

博士論文

アフリカツメガエルの初期胚予定神経領域における細胞の  
配列、張力の変化の研究

山下 慧

要旨	1
研究の背景	3
第1章：細胞配列の定量的な比較の方法と初期胚への応用	7
概要	7
1.1・背景	7
1.2・方法	9
1.2.1 <i>Xenopus</i> 胚の固定とアクチンフィラメントの染色	9
1.2.2 画像解析	9
1.3・結果	10
1.3.1 小グラフの構成による細胞配列の定量的な記述法	10
1.3.2 19種の主要な小グラフが <i>Xenopus</i> 原腸胚の外胚葉に含まれていた	12
1.3.3 区画間で細胞配列を比較するための関数	14
1.3.4 細胞配列の境界とその挙動	16
1.3.5 細胞配列上の境界の空間的分布と神経－表皮境界との対応	18
1.4・考察	21
第2章：FRET張力センサーを用いた外胚葉の張力分布の解析	23
概要	23
2.1・背景	23
2.2 方法	25
2.2.1 コンストラクト	25
2.2.2 細胞培養とトランスフェクション	25
2.2.3 <i>Xenopus</i> 胚への微量注入	26
2.2.4 蛍光染色	26
2.2.5 共焦点顕微鏡観察	26
2.2.6 FRAP 解析	27
2.2.7 FRET 解析	27
2.2.8 Acceptor photo-bleaching	28
2.2.9 細胞と組織の変形の計算	28

2.3・結果	29
2.3.1 培養細胞系および胚を用いた張力センサーの機能評価	29
2.3.2 <i>Xenopus</i> の初期胚外胚葉における張力計測	36
2.3.3 組織の形態形成に伴う細胞の変形と再配列	39
2.4・考察	43
総括	46
謝辞	47
参考文献	48

## 要旨

初期発生において、組織の分化と形態形成、またその形態形成の原動力となる細胞の変形や物性の変化、再配列などは相互に影響を与え合っている。組織の分化に伴う増殖のスピード、細胞骨格、モータータンパク質や細胞間接着タンパク質の発現の変化は細胞の密度、形状、硬さ、または移動性を変化させ組織の形態形成を引き起こす。同時に細胞は形態形成によって引き起こされた張力の変化などを敏感に感知し、細胞内にシグナルを伝えて転写制御をおこなっている。すなわち細胞の配列や硬さ、細胞間、細胞内で発生している張力は遺伝子の発現の変化と同等に組織の正常な発生において重要な役割を持つ。しかし、遺伝子の発現を解析する様々な手法が確立しているのに対し、細胞の配列や物性を解析する実験系は少なく十分な研究がなされてきていない。

本研究ではアフリカツメガエルの原腸胚及び神経胚を用い、外胚葉から神経系と表皮がそれぞれ分化する際の細胞の配列、細胞内に発生する張力の変化を解析した。本博士論文は2章立てで構成されている。第1章では細胞の配列の研究について述べる。外胚葉での細胞配列の変化を調べるため、2つの細胞配列の相同性を定量的に評価する論理的枠組みと実験系を作り、これを外胚葉の細胞配列に応用した。次に、細胞配列を細胞同士の隣接関係のみで表したグラフモデルに変換し、様々な種類の小さいグラフそれぞれが全体のグラフの中で占める割合を用いて細胞配列を再定義した。これにより任意の2つの細胞配列の間で相同性を計算することが可能になった。原腸胚期から神経胚期にかけて外胚葉の細胞配列を解析したところ、原腸胚期後期から将来中枢神経系になる予定神経領域と表皮になる領域との間に細胞配列の変化する境界が現れることがわかった。第2章では細胞内に発生する張力の研究について述べる。外胚葉で細胞にかかっている張力を測定するため本研究ではFRET張力センサーを用いた。FRET張力センサーはもともと培養細胞系で開発されたプローブであり胚での利用が報告されているものがなかったため、プローブの張力センサーとしての機能の評価から行った。本研究で用いたプローブはアクチンフィラメントと共局在し、アクチンフィラメント上に発生している張力を反映してFRET効率を変化させた。このプローブを用いて

原腸胚期から神経胚期にかけての外胚葉の細胞内に発生している張力を測定したところ、表皮領域に比べ予定神経領域で高い張力が発生していることがわかった。また、側方予定表皮領域と予定神経領域がそれぞれ前後軸方向に伸長する際の細胞の挙動と細胞群の変形を解析したところ、側方予定表皮領域では細胞自身が伸長することにより、また予定神経領域では細胞が再配列することにより細胞群全体が前後軸方向に伸長していることがわかった。

これらの結果から、アフリカツメガエルの外胚葉では原腸胚期後期から表皮領域と神経領域の間で細胞配列、細胞内に発生している張力の両方が変化していることがわかった。神経領域では表皮領域に比べより活発に細胞再配列が起こっており、その差が両領域間の細胞配列の違いを生み出していると考えられる。細胞内に発生している張力は細胞の外力に対する硬さとして組織の形態形成時に細胞の変形、再配列を制御している可能性が示唆された。

## 研究の背景

胚発生において、組織の分化と形態形成は様々なタイプの制御を受けている。伝統的な分化誘導のモデルでは、隣接する細胞の表面にある分子や離れたところにあるオーガナイザーから分泌された分子が細胞膜にある受容体に結合し、細胞内をシグナルが伝わって遺伝子の発現が制御される。様々な組織やその原基でマスター遺伝子が同定されており、細胞がシグナルに応答してそのマスター遺伝子を発現すると細胞の分化運命が決定される。マスター遺伝子は他の様々な遺伝子の転写を調節し、その組織の発生に必要な遺伝子を発現させる。これらの遺伝子の中には細胞骨格や細胞接着に関わるものも含まれており、組織全体で協調してその発現が調節されることにより形態形成が駆動される。

形態形成を駆動する力は様々な形で制御されている。微小管の配向による細胞の伸長や、アクチンフィラメントのアピカルコンストリクションまたは核の移動による細胞のコーン型への変形など、個々の細胞の変形は局所的な力を生み出す。方向性を持った細胞分裂や局所的な細胞増殖、収斂伸長やラディアルインターカレーション (図0.1 A, B) などの細胞再配列は組織全体に力の分布の変化をもたらす。*Drosophila* を用いた近年の研究から、細胞内、細胞間の各所にかかる力が細胞の再配列を制御していることがわかり (Bertet et al., 2004; F.Gonzalez et al., 2009; Collinet et al., 2015)、細胞の再配列と組織にかかる物理的な力が相互に作用していることが明らかになりつつある。

これまで提唱されてきた胚発生モデルでは、細胞の外から分子が細胞を分化誘導し、分化誘導された細胞が形態形成を駆動する力を生み出すとされてきた。一方で、細胞は細胞膜や接着複合体、細胞骨格系にかかる張力に応答して細胞内にシグナルを伝える”mechano-sensing”を備えている (Desprat et al., 2008; Hayakawa et al., 2008; Hirata et al., 2015)。近年の研究から物理的な力が誘導分子と同様に組織の分化誘導に関わっていることがわかってきた (Engler et al., 2006; Dupont et al., 2011)。機械応答は物理的刺激を感覚神経の活動電位に変える、あるいは遊走細胞の運動性を変えるなどの生理的な機能だけでなく、核内に直接シグナルを伝えて遺伝子の転写調節を行うこともある。幹細胞を様々な硬さのゲルの上で培

養することにより分子的な誘導なしで各組織への分化誘導が可能である。また、実際の胚の中でも物理的な力に応答して核内に移行して転写調節を行う転写調節因子とその標的遺伝子が発見されている (Farge, 2003; Desprat et al., 2008; Lau et al., 2015)。すなわち、胚発生において細胞間、細胞内の分子的なシグナル伝達、細胞の配列と再配列、細胞増殖、細胞内、細胞間に発生している物理的な力はすべて相互に作用しあっている。

これまでの細胞配列の研究では組織ごとの特異的な配列が注目された。ある程度の複雑さを持つ組織は概ね複数種の細胞からなり、それぞれの細胞種の隣接関係が決まっているため、その組織に特異的な細胞配列を持つ。また、形態形成中の組織に現れる特殊な細胞再配列の様式が発見されている (Blankenship et al., 2006)。一方、組織の硬さや発生している張力の研究では、いくつかの測定法が開発され応用されてきた。測定法は大まかに分けて、外から力を加えた際の変形を計測するもの、構造を破壊して張力を解放した時の周囲の変形を計測するもの (図0.1 C-E)、物理的な力に応答する分子プローブを用いるものなどが挙げられる。

しかし、遺伝子の発現を評価する様々な手法が確立しているのに対し、細胞配列の解析法や張力などの物性の測定法は未だに問題も多く、取得できるデータも限られている。2つの細胞配列の相同性を遺伝子の相同性のように評価するのは難しい。細胞の大きさや隣接する細胞の数のばらつきなどを指標に細胞配列同士を比較することはできるが (Escudero et al., 2011)、その方法で相同性が高いと評価された細胞配列同士が他の指標を用いても同じように類似しているとは限らない。また、張力や硬さの計測は組織中の一点で行われるため解像度が低く、侵襲的な手法を用いると時間分解能も低くなる。そのため、組織内、組織間にわたる物性の正確な分布を計測することはできていない。

本研究ではアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚を用い、外胚葉か中枢神経系の原基が分化する際の細胞配列と張力の変化を解析した。任意の細胞配列を定量的に記述する新しい方法の論理的枠組みと実験系を開発した。この方法は全体の細胞配列を局所的な細胞の隣接関係の集合として扱う。直感的な解釈が難しく2つの細胞配列が相異なるとわかってこそ

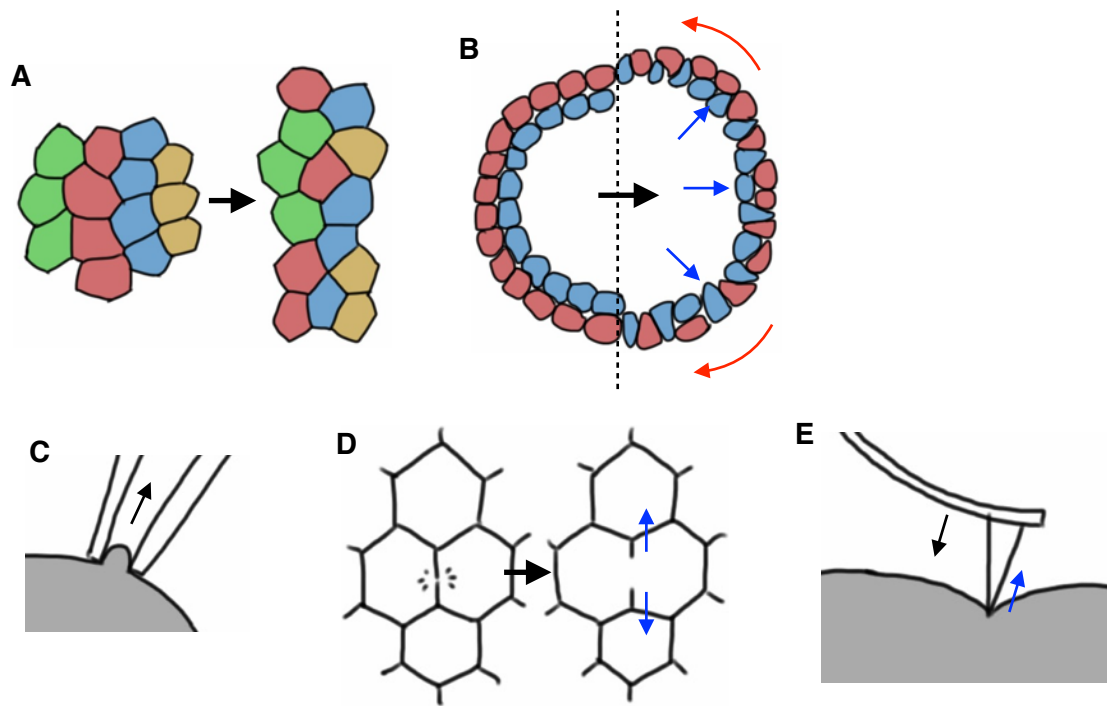


図0.1 形態形成を駆動する細胞の再配列と組織の物性の計測法

(A) 組織の収縮伸長。細胞が横方向に移動してお互いの間に割り込むことで組織は上下方向に伸長する。(B) ラディアルインターカレーション。図は2層の細胞層からなる球または管構造の組織の断面図。下層の細胞（青）が青矢印方向に移動し上層（赤）に割り込むことで組織は赤矢印の方向に広がる。(C) Micropipette aspiration. 組織の表面を矢印の方向に一定の圧力で吸引した時どれだけでっばるかで表面張力を測ることができる。(D) Laser ablation. 細胞間接着面をレーザーで焼き切り、ギャップが青矢印の方向に広がる速さを測ることで細胞間接着面にかかっていた張力を推定する。(E) 原子間力顕微鏡を用いた組織の硬さの計測。プローブを黒矢印の方向に押し付けた時青矢印の方向にどれだけ押し戻されるかを観察することで組織の硬さを計測できる。

れがどのような違いであるのかはわからないが、逆にどのような性質の違いでも検出することができる。これを用いて*Xenopus* 胚の外胚葉を解析したところ、マスター遺伝子の発現領域が中枢神経系の原基の境界を示すよりも先に原基の内外で細胞配列が変化することがわかった。外胚葉にかかる張力を非侵襲的、継時的、高解像で計測するために分子プローブを*Xenopus* 胚に導入した。張力を測定するための分子プローブはもともと培養細胞系で開発されたものであるので (Grashoff et al., 2010; Meng & Sachs, 2011; Borghi et al., 2012; Conway et al., 2013)、まず胚内でプローブとして機能するかの評価を行った。プローブは毒性もなく、実験的に加えられた力の変化に応答した。外胚葉にかかる張力を測定したところ、分子プローブは細胞レベルの解像度で力の分布を示し、中枢神経系の原基で周囲の表皮性外胚葉よりも高い張力が発生していることがわかった。この研究は脊椎動物の胚全体で張力計測を行った最初の例であることを指摘しておく。

# 第1章：細胞配列の定量的な比較の方法と初期胚への応用

## 概要

細胞接着の特性は細胞の分化状態とともに変化し、形態形成中の組織内において特異的な細胞再配列を引き起こしている。逆に、このような細胞配列の違いは接着の特性が変化した結果であると考えられる。すなわち、細胞配列は分化や表現型の指標になると期待される。しかし、一般の細胞配列を記述できる理論的な系も実験系も確立されているものはない。本研究において私は細胞配列を定量的に扱えるようにするために、細胞配列を細胞同士の隣接関係に簡略化したグラフモデルを用いた。細胞群のグラフの中に相異なる小さなグラフがそれぞれどれほどの量含まれているかという観点から細胞配列を記述する方法を新しく定義した。ベクトル形式で表されるこの記述法により細胞配列を領域間で比較することが可能になった。*Xenopus*の外胚葉を解析したところ、原腸胚期後期においてベクトルの変化する部位が背側と腹側の中間に現れ、神経胚期初期にその部位は背側正中線に向かって移動した。この移動は予定神経領域の移動と大まかに一致した。さらに、細胞配列が変化する領域の境界は神経―表皮境界と一致した。以上の結果より、細胞配列のグラフモデルは顕微鏡写真の直感的な観察では弁別することのできなかった細胞配列間の違いを見分けることができることが示された。細胞配列の境界の挙動は神経―表皮の境界と一致すること、さらには神経領域の決定が原腸胚期後期に始まっていることを示唆している。

## 1.1・背景

胚発生の間、細胞配列は動的に制御されている。何度かの卵割ののち、胚は分化中の組織を互いに分けるため、あるいは形態形成を駆動するため、細胞の再配列を始める。この時、細胞は接着特性を変えることにより選択的親和性を達成し、細胞のソーティングが行われている。同じ接着特性を示す細胞群の中においてさえも、細胞骨格系や接着因子の局在は環境に依存して極性を持っているので、細胞間の接着も一様ではない (Zalle nad Wieschaus, 2004; Shindo et al., 2008)。極性を持った細胞の接着特性は組織の形態形成を駆動する細胞

再配列にとって重要であり (Bertet et al., 2004; Blankenship et al., 2006; Rauzi et al., 2010)、細胞間の接着のパターンに特異的な細胞配列が形成される。実際、細胞の面積や接する他の細胞の数などの特性を計上することにより、異なる組織、生物種、発生段階や遺伝的背景を持つ上皮組織を見分けることが可能である (Escudero et al., 2011)。よって、細胞配列は分化中の領域の間で異なっており、また細胞配列の違いはその領域が分化しつつあることを示していると言える。

