

博士論文（要約）

異方性張力による平面内細胞極性制御機構の解明

Anisotropic tension and its effect on the regulation of planar cell polarity

平野 咲雪

目次

序文	5
第1章 新規細胞張力センサーの作製と神経外胚葉における張力観察	7
1-1. 序論	8
1-2. 材料と方法	12
1-2-1. コンストラクション	12
1-2-2. 共焦点顕微鏡法	12
1-2-3. HeLa 細胞の培養	13
1-2-4. ファロイジン染色	13
1-2-5. ツメガエル胚の培養と顕微注入	14
1-2-6. FRET 効率の計算	15
1-2-7. FRET index の定量化	15
1-2-8. 光刺激	16
1-2-9. 統計解析	16
1-3. 結果	17
1-3-1. Lima1 張力センサーの作製	17
1-3-2. センサーの機能検証	20
1-3-3. ツメガエル胚へのセンサー導入	22
1-4. 考察	27
第2章 異方性張力による平面内細胞極性制御	29
2-1. 序論	30

2-2. 材料と方法	34
2-2-1. ツメガエル胚の培養と顕微注入	34
2-2-2. 共焦点顕微鏡法	35
2-2-3. 細胞極性の解析	35
2-2-4. 細胞形状解析	36
2-2-5. レーザーアブレーション	36
2-2-6. ヘミセクション	37
2-2-7. 免疫染色	37
2-2-8. 組織片の伸展	38
2-2-9. 薬剤処理	39
2-2-10. 原子間力顕微鏡法 (AFM)	40
2-2-11. 統計解析	41
2-3. 結果	第2章の結果・考察については、
2-4. 考察	国際学術誌にて刊行予定のため公表を差し控える。
結論	43
謝辞	44
参考文献	44

序文

多細胞生物の体を構成する細胞は、互いに様々な形で情報のやり取りを行いながら、個体生命の維持や外部環境への適応に寄与している。細胞同士の情報のやり取りの形としては、タンパク質やその他の小分子を介した物質的なシグナル伝達経路が長年研究され、様々なシグナル分子の存在や細胞内外での情報伝達の仕組みが明らかにされてきた。一方で、細胞間に生じる張力や剪断応力、圧力といった機械的刺激も、細胞分化や個体の形態形成など様々な生命現象を制御する情報伝達因子として働くことが、この数十年で徐々に明らかになってきた。特に動物の初期発生においては、原腸陥入や神経管閉鎖などの大胆な組織変形や細胞移動が起こっており、これらに付随して生じる機械的刺激の情報伝達因子としての役割が注目され、多くの研究がなされている。

機械的刺激の情報伝達因子としての役割はこの数十年で非常に注目され、多くの研究が行われてきたにも関わらず、物質的シグナルほどそのメカニズムの解明は進んでいない。その背景には、生体内の機械的刺激を測定することの難しさがある。生体内の物理的環境は常に変化し続けており、それぞれがどのように生命現象に寄与しているかを調べるためには、生体内の機械的刺激を連続的に・広範囲に観察できる手法が求められている。そこで本研究では、第1章でまず生体内の張力を非侵襲的、広範囲に観察できる新規の細胞張力センサーを作製し、発生初期の胚の張力観察を試みた。そして、後期原腸胚期の神経外胚葉における異方性の張力の存在を明らかにした。これを受けて、第2章では異方性の張力が初期発生に果たす役割について検討し、神経外胚葉で観察される平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity: PCP) の形成に着目した。張力阻害/付加などの実験により異方性の張力が PCP 形成時の極性軸の決定に重要な役割を果たしていることを示し、さらに張

力負荷時に細胞が検知するシグナルとして細胞形状の変化が重要であることを示唆する結果を得た。これらの研究成果は、動物の初期発生を制御する新たな機械的シグナル伝達経路の存在を明らかにしており、また生体内の機械的刺激を観察・制御する種々の方法を実施したことから、今後の機械的シグナル研究にも貢献していくことが期待される。

第1章

新規細胞張力センサーの作製と神経外胚葉における張力観察

1-1. 序論

細胞にかかる張力を測る方法としては、レーザーアブレーション法やホールパンチング法、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy: AFM) 法など、これまでに様々な方法が実践されている。レーザーアブレーション法やホールパンチング法では、レーザー等で細胞や組織の一部を切断し、その際の周辺組織の収縮速度を測ることで、切断前の対象部位にかかっていた張力を推定する。この方法は幅広い組織に適用可能であり、張力の大きさを直接的に求めることが可能である一方で、侵襲的であるため同一組織で張力の変化を経時的に調べることができない等の欠点がある。AFM 法は、微小サイズのカンチレバーで試料を垂直方向に押し込み、その際の力の大きさやカンチレバーの変形度合いなどから対象部位の弾性率を測定する。弾性率は張力に比例することが知られているため、弾性率を測定することで張力の相対的な変化を観察することができる。この方法は、試料を傷つける必要がないため同一試料の経時変化を観察可能である一方で、一度に測定可能な範囲が限られているため組織や細胞全体での同時的な張力の分布を調べることができないといった欠点がある。

非侵襲的かつ広い範囲での張力分布の同時的観察が可能である方法として、FRET (Förster resonance energy transfer: フェルスター共鳴エネルギー移動) を利用したものがある (Grashoff et al., 2010; Kumar et al., 2016; Meng and Sachs, 2011; Yamashita et al., 2016)。この方法では、二つの蛍光タンパク質を伸縮性のリンカーで繋いだ FRET モジュールを用いる (Figure 1)。FRET の効率は二つの蛍光分子間の距離に依存するため、モジュールにかかる張力に応じてその FRET 効率は変化する。この FRET モジュールを対象となるタンパク質のドメイン間に挿入し、細胞に導入することで、対象タンパク質にかかる

張力の変化を蛍光観察によって調べることができる。対象タンパク質の種類によって細胞の様々な部分にかかる張力を検出することが可能であり、これまでに、Cadherin 張力センサーによる細胞—細胞間接着部分の張力観察(Lagendijk et al., 2017)や、Talin 張力センサーによる細胞—基質間接着部分の張力観察(Kumar et al., 2016)など、多くの例が報告されている。この方法は蛍光観察によって張力を調べる非侵襲的な方法であるため経時的な観察が可能であり、また蛍光画像内の広い範囲での張力分布を同時に観察することも容易である。また、特定の FRET モジュールに関して FRET 効率と張力の対応をあらかじめ光ピンセットなどを用いて調べておくことにより、蛍光画像から張力の絶対値を求めることも可能である(Grashoff et al., 2010)。

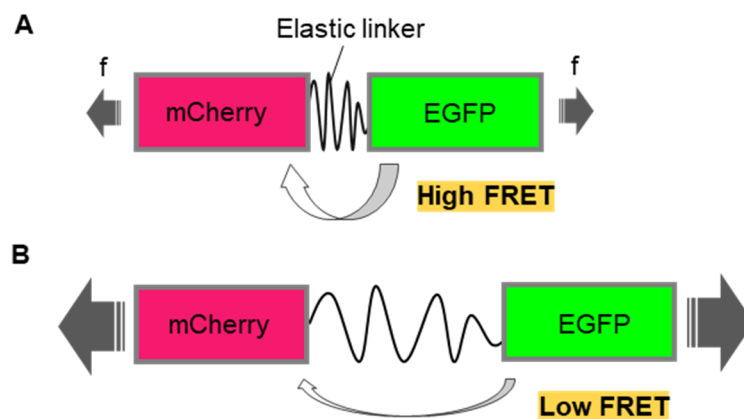


Figure 1. FRETモジュール

FRETモジュールの模式図。モジュールにかかる張力が小さいときは二つの蛍光タンパク質が近接するためFRET効率は高くなるが (A)、張力が大きいときにはリンカーが伸びることで蛍光タンパク質間の距離は遠くなり、FRET効率は低くなる (B)。

本研究では、アクチン結合タンパク質の一種である Lima1 (EPLIN と呼ばれる) に FRET モジュールを挿入することで、新規の FRET 張力センサーを作製した。Lima1 は LIM ファミリーに属するタンパク質であり、N 末端と C 末端のドメイン内にそれぞれアクチン結合領域を持つ。Lima1 はこれらのドメインを介して、アドヘレンスジャンクション内のカドヘリン-カテニン複合体やアクチンフィラメントと相互作用し、カドヘリン-カテニン複合体とアクチンフィラメント、あるいはアクチンフィラメント同士を繋ぐ働きを持つことが知られている (Figure 2) (Abe and Takeichi, 2008; Maul et al., 2003)。野生型 Lima1 は上皮・内皮細胞が密に集合した細胞シートでは細胞頂端側に形成される接着帯部分に局在し、まばらに播種された細胞では主にアクチンストレスファイバー上に局在する (Chervin-Pétinot et al., 2012)。よって Lima1 の両末端ドメインの間に FRET モジュールを挿入して張力センサーを作製することで、これらの接着帯やストレスファイバーにかかる張力を観察できると期待される。

本研究ではまず、当研究室から以前発表された張力センサーの作製方法に倣って、Lima1 を用いた新規の張力センサーを設計・作製し、培養細胞を用いてその機能を検証した。そして、新規張力センサーをツメガエル胚で発現させ、後期原腸胚期の神経外胚葉細胞にかかる張力について調べた。

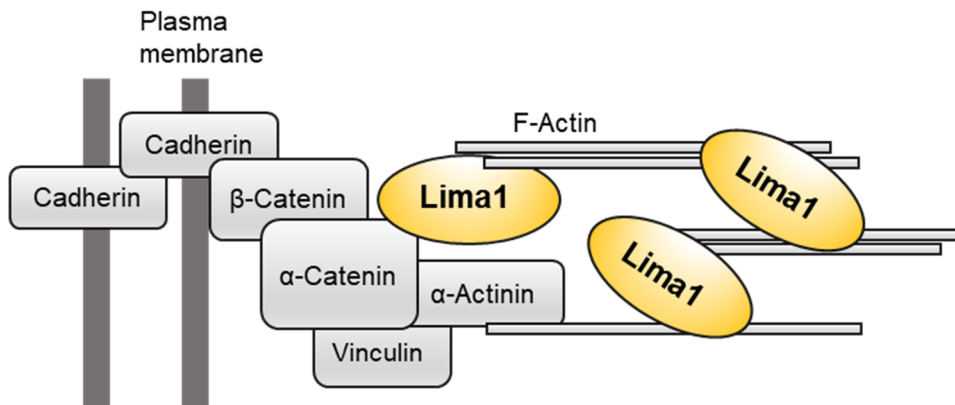


Figure 2. アドヘレンスジャンクションとLima1

アドヘレンスジャンクションの模式図。Lima1はカドヘリン-カテニン複合体とアクチンフィラメント、あるいはアクチンフィラメント同士を架橋する。

1-2. 材料と方法

1-2-1. コンストラクション

張力検出用の FRET モジュールは、EGFP と mCherry を、クモ糸タンパク質 Flagelliform 由来の伸縮性ペプチド(GPGGA)₈ でつないだモジュールを用いた(Yamashita et al., 2016)。Lima1 tension sensor (LimaTS) は、*Xenopus laevis* 由来の Lima1 の N 末端側アクチン結合ドメインの直後 (Ala355 と Arg356 の間) に FRET モジュールを挿入することによって作製した。LimaTS-EGFP(-)は、EGFP を非蛍光放出型にするため、Tyr66 をロイシンに置換した。LimaTS-mCherry(-)は、mCherry を非蛍光放出型にするため、mCherry の Tyr72 をロイシンに置換した。Lima1 control sensor (LimaCS)、Lima1-mCherry は、Lima1 の C 末端に FRET モジュールまたは mCherry を付加することで作製した。コンストラクトの作製に用いたプライマーとその配列は、以下に一覧を示す。

primer name	sequence
LimaTS-F	ccagagaagtctgcttagctg
LimaTS-R	ccggcaactggaacttcttac
LimaCS-F	actaacatggcttgccagtg
LimaCS-R	cattcttccacatcaacatc
LimaTS-EGFP(-)-F	gccgctaccccgaccacatgaagc
LimaTS-EGFP(-)-R	tgaagcactgcacgcccaaggcagggtggtcagc
LimaTS-mCherry(-)-F	tgaagcacccgcccacatccccg
LimaTS-mCherry(-)-R	cgtaggccttgagcccaacatgaactgaggggac

