

研究終了報告書

「古典的スクリーニングと先端計測技術による力学特性制御分子の探索」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：山田 壮平

1. 研究のねらい

生体の形態形成に関する遺伝子の多くは、形態異常などの表現系を指標とした遺伝学的スクリーニングにより同定されてきた。一方で、組織や器官の形態変化が引き起こされるのは、そこに機械的な力が働いているからであるが、力は目では見えないため、表現系の変化を指標とする遺伝学的スクリーニングとは相性が悪く、機械的な力の制御遺伝子の網羅的なスクリーニングは行われていない。もし、細胞に働く力を顕在化し、細胞間の力学的相互作用を直接計測することができれば、力を制御する遺伝子の網羅的なスクリーニングが可能になり、未知の制御遺伝子の同定ができると考えられる。申請者はこれまでに、ゼブラフィッシュ胚上皮組織を対象にフェムト秒レーザー照射時に発生する誘起衝撃力を利用した細胞間に働く応力の定量評価手法を確立し、力の分子制御機構を明らかにしてきた。本研究開発では、ENUを用いた古典的なゲノム DNA への変異誘導手法と、申請者が確立した力の測定手法を組み合わせ、遺伝学的スクリーニングを行い、機械的な力の制御に関わる因子群の網羅的に探索を行なった。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、古典的な化学変異源 N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) を用い、ゲノム上にランダムな点変異を誘導したゼブラフィッシュを作製し、変異体のスクリーニングを行った。1次スクリーニングではレーザー切断法を用い、上皮細胞間に働く粘弾性特性から変異体の選別を行った。2次スクリーニングでは、フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用し、細胞間に働く応力を直接計測することで、機械的な力の制御に関わる遺伝子に変異が導入された変異体を選別した。

(2) 詳細

1. ENU を用いた突然変異体の作製

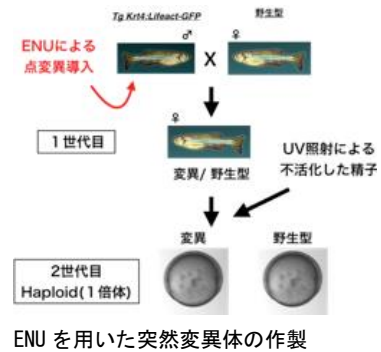
本研究計画では、まず変異体ゼブラフィッシュの作成を行った。スクリーニングでは、主に共焦点顕微鏡下で上皮細胞の形態を観察しながら、変異体の選別を行う必要がある。そこで上皮細胞の形態を可視化するため、変異体ゼブラフィッシュの作製は、上皮シート特異的に発現する Krt4 プロモーター制御下で繊維状アクチン特異的に結合する蛍光タンパク質 Lifeact-GFP を発現するトランスジェニック (Tg) ゼブラフィッシュ (Krt4:Lifeact-GFP) を元に行った。化学変異源 ENU を雄 Tg ゼブラフィッシュに処理することで、精子ゲノム DNA にランダム点突然変異を導入し、野生型雌ゼブラフィッシュと交配させ F1 世代の突然変異体を作製した。また、スクリーニング期間を短縮するため、1 倍体 (Haploid) を利用した 2 世代スクリーニングを行った (図)。突然変異を導入した F1 世代から未受精卵を採取し、UV 照射によって不活化した精子を用いて

刺激する。すると、接合子が形成されず、F2 世代では 1 倍体として発生が進行し、1:1 の割合でホモ変異体を取得しこの変異体を用いスクリーニングを行った。

2. 上皮シートの粘弾性評価による1次スクリーニング

1次スクリーニングでは、レーザー切断法を用い、上皮細胞間に働く粘弾性特性から変異体の選別を行った。生体組織の力学特性は、バネで表現される弾性性質とダッシュポットで表現される粘性性質を併せ持つ粘弾性体として表すことができる。粘弾性は、上皮細胞間の接着面の切断時に生じるひずみの時間変化を示す関数 $L(t)-L_0 = D(1-e^{-t/\tau})$ (ここで、 D = 細胞間に働く荷重、 τ = 粘性/弾性) を求めることで評価した。

