研究では、初期胚に与えた外部負荷の履歴が細胞系譜にどのような影響を与えるのかを検証する実験系の構築を試みた。主な成果を以下に記す：(1)紡錘体極の力学特性は、対称的にバランスされている。(2)細胞外環境の硬さは、細胞分裂過程に影響を与える。(3)初期胚の顕微力学操作によって、細胞系譜の後成的メカノケミカル制御機構を検証できる実験系を構築した。

研究成果の概要(英文)：During cellular development and growth, the mechanical force generated inside and outside a mitotic cell plays a critical role in cellular functions such as changes in cell morphology and the determination of cell division axis. We planned to develop techniques to probe how the cell lineage is affected by the externally applied force to the early embryo. The main results of this project are summarized as follows: (1) Using micromanipulation technique, we found that mechanical properties of spindle poles are symmetrically balanced. (2) The rigidity of surrounding environment affects the process of cell division. (3) We developed the technique to probe the epigenetic mechano-chemical regulatory mechanism in the cell lineage by micromechanical manipulation of the early embryo.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

発生・増殖・分化過程の研究を通じて、細胞をとりまく物理的な環境とその変動(力や温度、そしてそのシグナル・情報伝達機構)は、多くの細胞機能や制御機構に非常に重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。それらに共通の細胞分裂過程においても、細胞の内外で働く“力”は多くの機能に関わっている。例えば、細胞分裂軸は、1細胞内では紡錘体微小管と細胞膜上の微小管結合因子との力学バランスに依存するが、生体内では形態変化や分化に起因する細胞・組織に働く張力が結合因子の細胞膜上分布を制御し、細胞分裂軸が決定されると予測されている。このように、細胞分裂を制御する力は、細胞の運命決定、組織の形態形成など生物の形作りに必須の役割を果たすことが分子細胞生物学的観点から示唆されてきた。

これまで研究代表者は、MEMS力センサーを用いて定量的顕微操作及び力測定を可能とする実験系を構築し、試験管内で形成させた紡錘体を直接顕微操作することによって、紡錘体の力学特性及び外部負荷に対する応答性を解明してきた(*Nat methods* 2009, *Cell rep* 2013, *Biophys J* 2014)。このシステムを培養細胞系に導入し、一瞬の外部負荷によって、有糸分裂中期進行を加速・減速させることに成功した(*PNAS* 2012)。一方、長時間の外部負荷は紡錘体を細胞内で回転させ、分裂面を任意の方向に規定できる。また、中期進行のみならず、後期以降の過程においても、外部負荷は方向依存的に分裂溝陥入速度を減速させることが可能である。これらの結果は、細胞分裂が外部から物理的に補完・制御可能であることを示す。

しかしながら、「*in vivo*においても、外力によって細胞分裂を制御可能なのか？」という問いかけに対し、哺乳類などの複雑な組織構造の中で「細胞分裂の力学制御機構」を解析することは困難が想定され、生体組織内の細胞分裂を顕微力学操作する報告は皆無である。そこで、本研究課題では、顕微操作・顕微動態解析を比較的簡単に行える胚発生期の細胞に着目する。つまり、胚発生初期過程の分裂期細胞への外部力学操作の研究は、胚発生機構の構造的及び機能的な安定性(正常な個体発生)が、細胞内外や細胞間で様々な方向及び幅広い時間スケールで作用する力に対し、どのように維持されるのかについて洞察をあたえるものと考えた。

このような研究状況を踏まえ、研究代表者はこれまでの生体運動系の研究で培ってきた力計測・顕微操作法を活用し、*in vivo*系として胚発生期の細胞を対象とし、「*in vivo*において、どのように細胞は受ける力・発生する力を発生・増殖・分化過程において利用(feedback、feedforward)しているのか？」という、*in vivo*における“細胞分裂を制御する力”の履歴を検証することを着想・決意した。