1-2-2. 共焦点顕微鏡法

本章で示した蛍光画像は、共焦点顕微鏡 FV1200 (Olympus) または TiE-VBGR T-C2 (Nikon) を用いて撮影した。対物レンズは、Hela 細胞の撮影では UPLSAPO40×S

NA:1.25 を用い、ツメガエル胚の撮影では UPLSAPO10×2 NA:0.40、UPLSAPO20× NA:0.75、または Plan Apo VC 20× DIC N2 NA:0.75 を用いた。

1-2-3. HeLa 細胞の培養

HeLa 細胞の培養には、高グルコース DMEM (Wako) に 10% FBS (Thermo Fisher Scientific) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (SIGMA) を加えたものを用いた。培養は 37°C、5%CO₂ 条件下で行い、撮影の際は 4-ウェルカバーガラスチャンバー (IWAKI) に播種した。トランスフェクションは Lipofectamine 3000 transfection kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施要領の通りに行い、一晩培養後に撮影を行った。ストレスファイバーにかかる張力を実験的に上げる際は、細胞を 30% milliQ 水/DMEM 中で 5 分間培養した。アクトミオシンの収縮を阻害する際には、5 μM Cytochalasin B (Wako)/ 0.025% DMSO/ DMEM または 10 μM Y-27632(ADooQ)/ 0.002%DMSO/ DMEM 中で 1 時間培養した。Cytochalasin B 添加サンプルに対するコントロールサンプルは、0.025% DMSO/ DMEM 中で培養した。Y-27632 添加サンプル培養液内の DMSO は 0.002%と非常に低濃度であったため、これに対するコントロールサンプルの培養液は DMSO を含まない DMEM を用いた。

1-2-4. ファロイジン染色

HeLa 細胞を染色する際には、細胞を 4% パラホルムアルデヒド/ PBS で 10 分間固定後、0.5% Triton X-100/ PBS で 5 分間の透過処理を行った。PBS で洗浄後、Alexa Fluor 488 phalloidin (Thermo Fisher Scientific) で 30 分間処理し、PBS で洗浄後、観察を行った。

ツメガエル胚を染色する際には、卵膜を除去後、MEMFA (0.1 M MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3.7% formaldehyde) で1時間固定を行った。PTw (0.1% Tween20/ PBS) で30分間透過処理を行った後、Alexa Fluor 488 phalloidin で20分間染色し、PBSで洗浄後観察を行った。すべての操作は室温で行い、各処理の間細胞または胚は暗所に置いた。

1-2-5. ツメガエル胚の培養と顕微注入

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は室温 22°Cで飼育し、採卵の前日にゴナドトロピン (Kyoritsu Seiyaku) 300 units を皮下注射した。精巣は摘出後に DeBoer's solution (110 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 0.45 mM CaCl₂, 3 mM HEPES, 0.01% Kanamycin, pH 7.2)、4°Cで保管した。人工授精によって得た胚は、受精後1時間で4.6% L-システイン塩酸塩/1×スタインバーグ氏液 (pH7.8) でゼリー層を除去し、その後は1×スタインバーグ氏液 (58 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.34 mM Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 0.83 mM MgSO₄ · 7H₂O, 3.0 mM HEPES, 0.01% Kanamycin, pH7.4) 中で培養した。mRNA の顕微注入は4細胞期に行った。顕微注入には GD-1 ガラスキャピラリー (NARISHIGE) を用い、5% Ficoll/1×スタインバーグ氏液中で行った。mRNA の1胚あたりの注入量はそれぞれ以下のとおりである。LimaTS: 3.5 ng、LimaCS: 1.25 ng、LimaTS-EGFP (-): 3.5 ng、LimaTS-mCherry (-): 3.5 ng、Lima1-mCherry: 1 ng。mRNA は全て、mMESSAGE mMACHINE SP6 (Thermo Fisher Scientific) を用いて合成した。胚の正中線を判別する必要がある際には胚の片側に Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific) を注入した。顕微鏡観察の際は 35 mm/ glass-based dish (IWAKI) を用い、胚は 1.2% LMP Agarose (Thermo Fisher Science)/1×スタインバーグ氏液中に包埋した。

1 - 2 - 6. FRET 効率の計算

FRET 効率を表す指標として、本研究では FRET index を用いた(Periasamy et al., 2008)。FRET index の計算には、Acceptor、quenched Donor、raw FRET の三つの画像を用いた。計算に用いたアルゴリズムは当研究室の先行研究で用いられたものと同様であり(Yamashita et al., 2016)、計算はピクセルごとに行った。計算式は以下のとおりである。

$$FRET\ index = \frac{F - c_a A - c_d qD}{A}$$

F = raw FRET intensity、 A = acceptor intensity、 qD = quenched donor intensity、 c_a = acceptor bleed-through coefficient、 c_d = donor bleed-through coefficient。 c_a 、 c_d は LimaTS-EGFP(-)または LimaTS-mCherry(-)を発現した細胞または胚を用いて、次式に従って決定し、各実験を通して一定の値を用いた。

$$c_a = \frac{F}{A}, \quad c_d = \frac{F}{D}$$

1 - 2 - 7. FRET index の定量化

HeLa 細胞で FRET index を定量する際は、細胞の輪郭線を手動で決定し、輪郭線内部の FRET index の平均値をその細胞の FRET index とした。胚においては、細胞の輪郭線のあ
る頂点から別の頂点までを 1 辺と定義し、1 辺を手動で決定した後、辺上の FRET index
の平均値をその辺の FRET index とした。1 胚あたり、100 辺前後を定量した。辺の方向
は、胚の正中線方向を 90° 、それと直交する方向を 0° (180°) と定義し、 $75 \sim 105^\circ$ を
頭尾軸方向の辺、 $-15 \sim 15^\circ$ を左右軸方向の辺とした。

1-2-8. 光刺激

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)解析の際は、ブリーチング前の画像を5枚撮影した後、100% 559 nm レーザーパルス (Opti λ、NTTElectronics、power: 20 mW) を1秒間照射することによって選択領域をブリーチングした。ブリーチング領域は、ストレスファイバーがよく発達した細胞の辺縁部などを選択した。画像の撮影は5秒ごとに行い、合計で250秒間撮影を行った。選択領域の蛍光強度はダブルノーマライゼーション法によって正規化した。

レーザーアブレーションは、100% 405 nm レーザーパルス (COHERENT、power: 100 mW) を30秒間照射することによって行った。原腸陥入に伴う張力を観察する際には、発生ステージ11.5-12でアブレーションを行い、アブレーションの前後で撮影を行った。

1-2-9. 統計解析

統計的検定はすべて Microsoft Excel 上で行い、有意差検定は t 検定を用いた。実験のサンプル数については、各図の説明文に記した。各データ群の差の有意性については、 $p < 0.05$ であるときに有意であるとした。

1-3. 結果

1-3-1. Lima1 張力センサーの作製

Lima1 は、中央の LIM ドメインの両側にアクチン結合ドメイン (Actin Binding Domain: ABD) を持ち、この両端のドメインでカドヘリン-カテニン複合体やアクチンフィラメントと相互作用し、カドヘリン-カテニン複合体とアクチンフィラメント、あるいはアクチンフィラメント同士を繋ぐ働きを持つ (Figure 3A) (Abe and Takeichi, 2008; Maul et al., 2003)。アドヘレンスジャンクションやアクチンストレスファイバー内の張力を検出するという目的のもと、FRET モジュールを N 末端の ABD と LIM ドメインの間に挿入した、Lima1 張力センサー (Lima1 Tension Sensor: LimaTS) を作製した (Figure 3B)。FRET モジュールは、当研究室から以前発表された張力センサーと同様、FRET 現象におけるドナーEGFP とアクセプターmCherry を伸縮性のリンカーペプチド (GPGGA)₈ で繋いだものを用いた (Yamashita et al., 2016)。また、Lima1 にかかる張力によって FRET 効率の変化しないコントロールセンサーとして、Lima1 の C 末端に FRET モジュールを付加した Lima1 Control Sensor (LimaCS) を作製した (Figure 3C)。

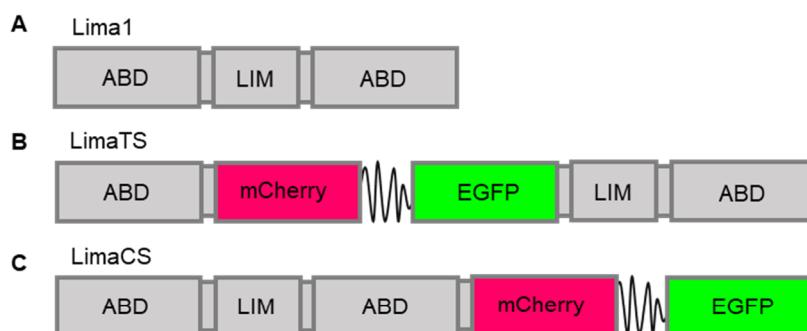


Figure 3. Lima1張力センサーとコントロールセンサー

(A) Lima1タンパク質。ABD: Actin Binding Domain、LIM: LIM Domain。

(B) LimaTS: Lima1 Tension Sensor (C) LimaCS: Lima1 Control Sensor

FRET モジュールの挿入がタンパク質の細胞内局在や動態に大きな影響を及ぼさないことを、蛍光観察や FRAP 法によって検証した。まず、LimaTS の細胞内局在を調べるため、LimaTS-EGFP(-)を HeLa 細胞に導入した。LimaTS-EGFP(-)は、LimaTS 内の EGFP に点変異を加えて EGFP の蛍光を発しないようにしたものである。観察の結果、LimaTS-EGFP(-)は、主にアクチンストレスファイバー部分に局在することがわかった (Figure 4A)。これは、先行研究によって報告された野生型 Lima1 の局在と同様であった(Chervin-Pétinot et al., 2012)。次に、FRAP 解析により、Lima1-mCherry と LimaTS-EGFP(-)の細胞内動態を比較した。解析は、ストレスファイバーが発達し Lima1 が多く局在する細胞辺縁部で行った。その結果、LimaTS-EGFP(-)は Lima1-mCherry とよく似た蛍光回復曲線を示すことが分かった (Figure 4B-4D)。これらのことから、FRET モジュールの挿入は、Lima1 の細胞内局在や動態に大きな影響を及ぼさないことが確かめられた。