*Xenopus* 胚において原腸陥入の間、予定神経領域は前後軸方向に伸長し中央側方軸方向に狭まる。続く神経胚期において神経堤が持ち上がり、神経板が折れ曲がり、さらに神経板の両端がジッパーのように閉じて神経管を表皮の内側にとじこむことによって神経領域は表皮領域から分離する。神経管閉鎖の制御には *shroom* や *actomyosin* (Hildebrand, 20005; Haigo et al., 2003)、微小管系 (Lee et al., 2007)、*nectin-2* と *N-cadherin* (Morita et al., 2010) など多くの細胞骨格や接着タンパク質が関わっており、さらにそれらに極性を与える *planar cell polarity* 経路 (Nishimura et al., 2012) も関与する。一方で、これらの細胞骨格系、細胞接着のネットワークを構成する要素が神経管閉鎖が起こるよりも前の予定神経領域の形成、制御においてどのような役割を持っているかについては、神経系への分化が起こる正確な発生段階が不明であること、原腸胚期から神経胚期初期において神経外胚葉と表皮外胚葉を弁別する確かな方法がないことなどの理由により詳しいことはわかっていない。現在、原腸胚期の形態形成に関する研究は主に中胚葉の細胞が側方から背側正中線に集まって全体が前後軸方向に伸長する収斂伸長に限定されている (Keller et al., 1992; Elul and Keller, 2000; Ezina et al., 2006; Skoglund et al., 2008)。

本研究で私はグラフモデルで表された細胞配列に小グラフの構成を導入し、細胞配列の定量的な記述を可能にした。数学のグラフ理論においてグラフとは頂点の集合と2つの頂点間をつなぐ辺の集合からなり、これを用いることにより細胞配列は3つ以上の細胞が接する点に頂点を、2つの細胞の接着面に辺を対応させることで表現される (Farhadifar et al., 2007; Landsberg et al., 2009) (図1.1 A, B)。半径  $r$  の小グラフは半径  $r$  の誘導部分グラフとして

定義され、局所的な細胞配列を表す。小グラフの構成は各種の小グラフがそれぞれどのぐらいの量ある領域に含まれるかを数えたものとして定義され、これにより一般の細胞配列を比較することが可能になった。この小グラフ及びその構成はPržuljら (Pržulj et al., 2004) の提案した、ある決まった個数の頂点からなるグラフによって定義される”graphlet”の細分化と一般化に相当する。この手法を用いて原腸陥入の間のいつ、どこで神経と表皮の境界が出現するのかを探った。

## 1.2・方法

### 1.2.1 *Xenopus* 胚の固定とアクチンフィラメントの染色

原腸胚期から神経胚期の*Xenopus* 胚の卵膜を除去し、4% formaldehyde/1 × Steinberg’s solution (3.4 g NaCl, 0.05 g KCl, 0.08 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.205 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.56g Tris / 1 L  $\text{H}_2\text{O}$ ) で固定した。固定胚を半球状に切断して中胚葉を取り除き1% TritonX-100 /1 × PBS で一晩透過処理した。透過処理した外胚葉を5% Immuno-block (FBM), 0.5% TritonX-100 /1 × PBS でブロッキングした後Alexa Fluor 488 phalloidine (Invitrogen) を加え一晩培養した。洗浄の後外胚葉を80% glycerol に包埋しプレパラートにした。

外胚葉の顕微鏡画像を共焦点顕微鏡LSM510 (Carl Zeiss) またはC2 (Nikon Instech) により取得した。

### 1.2.2 画像解析

得られた顕微鏡画像をImageJ (Wayne Rasband) およびGimp (The Gimp Development Team) を用いて処理し、細胞のマスキングと広範囲画像のタイリングを行った。各細胞は手作業マスクされた。マスクされた画像は本研究で開発したソフトウェアを用いてグラフ化された。細胞間の境界は分水嶺検出アルゴリズムを用いて決められた。細胞が分画された画像上でFarhadifar et al. (2007) の方法に若干の改良を加えたもので細胞接着面の上に頂点と辺を配置した。区画はグラフィカルユーザーインターフェース上で手作業で取られた。小グラ

フの解析において、起点を起点に移すような同型写像がある小グラフ同士を同じ種類の小グラフとし、隣接行列の標準型を用いて同定された。隣接行列は行列の行と列に頂点を対応させ、頂点同士が隣接しているかどうかを成分の1または0で表したものである。1の成分がなるべく対角線の近くで左上側に来るように行と列を並べ替えたものを小グラフの隣接行列の標準型とした。この標準型は一意に定まり同型な小グラフの間で同一のものになる。

## 1.3・結果

### 1.3.1 小グラフの構成による細胞配列の定量的な記述法

表皮の細胞シートにおいてはアクチンフィラメントと接着結合は頂端側側面に局在し、接着結合が秩序だったパターンに則って分解、組み立てられる細胞間接着面のリモデリングにより細胞の再配列が引き起こされる。グラフモデルはこの細胞間接着面を辺によって表しており、そのため細胞再配列は辺の収縮と拡張に相当する。図1.1A, Bに表皮組織の細胞配列のグラフ化の例を図示する。このグラフにおいて頂点は平面上の点である。明確化のため、以降の文章において発生運命や発現遺伝子によって決めることのできる空間を”領域”、これに対し適当に区切られた空間を”区画”と表記する。適当な区画を細胞シート上にとった時、その区画に含まれるすべての頂点の部分集合を作ることができる（図1.1B）。

ある頂点 $v$ に対し、 $U$ を $v$ からの距離（二つの頂点をつなぐのに必要な辺の最小本数）が $r$ 以下であるすべての頂点の集合とする。半径 $r$ の小グラフを $U$ によって誘導される部分グラフ（ $U$ に含まれる頂点及びその頂点の間にあるすべての辺からなる部分グラフ）によって定義する（図1.1C）。 $U$ を作る元となった頂点 $v$ は小グラフの中心点（他の頂点までの距離が最小の頂点、複数ある場合もある）であるが、他の中心点との混同を避けるため”起点”と呼ぶことにする。また、小グラフを起点、あるいは単純に頂点から作られると表記することにする。Graphlet (Pržulj et al., 2004) がある数の頂点からなるグラフとして定義されたのに対し、小グラフは起点からの距離によって定義されている。Graphlet と小グラフは相互に相

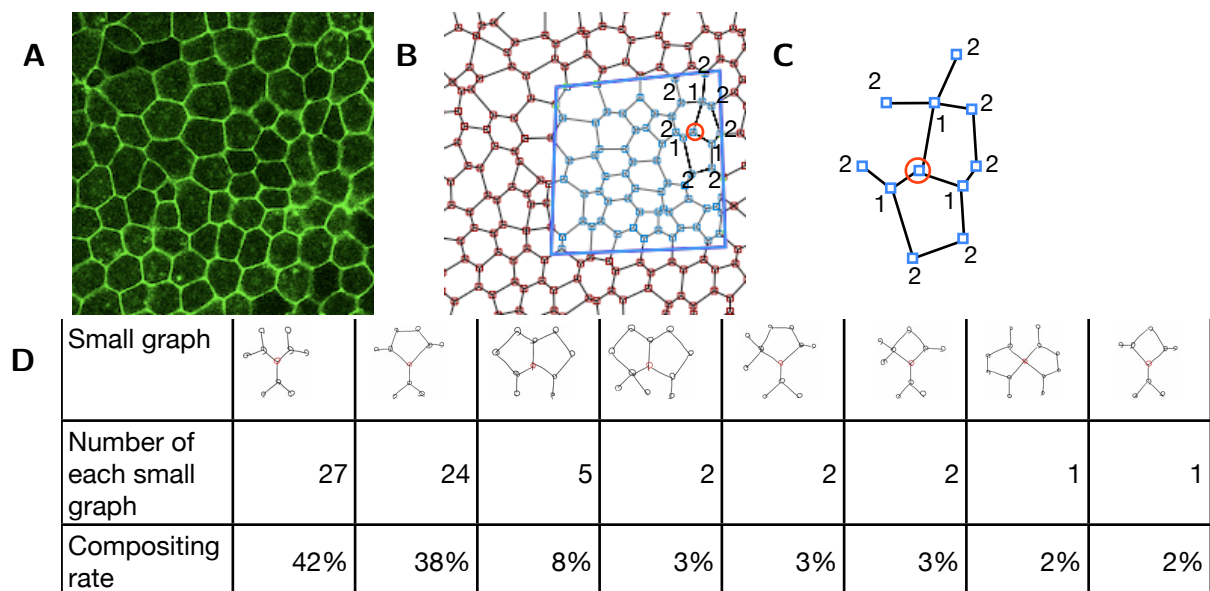


図1.1 小グラフとその構成の定義

(A, B) 細胞膜がGFP で標識された*Xenopus* 原腸胚の外胚葉の細胞シート (A) とグラフによる表現 (B)。3つ以上の細胞が接する点に頂点（赤、青の四角）、細胞間接着面に辺（黒線）を対応させている。1つの面が1つの細胞に対応する。細胞配列上に取りられた区画を (B) の青の四角い枠で表し、その区画に含まれる頂点を青で表示する。頂点の脇に降られた番号は赤丸で囲まれた頂点からの距離を表す。(C) (B) の赤丸で囲まれた頂点から作られた半径2の小グラフ。(D) (B) の青枠で囲まれた区画の小グラフの構成。表の上の行に赤い頂点を起点とする小グラフを図示する。真ん中の行は区画に含まれるそれぞれ的小グラフの数を、下の行はそれぞれの構成比を表す。

手を包含するものであり、例えば”5-node-graphlet”はすべて半径2の小グラフの部分グラフであるが、細胞配列に含まれる小グラフもまた十分に大きな数の頂点からなるgraphletの部分グラフである。細胞配列から作られるグラフは頂点の次数（頂点に接合する辺の数）がほぼ一定になるので、小グラフは細胞配列の解析により適している。

区画に含まれるすべての頂点それぞれから小グラフを作ることができる。ある区画に対し、半径 $r$ の小グラフの構成、あるいは単純に小グラフの構成をその区画に含まれる小グラフの各種それぞれを数えたものの集まりとして定義する (図1.1D)。小グラフの構成は区画全体に広がるグラフを緩く反映している。もし2つの区画が同型なグラフの上にとられているならば両区画の小グラフの構成は同じになる。また、隣接する（1つの辺の両端にある）頂点から作られる小グラフの対として可能なものは限られているので、小グラフの構成はその区画に対して可能な幾つかのグラフを決定する。

小グラフの構成内的小グラフの数、あるいは区画の広さを無視するため、各小グラフが小グラフの構成内で占める割合を表す構成比を利用する (図1.1D)。以降においては、半径2の小グラフおよび150から400の小グラフを含む区画を解析の対象とする。

### 1.3.2 19種の主要な小グラフが*Xenopus*原腸胚の外胚葉に含まれていた

本研究で開発したソフトウェアを用い、原腸陥入中の*Xenopus*胚の外胚葉をグラフ化して小グラフの構成を解析した。すると、背側外胚葉内で400種以上の小グラフが同定された。解析された細胞配列のグラフの内、19種の小グラフはほぼすべての区画に含まれていた。この19種を主要な小グラフと呼ぶことにする (図1.2A)。

このうち、s5とs6と名付けられたものは各区画に多量に含まれていた（構成比はそれぞれ33.1%と22.8%）。s5は他の主要な小グラフとの変換の容易さによって特徴付けられる。例えばs5は、1本の辺の収縮により六角形だった細胞が五角形になることでs3に変換できる (図1.2B)。同様に、s5は周囲の条件に依存して1本の辺の伸長、収縮により他の11種の主

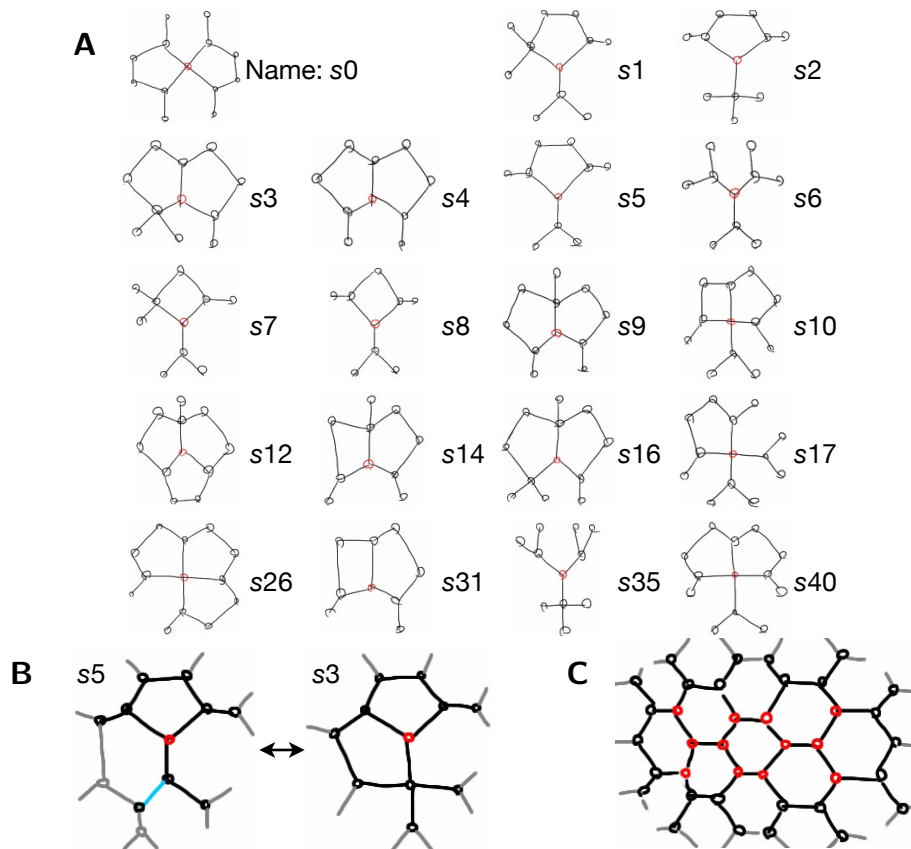


図1.2 19種の主要な小グラフ

(A) 主要な小グラフのカタログ。赤い頂点は起点を表す。s0 からs40 はそれぞれの小グラフの名前で、含まれる番号は同定された順番を表す。それぞれの構成比の間に相関はなかった (data not shown)。 (B) 赤い頂点を起点とするs5 とs3 の間の変換。灰色の頂点と辺は元のグラフで小グラフの周りにある要素を表す。水色の辺の伸縮により両者の間の変換が起こる。 (C) s6 のみを含む小グラフの構成に対応する細胞配列。赤い頂点それぞれからs6 が作られる。s6 のみを含む小グラフの構成は6角形の平面充填の細胞配列になる。

要な小グラフに変換することができる。一方、 $s_6$ は六角形の細胞同士による安定な接着を反映している。グラフが連結（任意の2頂点間に道がある。道とは頂点と辺が交互に並べられた列であり、列の中で隣に並ぶ頂点と辺は接合している）かつ平面的（平面上に辺が交差することなく描画することができる）で $n$ 個の頂点、 $m$ 本の辺、 $f$ 個の面（平面上で辺によって囲まれた領域）を持つとき、 $n - m + f = 2$ が成り立つ。 $3n = 2m$ （すなわち、すべての頂点の次数が3）であり $f$ と $m$ が大きいとき $6f \approx 2m$ となり、これは六角形による平面充填に相当する。六角形による平面充填は $s_6$ のみを含む小グラフの構成に対応する細胞配列である（図1.2C）。六角形による細胞配列が出来上がっているとき、どのような細胞再配列や細胞分裂ももとの配列を崩してしまう。

各区画がおおよそ38種の小グラフを含む中、19種の主要な小グラフの構成比の合計はおおよそ91%を占め、またおおよそ19種の小グラフが1つの区画内に複数個含まれていた。これらのことから細胞配列は主要な小グラフの構成比と主要でない小グラフの組み合わせによって特徴付けられると期待される。

### 1.3.3 区画間で細胞配列を比較するための関数

次に、区画間で細胞配列を比較するために以下の系を開発した。ある区画の小グラフの構成はその小グラフの構成内に含まれる各小グラフの数を成分とするベクトルによって表すことができる。 $v_a, v_b$ をそれぞれ区画 $a, b$ の小グラフの構成のベクトル表現とする。区画 $a, b$ 間で細胞配列を比較する関数 $f$ を次の式で定義する：

$$f(a, b) = 1 - \frac{v_a \cdot v_b}{\|v_a\| \|v_b\|}$$

この関数は2つの区画が同型な細胞配列を共有しているとき0を返す。逆に、 $f$ が大きな値を返すときほど細胞配列は大きく異なっている。

さらに、細胞配列上に適当に引かれた線（試験線）とその試験線を挟んで互いに隣接する2つの区画があるとき、この2つの区画は $f$ によって比較することができる（図1.3A）。関