2. 研究の目的

本研究では、紡錘体や細胞自体の力学応答性の解析と共に、初期胚発生中の胚全体もしくは特定の細胞の細胞分裂期を加速・減速させる顕微力学操作を行い、物理的な力に対する細胞周期進行や形態形成への影響(表現型の可塑性)を定量化する実験系の確立を第一の目的とした。それと共に、形態形成に関わる主要な遺伝子の発現パターン・機能動態の変調を時空間的に解析することを目指した。これらによって、力学的環境の擾乱に対して発生機構が備えているメカノケミカル制御・応答機構を顕在化し、プログラム化された機能遺伝子に支配される初期発生過程における“細胞分裂を制御する力”の役割を明らかにする手がかりを得る。

3. 研究の方法

本研究では、紡錘体の直接顕微操作実験にアフリカツメガエル卵抽出液を用いた。細胞とは異なり、この実験系は細胞膜がないため、ガラス針などを用いて紡錘体を直接的に顕微操作可能であることが、大きな利点であるため、分裂中期における紡錘体の力学特性を調べる研究に適している。紡錘体の力学操作には、微小ガラス針を使った。微小ガラス針は、紡錘体に直接変形を加えるための硬い針と、応力測定を行うための弾性定数の小さい柔らかい針の2種類を用いた。ピエゾアクチュエータを用い、定量的な外部負荷を紡錘体に与え、その後の紡錘体形状の応答性と力学特性を共焦点顕微鏡による三次元観察手法を用いて解析した。

細胞分裂後期の哺乳動物培養細胞を対象に、MEMS力センサーを用いた力制御解析システム(*Nat Methods* 2009)による顕微操作及び力測定を行った。蛍光タンパク質とのキメラタンパク質として、主に、細胞骨格、染色体や中心体の構成タンパク質類を恒常的に発現させた癌細胞(HeLa細胞)及び正常細胞(RPE1細胞)を用いた。

初期胚発生中の胚全体もしくは特定の細胞の細胞分裂期を加速・減速させる顕微力学操作を行い、物理的な力に対する細胞周期進行や形態形成への影響を解析するために、結果として、刺胞動物クラゲ(*Cyrtos*)の卵母細胞及び初期胚を用いた。

4. 研究成果

これまでの研究により、紡錘体内の微小管量、その密度や配向方向は、染色体整列や染色体分配といった紡錘体の機能発現のために最適化されていることを明らかにしてきた。安定的な機能発現のために、分裂中期において、紡錘体は一定の形状と大きさを維持していると考えられる。そのため、紡錘体周りの力学的、生化学的環境変化に対して、紡錘体はその形と微小管密度をダイナミックに維持し、大きさと微小管量を相関させるこ

とによって適応する機構を備えていることが示唆されてきた (*Cell Rep* 2013, *Biophys J* 2014)。

分裂中期において、紡錘体の形状は、赤道面を挟んで左右対称に維持されている。そこで、我々は、共焦点顕微鏡を用いた三次元観察法と、微小ガラス針を用いた顕微力学操作を併用し、紡錘体の極形状の左右対称を維持する制御メカニズムの解明にアプローチした。その結果、卵抽出液中で形成された分裂中期の紡錘体は、左右両極の形状のみならず、紡錘体極の力学特性（見かけの硬さ）や微小管密度も左右でほぼ等しいことを明らかにした。

紡錘体の極形成と安定化に重要な分子モーターである細胞質ダイニンを阻害した条件下では、極付近の見かけの硬さが明らかに低下した。一方で、紡錘体の両極性維持に重要なキネシンを阻害すると、極付近の見かけの硬さが増加した。興味深いことに、細胞質ダイニンとキネシンを両方とも阻害してみると、極付近の見かけの硬さは、コントロールの紡錘体と同様の値に回復した。これら阻害条件下においても、紡錘体の左右両極の力学特性は、ほぼ一致することも分かった。

これらの紡錘体極の形状と力学特性の左右対称を維持する機構を明らかにするため、顕微操作を用いて片側の紡錘体極を変形すると、もう片側の紡錘体極も自発的に同様な変形を示すことが分かった。この自発的な変形に応じて、左右両極の力学特性と微小管密度も変化していることが分かった。また、この力学応答性に積極的に関わる分子モーターの寄与も明らかにした。これらの結果は、紡錘体は、極構造の左右対称性をダイナミックに維持する機構を備えていることを示唆している (雑誌論文 (*Biophys Physicobiol* 2017))。