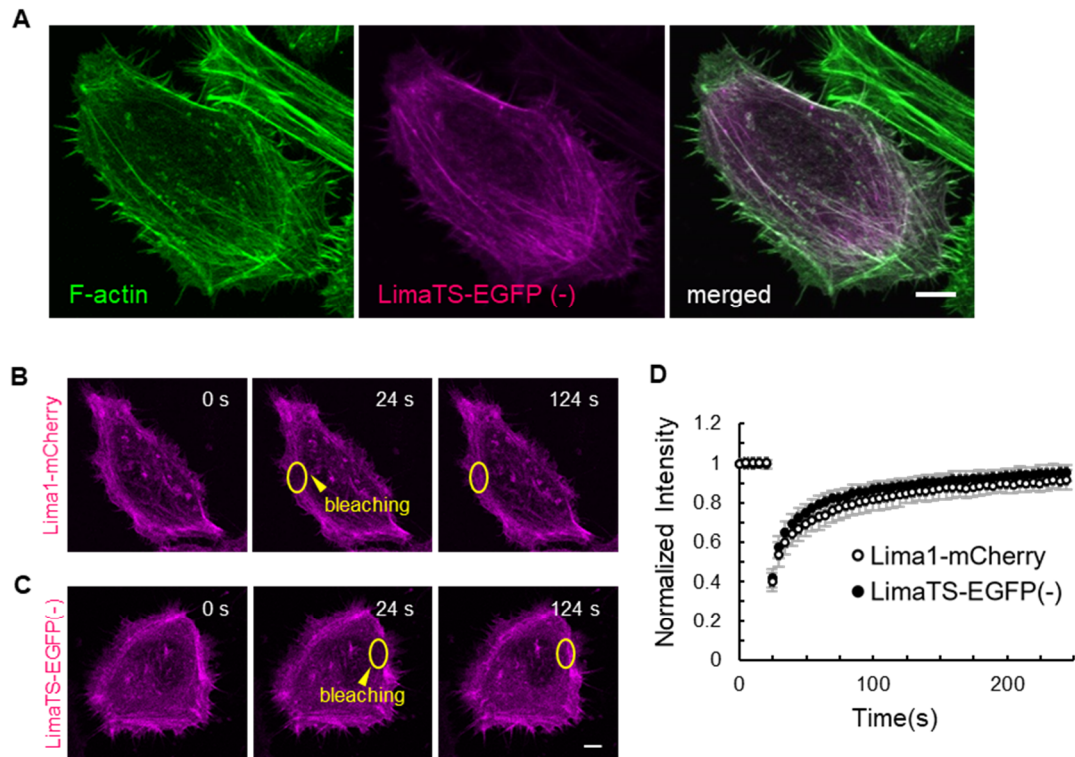


Figure 4. LimaTSの細胞内局在と動態

(A) HeLa細胞におけるアクチンフィラメントとLimaTS-EGFP(-)の蛍光画像。(B, C) FRAP解析を行った際のLima1-mCherryとLimaTS-EGFP(-)の蛍光画像。黄枠はmCherryの消光を行った領域を示す。(D) Lima1-mCherry (n=12)とLimaTS-EGFP(-) (n=19)の蛍光回復曲線。エラーバーは標準偏差を表す。Scale bars: 10 μ m

1-3-2. センサーの機能検証

LimaTS と LimaCS がそれぞれ張力センサーとコントロールセンサーとして機能することを、HeLa 細胞を用いて検証した。FRET 効率を表す指標として、本研究では FRET index を用い(Periasamy et al., 2008)、FRET index の計算は、当研究室の先行研究と同様の方法で行った(材料と方法 1-2-6)。FRET 効率は蛍光分子間の距離に依存する(蛍光分子間の距離の 6 乗に反比例する)ため、LimaTS ではセンサーにかかる張力が大きくなると FRET index が低下し、張力が小さくなると FRET index が上昇することが予想される。

まず、アクチンストレスファイバーにかかる張力を大きくした際の変化を調べるため、LimaTS または LimaCS を発現した細胞を低張液中で短時間培養した。その結果、LimaCS 発現細胞では FRET index に有意な変化は見られなかったが、LimaTS 発現細胞では FRET index は有意に低下した (Figure 5A-5C)。次に、アクチンストレスファイバーにかかる張力を小さくした際の変化を調べるため、細胞をアクチン重合阻害剤 Cytochalasin B または ROCK 阻害剤 Y-27632 で処理した。その結果、LimaCS 発現細胞では FRET index に有意な変化は見られなかったが、LimaTS 発現細胞では FRET index は有意に上昇した (Figure 5D-5I)。これらの結果から、LimaTS、LimaCS はそれぞれ張力センサー、コントロールセンサーとして機能的であることが確かめられた。

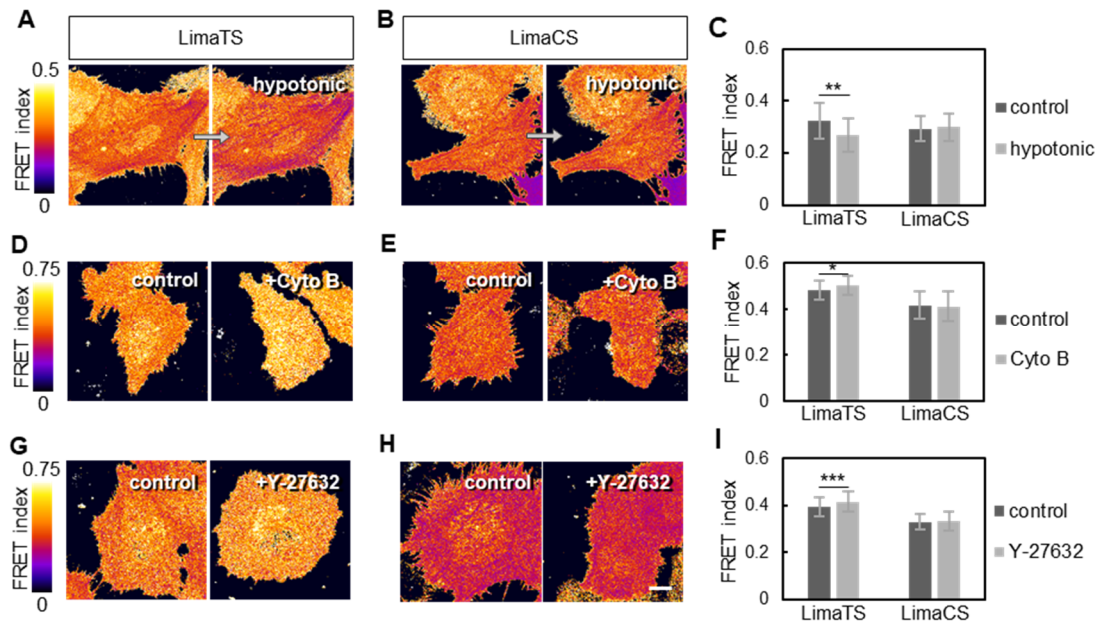


Figure 5. LimaTS、LimaCSの機能検証

LimaTS (A, D, G) またはLimaCS (B, E, H) を発現したHeLa細胞で、アクチンストレスファイバーにかかる張力を変化させた際のFRET indexをヒートマップで表した。

(A-C) 通常培地から低浸透圧培地に変える前後のFRET index。LimaTS: n=21、LimaCS: n=20。 (D-F) DMSOまたはCytochalasin B 添加培地で培養した際のFRET index。LimaTS control: n=51、Cytochalasin B: n=44、LimaCS control: n=50、Cytochalasin B: n=49。 (G-I) 通常培地またはY-27632添加培地中で培養した際のFRET index。エラーバーは標準偏差を表す。LimaTS control: n=64、Y-27632: n=65、LimaCS control: n=80、Y-27632: n=72。*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$ 。

Scale bar: 10 μ m

1-3-3. ツメガエル胚へのセンサー導入

作製したセンサーを、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の胚に導入し、発生初期の胚における張力観察を試みた。後期原腸胚期から初期神経胚期の神経外胚葉組織で LimaTS または LimaCS の観察を行ったところ、どちらのセンサーも隣接細胞との接着部分に主に局在することがわかった (Figure 6A and 6B)。これは、密に集合した外皮・内皮細胞における野生型 Lima1 の細胞内局在と同様であった (Chervin-Pétinot et al., 2012)。また、両センサーを導入した胚は正常に発生することが確かめられた (Figure 7)。Lima1 はカドヘリン-カテニン複合体とアクチンフィラメント、あるいはアクチンフィラメント同士を繋ぐ働きを持つため、これらの構造体が隣接細胞間の接触部分に沿って分布する外胚葉組織においては、LimaTS/LimaCS を用いることで細胞間接着部分に沿った方向に生じる張力を検出できると考えられる (Figure 6D)。ただし、両センサーを発現した胚の蛍光画像から FRET index を計算したところ、細胞質においてもある程度のシグナルが検出され、細胞間接着部分のみを判別することは難しかった (Figure 6A' and 6B')。これは、両センサーが少量ながら細胞質にも局在し、これらの弱い蛍光からでも FRET index が計算されたためである。そこで、細胞間接着部分の張力のみを評価するために、元の蛍光画像を用いて細胞間接着の位置情報を決定し、1 辺ごとに FRET index を抽出することとした (Figure 6C)。

原腸胚期から初期神経胚期の外胚葉組織は、原腸陥入や体軸伸長といった形態形成運動によって、継続的に頭尾軸方向に伸展されていると考えられる。そこで、上述の方法を用いて細胞間接着部分を一辺ずつ抽出し、接着の角度に応じて分類・比較することで、形態形成運動から予想されるような頭尾軸方向の張力が観察されるかどうかを検証することと