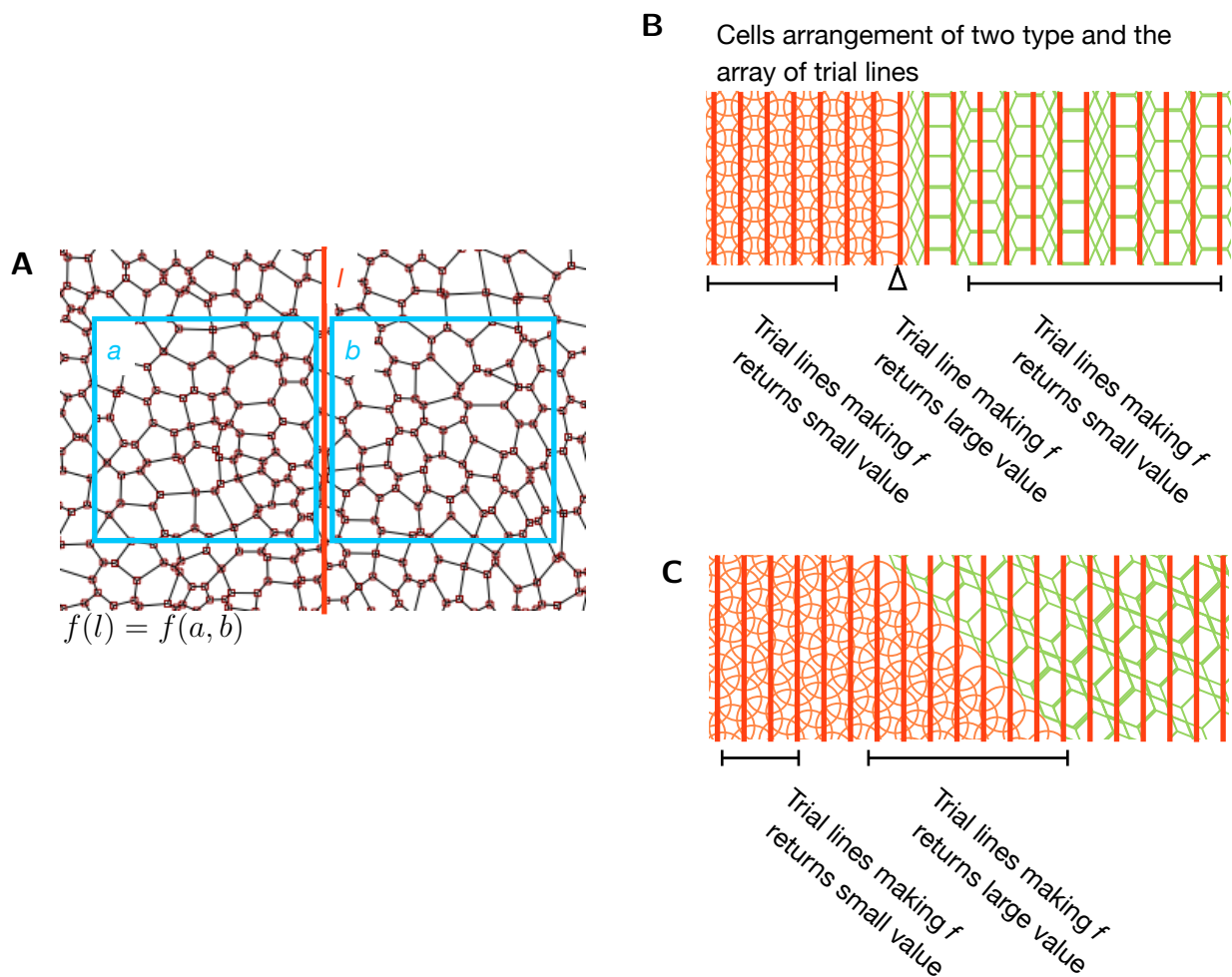


図1.3 細胞配列上の境界の検出

(A) 試験線をまたいだ細胞配列の比較。青枠で囲まれた2つの区画 $a$ と $b$ は赤線であらわされる試験線 $l$ に沿って互いに隣接している。 $f(l)$ は2つの区画の細胞配列の $f$ による比較を表す。 $f(l)$ が大きな値を返すとき、細胞配列は試験線をまたいで変化している。細胞配列は徐々に、または突然に変化する。(B, C) 試験線の列による細胞配列の境界の検出。1列に並べられた試験線それぞれで細胞配列を比較すると、細胞配列が突然に変化するとき $f$ のピークができ (B)、細胞配列が徐々に変化するとき $f$ は広い範囲で高い値を返す。

数の返す値が大きいとき、細胞配列はその試験線をまたいで変化していることがわかる。試験線 $l$ を挟んで隣接する2つの区画の比較を $f(l)$ によって表す。神経領域と表皮領域の間で細胞配列の変わる境界を探すため、中央側方軸方向に試験線の列を並べ細胞配列を解析した。この列の中で $f(l)$ のピークを作る試験線が細胞配列の境界に相当する(図1.3B)。この方法は細胞配列が徐々に変化する場合と境界をまたいで突然に変化する場合を見分けることができる(図1.3B, C)。

#### 1.3.4 細胞配列の境界とその挙動

次に、細胞配列を解析し、背側正中線と側方領域の間にある境界の探索を行った。解析において、一連の区画は適当な広さで区切られていなければならない、区画が小さすぎると小グラフの有効な構成比を得ることができない。逆に、区画が広すぎると複数の領域を同時に包含してしまう。これらの点を踏まえ、150から300の頂点を含む区画を取ることとし、いくつかの発生段階において背側外胚葉の解析を行った(図4)。細胞再配列は細胞配列の変化と区画の変形の両方またはどちらか一方を引き起こしうる。原腸陥入時における背側外胚葉においては、細胞配列と領域全体の形の両方が変化した。同じ発生段階の胚から得られたデータ間で共通して見られるチャートの特徴に注目すると、原腸胚期初期から得られたチャートでは原腸陥入による表皮組織の変形が最も激しい背側正中線付近で $f$ が高い値をとることがわかった(図1.4A, C)。この細胞配列の変化は組織の形態形成に伴う細胞の再配列によるものと考えられる。原腸胚期中期になると、背側と腹側の境界付近に $f(l)$ のピークが出現し、そのピークの周辺では一様な細胞配列が広がっていた(図1.4C)。原腸貫入が終わる時点では単一のピークが背側正中線から近い位置に現れた(図1.4I)。この2つの間の発生段階では、 $f(l)$ のピークは外胚葉の背側周辺領域に現れ、同時に背側正中線付近の $f$ の値は減少する傾向にあった(図1.4E, G)。これらの結果は図4で見られた $f(l)$ のピークに対応する細胞配列の境界は同じものであり、その細胞配列の境界が背側と腹側の境界の近くから背側正

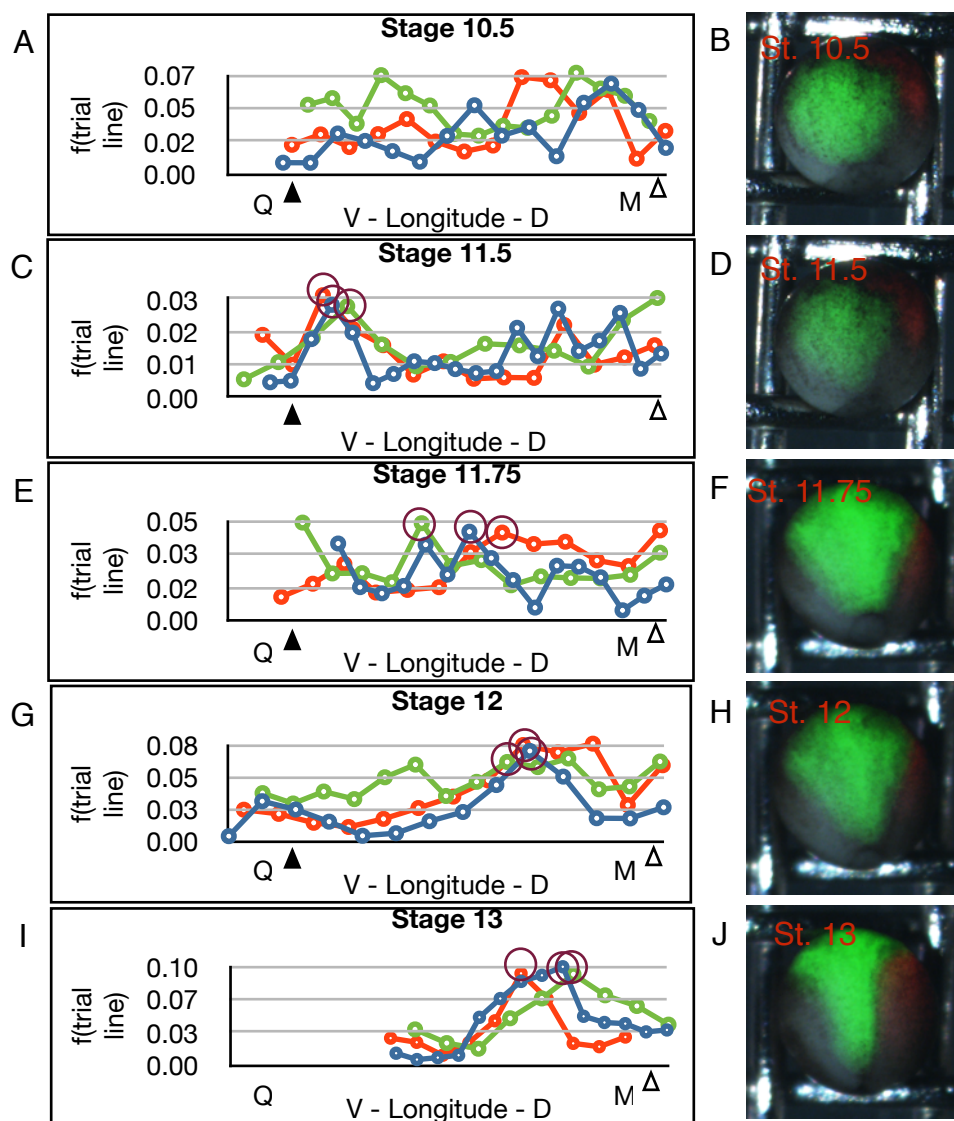


図1.4 細胞配列上の境界の挙動

(A, C, E, G, I) 原腸胚期から初期神経胚期 (stage 10.5-13) において、背側正中線から側方にかけて並べられた試験線の列の  $f$  の値のプロット。それぞれの発生段階で3つの胚から得られた結果を色を分けて表示する。Qの付いた黒い三角形は背側と腹側の境界の、Mの付いた白い三角形は背側正中線の位置を表す。細胞境界に対応するピークを小豆色の丸でマークした。(B, D, F, H, J) 背側外胚葉の形態形成。背側外胚葉にAlexa-488 (緑) を、腹側外胚葉にAlexa-568 (赤) を微量注入し、それぞれの変形を追った。

中線に向かって移動したことを示唆している。

興味深いことに、この背側領域の狭まる挙動は予定神経領域の挙動とよく一致していた。4割球の段階で背側動物極にAlexa-488を、腹側動物極にAlexa-568を微量注入することにより、それぞれに由来する組織を初期発生を通じて可視化することができる（図1.4B, D, F, H, J）。両者の境界は原腸胚期初期まで背側と腹側の境界に沿ったまま動かず、原腸陥入の進行に伴って背側が狭まった。神経管閉鎖において背側割球に由来するほとんどの細胞が神経管に含まれた。加えて、原腸胚期後期に見られた尖っていないピーク（図1.4E, G）は神経領域が狭まりつつあることによって比較のために取られた区間が複数の領域を内包してしまったことによると説明することができる。このような場合、試験線の列は隣接する複数の境界と細胞配列のゆるやかな変化を見分けることはできない。言い換えれば、これがこの系の現状での空間分解能になる。

また、この解析は既知の指標で同等な細胞配列に対する小グラフの構成の有効性も同時に示した。神経胚期初期で検出された細胞配列の境界は直感的な観察でも容易に認められるのに対し（図1.5B）、原腸胚期中期に検出された境界はそれと異なり（図1.5A）、小グラフの構成を用いない限りそこに境界があると判別することは難しい。

### 1.3.5 細胞配列上の境界の空間的分布と神経一表皮境界との対応

タイムコース上の細胞配列の境界の検出では、動物極と卵黄栓の中間の領域に注目した。そこで私は次に、境界が最初に検出された原腸胚期中期の細胞配列をより広い範囲で解析した。背側外胚葉上で試験線が並べられた経路に沿って細胞配列の変化をプロットし、解析結果を胚に投射した（図1.6B-G）。側方の背側外胚葉においてピークは各経路上の辺縁部に現れた（図1.6C-E）。前方の背側外胚葉では辺縁部のピークは小さくなり、同時にもう一つのピークが中間の領域に現れた（図1.6E-G）。この発生段階では、外胚葉の背側は予定神経領域とプラコード領域に大まかに一致する。これらの結果は細胞配列上の境界が神経一表皮境界、神経一プラコード境界に対応し、さらにそれらが原腸胚期中期以前に現れることを示唆

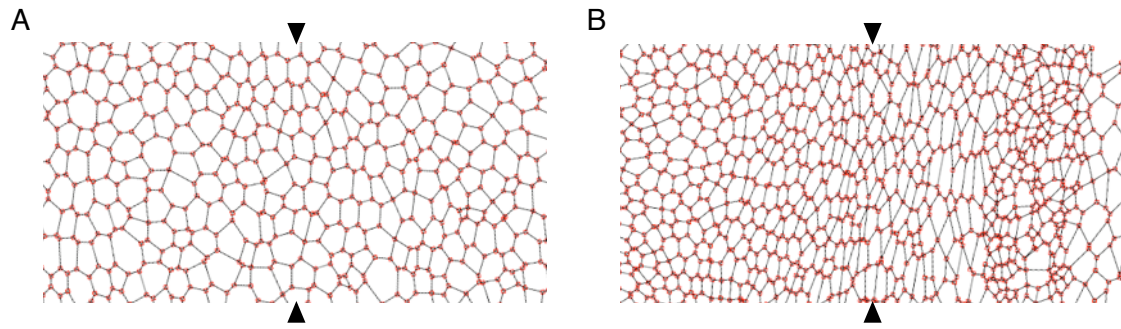


図1.5 細胞配列上に検出された境界

(A, B) 原腸胚期に検出された細胞配列上の境界とその周りの細胞配列 (A) と初期神経胚期に検出された境界とその周りの細胞配列 (B)。初期神経胚期では細胞配列の境界は直感的にわかりやすいのに対し、原腸胚期の細胞配列では他の方法で境界を見つけることは難しい。

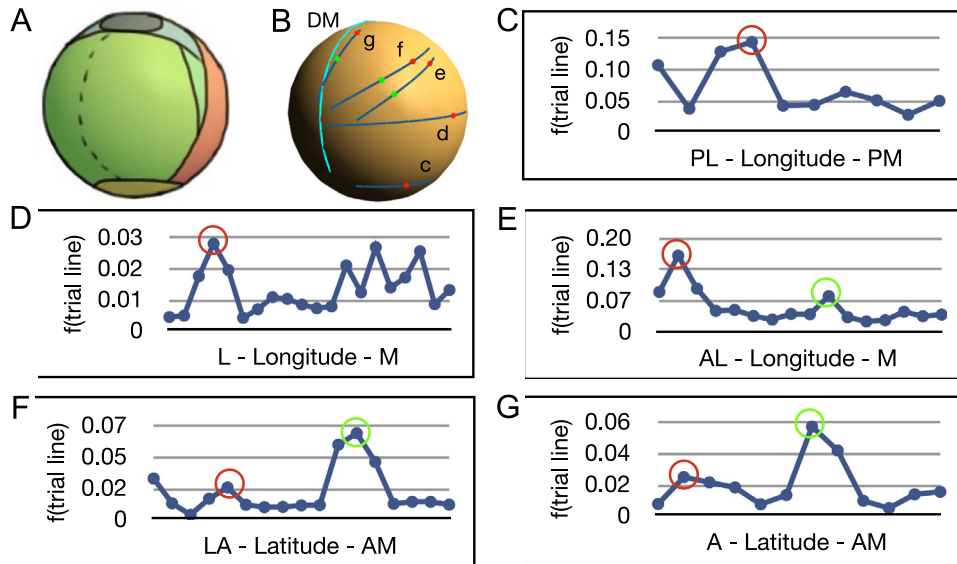


図1.6 原腸胚期における細胞配列の境界と神経―表皮領域の境界

(A) 原腸胚期の外胚葉の大まかな予定運命図。破線は背側正中線を示し、下側の黄色い領域は原口のヨークプラグを表す。黄緑色の領域は将来中枢神経系になり、赤い領域は表皮になる。それらの間にある緑の領域は神経堤に、青の領域はプラコードに、黒い領域はセメントグランドになる。(B) 外胚葉上に取られた試験線の列の位置の投影。胚の向きは (A) に倣う。水色の線は背側正中線を表す。c からg までの青線は試験線の列が並べられた位置を表す。(C-G) (B) のc からg の青線の上に並べられた試験線の列の  $f$  の値のプロット。線とパネルのラベルのアルファベットの小文字と大文字がそれぞれ対応する。プロットで赤と緑の丸で標識されたピークの位置を (B) の青線の上に赤と緑の点で表す。