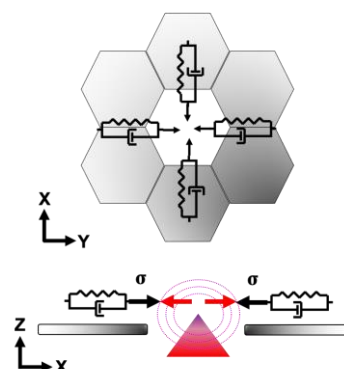
次に、1次スクリーニングで選別した突然変異体に対し、 D と τ を求め、コントロール胚に比べ、値が低下または、増加した変異体のスクリーニングを行った。その結果、野生型に比べ D 値が低下(負の荷重が増加)した系統を3系統得ることができた。



3. 細胞組織の粘弾性特性が生み出す「応力」の定量評価

上皮シートにかかる応力を実測値から評価するため、1次スクリーニングにより選別された変異体に対して、フェムト秒レーザー誘起衝撃力を用い、細胞間にかかる応力を測定する。本手法で用いる高強度のフェムト秒レーザーを水溶液中に照射すると、集光点で微小な爆発現象が誘起し、周囲に圧力が作用する(誘起衝撃力)。この誘起衝撃力を利用し、研究内容3)と同様に上皮シートを破壊後、破壊領域中心から細胞との境界面に衝撃力を発生させ、上皮シートの伸長と衝撃力を釣り合わせる。並行して衝撃力を、原子間力顕微鏡を用いて校正し、発生する応力「 σ 」の実測を行う(図2)。野生型の実測値と比較し、応力が変化していた変異体の遺伝子座を決定し、原因遺伝子を同定する。

野生型ゼブラフィッシュ胚上皮シートを対象に、応力「 σ 」の実測に成功している。このことから本手法を用いて、細胞間に働く力学相互作用の変化を評価できることが示された。本手法を用いて細胞間に働く応力を実測できることが示された。本手法を用いて細胞間に働く応力を実測できることが示された。また、2)で評価した τ_0 の値と対応付けて解析を行い、上皮シートの粘弾性と発生する応力の関係も同時に明らかにすることを旨とする。



上皮シートの一部を破壊すると、縮んだバネが伸びる様に動く(図1)。この動きとフェムト秒レーザー照射時に発生する衝撃力を釣り合わせることで、その動きを止め、この時必要な衝撃力を定量することで、上皮組織に内在する力を定量評価する。

3. 今後の展開

本研究計画では、期間内に F1 世代の突然変異体を 500 系統以上作製し、スクリーニングを行なった結果、細胞間に働く力学相互作用が変化している系統を 3 系統得ることができた。しかし、本計画期間内での原因遺伝子の同定を行うことはできなかった。得られた系統は、すでにライン化が完了しているため、今後の研究の展開として変異部位の同定を行い、変位が誘導された遺伝子の同定を行う。変異が導入された領域が細胞間の力学相互作用の制御に関与するか明らかにするため、その遺伝子のノックダウン/ノックアウトを行い、細胞間の力学相互作用を定量的に評価することで、本家研究で同定した遺伝子が細胞間力学相互作用に関与するか明らかにする。

レーザーアブレーションにより、ショウジョウバエ胚上皮組織や MDCK 細胞間の接着面を切断すると、接着面を構成する頂点間の距離が頂点間の距離が広がることから、上皮細胞間には張力が作用していることが報告されている。一方で、ゼブラフィッシュ胚上皮細胞間を対象に同様の実験を行うと、頂点間の距離が近づく様子が本研究結果から示された。これらの観察結果は、ゼブラフィッシュ胚上皮組織では、これまで報告されている制御機構とは異なる仕組みで細胞間の力学相互作用が行われている可能性が考えられる。細胞間の力学相互作用は、細胞接着面に働く、張力と圧力のバランスによって制御されることが知られている。そこで後の研究の展開として、力学シミュレーションを取り入れ、ゼブラフィッシュ上皮細胞間の力学相互作用が、どのような張力と圧力のバランスによって制御されているのか細胞間力学相互作用を説明できる力学モデルの構築を行う。本研究で得られた変異系統などの粘弾性特性を、構築した力学モデルを用いて解析することで、どの遺伝子がどのような力学特性を制御するのか解明することを目指す。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

本研究課題では、研究期間内での細胞間力学相互作用を制御する未知の遺伝子同定には至らなかった。しかし、細胞間力学相互作用を制御する遺伝子群のスクリーニング系を確立できたため、大まかな研究目標は達成できたと考えている。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

概ね順調に進められた。ゼブラフィッシュ飼育用システムの構築や変異系統の作製や、機器の修理などに予想以上に時間がかかり、研究進捗が遅れる場面もあった。それ以外の場面では概ねスムーズに実験が進んだと思う。研究費は主にゼブラフィッシュ飼育システムの維持費やスペースチャージ費、試薬代当てたため、研究費の執行は予定通りであり、研究の進め方に問題は無く、良好だと自己評価する。