した。細胞間接着の角度は、胚の正中線方向を 90° としたとき、 $-15^\circ \sim 15^\circ$ の範囲を左右軸方向、 $75^\circ \sim 105^\circ$ の範囲を頭尾軸方向と定義した (Figure 8A)。後期原腸胚期 (発生ステージ 12) において LimaTS 発現胚の神経外胚葉を観察したところ、左右軸方向に比べて頭尾軸方向の細胞間接着部分で FRET index が有意に低いことが分かった (Figure 8B and 8C)。このことから、頭尾軸方向の細胞間接着部分に沿って生じる張力が、左右軸方向の細胞間接着部分に沿って生じる張力より大きいことが示唆された。またこのとき、神経外胚葉の一部をレーザーアブレーションにより左右軸方向に切断したところ、切断部分の周辺では頭尾軸方向と左右軸方向の FRET index の差が消失した (Figure 8B and 8C)。これは、頭尾軸方向に働いていた張力がアブレーションによって解消されたことを表していると考えられる。LimaCS 発現胚で同様の観察を行った際には、アブレーションの有無にかかわらず、頭尾軸方向と左右軸方向とで FRET index に有意な差は見られなかった (Figure 8D and 8E)。これらのことから、後期原腸胚期の神経外胚葉では左右軸方向に比べて頭尾軸方向の細胞間接着部分に沿ってより大きな張力が働いていることが示唆されており、形態形成運動から予想された通りこの時期の細胞は頭尾軸方向に伸展されているのではないかと考えられる。

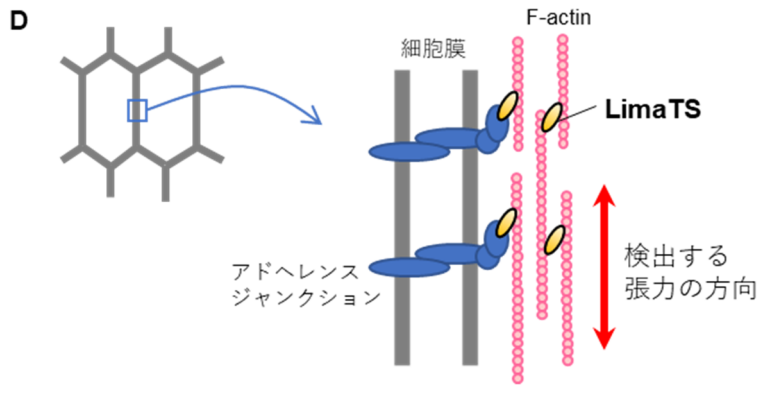
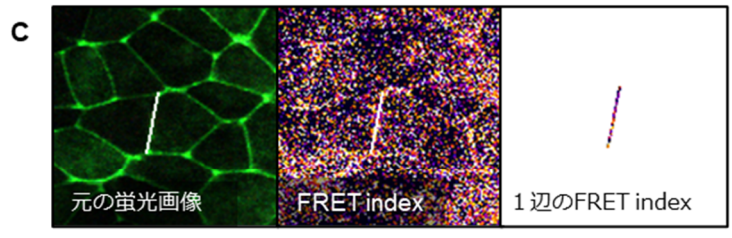
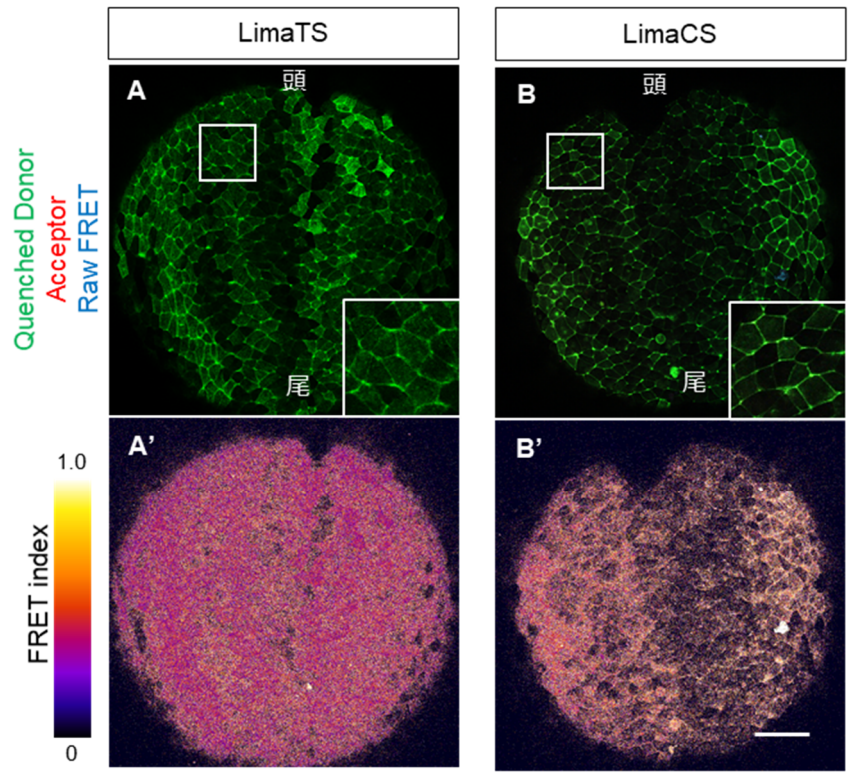


Figure 6. ツメガエル胚における張力観察

(A, B) LimaTS (A) またはLimaCS (B) を発現したツメガエル胚（発生ステージ13）を背側から撮影した蛍光画像。右下に挿入された画像は白枠内の拡大画像である。

(A', B') (A, B) の蛍光画像から計算されたFRET index。Scale bar: 200 μm (C) 1 辺の定義と、その辺のFRET indexの抽出の例。(D) 外胚葉細胞の細胞間接着部分の模式図。

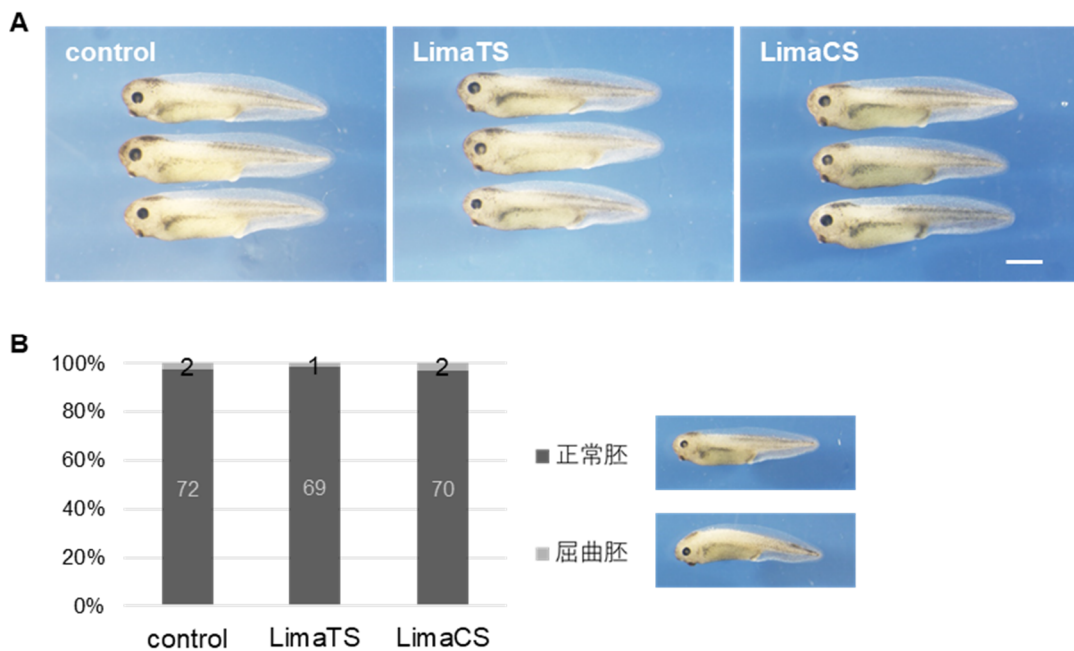


Figure 7. LimaTS、LimaCS 発現胚の表現型

(A) コントロール胚と、LimaTSまたはLimaCS発現胚の画像（発生ステージ37-38）。

(B) コントロール胚、LimaTS発現胚、LimaCS発現胚での各表現型の割合。グラフ内の数字は観察した胚の数を表す。Scale bar: 1 mm

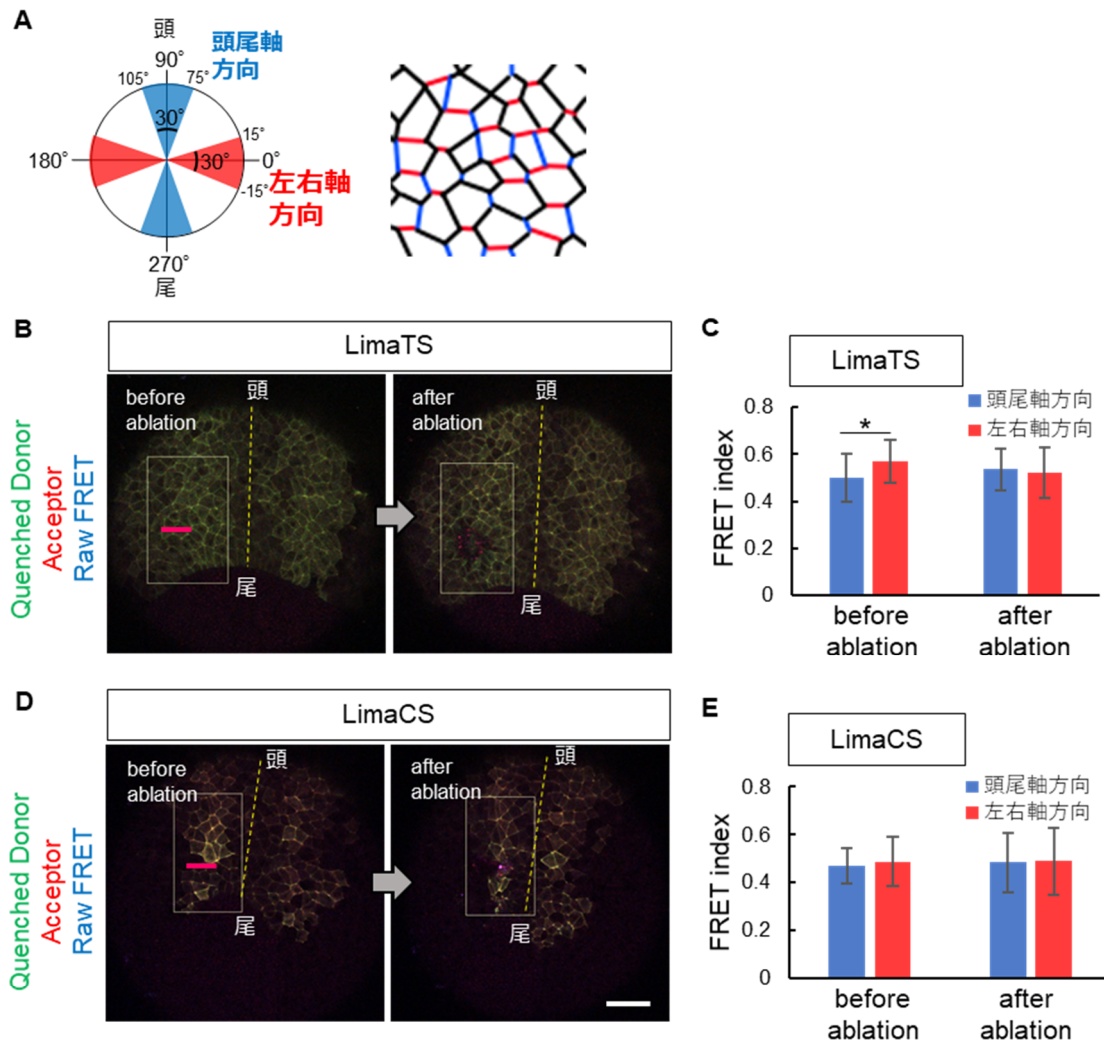


Figure 8. 後期原腸胚期の張力とその方向

(A) 細胞間接着の方向の定義。胚の正中線方向30° の範囲を頭尾軸方向とし、正中線と直交する方向30° の範囲を左右軸方向とした。(B, D) 後期原腸胚期のLimaTS