している。

## 1.4・考察

本研究により、小グラフの構成を用いた解析系が一般の細胞配列を定量的に記述できることが示された。小グラフ及びその構成は細胞配列の既知の生物学的な特徴とは無関係に定義されたにもかかわらず、得られた解析結果は初期の神経発生の特徴とよく一致した。また、この解析系はあらゆる上皮組織の細胞配列にも適用しうることも特筆に値する。

局所的な細胞配列の集まりとして全体の細胞配列を捉えるというアイディアはEscudero et al. (2011)に倣うものである。彼らによって導入されたfeature vectorは異なる組織、生物種、発生段階にある上皮組織の比較において有効であったが、直感的な観察で見分けることのできない細胞配列を同様に比較弁別できるかどうかは不明瞭であった。それに対し、小グラフの構成は細胞の直感的な特性から独立している点で特徴的であり、顕微鏡画像上で一見似ているように見える細胞配列でも弁別することができる。これは、同じ原基組織から分かれて分化したばかりで平均的な細胞の大きさや接している細胞の数がどの点でも変わらないような組織間の解析を行う上で有用である。

*Xenopus*原腸胚の外胚葉の場合、19種の主要な小グラフが小グラフの構成を特徴付けていた。それらの中でもs5とs6は特に高い構成比を持っていた。s5は他の12種の主要な小グラフへと簡単に変換することができることから、s5の構成比は細胞再配列の頻度を反映しているのではないかと考えられる。一方で、s6のみを含む小グラフの構成は細胞の再配列や分裂のない蜂の巣模様の細胞配列を示していた。これらのことから、（１）s5の構成比が高い時には細胞が活発に再配列をしていること、（２）s6の構成比が高い時には細胞配列は安定であること、（３）どちらも少ない時には細胞分裂または特殊なタイプの再配列が活発に起こっていることが予想される。

小グラフの構成を用いた区画の比較により、原腸胚期中期に背側と腹側の区画を分ける境界が示された。これはこの2つの区画の細胞が接着特性を変化させるのに十分なほど分化していることを示唆している。細胞配列上の境界の形と動きは予定神経領域のそれらと一致し、両者が同一のものであることを示唆している。予定神経領域ではwhole-mount *in situ* hybridization によりSox2などのマーカー遺伝子が発現していることがわかるが、初期の発生段階においてはその発現は神経領域と表皮領域の間でだんだんと変化するため境界が存在するのか、また存在するとしてそれがどこかを示すことは難しい。これに対し、小グラフの構成の比較は2つの異なるタイプの細胞配列が接している時に $f$ のピークを作ることによるやかな変化と境界をまたいだ変化を見分けることができる。すなわち、試験線 $l$ が試験線の列の中で $f(l)$ のピークを作るとき2つの区画が別のものに分化していることを確かめることができる。

結論として、小グラフの構成によって定義された細胞配列は神経管閉鎖に先行する神経組織の分化と形態形成の指標となることがわかった。この時期他の指標で神経と表皮を見分けられるものはない。また、小グラフの構成は形態形成における細胞骨格系や細胞間接着の研究にも応用できる。神経分化が神経管閉鎖よりも前から始まるにもかかわらず、神経管閉鎖阻害に先行する表現型の評価は主に中胚葉や表皮外胚葉を含む原腸陥入阻害を調べるものである。小グラフの構成は初期神経胚の細胞配列を評価することによりこのギャップを埋めることができると期待される。

## 第2章：FRET張力センサーを用いた外胚葉の張力分布の解析

### 概要

発生の間、物理的な力は形態形成と分化の両方において重要な役割を担っている。張力応答性のfluorescence resonance energy transfer (FRET) は非侵襲的に生体内で張力を測定するツールになりうると期待されてきた。本研究で私はFRET を用いたアクチニン張力センサーを *Xenopus* 胚に導入し、それが分化途中にある外胚葉の張力の変化を捉えることができることを示した。まず、spider silk タンパク質によってつながれたEGFP とmCherry を含むアクチニン張力センサーの機能をHEK 細胞と胚で検証した。センサーはアクチンフィラメントと共局在し、アクチンフィラメントの崩壊、ミオシンの不活性化、浸透圧の変化に対し応答してFRET 効率を変化させた。時系列のFRET 解析は原腸胚期から神経胚期にかけて予定神経領域が表皮領域よりも高い張力を発生させていることを示し、細胞群の形態形成運動も張力の差に一致していた。これらの結果から、アクチニン張力センサーが生体内の張力を高解像度で一括的に測定できること、*Xenopus* 胚が原腸胚期から予定神経領域で高い張力を発生させていることがわかった。

### 2.1・背景

初期発生の間、胚は原腸陥入や肢芽形成、神経管閉鎖などの大きな形態形成をひきおこす。形態形成は細胞群の上にかかる物理的な力、すなわち方向性を持った張力分布、細胞間の張力や硬さの違い、局所的な細胞増殖が作る圧力などによって駆動される (Bosveld et al., 2012; Brezavscek et al., 2012; Rozbicki et al., 2015; Collinet et al., 2015; Brodland et al., 2010)。細胞は骨格系や接着複合体を通じて張力、硬さやその他の周囲の物理的な特性を感じ取っており (Desprat et al., 2008; Hayakawa et al., 2008; Hirata et al., 2015)、そのような物理的な環境が細胞や組織の分化に影響を与えることがわかっている (Engler et al., 2006; Dupont et al., 2011)。近年の研究によって、発生において張力が分化や転写制御に対し重要

かつ相互作用的な役割を担っていることが明らかになりつつある (Lan et al., 2015; Barrio et al., 2013)。

細胞内、あるいは細胞間の物理的な性質を測定するため、いくつかの方法が開発されている。Micropipette aspiration や原子間力顕微鏡は細胞膜上に発生している張力や細胞の硬さを細胞単位で測定できる。これらの方法は非侵襲的であるが、方向成分を測定することはできない。一方、胚内で細胞間に発生している張力を測定する方法としてlaser ablation や hole punching (Varner et al., 2010)、細胞の形から計算する方法 (Ishihara & Sugimura, 2012) などが利用されているが、それらは侵襲的、あるいは応用できる対象が限られているなどの問題点を持つ。高い空間分解能を持つ非侵襲的な測定法として、FRET を利用した張力センサーが培養細胞系でいくつか開発されている (Grashoff et al., 2010; Meng & Sachs, 2011; Borghi et al., 2012; Conway et al., 2013)。FRET 張力センサーは細胞骨格系タンパク質や細胞接着タンパク質の中に 2 種類の蛍光ドメインを伸縮性のリンカーでつないだ FRET ドメインを挿入し、タンパク質に張力がかかった時 FRET ドメインのリンカーが伸びて FRET 効率が下がることを利用して張力を測定するセンサーである。これらの張力センサーは細胞内レベルの解像度で張力計測を可能にすることが期待されるが、それらを実際に組織内で利用したという報告はあまりなく (Krieg et al., 2014; Kelley et al., 2015)、生体内で機能する張力実測系の確立が必要とされている。

本研究で私は FRET を用いたアクチニン張力センサーを *Xenopus* 胚に導入し、組織内の張力の計測を行った。アクチニンは spectrin スーパーファミリーに属するアクチン結合タンパク質の 1 種で、2 量体を形成してアクチンフィラメント同士を架橋する。ロッド部分に FRET カセットを挿入されたアクチニン張力センサーはアクチンフィラメントにかかる張力が測定できると期待された。まず、張力センサーの機能評価を培養細胞系と胚で行い、次にこれを原腸胚期から神経胚期の外胚葉における張力の測定に応用した。張力センサーはアクチンフィラメントと共局在し、細胞内部に発生している張力を反映して FRET 効率を変化さ

せた。また、張力センサーは外胚葉の予定神経領域と表皮領域の張力の差を識別することができた。原腸陥入に伴う細胞と細胞群の変形を計測したところ、外胚葉予定神経領域と側方の表皮領域は同様の形態形成を行うにも関わらず、それらを構成する細胞は異なる挙動を示すことが明らかになった。

## 2.2 方法

### 2.2.1 コンストラクト

コンストラクトの概要は図2.1 の通りである。ActTS-GR及びhiActTS-GRは東京大学の坪井貴司博士と早稲田大学の北口哲也博士より分与された。このコンストラクトのFRETドメインは伸縮性のリンカーとして (GPGGA)<sub>8</sub> をmCherryとEGFPの間に持つ (Grashoff et al., 2010)。FRETドメインはヒトの $\alpha$ アクチニンの1番目と2番目のスペクトリンリピートドメインの間に挿入されている (Meng & Sachs, 2011)。ActTS-GRの蛍光ドメインが蛍光を発しない変異型を作るため、chromophoreを構成するアミノ酸を1つ置換した。EGFPドメインの66番目のチロシンがロイシンに、mCherryドメインの72番目のチロシンがロイシンにそれぞれ置換された。*in vitro*でのmRNA転写のため、コンストラクトはpCS2ベクターのSP6プロモーターの下に移された。mRNAはmMESSAGE mMACHINE kit (Ambion)を用いて転写した。

### 2.2.2 細胞培養とトランスフェクション

HEK 293細胞は4-well coverglass chamber (Iwaki)を用いて10%非働化FBS, 100 U/mlペニシリンと100 $\mu$ g/mlストレプトマイシンを含む高グルコースDMEM培地1 ml中で37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>下で培養した。トランスフェクションのため、100ng/ $\mu$ l DNAと75mM NaClを含む溶液に対し等倍量の0.323 mg/ml polyethylenimine (Wako)を加え30分間室温で培養した。0.5 mlの細胞培地に25  $\mu$ lの混合液を加え、1から2日間培養した。

### 2.2.3 *Xenopus* 胚への微量注入

mRNA は背側動物極側辺縁部の 4 箇所または動物極側辺縁部の 8 箇所に注入した。微量注入は 5% ficoll / 1 × Steinberg's solution 下で行った。微量注入胚は 1 × Steinberg's solution 中で培養した。浸透圧変動の際、胚は異なる濃度の培養液が入れられえたディッシュの間を移動した。

### 2.2.4 蛍光染色

アクチンフィラメントの染色の際、HEK 細胞は 4% paraformaldehyde / PBS で 20 分間固定し、続いて 0.1% PBT で 30 分間透過処理した。透過処理されたサンプルはブロッキングバッファー中で 30 分間培養したのち、Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen) によって 4℃ 下で一晩染色し、PBS で洗浄した。*Xenopus* の胚は卵膜を外科的に除去したのち、MEMFA を用いて 30 分間固定した。固定されたサンプルは 1% PBT を用いて 1 時間透過処理し、続いてブロッキングバッファー中で 1 時間培養した。このサンプルを Alexa Fluor 488 phalloidin を用いて 4℃ 下で一晩染色し、PBS で洗浄した。

### 2.2.5 共焦点顕微鏡観察

本研究の顕微鏡画像は全て共焦点顕微鏡によって取得した。胚を 35mm/glass base dish (Iwaki) にマウントし、FRET 画像や免疫染色画像の取得の際には Steinberg's solution 中で、膜結合型 GFP を注入された胚は 1.2% UltraPure L.M.P Agarose (Invitrogen) / Steinberg's solution に包埋して観察した。HEK 細胞の免疫染色画像は細胞の下方のガラス面に近い部分をカバーする Z スタックの最大輝度投影を表示している。胚の顕微鏡像は Z スタックの最大輝度投影を表示している。

## 2.2.6 FRAP 解析

最初の 5 枚の画像が取られた後、HEK 細胞の細胞内のスポットまたは胚の上皮の細胞間接着面上のスポットにある EGFP を退色させた。HEK 細胞では 0.128898 秒間隔で 12.11641 秒間、胚では 0.064904 秒間隔で 6.10097 秒間タイムラプス画像を取得した。スポット内の EGFP の平均輝度を顕微鏡制御ソフトの FV10-ASW で計算した。

## 2.2.7 FRET 解析

FRET index は本研究で作成した Image J のスクリプトにより計算した。計算アルゴリズムは intensity-based FRET index calculation (Periasamy et al., 2008) に従い、FRET を全く起こさなかった場合のドナーの蛍光輝度 ( $D$ ) をアクセプターの蛍光輝度 ( $A$ , 取得された顕微鏡画像のアクセプターチャンネル) に比例するとした。アクセプターとドナーの spectral bleed-through (ASBT と DSBT, 励起スペクトルや蛍光スペクトルの重なりが取得された顕微鏡画像の FRET チャンネルに寄与する分) は  $A$  と FRET によって減光されたドナーの蛍光輝度 ( $qD$ , 取得された顕微鏡画像のドナーチャンネル) から  $ASBT = c_a A$  と  $DSBT = c_d qD$  として得た。ここで係数  $c_a$  と  $c_d$  はそれぞれ変異型蛍光ドメインを持つ ActTS-GR の片方のみを発現する細胞または胚の顕微鏡画像から得た。これらを用いて純粋な FRET (PFRET) は  $PFRET = uFRET - ASBT - DSBT$  で計算される。ここで  $uFRET$  は uncorrected FRET (取得された顕微鏡画像の FRET チャンネル) を表す。よって、 $D$  は蛍光色素のペアによって決まる係数  $\gamma$  を用いて  $D = qD + PFRET \times \gamma$  で表され、下の式により FRET 効率  $E$  は FRET index に比例する：

$$E = 1 - qD/D = PFRET \times \gamma / D \propto PFRET/A = \text{FRET index.}$$

HEK 細胞の FRET index は細胞の下側のガラス面と接している部分の 1 スライスから計算した。胚の FRET index は 1 スライスごとに計算し、Z スタックの FRET index の最大値が投影されている。

FRET ratio は本研究で書き起こしたImage J のスクリプトにより  $\text{FRET ratio} = A / qD$  として計算した。ドナーチャンネルでアクセプターチャンネルを割る前に張力センサーが発現していない範囲をマスクした。ここでマスクはドナーチャンネルの蛍光輝度が閾値よりも低い範囲を覆うように取った。閾値は胚から外れた辺縁部の輝度を元に決めた。FRET ratio はZスタックの最大輝度を投影した画像の上で計算した。センサーにかかる張力が弱く蛍光ドメイン同士が近くにあるとき、励起されたEGFP はFRET によってエネルギーを失うためEGFP の蛍光輝度は下がる。張力が強いときはFRET が起こらず、EGFP は最大限の蛍光を発する。よって、EGFP とmCherry の比はFRET 効率を反映している。

## 2.2.8 Acceptor photo-bleaching

アクセプターの退色は選択された範囲内への559 nm レーザーの連続照射によって行った。Gimp 上で退色前の画像から退色後の画像を引き算しキャリブレーションした。蛍光の回復  $R$  は  $R = (D_{post} - D_{pre}) / D_{pre}$  によって計算した。ここで  $D_{pre}$  と  $D_{post}$  はそれぞれアクセプターを退色させる前と後のドナーの蛍光輝度を表す。計算は本研究で書き起こしたImage J のスクリプトにより行った。

## 2.2.9 細胞と組織の変形の計算

各細胞に関して、 $x, y$  平面上での細胞の中心の位置を手作業で取り、その移動速度 ( $v_x, v_y$ ) に関して、40分前の位置からの移動をその間の平均移動速度として取り以下の計算に用いた。20から30の細胞からなる細胞群を細胞同士が互いに接しており、再配列の間に2つの細胞群に分離することのないように選んだ。組織の速度勾配テンソル、

$$\mathbf{L}_T = \begin{bmatrix} \partial v_x / \partial x & \partial v_x / \partial y \\ \partial v_y / \partial x & \partial v_y / \partial y \end{bmatrix}$$

を各細胞の位置と速度から計算した。ここで  $v_x$  と  $v_y$  の  $x$  または  $y$  に関する偏微分はそれぞれの分布に対する回帰直線の傾きから求めた。すなわち、 $\partial v_x / \partial x$  は  $x, v_x$  平面上に投影された