有糸分裂中期の哺乳動物培養細胞に外部負荷(力パルス)を加えると、負荷の方向や大きさに依存して、染色体分配開始のタイミングを力によって制御(促進・抑制)できることを発見し、シグナル伝達の分子機構の大枠は明らかにしてきた。初期胚発生中の胚全体もしくは特定の細胞の細胞分裂期を加速・減速させる顕微力学操作を行う上で、細胞分裂動態の力学感受性の高い時期、制御因子やシステムを明確にすることが必要である。これまで、細胞分裂後期について、後期紡錘体への力学摂動は染色体分配のみならず細胞質分裂へも影響を及ぼすことを明らかにしたが、力学摂動を与える顕微力学操作用カンチレバーの硬さに対する依存性を検証した。細胞分裂後期進行の速度は、特定の硬さに強く依存していることが分かった。その硬さは、外部負荷を与えた細胞の見かけの硬さと同程度の時に、強く影響が現れた。細胞分裂後期進行を遅延させるカンチレバーの硬さと、それを感じていると推測されるアクトミオ

シン活性との関係を定量した。これらの結果は、発生中の胚や組織においても、周りの細胞の硬さ等の力学環境に依存して、細胞分裂後期の進行速度が調節されている可能性を示唆している。

初期胚発生中の胚全体もしくは特定の細胞の細胞分裂期を加速・減速させる顕微力学操作を行い、物理的な力に対する細胞周期進行や形態形成への影響(表現型の可塑性)を定量化する実験系の確立を目的に、海産生物のウニ、ハスノハカシパンを用いて研究課題を開始した。しかしながら、研究室で状態良く個体を維持する困難さや、生殖シーズン(実験可能な季節)が限定されるなどの問題により、ライブイメージング・顕微操作する個体数・実験数が期待される以上に得られない問題に直面した。そのため、実験室で通年安定的に使用可能な刺胞動物クラゲを導入し、実施する実験系の確立を目指した。

顕微力学操作を行う2~32細胞期において、外部負荷の方向、細胞分裂のタイミングと分裂面を定量解析するため、細胞周期、アクチン細胞骨格及び微小管細胞骨格を4細胞期から幼生期までを通してイメージング可能な動態解析用タンパク質プローブをクラゲ用に改良・開発した。

動態解析用タンパク質プローブを顕微注射した4細胞期の初期胚において、細胞分裂時に外部負荷を加える顕微操作に成功し、顕微操作や動態イメージングの実験技術基盤を確立した。現在、外部負荷条件に対する発生様式と幼生の表現型を体系的に解析している。

一方で、短時間の力学的環境の擾乱に対して、その後の胚や個体レベル、そして世代を超えて、その履歴がどのように残り、どのような影響を及ぼすのか、を解析することを目指した。そのために、クラゲ(*Cyrtia*)において、有性生殖及び無性生殖のライフサイクルを任意に回すことが重要であるので、卵成熟誘起ホルモンの探索と、プラヌラ幼生からポリプへの変態誘導物質の探索を行った。変態誘導物質に関しては、効果的な物質を選定できたが(図書)、卵成熟誘起ホルモンに関しては、現在も解析中である。導入したクラゲのメス個体において、トランスクリプトーム解析を行った。得られた結果から、卵成熟誘起ホルモンの遺伝子探索と、変態誘導物質の遺伝子探索を行った。候補となった遺伝子群については、人工ペプチドを合成し、その効果を解析した。その結果、変態誘導物質の遺伝子は決定できたものの、卵成熟誘起ホルモンに関しては、効果的な遺伝子の決定には至らなかった。

以上、本研究によって、発生中の胚の特定の細胞の細胞分裂期を加速・減速させる顕微力学操作を行い、物理的な力に対する細胞周期進行や形態形成への影響を定量化する実

験系を確立し、遺伝子の発現パターン・機能動態の変調を時空間的に解析できる系を構築した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Shin'ichi Ishiwata, Makito Miyazaki, Katsuhiko Sato, Koutaro Nakagome, Seine A. Shintani, Fuyu Kobirumaki-Shimozawa, Norio Fukuda, Kazuya Suzuki, Jun Takagi, Yuta Shimamoto, and Takeshi Itabashi. Dynamic properties of bio-motile systems with a liquid-crystalline structure. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 647: 127-150 (2017). 査読有.