(B) またはLimaCS (D) 発現胚の背側像(発生ステージ11.5-12)。黄破線は胚の正中線、赤線はアブレーション部位、白枠はFRET indexの定量に用いた領域を表す。

Scale bar: 100 μm 。(C, E) アブレーション周辺領域の細胞のFRET indexを辺ごとに

に定量したもの。エラーバーは標準偏差を表す。定量に用いた胚の数は、LimaTS: n=2、LimaCS: n=2。*: $p < 0.05$ 。

1-4. 考察

本章では、FRET モジュールを用いた新たな張力センサーの作製を行い、これが生体内で張力を測定するのに有用であることを示した。新規張力センサーは、当研究室から以前発表されたものと同様(Yamashita et al., 2016)、生体内の張力変化を広い範囲で連続的に、また非侵襲的に観察することができた。ただし以前発表されたセンサーとは違い、通常培地で培養した細胞では、FRET モジュールに張力がかからないはずの LimaCS よりも、LimaTS の方がより高い FRET 効率を示した。これは、LimaTS 中の FRET モジュールが、Lima1 のサブユニット間に挟まれることによってよりコンパクトな構造をとるためである可能性がある。あるいは、FRET 効率は蛍光分子間の距離だけでなく角度によっても変化することが知られているため、LimaTS 内の FRET モジュールの角度がエネルギー移動により適した角度になっている可能性も考えられる。培養細胞では LimaCS に比べて LimaTS の方が FRET 効率が高かったが、ツメガエル胚の外胚葉組織で観察を行った際にはこの関係は逆転し、LimaCS の方が高い FRET 効率を示した (Figure 6A' and 6B')。外胚葉組織の細胞間には常にある程度の張力が働いていると考えられるため、これにより LimaTS の FRET 効率が低下したことによるのかもしれない。

FRET モジュールを用いた張力観察は、考慮すべき多くの要素を含む複雑な手法である。それは例えば、FRET モジュールを挿入したセンサータンパク質が野生型タンパク質と同様の細胞内動態を示すことを確かめなくてはならない、センサータンパク質の導入が個体発生に悪影響を及ぼさないことを確かめなくてはならない、などである。しかしこれらの複雑さを補って余りあるほどに、FRET 張力センサーは幅広い有用性を持つものである。本研究で作製した張力センサーは、アクチンストレスファイバーや接着帯など、アク

チンフィラメント関連構造中に局在していた。Figure 8 では、FRET 効率の解析領域を細胞間接着部分に限定するとともに、これを角度に応じて分類・比較することで、外胚葉組織にどのような方向の張力がかかっているのかを調べた。後期原腸胚期の外胚葉組織は、原腸陥入や体軸伸長によって頭尾軸方向に伸展されていることが予想されるが、解析の結果、予想通り頭尾軸方向の細胞間接着部分に沿ってよりおおきな張力が働いていることが示唆された。このように領域を限定した解析を行うことにより、本研究で観察対象とした構造体以外にもアクチンフィラメントに関連する細胞内の様々な構造体にかかる張力を調べられる可能性がある。

第2章では、本章で観察された異方性の張力が発生現象の制御にどのように寄与しているのかを調べる。異方性の張力が観察された後期原腸胚期から初期神経胚期にかけて、神経外胚葉では平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity: PCP) の形成が見られる。張力の方向と PCP の方向が一致していることから、張力による細胞極性制御が行われているのではないかと仮定し、これを検証することとした。

第2章

異方性張力による平面内細胞極性制御

2-1. 序論

平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity: PCP) は、細胞シートの平面内で一定方向に整列した細胞極性のことであり、ショウジョウバエの翅や脊椎動物の外胚葉組織をはじめ、様々な動物組織の正常な発生に関与している (Butler and Wallingford, 2017)。PCP は、進化的に保存された種々のコア PCP タンパク質によって制御されており、ここには膜貫通タンパク質である Flamingo (脊椎動物では Celsr)、Van Gogh (Vangl)、Frizzled (Fzd) や、細胞質タンパク質である Prickle、Dishevelled (Dvl) などが含まれる (Butler and Wallingford, 2017; Devenport, 2014; Gray et al., 2011; Singh and Mlodzik, 2012)。これらのコア PCP タンパク質は、頂端側の細胞間接着部分に局在し、Celsr/Vangl/Prickle または Celsr/Fzd/Dvl からなる 2 種類の安定的な複合体を形成し、同一細胞内で互いに排他的な局在を示す (Figure 9) (Devenport, 2014; Peng and Axelrod, 2012)。コア PCP タンパク質の欠損や機能欠失は様々な発生障害を引き起こすことが知られている (Goodrich and Strutt, 2011; Jenny, 2010; Singh and Mlodzik, 2012; Wang and Nathans, 2007)。

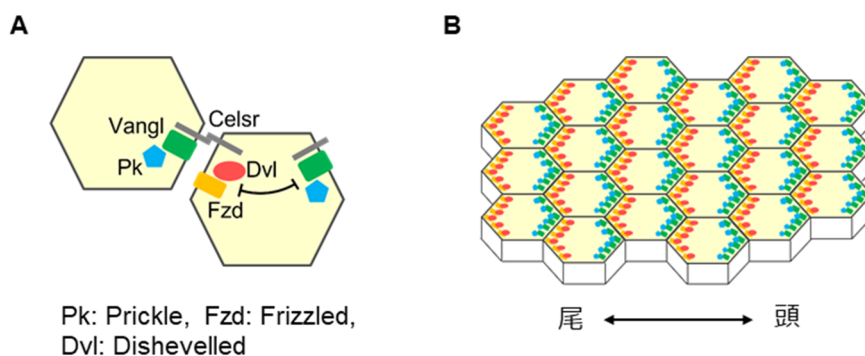


Figure 9. コアPCPタンパク質とその細胞内局在

コアPCPタンパク質の局在を表す模式図。(A) Celsr/Vangl/Pk、Celsr/Fzd/Dvlからなる 2 種類の複合体は同一細胞内で互いに排他的な局在を示す。(B) Vangl/Pkは胚の頭側、Fzd/Dvlは胚の尾側に局在する。

同一細胞内および隣接細胞間でのコア PCP タンパク質の相互作用など、局所的な極性形成の分子メカニズムについてはこれまでによく研究されてきた(Axelrod, 2013; Chen et al., 2008; Tree et al., 2002; Wu and Mlodzik, 2008)。しかし一方で、組織全体で細胞極性の初期軸を決定する長距離伝達因子についてはいまだに議論的となっており、生化学的勾配や機械的刺激などを含むいくつかの候補が提案されている。これらの候補の中でもっともよく研究されてきたもののひとつに、Wnt リガンドの濃度勾配がある(Gao et al., 2011; Qian et al., 2007; Sokol, 2015)。これは、組織の一端に位置する分泌源から Wnt リガンドが分泌され、組織全体にわたって Wnt シグナル勾配を形成することで、細胞極性の方向を決定するという説である。実際 Wnt リガンドのうちの何種類かは、組織内で異所的に発現させると、リガンド発現細胞を中心に周囲の細胞の極性が変化することが知られている(Chu and Sokol, 2016; Wu et al., 2013)。しかし、PCP 研究の代表的なモデルの一つであるショウジョウバエの翅において、Wnt 遺伝子の機能喪失を行っても PCP 形成に顕著な影響が生じないことが明らかになっており(Ewen-Campen et al., 2020; Yu et al., 2020)、PCP を制御する長距離伝達因子には冗長性があることが示唆されている。長距離伝達因子の別の候補としては、機械的シグナルが提案されている。例えば、アクチオシンの活性が PCP 形成に寄与することが示されており(Luxenburg et al., 2015; Mahaffey et al., 2013; Ossipova et al., 2015)、また形態形成運動に由来する機械的刺激が、微小管の再配向や細胞の再配置などを通じて極性の方向を制御することが明らかにされている(Aigouy et al., 2010; Aw et al., 2016; Butler and Wallingford, 2018; Chien et al., 2015)。しかし、生体内の機械的刺激を測定したり操作したりすることの困難さから、PCP を制御する機械的刺激の正確な役割については依然として不明なことが多い。そこで本研究では、機械的刺激の付

加等の手法が当研究室ですでに確立されているアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の神経外胚葉を用いて、PCP を制御する機械的刺激について調べることにした。

アフリカツメガエルの神経外胚葉では、後期原腸胚期から初期神経胚期にかけて頭尾軸方向の PCP が形成され、発生ステージ 12.5~13 には Vangl/Prickle 複合体が各細胞の頭側部分に局在することが知られている (Ossipova et al., 2015)。PCP 形成の期間中、神経外胚葉は原腸陥入や体軸伸長といった形態形成運動によって常に頭尾軸方向に伸展されていると考えられる。実際、第 1 章で張力センサーを用いて細胞接着部分に沿ってかかる張力を調べたところ、左右軸方向に比べて頭尾軸方向により大きな張力が働いていることが示唆された。そこで本研究では、この一方向性の張力が PCP の方向を制御する長距離伝達因子として働くのではないかと考え、これを検証することとした。

本研究ではまず、PCP 形成の直前期に外胚葉組織の一部を切断することで張力を緩和し、PCP 形成の様子を観察した。その結果、張力が緩和されたと考えられる領域で PCP 形成が阻害されることが分かった。また、神経外胚葉を胚から切り出して任意の方向に伸展したところ、伸展方向に応じて極性の方向が変化することが分かった。これらのことから、組織にかかる一方向性の張力が PCP の軸決定に寄与することが明らかになった。また、別の PCP 制御因子として知られる Wnt シグナル勾配と一方向性張力との関係性を調べたところ、一方向性張力は Wnt シグナル勾配に対して相加的に働くシグナルであり、二種類の PCP 制御因子が同じ方向に揃うことで明確な PCP が形成されることが示唆された。本研究ではさらに、伸展刺激を受けた細胞が極性決定の手がかりとして検知するシグナルについても調べ、その結果、細胞形状の変化が重要であることが示唆された。張力の絶対的な大きさや細胞骨格系の配向の変化が極性決定に大きな影響を及ぼさなかった一方