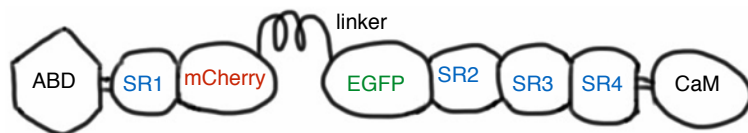
データに対するトレンド線により与えた。次に $\mathbf{L}_T$ を反対称の回転成分 $\mathbf{\Omega}_T = (\mathbf{L}_T - \mathbf{L}_T^T) / 2$ と対称のひずみ速度テンソル $\mathbf{\dot{E}}_T = (\mathbf{L}_T + \mathbf{L}_T^T) / 2$ に分離した。細胞群の伸長速度と伸長の方向はそれぞれ $\mathbf{\dot{E}}_T$ の固有値と固有ベクトルにより与えた。固有値に1を加えたものを対称な伸長の速度、 $\mathbf{\Omega}_T$ の(1, 2)成分を回転速度として取った。細胞群と個々の細胞の前後軸方向または伸長軸方向の伸長速度は外接する長方形の幅の変化を表す。前後軸は神経管が閉じた位置によって決めた。細胞群と細胞の伸長方向は $\mathbf{\Omega}_T$ によって補正した。胚は球状のため平面への投影は歪みを発生させるが、細胞群と細胞の間の相対的な伸長速度の比を対象にする限り無視できる。

## 2.3・結果

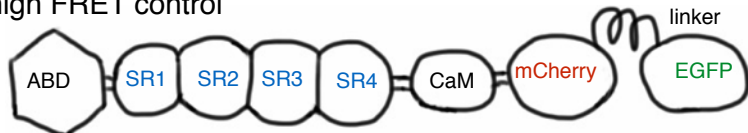
### 2.3.1 培養細胞系および胚を用いた張力センサーの機能評価

本研究では、過去に報告されたアクチニン張力センサー (Meng & Sachs, 2011) の伸展応答FRETドメインをspider silk タンパク質で繋がれたEGFP とmCherry を含むものに置き換えたActTS-GRを用いた (図2.1)。また、常に高い効率でFRETを起こすコントロールとして、全長のアクチニンのC末端にFRETドメインが繋がれたhiActTS-GRを用いた (図2.1 B)。これらのコンストラクトは坪井貴司博士と北口哲也博士より分与された。これらの張力センサーをHEK細胞および*Xenopus* 原腸胚の背側外胚葉に導入し、機能評価した。HEK細胞へのプラスミド導入はpolyethlenimineを用いて行い、ツメガエル胚への導入は、4細胞期の胚の背側動物極に500 pgのセンサーのmRNAを微量注入して行った。張力センサーを発現しているHEK細胞、胚を固定し、phalloidineでアクチンフィラメントを染色したところ、ともにセンサーはアクチンフィラメントと共局在した (図2.2 A, B)。背側外胚葉ではアクチンフィラメントは細胞の頂端側側面の接着結合の周りに多量に局在し、細胞シートの平面上で細胞の形を映した。センサーの動態を調べるため、fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) を測定したところ、回復曲線はHEK細胞においても胚においてもActTS-GRとアク

### A tension sensor



### B high FRET control



### C mutant non-fluorescent constructs

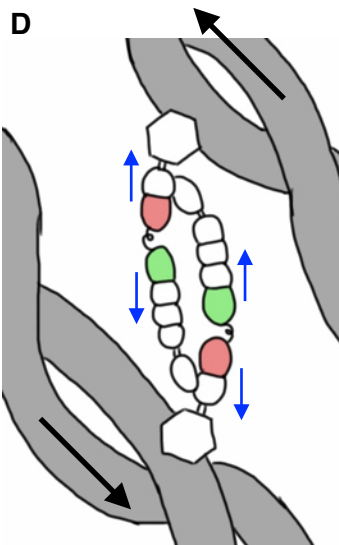
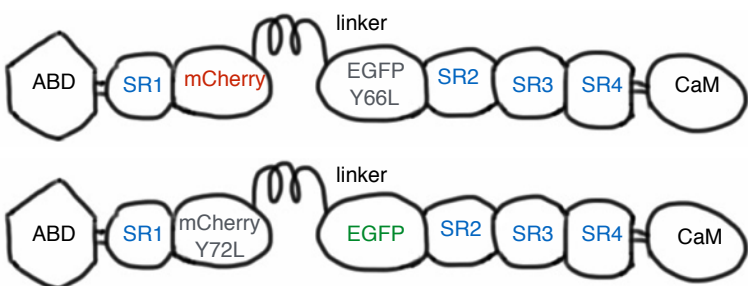


図2.1 センサーとそのコントロールのコンストラクトの概略図

(A) ActTS-GR 張力センサー。リンカードメインはspider silk タンパク質から作られた。ABD: アクチン結合ドメイン。SR1-4: spectrin 繰り返しドメイン。CaM: calmodulin-like ドメイン。(B) High-FRET コントロール。アクチニンのC 末端に2つのアミノ酸残基を挟んでFRET ドメインが付加された。(C) 蛍光ドメインを不活性化された変異型コンストラクト。EGFP の蛍光をなくすため、EGFP ドメインの66番目のチロシンをロイシンに置き換えた。mCherry の蛍光をなくすため、mCherry ドメインの72番目のチロシンをロイシンに置き換えた。EGFP のTyr66 とmCherry のTyr72 はそれぞれ発色団を形成する。(D) センサーの作用機序。アクチンフィラメント（灰色）に張力（黒矢印）がかかるとアクチンフィラメントを架橋するセンサーの2量体が青矢印の方向に引き伸ばされ蛍光ドメイン間の距離が長くなるためFRET 効率が下がる。

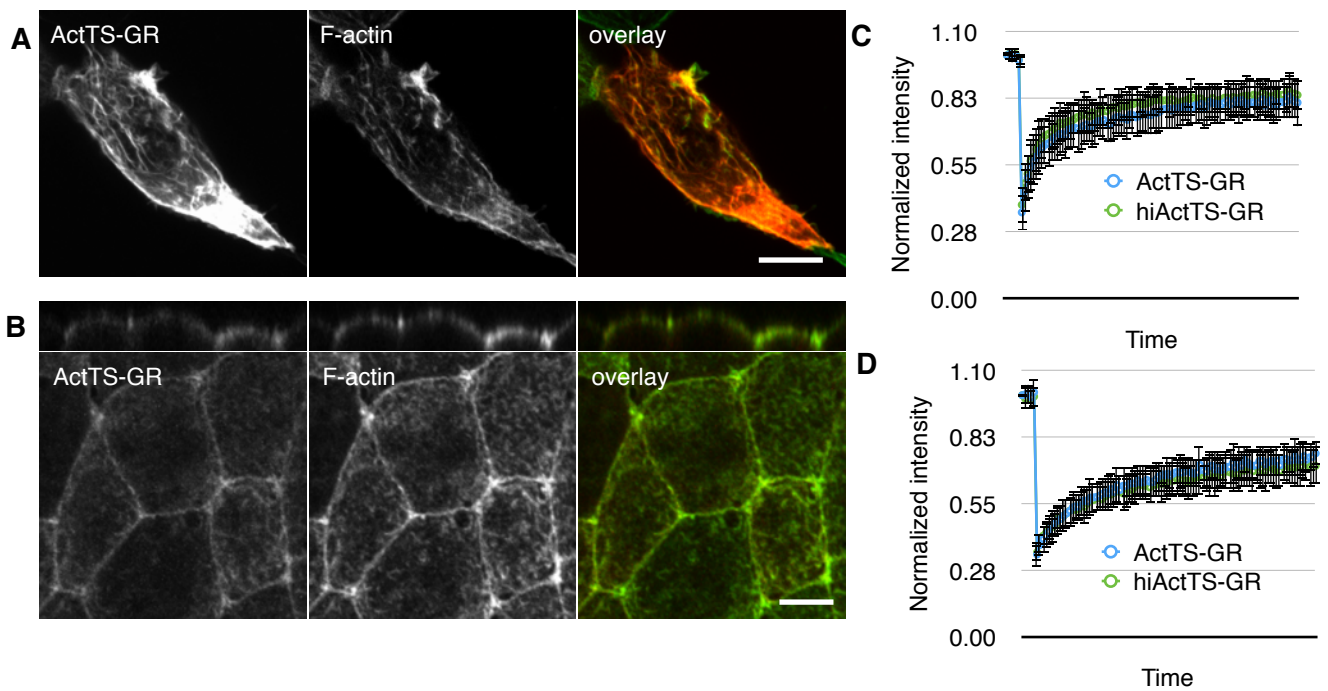


図2.2 張力センサーの局在と動態

(A, B) HEK 細胞 (A) と *Xenopus* の外胚葉 (B) における ActTS-GR の局在。(B) の上の行のパネルは 3D 画像の側面の投影を表示している。左: ActTS-GR。中: アクチンフィラメント。右: 重ね合わせ。張力センサーはアクチンフィラメントと共局在した。(C) HEK 細胞に ActTS-GR または hiActTS-GR を導入し、細胞内の 1 箇所で EGFP を退色させて蛍光の回復を計測した。(D) ActTS-GR または hiActTS-GR の外胚葉での FRAP。細胞間接着面上の 1 箇所で EGFP を退色させた。HEK 細胞でも外胚葉でも ActTS-GR は正常な動態を示した。値は平均 $\pm$ 標準偏差、 $n = 5$ 。スケールバー =  $10\mu\text{m}$ 。

チニンの全長を無傷で含むhiActTS-GR の間で同一であり (図2.2 C, D)、ActTS-GR が野生型のアクチニンと同様の動態を持っていることが示唆された。

次に、生きた状態のHEK 細胞と胚でFRET index を計算した。ActTS-GR とhiActTS-GR に加え、蛍光ドメインに変異を導入したActTS-GR のペアをHEK 細胞に共導入、胚に共注入し分子間FRET を計測した。想定通り、HEK 細胞と胚の両方においてhiActTS-GR は高いFRET index を、変異型蛍光ドメインを持つペアは低いFRET index を、そしてActTS-GR はその中間の値のFRET index を示した (図2.3)。この結果をさらに確かめるため、mCherry を局所的に退色させてEGFP の蛍光を回復させるacceptor photo-bleaching を行った。

Acceptor photo-bleaching は蛍光ドメインの励起スペクトル、蛍光スペクトルの重なりや自家蛍光の影響が少ない測定法である。mCherry の退色後ActTS-GR とhiActTS-GR の両方ともmCherry の退色した領域でのみEGFP の蛍光強度が増加し (図2.4)、先の計測で計算されたFRET index がスペクトルの重なりや他のエラーによるものではなくコンストラクト内の蛍光ドメイン間の実際の距離を反映したものであることが確かめられた。また、高倍率のレンズを用いたFRET 解析も行った。張力センサーは頂端側側面の接着結合の近くに多く局在していた。そのため、発現量が多量でない限り、計測されたFRET index は側面周辺に由来するものが主だった (図2.5)。頂端面の細胞膜上にかかる張力と細胞間接着面にかかる張力を比較する場合には蛍光強度がFRET 解析に有効な範囲に入るよう注意を払う必要がある。

次に、センサーの機能をHEK 細胞や胚にかかっている張力を実験的に変化させて評価した。ActTS-GR またはhiActTS-GR を発現しているHEK 細胞をアクチンフィラメントの重合阻害剤のcytochalasin b またはRho 依存性キナーゼ (ROCK) の阻害剤であるY27632 のいずれかを用い処理前および処理後でFRET 解析を行った。センサーを導入した細胞を2.5  $\mu$ M のcytochalasin b 中で培養したところ、センサーの繊維状の局在が消失し蛍光がいくつかの塊に凝集したことから、アクチンフィラメントが崩壊したことがわかった (図2.6 A, B)。

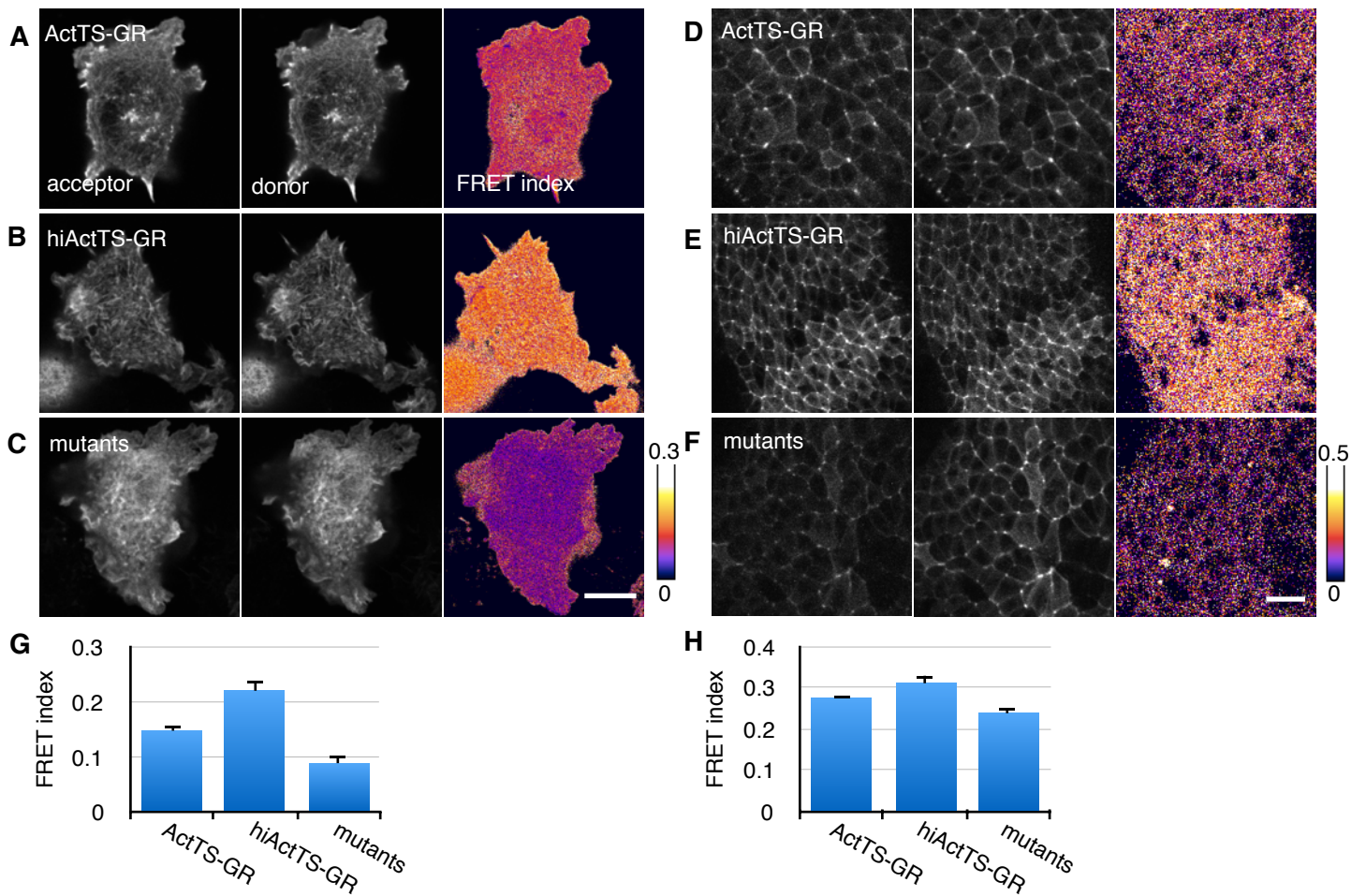


図2.3 HEK 細胞と *Xenopus* 胚におけるFRET 計測

(A-F) ActTS-GR (A, D)、hiActTS-GR (B, E)、または変異型蛍光ドメインを持つActTS-GR のペア (C, F) を発現しているHEK 細胞 (A-C) または*Xenopus* の外胚葉 (D-F) の像。左：アクセプターチャンネル。中：ドナーチャンネル。右：FRET index。(G, H) HEK 細胞 (G) または外胚葉 (H) におけるFRET index の定量評価。値は平均 $\pm$ 標準偏差、 $n > 7$ 。スケールバー = 10  $\mu\text{m}$  (c), 50  $\mu\text{m}$  (f)。