DOI:10.1080/15421406.2017.1289445

Kazuya Suzuki, Makito Miyazaki, Jun Takagi, Takeshi Itabashi, and Shin'ichi Ishiwata. Spatial confinement of active microtubule networks induces large-scale rotational cytoplasmic flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 114(11): 2922-2927 (2017). 査読有.

DOI: 10.1073/pnas.1616001114

Kazuya Suzuki, Takeshi Itabashi, and Shin'ichi Ishiwata. Mechanical properties of spindle poles are symmetrically balanced. *Biophysics and Physicobiology*, 14:1-11 (2017). 査読有.

DOI:10.2142/biophysico.14.0_1

Kotaro Oyama, Vadim Zeeb, Yuki Kawamura, Tomomi Arai, Mizuho Gotoh, Hideki Itoh, Takeshi Itabashi, Madoka Suzuki, and Shin'ichi Ishiwata. Triggering of high-speed neurite outgrowth using an optical microheater. *Scientific Reports*, 5: 16611 (2015). 査読有.

DOI:10.1038/srep16611

Kotaro Oyama, Tomomi Arai, Akira Isaka, Taku Sekiguchi, Hideki Itoh, Yusuke Seto, Makito Miyazaki, Takeshi Itabashi, Takashi Ohki, Madoka Suzuki, and Shin'ichi Ishiwata. Directional bleb formation in spherical cells under temperature gradient. *Biophysical Journal*, 109: 355-364 (2015). 査読有.

DOI:10.1016/j.bpj.2015.06.016

〔学会発表〕(計5件)

板橋 岳志,石渡 信一.顕微力学操作による細胞分裂機構のメカノケミカル制御. 第94回日本生理学会大会 シンポジウム

“日本生物物理学会連携シンポジウム 生物物理学的手法による生理学研究の新展開”, アクトシティ浜松(静岡県・浜松市), 2017年3月28日.招待講演.

Shin'ichi Ishiwata, Makito Miyazaki, Katsuhiko Sato, Koutaro Nakagome, Seine A. Shintani, Norio Fukuda, Kazuya Suzuki, Jun Takagi, Yuta Shimamoto, and Takeshi Itabashi. Dynamic properties of bio-motile systems as a liquid-crystalline structure. 26th International Liquid Crystal Conference, Ohio (USA), August 2016.招待講演.

板橋 岳志,石渡 信一.顕微力学操作による細胞分裂機能のメカノケミカル制御. 第24回日本バイオイメージング学会学術集会 シンポジウム “NO DIVISION, NO LIFE”, 東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区), 2015年9月27日.招待講演.

Takeshi Itabashi, and Shin'ichi Ishiwata. Examining the cell division machinery by using the cantilever system. 第52回日本生物物理学会年会 シンポジウム “Beyond Biophysics!”, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2014年9月25日.招待講演.

Jun Takagi, Takeshi Itabashi, and Shin'ichi Ishiwata. Mechanical transition of the vertebrate meiotic spindle facilitates chromosome dynamics. 第52回日本生物物理学会年会,札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2014年9月27日.

〔図書〕(計1件)

Noriyo Takeda, Ryusaku Deguchi, and Takeshi Itabashi. Reproductive strategies in marine hydrozoan jellyfish: sexual medusae and asexual polyps. In: K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao, M. Kondo (eds). *Reproductive and Developmental Strategies: the Continuity of Life*, Springer, Tokyo. in press (2016). (作本中のためページ数未定)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

雑誌論文 についてのプレスリリース

<https://www.waseda.jp/top/news/49174>

6. 研究組織

(1)研究代表者

板橋 岳志 (ITABASHI, Takeshi)

早稲田大学・理工学術院・助教
研究者番号：20434384

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
石渡 信一 (ISHIWATA, Shin'ichi)