で、細胞の伸長方向と極性方向とが常によく一致することが明らかになった。以上のことから、ツメガエル胚の神経外胚葉では、形態形成運動に由来する一方向性の張力によって細胞が伸長し、その伸長と同じ方向に各細胞の極性が制御されることで、組織全体で一方向に揃った PCP が確立されることが示唆された。

2-2. 材料と方法

2-2-1. ツメガエル胚の培養と顕微注入

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は室温 22°C で飼育し、採卵の前日にゴナドトロピン (Kyoritsu Seiyaku) 300 units を皮下注射した。精巣は摘出後に DeBoer's solution (110 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 0.45 mM CaCl₂, 3 mM HEPES, 0.01% Kanamycin, pH 7.2)、4°C で保管した。人工授精によって得た胚は、受精後 1 時間で 4.6% L-システイン塩酸塩/1×スタインバーグ氏液 (pH7.8) でゼリー層を除去し、その後は 1×スタインバーグ氏液 (58 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.34 mM Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 0.83 mM MgSO₄ · 7H₂O, 3.0 mM HEPES, 0.01% Kanamycin, pH7.4) 中で培養した。

pCSf107-mRuby2-xPrickle3、pCSf107-xWnt11、pCS2+xCrescent は、三井優輔博士 (基礎生物学研究所) よりご提供いただいた。mRNA は全て、mMESSAGE mMACHINE SP6 (Thermo Fisher Scientific) を用いて合成した。顕微注入には GD-1 ガラスキャピラリー (NARISHIGE) を使い、5% Ficoll/1×スタインバーグ氏液中で行った。細胞極性検出用 mRNA の顕微注入は 8-16 細胞期の背側動物割球に行い、mRNA の 1 胚あたりの注入量はそれぞれ以下のとおりであった。mRuby-xPrickle3L: 150 pg、Vangl2: 65 pg、membrane-tethered GFP: 100 pg。Crescent mRNA を注入する際には、細胞極性検出用の mRNA とあらかじめ混合したうえで注入した。Wnt11 mRNA は、32 細胞期胚の腹側 1 割球に、胚あたり 300 pg 注入した。胚の正中線を可視化する際には胚の片側に Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific) を注入した。顕微注入後は 5% Ficoll/1×スタインバーグ氏液中で 30 分以上培養した後、培養液を 0.1×スタインバーグ氏液に交換した。胚の顕微鏡観察の際は 35 mm/ glass-based dish (IWAKI) を使い、胚は 1.2% LMP Agarose

(Thermo Fisher Science)/ 1×スタインバーグ氏液中に包埋した。

2-2-2. 共焦点顕微鏡法

本章で示した蛍光画像は、共焦点顕微鏡 FV1200 (Olympus) または TiE-VBGR T-C2 (Nikon) を用いて撮影した。対物レンズは、UPLSAPO10×2 NA:0.40、UPLSAPO20× NA:0.75、または Plan Apo VC 20× DIC N2 NA:0.75 を用いた。Z 投影画像は Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いて取得した。

2-2-3. 細胞極性の解析

細胞極性の定量化には、Polarity Measurement(Strutt et al., 2016)を用いた。細胞極性の定量に用いた画像は、membrane-tethered GFP の蛍光画像から Packing Analyser(Aigouy et al., 2010)を用いて取得した細胞膜マスク画像と、極性タンパク質 (Vangl2 または Prickle3) の蛍光画像である。極性値・極性軸の算出方法を簡潔に述べると、まず、細胞膜上の極性タンパク質の蛍光強度を、細胞の重心を基準とした角度に応じて 360 個のビンに割り当てた。細胞の重心を通る基準軸を設定した後に、360 個のビンは基準軸周り 90° の二つの象限とそれと直交する軸周り 90° の二つの象限の、合計四つの象限に分割された。極性タンパク質の蛍光強度は各象限内で合計され、さらに直径方向に対向する象限同士で加算された。基準軸周りの二つの象限の合計値と、それと直交する軸周りの二つの象限の合計値との比を計算し、これを蛍光強度比とした。蛍光強度比の計算を、基準軸を 1° ずつ変えながら繰り返し、最大の蛍光強度比を与える基準軸をその細胞の極性軸とし、そのときの蛍光強度比をその細胞の極性値とした。算出した細胞極性の情報を細胞形

状の情報と結び付ける際には、細胞重心の座標を用いてそれぞれの解析結果を1細胞ごとに紐づけを行った。Figure 18の極性解析ではQuantify Polarity(Tan et al., 2021)を用いた。極性軸の角度は、胚の正中線方向が 90° となるように表示した。

2-2-4. 細胞形状解析

細胞形状の解析には、細胞極性の解析に用いたものと同じマスク画像を用いた。アスペクト比の計算では、MATLABのregionprops関数を用いて細胞形状を楕円で近似した後、近似楕円の長軸と短軸の比を計算した。細胞長軸の角度は、胚の正中線方向が 90° となるように表示した。細胞の長軸と極性軸とのなす角は、Microsoft Excel上で一細胞ごとに計算を行った。丸い細胞と細長い細胞の分類は、細胞のアスペクト比を基準に行った：アスペクト比が集団の中央値より小さい細胞は丸い細胞、中央値より大きい細胞は細長い細胞に分類された。細胞の長軸が $0^\circ \sim 45^\circ$ のときは左右軸方向に伸びた細胞、 $45^\circ \sim 90^\circ$ のときは頭尾軸方向に伸びた細胞に分類した。

2-2-5. レーザーアブレーション

レーザーアブレーションは、Nikon Eclipse TiE-VBGR T-C2 (Nikon)上で100% 405 nmレーザーパルス (COHERENT、power: 100mW) を30秒間照射することによって行った。アブレーションは3-5細胞の幅で直線状に行った。発生ステージ12でアブレーションを行い、直後に撮影を行った後、そのまま室温でステージ14まで培養して再び撮影を行った。アブレーションにより張力が緩和されたと考えられる領域は、切断線に垂直な方向に約10細胞の幅とした (Figure 15A, 15E, 15I, 15Mにおいて網掛けで表示された領

域)。張力が緩和されていないと考えられるその他の領域をコントロール領域とした。アブレーション部位は、Figure 15A-15D、15I-15L では原口から 5–10 細胞離れた位置、Figure 15E-15H、15M-15P では 15–20 細胞離れた位置とした。

2-2-6. ヘミセクション

レーザーアブレーション後の胚を MEMFA (0.1 M MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3.7% formaldehyde) 中、室温で 2 時間固定した後、1×スクロース溶液(0.2xPBS, 0.3 M Sucrose, 0.05% Tween 20) 中で 10 分間培養した。溶液の半分を捨てて等量の 4% LMP Agarose (Thermo Fisher Scientific) /1×スクロース溶液を加え (LMP Agarose の最終濃度は 2%)、胚を含む全量を 35 mm dish (IWAKI) に移して、ゲルが十分に固まるまで 4°C で静置した。剃刀を用いて、アブレーション直線と直交するように胚を 2 分割した後、MEMFA 中で 30 分間固定し、PBS で洗浄した後に観察を行った。

2-2-7. 免疫染色

胚は MEMFA 中、室温で 1.5–2 時間固定した後、DW 中で 5–10 分培養することで卵膜を除去した。脱水処理をした後に、100%EtOH、-20°C で一晩以上静置した。再水和した胚は TBT (50 mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 7.4) で洗浄した後ブロッキングを行った。ブロッキングは、微小管染色の際には 10%BSA/TBT 中、室温で 2 時間行い、Vangl2 染色の際には 10%FBS/TBT 中、4°C で 2 時間行った。Vangl2 染色の際には、ブロッキングの前に Antigen Unmasking Solution (Vector Laboratories) 中で 95°C、20 分間処理することにより抗原の賦活化を行った。ブロッキングの後に一次抗体を加えて

4°Cで一晩培養し、TBT で洗浄後同様に二次抗体反応を一晩行い、再び TBT で洗浄後速やかに観察を行った。使用した抗体とその濃度は以下のとおりである。1/200 anti-ZO-1 (61-7300, Invitrogen)、1/200 anti-ZO-1 (33-9100, Invitrogen)、1/500 anti-alpha-tubulin (T9026, Sigma-Aldrich)、anti-Vangl2 (HPA027043, Sigma-Aldrich)、1/500 anti-mouse IgG Alexa 488 (A-11029, Invitrogen)、1/500 anti-rabbit IgG Alexa 594 (A11012, Invitrogen)。

ファロイジン染色の際は、前述と同様の方法で胚の固定と卵膜の除去を行った後、1/100 Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen)/PBS 中、室温で 20 分間培養した。PBS で洗浄を行った後、速やかに観察を行った。

2-2-8. 組織片の伸展

外胚葉片は、初期原腸胚期（発生ステージ 10.5）で胚から切り出し、フィブロネクチンコートをしたシリコン製チャンバー STB-CH-04 (Strex) 上に張り付けた。組織片の切り出しと培養は 1×スタインバーグ氏液中で行った。フィブロネクチンコートは、5% Fibronectin bovine plasma (SIGMA) / PBS でチャンバーを満たして一晩静置することによって行った。切り出した外胚葉片は 26°C で培養し、ステージ参照用の胚が後期原腸胚期（発生ステージ 12）に到達したときに伸展を開始した。伸展は、伸展装置 STB-100-4 (Strex) を用いて、25 分ごとにチャンバーを 2 mm ずつ伸ばすことによって行った (Figure 10)。伸展は計 5 回行い、チャンバーは最終的に 1.5 倍の長さに引き伸ばされた。最後の伸展が終わってから 25 分間静置し、ステージ参照用の胚が初期神経胚期（発生ステージ 14）に到達しているのを確認した後、MEMFA、室温で 2 時間固定した。PBS で洗浄後、