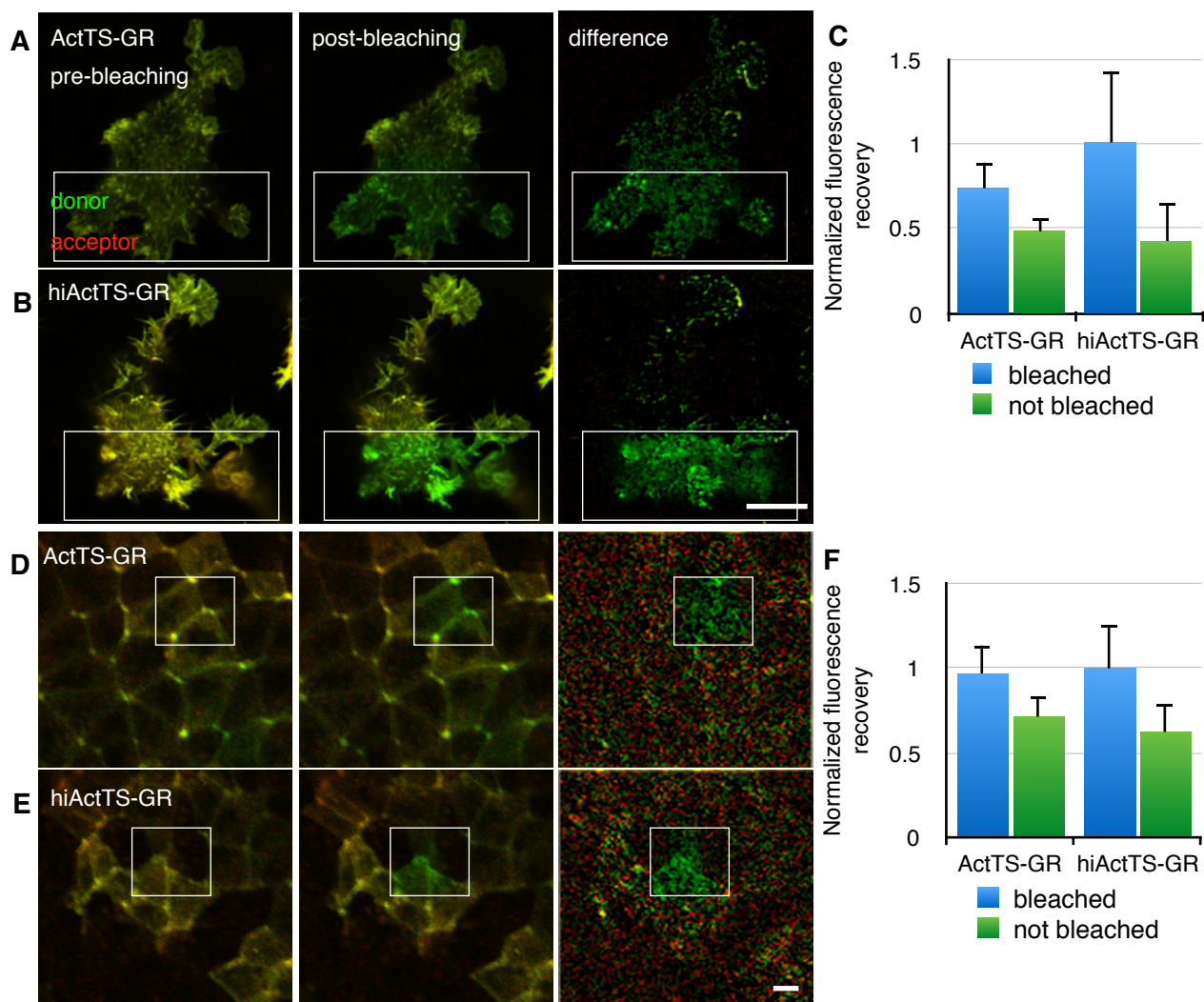


図2.4 Acceptor photo-bleaching

(A, B) ActTS-GR (A) またはhiActTS-GR (B) を発現するHEK 細胞の退色前（左）と退色後（中）、その差を強調したものの像（右）。白枠内のmCherry を退色させた。(C) 退色後の枠の内と外のEGFP の蛍光の増加の定量評価。値は平均 $\pm$ 標準偏差、 $n > 5$ 。(D, E) ActTS-GR (D) またはhiActTS-GR (E) を発現する*Xenopus* 胚の像。(F) 外胚葉での蛍光の増加の定量評価。 $n = 10$ 。スケールバー = 10  $\mu\text{m}$ 。

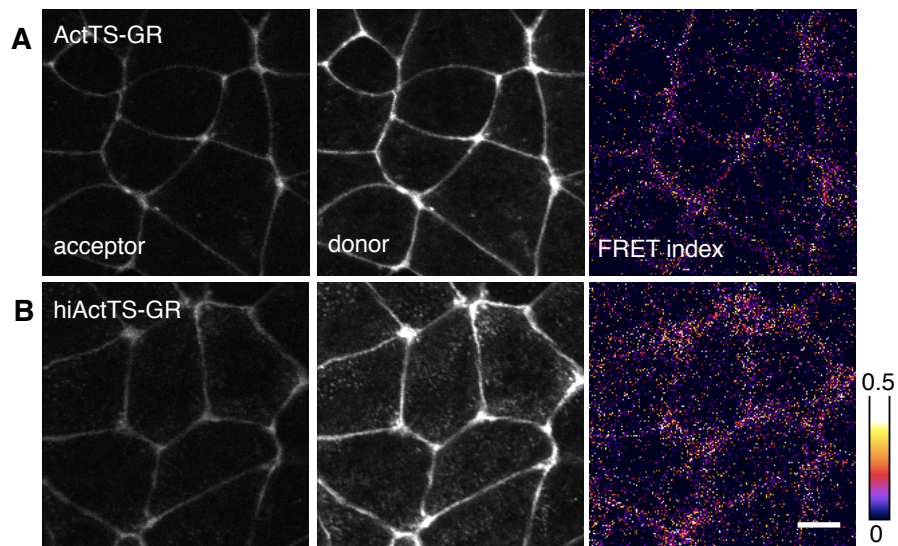


図2.5 高倍率の胚の画像のFRET 解析

(A, B) ActTS-GR (A) またはhiActTS-GR (B) を発現している外胚葉の細胞の像。左：アクセプターチャンネル。中：ドナーチャンネル。右；corrected FRET index の像。ActTS-GR は主に頂端側側面の細胞間接着面周囲に局在し、頂端面への局在は少ない。そのため発現量が高くないとき計測されるFRET は主に頂端側側面の張力を反映する。

スケールバー = 10  $\mu\text{m}$ 。

Cytochalasin b の処理の後、hiActTS-GR のFRET index には変化がなかったがActTS-GR はFRET index を増加させた (図2.6 A-C)。ROCK はミオシンをリン酸化して活性化しており、Y27632 はROCK を阻害してミオシンを不活性型にする。HEK 細胞を10  $\mu$ M のY27632 中で培養したところ、cytochalasin の処理時と同様にhiActTS-GR のFRET index は変化せずActTS-GR のFRET index が増加したことから (図2.6 D)、ActTS-GR には張力がかかっており、張力の変化に応答できることが示された。次に、センサーを発現している胚を用いて、異なる浸透圧下でFRET 解析を行った。胚を通常濃度のSteinberg's solution (SS) から2倍の濃度のSS に映した際、hiActTS-GR のFRET index には変化はなかったがActTS-GR はFRET index を増加させた (図2.7)。このことは、胚全体が縮むことにより胚表面に広がるアクチンフィラメントのネットワークにかかっていた張力を解放したことを示唆している。センサーが毒性を持つかどうかを確かめるため注入胚を幼生段階まで培養したが、注入による明確な表現型は観察されなかった (data not shown)。これらの結果から、ActTS-GR が培養細胞に導入されたとき、過去に報告されている他のコンストラクトと同様に張力センサーとして機能すること、さらに*Xenopus* 胚に導入された際にも正常な発生に影響を与えることなく張力センサーとして機能することが確かめられた。

### 2.3.2 *Xenopus* の初期胚外胚葉における張力計測

張力センサーの機能が確かめられたことから、次にこれを用いて異なる組織に分化しつつある細胞群の間の張力の変化を計測した。原腸胚期の*Xenopus* の背側外胚葉は前後軸方向に伸長し、中央側方軸方向に狭まる。背側外胚葉は神経胚期に神経板になり、神経管閉鎖を経て表皮性外胚葉から物理的に分離する。このとき、腹側外胚葉は胚全体を覆い、表皮を形成する。*Xenopus* 胚と形態のよく似ているイモリ胚では神経板と表皮性外胚葉で物性が異なることが報告されている (Wiebe & Brodland, 2005)。4細胞期の胚の動物極側辺縁部に1 ng のActTS-GR またはhiActTS-GR のmRNA を注入し、原腸胚期から神経胚期にかけて共焦点

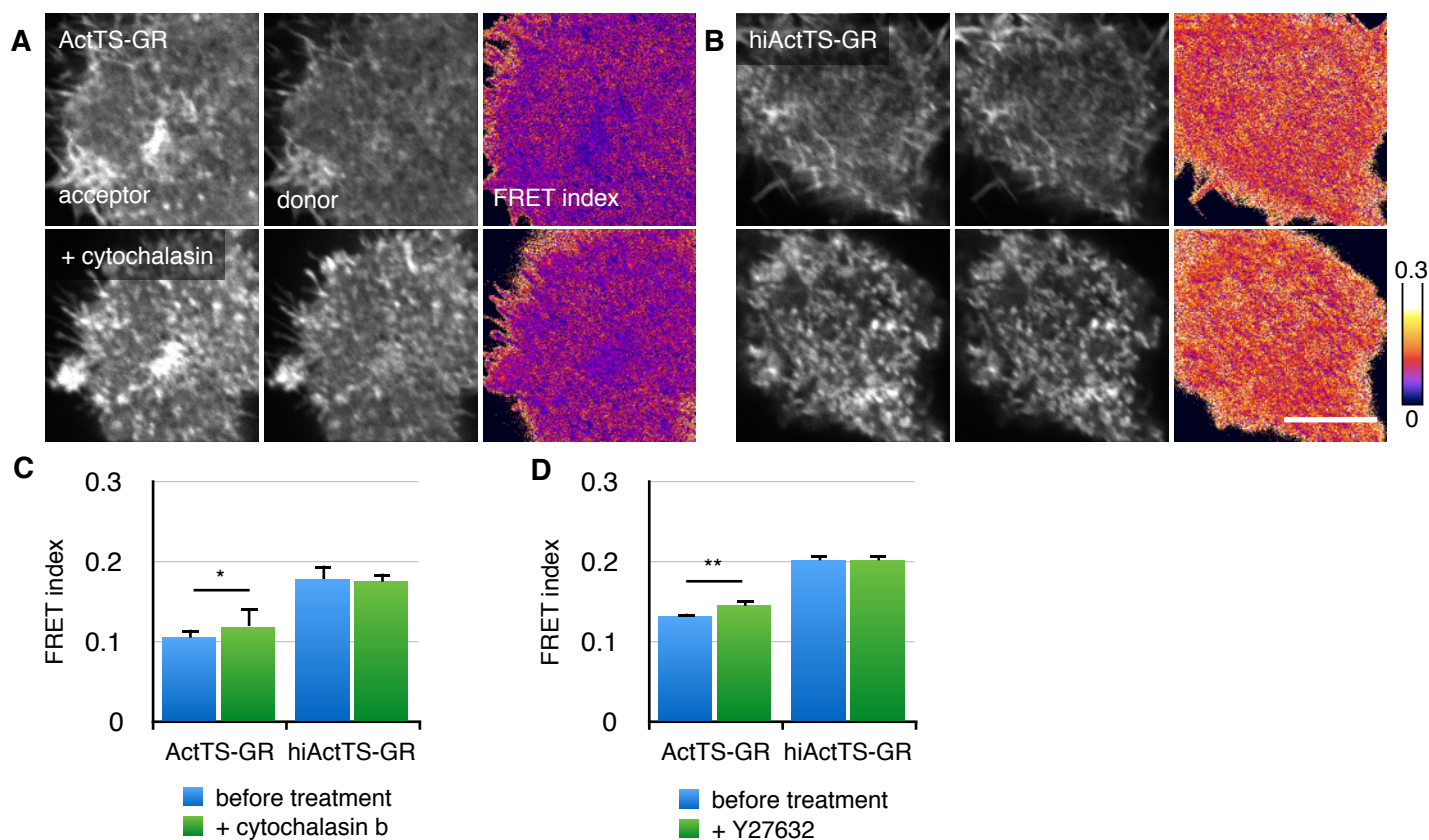


図2.6 Cytochalasin b またはY27632 処理時のFRET 効率

Cytochalasin を加える前（上）と30分間2.5  $\mu$ M のcytochalasin b 中で培養した後（下）のActTS-GR (A) またはhiActTS-GR (B) を発現しているHEK 細胞の像。左：アクセプターチャンネル。中：ドナーチャンネル。右：corrected FRET index の像。コンストラクトのフィラメント状の局在が消えいくつかの塊に凝集した。(C) Cytochalasin 処理の前と後のFRET index の定量評価。値は平均値 $\pm$ 標準偏差、 $n > 8$ 。(D) ActTS-GR またはhiActTS-GR を発現するHEK 細胞のY27632 を加える前と20  $\mu$ M Y27632 で1時間培養した時のFRET index の定量評価。Y27632 はミオシンを活性化するROCK に対し阻害剤として働く。値は平均値 $\pm$ 標準偏差、 $n = 9$ 。スケールバー = 10  $\mu$ m。\* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.0005$ .

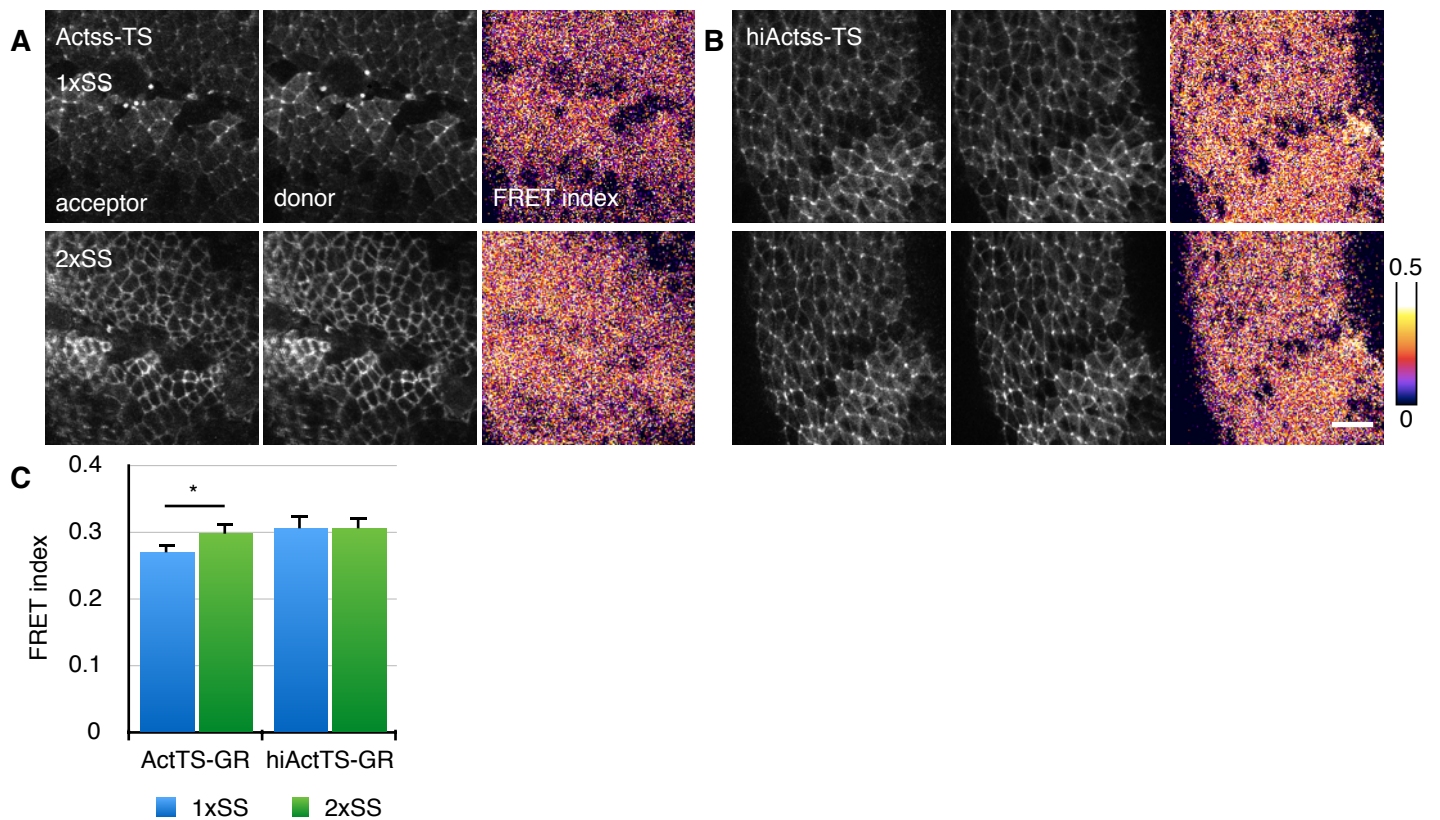


図2.7 異なる浸透圧下でのFRET 効率

(A) 1 倍濃度のSteinberg's solution (SS) に入れられた場合（上）または 2 倍濃度の SS に入れられた場合（下）の ActTS-GR (A) または hiActTS-GR (B) を発現している *Xenopus* 外胚葉の像。左：アクセプターチャンネル。中：ドナーチャンネル。右：corrected FRET index の像。(C) 異なる浸透圧下の外胚葉での FRET index の定量評価。値は平均値±標準偏差、 $n > 4$ . スケールバー = 50  $\mu\text{m}$ . \* $p < 0.05$ .