・研究成果の科学技術及び学術・産業・社会・文化への波及効果



本研究の成果は、押し合いへし合いが組織内の力学的な歪みを誘導し、細胞死などの細胞運命を決定する要因になることが明らかになっている(Saw et al., 2017)。しかし、こうした解析は培養細胞を用いたものにとどまり、細胞間で行われる押し合いへし合いの生体組織における役割については、明らかになっていない。本研究課題により、形態形成過程における細胞間の押し合いへし合いの役割を持つことを明らかにできれば、生物の形態形成を制御する新しいロジックを理解できると考えられる。

・研究課題の独創性・挑戦性

本研究課題は、細胞間力学相互作用を制御する未知の遺伝子を同定するという挑戦的なテーマであった。研究の実施はその過程で細胞間力学相互作用が制御する生命現象とその分子制御メカニズムの解析に関する研究領域を開拓している点は評価できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 9件

1. Sohei Yamada, Kentarou Baba, Naoyuki Inagaki, Yoichiroh Hosokawa. Cell Adhesion-Dependent Biphasic Axon Outgrowth Elucidated by Femtosecond Laser Impulse. bioRxiv 2021.10.10. 463848; doi: 10.1101/2021.10.10.463848

本研究で確立したフェムト秒レーザー照射時に発生する衝撃力を利用し、成長円錐の接着強度の定量評価を行った。その結果、成長円錐の接着強度は、Cell adhesion molecule L1 と Laminin によって制御されることを見出した。また、接着強度と軸索伸長の関連性を解析した結果、成長円錐は接着強度に依存し 2 相性の軸索伸長を示しことを見出した。

2. Sohei Yamada, Yasumasa Bessho, Yasuyuki Fujita, Yoichiroh Hosokawa, Takaaki Matsui. A Ca^{2+} wave generates a force during cell extrusion in zebrafish. bioRxiv 2021.07.14.452309; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.07.14.452309>

ゼブラフィッシュ 胚を対象に細胞排除現象の解析を行った。その結果、死細胞が排除される際、周囲の細胞へ向かって Calcium Wave が伝播し、周囲の細胞が集団的に移動することで、1kPa 程度の力を発生することを発見した。Calcium Wave が mechanosensitive channel や IP3 受容体を介して周囲の細胞へ伝搬し、細胞骨格のアクチン繊維の再構成を誘導することを示した。本研究では、Calcium Wave を介した細胞運動が、1kPa の力を生み出していることを見出した。

3. Tamako Nishimura, Takuya Oyama, Hooi Ting Hu, Toshifumi Fujioka, Kyoko Hanawa-Suetsugu, Kazutaka Ikeda, Sohei Yamada, Hiroki Kawana, Daisuke Saigusa, Hiroki Ikeda, Rie Kurata, Kayoko Oono-Yakura, Manabu Kitamata, Kazuki Kida, Tomoya Hikita, Kiyohito Mizutani, Kazuma Yasuhara, Yuko Mimori-Kiyosue, Chitose Oneyama, Kazuki Kurimoto, Yoichiroh Hosokawa, Junken Aoki, Yoshimi Takai, Makoto Arita, Shiro Suetsugu
Filopodium-derived vesicles produced by MIM enhance the migration of recipient

cells. Developmental cell 56(6) 842-859 2021年3月22日

老化やがんなどの生体情報の伝達を担うことで注目されている「細胞外小胞」という脂質膜の微粒子について、細胞表面で突起した生体膜がちぎれて生み出されるという新たな機構を明らかにした。フェムト秒レーザー誘発衝撃力と原子間力顕微鏡（AFM）を組み合わせ、細胞膜の変形によって生じた細胞突起が、毛細血管の圧力相当の生体内で通常に観察できる程度の外力により切断されて、細胞外小胞となることを見出した。

(2)特許出願

研究期間全出願件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. ゼブラフィッシュ上皮組織の持つ粘弾性特性を利用した創傷治癒機構の解析、山田壮平, 別所康全, 細川陽一郎, 松井貴輝、日本分子生物学会年会、2019年
2. フェムト秒レーザーを用いたゼブラフィッシュ胚の発生初期段階における細胞間機械特性の評価、弘永海人, 山田壮平, 別所康全, 松井貴輝, 細川陽一郎、68th 応用物理学会春季学術講演、2021年