シリコン製チャンバーから剥がし、速やかに観察を行った。

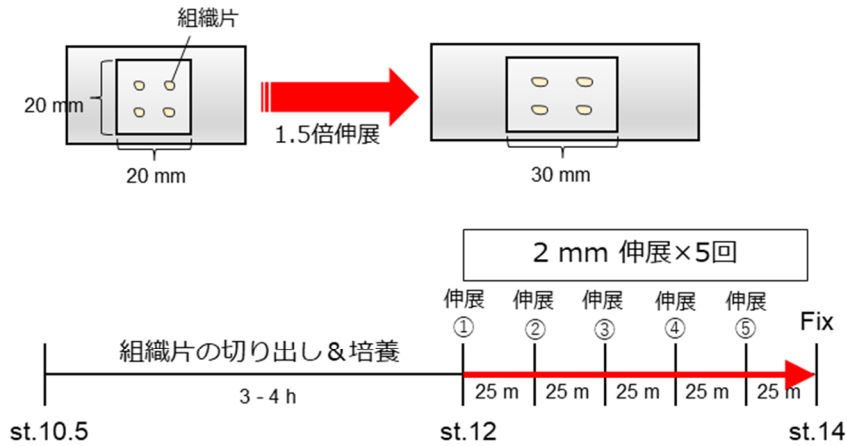


Figure 10. 組織片伸展の模式図とタイムスケジュール

組織片を張り付けたシリコンチャンバー（1辺20 mm）は、2 mm伸展を計5回行うことで、1.5倍に伸展した（長辺30 mm）。

2-2-9. 薬剤処理

ミオシン活性阻害がPCP形成に及ぼす影響を調べるために、胚を100 μ M blebbistatin (Sigma)/0.1 \times スタインバーグ氏液中、20 $^{\circ}$ Cで、後方神経外胚葉におけるPCP形成時期の間中（発生ステージ12~14）培養した。培養後、0.1 \times スタインバーグ氏液で洗浄を行い、観察した。コントロールサンプルの培養は、blebbistatin溶液と同量のDMSOを含む培養液で行った。

微小管重合阻害がPCP形成に及ぼす影響を調べるために、胚を0.001% nocodazole (Cayman Chemical)/0.1 \times スタインバーグ氏液中、20度で発生ステージ12~14の間中培養した。コントロールサンプルの培養は、nocodazole溶液と同量のDMSOを含む培養液で行った。組織伸展実験においては、組織の伸展を始める直前にnocodazole溶液を培養液

に加えた。

2-2-10. 原子間力顕微鏡法 (AFM)

胚や組織片の弾性率の測定は、倒立蛍光顕微鏡 (IX71, Olympus) 上に設置した JPK Nanowizard CellHesion 200 (Bruker) を用いて行った。カンチレバーはチップレス窒化物カンチレバー MLCT-O10 (Bruker) を用い、直径 15 μm のポリスチレン製マイクロビーズを UV 硬化接着剤 LOCTITE AA 350 (Henkel) で先端に付加して使用した。カンチレバーのばね定数はサーマルノイズ法によって決定し、ばね定数が 0.03~0.06 N/m のカンチレバーのみを使用した。カー距離曲線は以下の条件で取得した；setpoint: 3-5 nN、extend speed: 5 $\mu\text{m}/\text{s}$ 、sample rate: 1024 Hz。AFM を用いて取得したデータはすべて JPK Data Processing software (JPK) 上で解析した。ヤング率の計算には Hertz/Sneddon モデルを用い、圧入の深さは 2 μm とした。これは、細胞の高さと比べて浅いものである (Harris and Charras, 2011)。

胚の弾性率を測定する際には、あらかじめ卵膜を除去し、モデリング粘土を敷き詰めたディッシュ上に包埋した。弾性率の測定は 0.1xMMR (10 mM NaCl, 0.2 mM KCl, 0.1 mM MgSO_4 , 0.2 mM CaCl_2 , 0.5 mM HEPES, 0.01 mM EDTA, pH 7.4) 中で行った。測定領域は原口の上 400 μm x 100 μm である。AFM の z 軸可動域の限界から、測定領域は 2 領域 (200 μm x 100 μm) に分け、この 2 領域の測定の順番はランダムに設定した。測定は x 軸方向・y 軸方向ともに 12.5 μm 間隔で行った。

組織片の弾性率を測定する際には、シリコン製チャンバーを伸展装置ごと顕微鏡ステージ上に設置した。弾性率の測定は 1x スタインバーグ氏液中で行った。測定領域は組織の

端から伸展軸に沿って $400\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ であり、非伸展組織の場合は頭尾軸に沿って $400\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ とした (Figure 11)。測定は x 軸方向・y 軸方向ともに $12.5\ \mu\text{m}$ 間隔で行った。

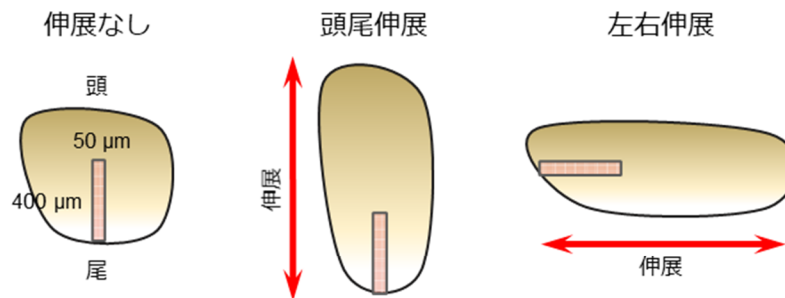


Figure 11. 組織片における弾性率の測定領域

組織片における弾性率の測定領域をピンク色で表示した。

2-2-1 1. 統計解析

統計的検定はすべて MATLAB 上で行った。胚のレーザーアブレーション実験の平均極性値と、極性軸や細胞長軸の角度以外のデータに関しては、有意差検定は Mann-Whitney U-test を用いた。レーザーアブレーション実験の極性値については、サンプルごとに内部コントロールを取得していたため、有意差検定は Wilcoxon signed rank test を用いた。極性軸や細胞長軸の角度については、Kuiper test (角度版 Kolmogorov-Smirnov test) を用いた (Berens, 2009)。プロット内の点は何を表すかや実験のサンプル数については、各図の説明文に記した。各データ群の差の有意性については、 $p < 0.05$ であるときに有意であるとした。

第2章の結果・考察については、国際学術誌にて刊行予定のため公表を差し控える。

結論

第1章では新規の細胞張力センサーを作製し、これを用いて後期原腸胚期の神経外胚葉では左右軸方向に比べて頭尾軸方向の細胞間接着部分に沿ってより大きな張力が働いていることを観察した。第2章では後期原腸胚期～初期神経胚期にかけて細胞が頭尾軸方向に顕著に伸展することを観察し、さらにレーザーアブレーション時の傷口の大きさの比較からもこの時期の神経外胚葉は頭尾軸方向に伸展されていることが確かめられた。このことから、第1章で観察された頭尾軸方向の張力は、神経外胚葉が周りの組織によって頭尾軸方向に伸展されたことに由来する張力であると考えられる。第2章ではさらに、頭尾軸方向の張力が観察されるのと同時期に神経外胚葉に出現する平面内細胞極性（PCP）に着目し、張力が極性軸の制御に関わることを明らかにした。また、この張力が単独で働くわけではなく、別のPCP制御因子として知られるWntシグナル勾配と協力して、強固なPCPを形成していることを示唆する結果を得た。機械的刺激とWntシグナルとの相互作用の有無やそのメカニズムについては、今後のさらなる研究により明らかにされる価値があるだろう。張力が細胞極性を制御するメカニズムとしては、細胞形状の変化が特に重要である可能性を考え、これを指示するようないくつかの成果を得た。ただし細胞形状が極性軸を制御する分子メカニズムについては本研究では明らかになっておらず、今後さらなる研究を行う必要があるだろう。本研究では生体内の機械的刺激を観察・操作する様々な手法を実施し、動物の初期発生を制御する新たな機械的シグナル伝達経路の存在を明らかにしており、今後の機械的シグナル研究の発展にも貢献していくことが期待される。

謝辞

本研究全般にわたり、道上達男教授をはじめ道上研究室の皆様には様々にご指導ご鞭撻を賜りました。FRET 張力センサーの作成にあたって、坪井貴司教授（東京大学）、北口哲也准教授（東京工業大学）にご助力いただきました。原子間力顕微鏡を用いた実験に関しては、Guillaume Charras 教授（University College London）をはじめ Charras 研究室の皆様にご助力いただきました。また UCL でのツメガエル胚を用いた実験では、Roberto Mayor 教授をはじめ Mayor 研究室の皆様にご助力いただきました。Wnt シグナルに関する実験に関しては、三井優輔博士（基礎生物学研究所）より様々な助言を頂き、また pCSf107-mRuby2-xPrickle3、pCSf107-xWnt11、pCS2-xCrescent をご提供いただきました。また本研究は、日本学術振興会特別研究員制度（DC1）、日本学術振興会若手研究者海外挑戦プログラムによる支援を受け遂行されました。

本研究を様々にご支援くださりました以上の方々に、厚く御礼申し上げます。

参考文献

Abe, K., and Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 13–19.

10.1073/pnas.0710504105.

Aigouy, B., Farhadifar, R., Staple, D.B., Sagner, A., Röper, J.-C., Jülicher, F., and Eaton, S.

(2010). Cell Flow Reorients the Axis of Planar Polarity in the Wing Epithelium of *Drosophila*.

Cell *142*, 773–786. 10.1016/j.cell.2010.07.042.

Aw, W.Y., Heck, B.W., Joyce, B., and Devenport, D. (2016). Transient Tissue-Scale Deformation Coordinates Alignment of Planar Cell Polarity Junctions in the Mammalian Skin. *Curr. Biol.* *26*, 2090–2100. 10.1016/j.cub.2016.06.030.

Axelrod, J.D. (2013). Mathematical modeling of planar cell polarity signaling. *Springer Proc. Math.* *15*, 27–35. 10.1007/978-3-642-20164-6_4.

Berens, P. (2009). CircStat: A MATLAB Toolbox for Circular Statistics. *J. Stat. Softw.* *31*. 10.18637/jss.v031.i10.

Butler, M.T., and Wallingford, J.B. (2017). Planar cell polarity in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 375–388. 10.1038/nrm.2017.11.

Butler, M.T., and Wallingford, J.B. (2018). Spatial and temporal analysis of PCP protein dynamics during neural tube closure. *Elife* *7*, e36456. 10.7554/eLife.36456.

Carron, C., Bourdelas, A., Li, H.Y., Boucaut, J.C., and Shi, D.L. (2005). Antagonistic interaction between IGF and Wnt/JNK signaling in convergent extension in *Xenopus* embryo. *Mech. Dev.* *122*, 1234–1247. 10.1016/J.MOD.2005.06.007.

Chen, W.S., Antic, D., Matis, M., Logan, C.Y., Povelones, M., Anderson, G.A., Nusse, R., and Axelrod, J.D. (2008). Asymmetric Homotypic Interactions of the Atypical Cadherin Flamingo Mediate Intercellular Polarity Signaling. *Cell* *133*, 1093–1105. 10.1016/j.cell.2008.04.048.

Chervin-Pétinot, A., Courçon, M., Almagro, S., Nicolas, A., Grichine, A., Grunwald, D., Prandini, M.H., Huber, P., and Gulino-Debrac, D. (2012). Epithelial Protein Lost In Neoplasm (EPLIN) interacts with α -catenin and actin filaments in endothelial cells and stabilizes vascular capillary network in vitro. *J. Biol. Chem.* *287*, 7556–7572. 10.1074/jbc.M111.328682.