顕微鏡像を植物極側から取得して原口周辺と背側辺縁部の張力を計測した。ここではアクセプターの蛍光強度をドナーの蛍光強度で割ってFRET ratio を計算した (Meng & Sachs, 2011)。FRET ratio は他のFRET 解析に比べ画像の取得、計算が簡便な方法であり、スペクトルの重なりやアロステリック効果の影響を受けやすいため機能評価で使うことはできないが、機能が確認されたセンサーを用いた計測には応用できる。画像の取得が簡便であることは広い組織の解析や継時観察にとって有利である。ActTS-GR のFRET ratio は予定神経領域と表皮領域の間の分離をはっきりと示し、予定神経領域で表皮領域よりも低いFRET ratio を示した (図2.8 A, C)。この傾向は原腸胚期から観察された。一方、hiActTS-GR を発現させた胚では全体で一様なFRET ratio が観察され、予定神経領域と表皮領域の間に差は見られなかった (図2.8 B, C)。これらの結果は原腸胚期から予定神経領域が表皮領域よりもアクチンフィラメント上に高い張力を発生させていることを示している。また、神経胚期の予定神経領域と側方表皮領域を観察すると、FRET ratio が異なることに加え、細胞の形が違っており、予定神経領域では方向性がないのに対し、側方表皮領域では前後軸方向に伸長していた (図2.8 D)。

### 2.3.3 組織の形態形成に伴う細胞の変形と再配列

神経胚期において、神経板と側方表皮領域では異なる形の細胞が観察された。この違いがいつどのように生じるのかを調べるため、4細胞期の胚の動物局側辺縁部に400 pg の膜結合GFP のmRNA を注入し、細胞と組織の変形を測定した (図2.9, 2.10 A)。まず、細胞の移動を手作業で追跡して組織の速度勾配テンソル (図2.9, 2.10 B) を計算した (Blanchard et al., 2009)。速度勾配テンソルを用いると伸縮などの変形の度合い (strain rate) と全体の回転速度 (spin rate) を分離して測定できる (図2.9)。原腸胚期後期、予定神経領域と表皮領域の両領域の細胞群はよく似た回転と変形をしていた (図2.10 C, D)。両細胞群は前後軸に大まかに沿って伸長した。次に、細胞群と個々の細胞の伸長軸方向の幅の変化を測定した (図2.10 B, E)。

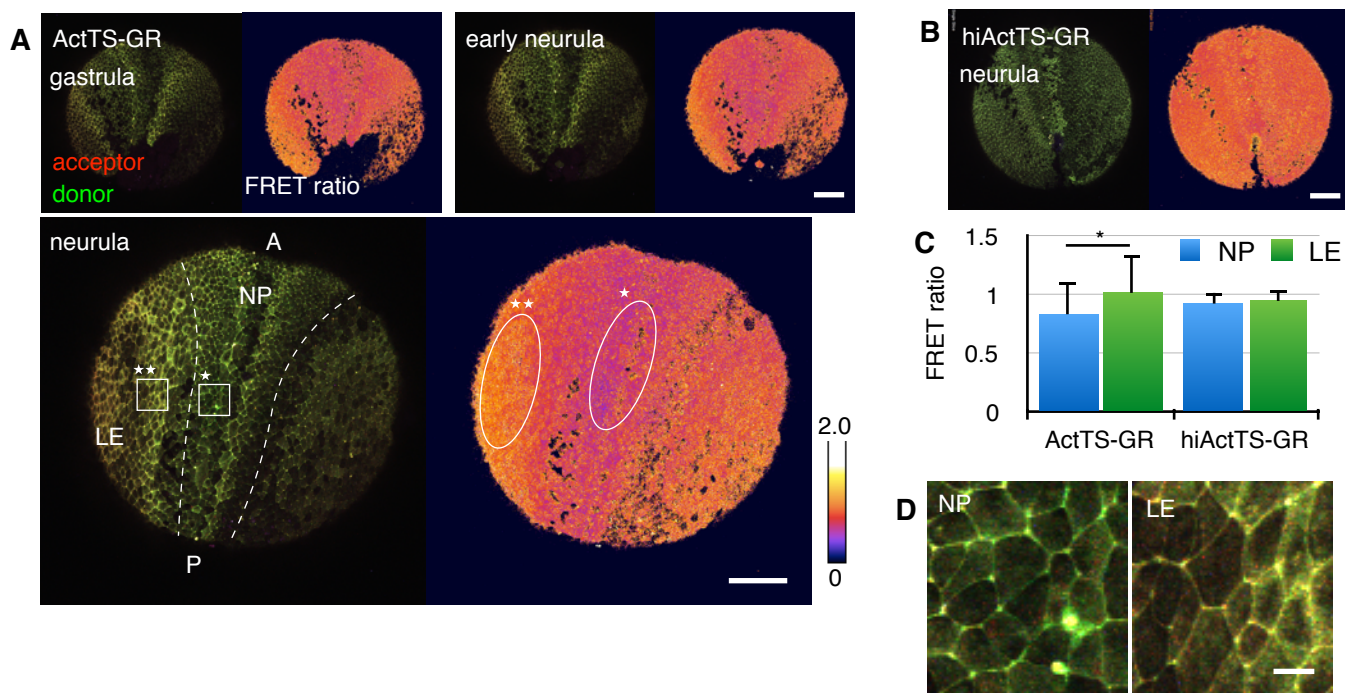


図2.8 外胚葉にかかる張力の分布

(A) ActTS-GR を発現する胚の原腸胚期から神経胚期にかけての継時観察（左）とその FRET ratio（右）。植物極側から観察した。破線は閉鎖しつつある神経板 (NP) と側方表皮 (LE) の境界を表す。A: 前方。P: 後方。(B) hiActTS-GR を発現する神経胚（左）とその FRET ratio（右）。(C) 神経胚期の神経板（Aの\*つき楕円）と側方表皮（Aの\*\*つき楕円）における FRET ratio の定量評価。値は平均値 $\pm$ 標準偏差、n > 5. (D) 神経板（Aの\*つき四角）と側方表皮（Aの\*\*つき四角）の拡大図。スケールバー = 200 $\mu$ m (A, B), 20  $\mu$ m (D).

\*p < 0.05.

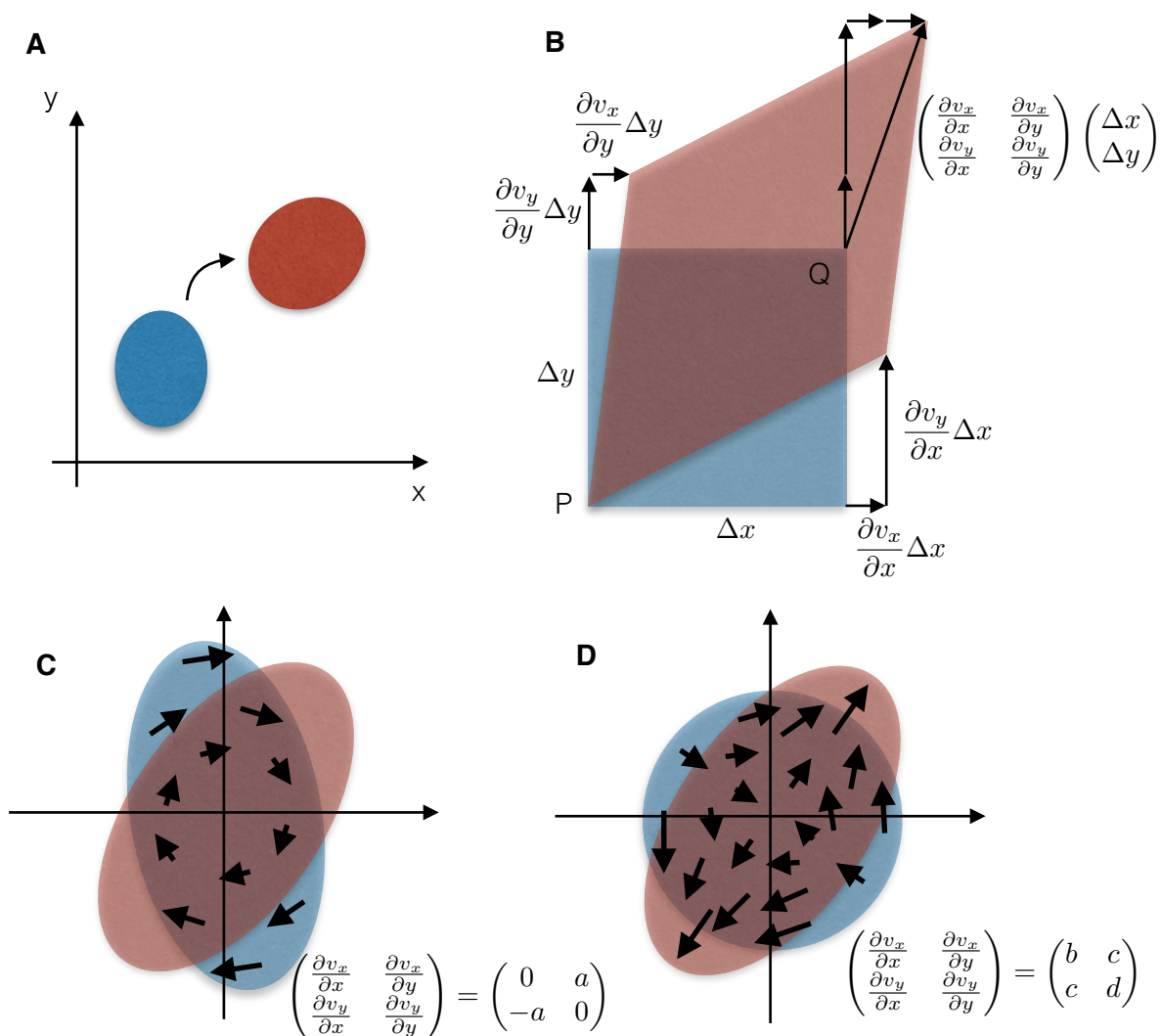


図2.9 速度勾配テンソル

速度勾配テンソルはもともと流体力学のツールで液体や気体などの自由に變形する対象の振る舞いを記述する物理量で、速度の方向成分の座標の方向成分に関する偏微分を成分とする行列によって表される。ある物体が一定の速度で移動と變形をしながら青から赤に移ったとする (A)。物体中の点Pに対し、 $(\Delta x, \Delta y)$  だけ離れたところにある点Qの相対的な速度は速度勾配テンソルと  $(\Delta x, \Delta y)^T$  の外積によって与えられる (B)。速度勾配テンソルをとった点の周りで物体が回転している場合速度勾配テンソルは対角成分が0で反対称の行列になる (C)。回転せずに變形のみしている場合速度勾配テンソルは対称行列になる (D)。一般の速度勾配テンソルはC とD の行列の和として解釈できる。

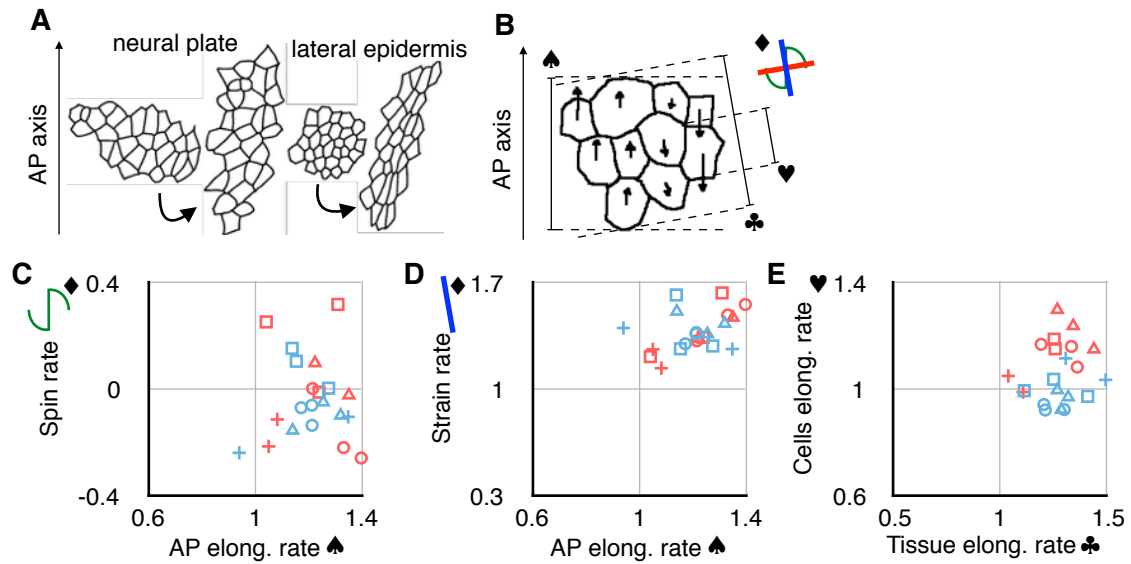


図2.10 組織と細胞の変形

(A) 前後軸方向への伸長の前と後の神経板と側方表皮の細胞群の図。(B) 細胞群と各細胞の軌跡（黒矢印）の図と計測されたパラメーター。細胞群の前後 (AP) 軸方向の幅（スパー）の変化から前後軸方向の伸長速度を計算した。各細胞の軌跡から速度勾配テンソル（ダイヤモンド）を計算し、反対称の回転速度テンソル（緑の曲線）と変形の度合いを表す対称の歪み速度テンソル（赤と青の棒）に分離した。伸長軸方向（青の棒）の細胞の幅（ハート）と細胞群の幅（クラブ）から細胞と組織の伸長速度を計算した。(C) 前後軸方向の伸長速度に対する回転速度。青のプロット：神経外胚葉。赤のプロット：表皮外胚葉。円：神経管閉鎖の開始時点（0分）。三角：40分前。四角：80分前。十字：120分前。(D) 前後軸方向の伸長速度に対する歪み速度。各シンボルはCに倣う。(E) 組織の伸長速度に対する細胞の伸長速度。各シンボルはCに倣う。

表皮領域では細胞群と個々の細胞の両方が伸長していた。これに対し、予定神経領域では組織の形態形成の間個々の細胞の幅は変化しなかった。すなわち、2つの分化しつつある領域は全体ではよく似た変形をしているにもかかわらず、個々の細胞の振る舞いは異なっていた。

原腸形成において、背側外胚葉は裏打ちする中胚葉によって前後軸方向に引き伸ばされている (Keller et al., 1992; Bauer et al., 1994)。本研究で得られた結果を総合すると、予定神経領域の細胞は表皮領域の細胞よりも強い張力をアクチンフィラメント上に発生させており、強い張力は外側からの力に対する細胞の硬さとして現れたということを示唆している (図 2.11)。予定神経領域と側方表皮領域は両方とも中胚葉によって前後軸方向に引き伸ばされており、予定神経領域では硬い細胞が再配列をひき起こすことで、表皮領域では柔らかい細胞自身に変形することで組織を変形させていると考えられる。

## 2.4・考察

本研究により ActTS-GR が胚内でも張力センサーとして十分に機能することが示された。ActTS-GR は私が試したいくつかの FRET 張力センサーの中で最も機能的なコンストラクトだった (data not shown)。この張力センサーは非侵襲的で、注入された細胞は正常発生を行い、胚は発生の初期幼生までの全過程をたどった。さらに、外胚葉からそれぞれに分化したばかりの予定神経領域と表皮領域を区別することができた。この2つの領域間で計測された張力の差は過去に報告されていたものと一致していた (Wiebe & Brodland, 2005)。神経板の発生にはカドヘリンなどの接着複合体を構成する要素の発現の変化が必要であることが報告されており (Nandadasa et al., 2009; Nandadasa et al., 2012)、これらが張力の変化を引き起こしているのではないかと予想される。

アクチンフィラメントが頂端側側面の細胞間接着面に多く局在するような上皮組織では、十分に高い解像度で取得された FRET 画像を用いて細胞接着面にかかる張力を計測することで力の方向成分も見分けることができると期待される。ActTS-GR は細胞内の張力を計測す