- Chien, Y., Srinivasan, S., Keller, R., and Kintner, C. (2015). Mechanical strain determines the axis of planar polarity in ciliated epithelia. *Curr. Biol.* *25*, 2774–2784.
10.1016/j.cub.2015.09.015.
- Chien, Y., Srinivasan, S., Keller, R., and Kintner, C. (2018). Mechanical strain determines cilia length , motility and planar position in the left-right organizer. *Dev. Cell* *45*, 316-330.e4.
10.1016/j.devcel.2018.04.007.
- Chu, C.-W., and Sokol, S.Y. (2016). Wnt proteins can direct planar cell polarity in vertebrate ectoderm. *Elife* *5*, e16463. 10.7554/eLife.16463.
- Devenport, D. (2014). The cell biology of planar cell polarity. *J. Cell Biol.* *207*, 171–179.
10.1083/jcb.201408039.
- Ewen-Campen, B., Comyn, T., Vogt, E., and Perrimon, N. (2020). No Evidence that Wnt Ligands Are Required for Planar Cell Polarity in *Drosophila*. *Cell Rep.* *32*, 108121.
10.1016/j.celrep.2020.108121.
- Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliot, G., Garrett, L., English, M.A., Andre, P., Robinson, J., Sood, R., Minami, Y., et al. (2011). Wnt Signaling Gradients Establish Planar Cell Polarity by Inducing Vangl2 Phosphorylation through Ror2. *Dev. Cell* *20*, 163–176.
10.1016/j.devcel.2011.01.001.
- Goodrich, L. V., and Strutt, D. (2011). Principles of planar polarity in animal development. *Development* *138*, 1877–1892. 10.1242/dev.054080.
- Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin

reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* *466*, 263–266. 10.1038/nature09198.

Gray, R.S., Roszko, I., and Solnica-Krezel, L. (2011). Planar Cell Polarity: Coordinating Morphogenetic Cell Behaviors with Embryonic Polarity. *Dev. Cell* *21*, 120–133. 10.1016/j.devcel.2011.06.011.

Hannus, M., Feiguin, F., Heisenberg, C.P., and Eaton, S. (2002). Planar cell polarization requires widerborst, a B' regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *Development* *129*, 3493–3503.

Harris, A.R., and Charras, G.T. (2011). Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements. *Nanotechnology* *22*, 345102. 10.1088/0957-4484/22/34/345102.

Jenny, A. (2010). Planar cell polarity signaling in the drosophila eye. *Curr. Top. Dev. Biol.* *93*, 189–227. 10.1016/B978-0-12-385044-7.00007-2.

Jenny, A., Darken, R.S., Wilson, P.A., and Mlodzik, M. (2003). Prickle and strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. *EMBO J.* *22*, 4409–4420. 10.1093/emboj/cdg424.

Ku, M., and Melton, D.A. (1993). Xwnt-11: A maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development* *119*, 1161–1173.

Kumar, A., Ouyang, M., Van den Dries, K., McGhee, E.J., Tanaka, K., Anderson, M.D., Groisman, A., Goult, B.T., Anderson, K.I., and Schwartz, M.A. (2016). Talin tension sensor reveals novel features of focal adhesion force transmission and mechanosensitivity. *J. Cell Biol.* *213*, 371–383. 10.1083/jcb.201510012.

Lagendijk, A.K., Gomez, G.A., Baek, S., Hesselson, D., Hughes, W.E., Paterson, S., Conway, D.E., Belting, H.G., Affolter, M., Smith, K.A., et al. (2017). Live imaging molecular changes in junctional tension upon VE-cadherin in zebrafish. *Nat. Commun.* *8*. 10.1038/s41467-017-01325-6.

Luxenburg, C., Heller, E., Pasolli, H.A., Chai, S., Nikolova, M., Stokes, N., and Fuchs, E. (2015). Wdr1-mediated cell shape dynamics and cortical tension are essential for epidermal planar cell polarity. *Nat. Cell Biol.* *17*, 592–604. 10.1038/ncb3146.

Mahaffey, J.P., Grego-Bessa, J., Liem, K.F., and Anderson, K. V. (2013). Cofilin and Vangl2 cooperate in the initiation of planar cell polarity in the mouse embryo. *Dev.* *140*, 1262–1271. 10.1242/dev.085316.

Mancini, P., Ossipova, O., and Sokol, S.Y. (2021). The dorsal blastopore lip is a source of signals inducing planar cell polarity in the *Xenopus* neural plate. *Biol. Open* *10*. 10.1242/BIO.058761.

Matis, M., Russler-Germain, D.A., Hu, Q., Tomlin, C.J., and Axelrod, J.D. (2014). Microtubules provide directional information for core PCP function. *Elife* *3*, e02893. 10.7554/eLife.02893.

Maul, R.S., Song, Y., Amann, K.J., Gerbin, S.C., Pollard, T.D., and Chang, D.D. (2003). EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments. *J. Cell Biol.* *160*, 399–407. 10.1083/jcb.200212057.

Meng, F., and Sachs, F. (2011). Visualizing dynamic cytoplasmic forces with a compliance-matched FRET sensor. *J. Cell Sci.* *124*, 261–269. 10.1242/jcs.071928.

Nestor-Bergmann, A., Goddard, G., Woolner, S., and Jensen, O.E. (2018). Relating cell shape and mechanical stress in a spatially disordered epithelium using a vertex-based model. *Math.*

Med. Biol. *35*, 1–27. 10.1093/imammb/dqx008.

Nestor-Bergmann, A., Stooke-Vaughan, G.A., Goddard, G.K., Starborg, T., Jensen, O.E., and Woolner, S. (2019). Decoupling the Roles of Cell Shape and Mechanical Stress in Orienting and Cueing Epithelial Mitosis. *Cell Rep.* *26*, 2088–2100.e4. 10.1016/j.celrep.2019.01.102.

Olofsson, J., Sharp, K.A., Matis, M., Cho, B., and Axelrod, J.D. (2014). Prickle/spiny-legs isoforms control the polarity of the apical microtubule network in planar cell polarity. *Development* *141*, 2866–2874. 10.1242/DEV.105932.

Ossipova, O., Kim, K., and Sokol, S.Y. (2015). Planar polarization of Vangl2 in the vertebrate neural plate is controlled by Wnt and Myosin II signaling. *Biol. Open* *4*, 722–730. 10.1242/bio.201511676.

Peng, Y., and Axelrod, J.D. (2012). 10.1016/B978-0-12-394592-1.00002-8 (Elsevier Inc.) 10.1016/B978-0-12-394592-1.00002-8.

Periasamy, A., Wallrabe, H., Chen, Y., and Barroso, M. (2008). 10.1016/S0091-679X(08)00622-5 (Elsevier Inc.) 10.1016/S0091-679X(08)00622-5.

Qian, D., Jones, C., Rzadzinska, A., Mark, S., Zhang, X., Steel, K.P., Dai, X., and Chen, P. (2007). Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev. Biol.* *306*, 121–133. 10.1016/j.ydbio.2007.03.011.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682. 10.1038/nmeth.2019.

Sepich, D.S., Usmani, M., Pawlicki, S., and Solnica-Krezel, L. (2011). Wnt/PCP signaling

controls intracellular position of MTOCs during gastrulation convergence and extension movements. *Development* *138*, 543–552. 10.1242/dev.053959.

Shibata, M., Itoh, M., Hikasa, H., Taira, S., and Taira, M. (2005). Role of crescent in convergent extension movements by modulating Wnt signaling in early *Xenopus* embryogenesis. *Mech. Dev.* *122*, 1322–1339. 10.1016/j.mod.2005.06.002.

Shimada, Y., Yonemura, S., Ohkura, H., Strutt, D., and Uemura, T. (2006). Polarized transport of Frizzled along the planar microtubule arrays in *Drosophila* wing epithelium. *Dev. Cell* *10*, 209–222. 10.1016/j.devcel.2005.11.016.

Singh, J., and Mlodzik, M. (2012). Planar cell polarity signaling: Coordination of cellular orientation across tissues. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *1*, 479–499. 10.1002/wdev.32.

Sokol, S.Y. (2015). Spatial and temporal aspects of Wnt signaling and planar cell polarity during vertebrate embryonic development. *Semin. Cell Dev. Biol.* *42*, 78–85. 10.1016/j.semcdb.2015.05.002.

Strutt, H., Gamage, J., and Strutt, D. (2016). Robust Asymmetric Localization of Planar Polarity Proteins Is Associated with Organization into Signalosome-like Domains of Variable Stoichiometry. *Cell Rep.* *17*, 2660–2671. 10.1016/j.celrep.2016.11.021.

Sunyer, R., Conte, V., Escribano, J., Elosegui-Artola, A., Labernadie, A., Valon, L., Navajas, D., García-Aznar, J.M., Muñoz, J.J., Roca-Cusachs, P., et al. (2016). Collective cell durotaxis emerges from long-range intercellular force transmission. *Science* (80-.). *353*, 1157–1161. 10.1126/science.aaf7119.

Tada, M., and Smith, J.C. (2000). Xwnt11 is a target of *Xenopus* Brachyury: Regulation of

gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway.

Development *127*, 2227–2238.

Tan, S.E., Tan, W., Fisher, K., and Strutt, D. (2021). QuantifyPolarity, a new tool-kit for measuring planar polarized protein distributions and cell properties in developing tissues.

Development 10.1242/DEV.198952.

Tree, D.R.P., Shulman, J.M., Rousset, R., Scott, M.P., Gubb, D., and Axelrod, J.D. (2002).

Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling.

Cell *109*, 371–381. 10.1016/S0092-8674(02)00715-8.

Vladar, E.K., Bayly, R.D., Sangoram, A.M., Scott, M.P., and Axelrod, J.D. (2012). Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. *Curr. Biol.* *22*, 2203–2212.

10.1016/j.cub.2012.09.046.

Wang, Y., and Nathans, J. (2007). Tissue/planar cell polarity in vertebrates: New insights and new questions. *Development* *134*, 647–658. 10.1242/dev.02772.

Wu, J., and Mlodzik, M. (2008). The Frizzled Extracellular Domain Is a Ligand for Van

Gogh/Stbm during Nonautonomous Planar Cell Polarity Signaling. *Dev. Cell* *15*, 462–469.

10.1016/j.devcel.2008.08.004.

Wu, J., Roman, A.C., Carvajal-Gonzalez, J.M., and Mlodzik, M. (2013). Wg and Wnt4 provide long-range directional input to planar cell polarity orientation in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* *15*,

1045–1055. 10.1038/ncb2806.

Yamashita, S., Tsuboi, T., Ishinabe, N., Kitaguchi, T., and Michiue, T. (2016). Wide and high

resolution tension measurement using FRET in embryo. *Sci. Rep.* *6*, 28535. 10.1038/srep28535.

Yu, J.J.S., Maugarny-Calès, A., Pelletier, S., Alexandre, C., Bellaïche, Y., Vincent, J.P., and McGough, I.J. (2020). Frizzled-Dependent Planar Cell Polarity without Secreted Wnt Ligands. *Dev. Cell* 54, 583-592.e5. [10.1016/j.devcel.2020.08.004](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.08.004).