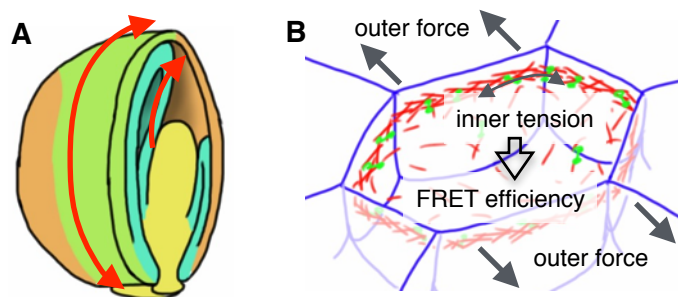


図2.11 外胚葉にかかる張力と細胞内の張力の模式図

(A) 原腸陥入時の*Xenopus* 胚と外胚葉。緑：外胚葉予定神経領域。橙：外胚葉表皮領域。水色：中胚葉。黄色：内胚葉。単頭の矢印で中胚葉の陥入を表す。予定神経領域とそこに隣接する表皮領域を含む背側外胚葉は中胚葉によって双頭の矢印の方向（前後軸方向）に引き伸ばされる。(B) 原腸陥入時の外胚葉の細胞。細胞は外力によって引っ張られると同時に内部に張力を発生させている。ActTS-GR のFRET 効率は内部に発生している張力を反映する。細胞の変形は外力と内部の張力の差によって決まり、外力が強く内部の張力が弱い側方表皮領域で細胞が大きく変形する。

るものだったが、細胞に外からかかる力もカドヘリンやtalin, その他の細胞間接着を担うタンパク質などを用いた張力センサーによって同様に計測できると期待される。しかし、FRET を利用した張力センサーはいくつかの問題点も持っている。まず、このセンサーが測定できる張力の強さの幅は広くはないため、*Xenopus* の外胚葉以外の組織で張力を計測するためにはその組織に発生している張力に合った伸縮性を持つリンカーを開発する必要がある。また、mRNA の微量注入では張力センサーを広範囲に一樣に発現させることは簡単ではなく、正確な解析のためにはセンサーが胚全体で恒常的に発現するトランスジェニック系統を確立する必要がある。

FRET を用いた張力センサーを用いれば組織全体を同時に細胞レベルの解像度で張力計測することができる。この計測は組織が生きたままの状態でもできるだけでなく、さらに重要なこととして、通常の蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡でFRET 画像の取得ができるため張力測定のための特別な機器を必要とせず、すべての研究者が即座に使用できるという利点がある。今後、このActTS-GR は形態形成や細胞再配列、組織分化における張力計測の簡便で高い空間分解能と時間分解能を持つ方法を与えると期待される。

## 総括

本研究で私は小グラフの構成による細胞配列の解析とアクチンフィラメントにかかっている張力のActTS-GRによる測定を*Xenopus*の胚で行った。小グラフの構成は全体の細胞配列を局所的な細胞配列の集まりとして捉える。局所的な細胞配列を表す小グラフは*Xenopus*胚の外胚葉から数百種が同定され、十数種の小グラフの構成比が外胚葉上に適当に取られた区画の細胞配列を特徴付けた。小グラフの構成による細胞配列の解析は、視覚的に明らかな細胞配列の境界だけでなく、他の指標では弁別し難かった原腸胚期の外胚葉における細胞配列の境界を明らかにした。また、ActTS-GRはアクチンフィラメントに結合し、アクチンフィラメントにかかる張力を反映してFRET効率を変化させた。このコンストラクトで用いたリンカーは過去に報告されたアクチニン張力センサーのhigh-FRETコントロールに関する問題 (Meng & Sachs, 2011) を解決した。*Xenopus*胚の外胚葉ではアクチンフィラメントは頂端側側面のadherens junction周辺に多量に局在して細胞間接着面を裏打ちしている。ActTS-GRにより各細胞内に発生している張力を組織全体で同時に計測することができた。イモリの胚と同様 (Wiebe & Brodland, 2005)、予定神経外胚葉で表皮性外胚葉よりも高い張力が発生していた。これらの結果から、予定神経外胚葉では細胞配列、再配列、細胞内に発生している張力のすべてが原腸胚期から変化していることがわかった。

小グラフの構成の解析とActTS-GRを用いた張力測定は細胞配列と張力の時空間的な変化の解析を可能にした。観察された細胞配列や張力の変化の境界は予定神経領域の境界と一致した。観察された境界の出現する時期は神経板への分化が始まる時期と一致し (Kishi et al., 2000)、これらの指標が境界の決定を反映していることが示唆される。また、予定神経領域と側方表皮領域がよく似た変形をしているにもかかわらず、両者の間で細胞の振る舞いが異なり、予定神経領域で活発に細胞再配列が起こっていることがわかった。*Xenopus*の外胚葉では中胚葉のようなアクチンフィラメントの局在や細胞の変形 (Wallingford et al., 2000; Skoglund et al., 2008) は観察されず、*Drosophila*の胚帯伸長に見られるような細胞接着面の

リモデリング (Bertet et al., 2004; Blankenship et al., 2006; Rauzi et al., 2010) と似た様式の細胞再配列が予定神経領域の変形を担っていると考えられる。予定神経領域と表皮領域の細胞配列の差はこの予定神経領域の細胞再配列によって生じたと考えられる。

また、小グラフの構成とActTS-GR は利用しやすい点で優れている。どのような組織でも、その細胞配列をグラフに変換し小グラフの構成を取り出すことができる。ドナーとアクセプターにEGFP とmCherry を用いるActTS-GR のFRET は通常の蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡で観察可能であり、多くの研究者が即座に利用できる。これらのツールは今後、胚発生における細胞配列や細胞の物性の制御や作用を研究する上で大いに役立つと期待される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、実験と実験結果の解析、論文作成において熱心なご指導、ご鞭撻賜りました、道上達男教授に心より感謝申し上げます。プログラミングに関してアドバイスをくださったお茶の水女子大学の山下真助教にお礼申し上げます。ActTS-GR, hiActTS-GRのコンストラクトを提供してくださった東京大学の坪井貴司准教授ならびに早稲田大学の北口哲也准教授に厚くお礼申し上げます。また、日々の研究を支えてくださった道上研究室の皆様、友人、家族にこの場をお借りしてお礼申し上げます。

## 参照文献

- Barrio, R. A., Romero-Arias, J. R., Noguez, M. A., Azpeitia, E., Ortiz-Gutierrez, E., ndez, V. H.-H., Cortes-Poza, Y., and Ivarez Buylla, E. R., 2013. Cell patterns emerge from coupled chemical and physical fields with cell proliferation dynamics: the arabidopsis thaliana root as a study system. PLoS Comput Biol 9, e1003026.
- Bauer, D. V., Huang, S., and Moody, S. A., 1994. The cleavage stage origin of spemanns organizer: analysis of the movements of blastomere clones before and during gastrulation in xenopus. Development 120, 1179.
- Bertet, C., Sulak, L., Lecuit, T., 2004. Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. Nature 429, 667–671.
- Blanchard, G. B., Kabla, A. J., Schultz, N. L., Butler, L. C., Sanson, B., Gorfinkiel, N., Mahadevan, L., and Adams, R. J., 2009. Tissue tectonics: morphogenetic strain rates, cell shape change and intercalation. Nat Methods 6, 458.
- Blankenship, J.T., Backovic, S.T., Sanny, J.S., Weitz, O., Zallen, J.A., 2006. Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis. Dev. Cell 11, 459–470.
- Borghi, N., Sorokina, M., Shcherbakova, O. G., Weis, W. I., Pruitt, B. L., Nelson, W. J., & Dunn, A. R., 2012. E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cellcell contacts upon externally applied stretch. Proc Natl Acad Sci U S A. 109, 12568–12573.
- Bosveld, F., Bonnet, I., Guirao, B., Tlili, S., Wang, Z., Petitalot, A., Marchand, R., Bardet, P.-L., Marcq, P., Graner, F., & Bellache, Y., 2012. Mechanical control of morphogenesis by fat/dachsous/four- jointed planar cell polarity pathway. Science, 336, 724–727.
- Brezavscek, A. H., Rauzi, M., Leptin, M., & Zihlerl, P., 2012. A model of epithelial invagination driven by collective mechanics of identical cells. Biophys J, 103, 1069–1077.
- Brodland, G. W., Chen, X., Lee, P., & Marsden, M., 2010. From genes to neural tube defects (ntds): insights from multiscale computational modeling. HFSP J, 4, 142–152.

- Collinet, C., Rauzi, M., Lenne, P.-F., & Lecuit, T., 2015. Local and tissue-scale forces drive oriented junction growth during tissue extension. *Nat Cell Biol*, 17, 1247– 1258.
- Conway, D.E., Breckenridge, M.T., Hinde, E., Gratton, E., Chen, C.S., & Schwartz, M. A., 2013. Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across *ve-cadherin* and *pecam-1*. *Curr Biol*, 23, 1024–1030.
- Desprat, N., Supatto, W., Pouille, P.-A., Beaurepaire, E., & Farge, E., 2008. Tissue deformation modulates *twist* expression to determine anterior midgut differentiation in *drosophila* embryos. *Dev Cell*, 15, 470–477.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Digabel, J. L., MattiaForcato, B., Biciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S., 2011. Role of *yap/taz* in mechanotransduction. *Nature*, 474, 179–183.
- Elul, T., Keller, R., 2000. Monopolar protrusive activity: a new morphogenic cell behavior in the neural plate dependent on vertical interactions with the mesoderm in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 224, 3–19.
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E., 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126, 677–689.
- Escudero, L.M., da F. Costa, L., Kicheva, A., Briscoe, J., Freeman, M., Babu, M.M., 2011. Epithelial organisation revealed by a network of cellular contacts. *Nat. Commun.* 2, 526.
- Ezina, A.M., Skoglund, P., Keller, R., 2006. The presumptive floor plate (notoplate) induces behaviors associated with convergent extension in medial but not lateral neural plate cells of *Xenopus*. *Dev. Biol.* 300, 670–686.
- Farge, E., 2003. Mechanical induction of *Twist* in the *Drosophila* foregut/stomodaeal primordium. *Curr. Biol.* 13, 1365-1377.
- Farhadifar, R., Röper, J.-C., Aigouy, B., Eaton, S., Jülicher, F., 2007. The influence of cell mechanics, cell–cell interactions, and proliferation on epithelial packing. *Curr. Biol.* 17, 2095–2104.

- Fernandez-Gonzalez, R., Simoes, S.M., Röper, J.C., Eaton, S., Zallen, J.A., 2009. Myosin II dynamics are regulated by tension in intercalating cells. *Dev. Cell* 17, 736-743.
- Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., Zhou, R., Parsons, M., McLean, M. T. Y. M. A., Sligar, S. G., Chen, C. S., Ha, T., & Schwartz, M. A., 2010. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466, 263–266.
- Haigo, S.L., Hildebrand, J.D., Harland, R.M., Wallingford, J.B., 2003. Shroom induces apical constriction and is required for hinge point formation during neural tube closure. *Curr. Biol.* 13, 2125–2137.
- Hayakawa, K., Tatsumi, H., & Sokabe, M., 2008. Actin stress fibers transmit and focus force to activate mechanosensitive channels. *J Cell Sci*, 121, 496–503.
- Hildebrand, J.D., 2005. Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J. Cell Sci.* 118, 5191–5203.
- Hirata, H., Gupta, M., Vedula, S. R. K., Lim, C. T., Ladoux, B., & Sokabe, M., 2015. Actomyosin bundles serve as a tension sensor and a platform for erk activation. *EMBO Rep*, 16, 250–257.
- Ishihara, S. & Sugimura, K., 2012. Bayesian inference of force dynamics during morphogenesis. *J Theor Biol*, 313, 201–211.
- Keller, R., Shih, J., Sater, A., 1992. The cellular basis of the convergence and extension of the *Xenopus* neural plate. *Dev. Dyn.* 193, 199–217.
- Kelley, M., Yochem, J., Krieg, M., Calixto, A., Heiman, M. G., Kuzmanov, A., Meli, V., Chalfie, M., Goodman, M. B., Shaham, S., Frand, A., & Fay, D. S., 2015. Fbn-1, a fibrillin-related protein, is required for resistance of the epidermis to mechanical deformation during *c. elegans* embryogenesis. *Elife*, 4, e06565.
- Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S., Sasai, Y., 2000. Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* 127, 791-800.

- Krieg, M., Dunn, A. R., & Goodman, M. B., 2014. Mechanical control of the sense of touch by -spectrin. *Nat Cell Biol*, 16, 224–233.
- Lan, K., Tao, H., Liu, H., Wen, J., Sturgeon, K., Sorfazlian, N., Lazic, S., Burrows, J. T. A., Wong, M. D., Li, D., Deimling, S., Ciruna, B., Scott, I., Simmons, C., Henkelman, R. M., Williams, T., Hadjantonakis, A.-K., Fernandez-Gonzalez, R., Sun, Y., & Hopyan, S., 2015. Anisotropic stress orients remodelling of mammalian limb bud ectoderm. *Nat Cell Biol*, 17, 569–579.
- Landsberg, K.P., Farhadifar, R., Rnft, J., Umetsu, D., Widmann, T.J., Bittig, T., Said, A., Jülicher, F., Dahmann, C., 2009. Increased cell bond tension governs cell sorting at the *Drosophila* anteroposterior compartment boundary. *Curr. Biol.* 19, 1950–1955.
- Lee, C., Scherr, H.M., Wallingford, J.B., 2007. Shroom family proteins regulate  $\gamma$ -tubulin distribution and microtubule architecture during epithelial cell shape change. *Development* 134, 1431–1441.
- Meng, F. & Sachs, F., 2011. Visualizing dynamic cytoplasmic forces with a compliance-matched fret sensor. *J Cell Sci*, 124, 261–269.
- Morita, H., Nandadasa, S., Yamamoto, T.S., Terasaka-Iioka, C., Wylie, C., Ueno, N., 2010. Nectin-2 and N-cadherin interact through extracellular domains and induce apical accumulation of F-actin in apical constriction of *Xenopus* neural tube morphogenesis. *Development* 137, 1315–1325.
- Nandadasa, S., Tao, Q., Menon, N. R., Heasman, J., & Wylie, C., 2009. N- and e-cadherins in *xenopus* are specifically required in the neural and non-neural ectoderm, respectively, for f-actin assembly and morphogenetic movements. *Development*, 136, 1327–1338.
- Nandadasa, S., Tao, Q., Shoemaker, A., wook Cha, S., & Wylie, C., 2012. Regulation of classical cadherin membrane expression and f-actin assembly by alpha-catenins, during *xenopus* embryogenesis. *PLoS One*, 7, e38756.
- Nishimura, T., Honda, H., Takeichi, M., 2012. Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural-tube closure. *Cell* 149, 1084–1097.

- Periasamy, A., Wallrabe, H., Chen, Y., & Barroso, M., 2008. Chapter 22: Quantitation of protein-protein interactions: confocal fret microscopy. *Methods Cell Biol.* 89, 569–598.
- Pržulj, N., Corneil, D.G., Jurisica, I., 2004. Modeling interactome: scale-free or geometric?. *Bioinformatics* 20, 3508–3515.
- Rauzi, M., Lenne, P.-F., Lecuit, T., 2010. Planar polarized actomyosin contractile flows control epithelial junction remodelling. *Nature* 468, 1110–1115.
- Rozbicki, E., Chuai, M., Karjalainen, A. I., Song, F., Sang, H. M., Martin, R., Knlker, H.-J., MacDonald, M. P., & Weijer, C. J., 2015. Myosin-ii-mediated cell shape changes and cell intercalation contribute to primitive streak formation. *Nat Cell Biol*, 17, 397–408.
- Shindo, A., Yamamoto, T.S., Ueno, N., 2008. Coordination of cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *PLoS One* 3, e1600.
- Skoglund, P., Rolo, A., Chen, X., Gumbiner, B.M., Keller, R., 2008. Convergence and extension at gastrulation require a myosin IIB dependent cortical actin network. *Development* 135, 2435–2444.
- Varner, V. D., Voronov, D. A., & Taber, L. A., 2010. Mechanics of head fold formation: investigating tissue-level forces during early development. *Development*, 137, 3801–3811.
- Vincent, L., Soille, P., 1991. Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 13 (6), 583–598.
- Wallingford, J.B., Rowning, B.A., Vogell, K.M., Rothbächer, U., Fraser, S.E., Harland, R.M., 2000. Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 405, 81–85.
- Wiebe, C. & Brodland, G. W., 2005. Tensile properties of embryonic epithelia measured using a novel instrument. *J Biomech*, 38, 2087–2094.
- Zallen, J.A., Wieschaus, E., 2004. Patterned gene expression directs bipolar planar polarity in *Drosophila*. *Dev. Cell* 6, 343–355.