

論文内容の要旨

論文題目: Emergence of traveling waves in the segmentation clock (分節時計における移動波の出現メカニズム)

氏名 石松 愛

Introduction

心臓の拍動や概日リズムに代表されるように、多くの生命現象においてリズム、すなわち振動現象は重要な意味をもつ。特に、多数の振動子が協調的に振動することは、組織もしくは個体として統一的なリズムを刻むために重要である。本研究では、体節形成に利用されるリズムの協調に焦点をあてた研究を行った。

体節形成過程では、多数の振動子が集団で協調的に振動することで、移動波という時空間パターンが形成される。本研究では、移動波の出現メカニズムを、ゼブラフィッシュをモデルに、数理解析と実験解析を組み合わせることで明らかにした。

脊椎動物における体節 (図1 a) は、未分節中胚葉 (presomitic mesoderm; PSM) という連続した組織に、一定時間おきに一定間隔で、切れ目が入ることで形成される (図1 b)。この時間的/空間的周期性を支配するのは、PSMで機能する分節時計と呼ばれる分子時計である。分節時計は細胞を単位とする振動子の集合体であり、個々の細胞内では、*her1*という転写抑制因子が、自身の転写を抑制することで、転写のON/OFFを繰り返す。この細胞振動子 (cellular oscillator) は、振動子間で協調した位相差を作ることで、移動波と呼ばれる波状のパターンを示す (図1 c)。この波は、PSM後端で現れ、徐々に前方に移動し、PSM前端で停止するが、この停止のタイミングと位置が、分節がおこるタイミングと位置の情報に変換されると考えられている。過去の研究により、分節時計の構成要素に関する知識は蓄積しているが、移動波形成におけるシステムレベルの理解はほとんど進んでいなかった。本研究では、発生過程初期における移動波出現過程に着目した研究を行い、そのメカニズムを明らかにした。

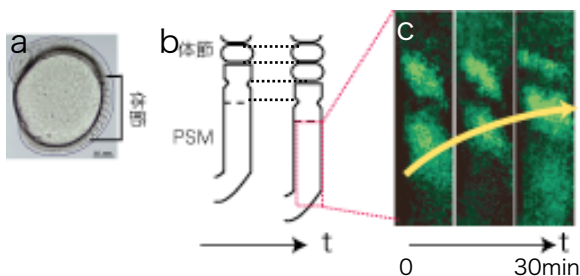


図1 体節形成・移動波の模式図

a ゼブラフィッシュの体節。 b 体節形成の模式図。 c 分節時計における移動波。 緑は*her1*のmRNA。 時間経過とともに、発現部位が前方にシフトする。

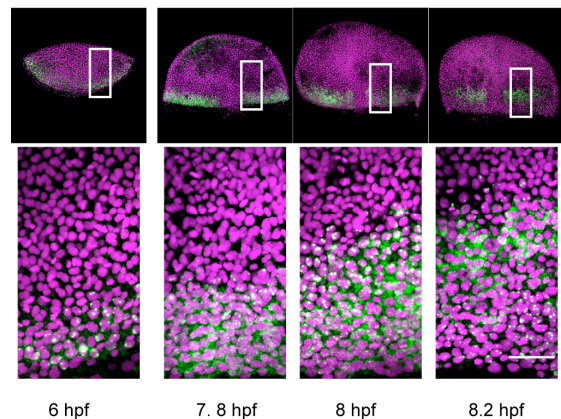


図2 移動波の出現過程

*her1*の発現の時系列データ。 最初は、マージン領域のみで発現が観察されるが、徐々にバンド状の発現が前方にシフトする。 緑; *her1* mRNA, マゼンタ; 核. hpf; 受精後経過時間 (hours postfertilization)

Results

1-1. 局所振動から移動波への状態遷移

高感度in situ hybridizationにより*her1*発現の時系列解析を行ったところ、*her1*の空間振動パターンは、原腸形成期に、大きく変化することが明らかになった。振動開始直後の*her1*は胚と卵黄の境界領域（マージン領域）で局所的に同調振動を示す。数サイクルの局所的な同調振動の後、それまで*her1*を発現していなかった前方領域の細胞が、後方から順に振動を開始し、移動波に切り替わる(図2)。

1-2. 移動波出現はFgfによる二通りの制御を受ける

薬剤処理や過剰発現実験から、この切り替えにはFgfが必須の役割を果たしていることがわかった。さらに、以下に示すように、Fgfは、*her1*の発現開始時の「初期位相」と「振動周期の空間勾配」を同時に制御することで、移動波を生み出すことが明らかになった。前方へ進行する波が形成されるには、初期位相、すなわち、振動開始時の位相が前方ほど遅れていること、もしくは、振動周期が前方ほど長いことが必要である。いずれの場合にも、移動波を生じることが理論的研究から明らかになっている(図3)。

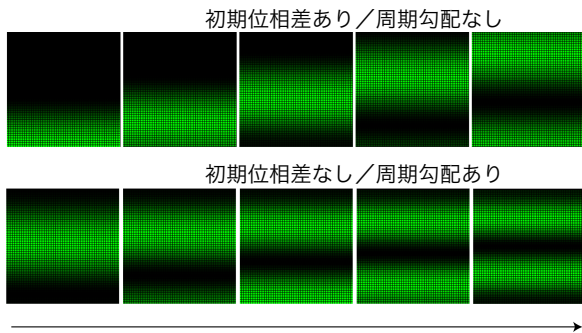


図3 初期位相差/振動周期勾配による移動波形成のシミュレーション

シミュレーションでは、50個の細胞を一列に並べ、その振動パターンを調べた。上; 各振動子が振動開始時に異なる位相(前方ほど遅れて振動を開始)をもち、振動周期は全て同じ場合。下; 初期位相は同じで、振動子ごとに異なる周期を持つ場合(前方ほど周期が長い)。どちらの場合にも波が形成される。

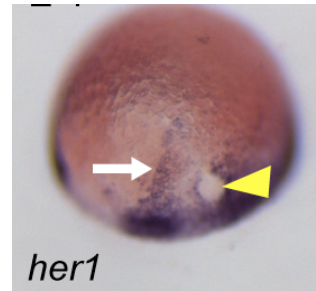


図4 Fgfによる*her1*移動波の誘導

移動波発生前の胚にFgfビーズを移植すると(黄色矢じり)、ビーズ周囲に異所的に*her1*の移動波が誘導される(白矢印)。これより、Fgfは*her1*の振動を誘起できることがわかる。

1-2-1. Fgf活性の領域拡大によって*her1*の初期位相差が作られる

*her1*の振動領域は、移動波の進行に伴って拡大する。Fgfの活性の時系列変化を調べたところ、*her1*振動領域と同様、マージン領域から徐々に拡大する、という時系列変化を示した。また、Fgfは*her1*の振動を誘起できる(図4)。これらは、Fgf活性が後方から前方に向かって徐々に拡大することによって、*her1*の振動が後方から前方に向かって徐々に開始することを示している。その結果、振動開始時における初期の位相差が与えられるのである。

1-2-2 Fgfは*her1*振動周期勾配形成を制御する

薬剤処理によりFgfの活性を空間一様に減少させたところ、*her1*移動波の空間パターンが変化し、より後方に細いストライプが形成されることがわかった。数理モデルを用いて計算機シミュレーションを行ったところ、この変化は振動周期が長くすることで再現された(図5)。すなわち、Fgfは*her1*の振動周期勾配も制御していることが示された。

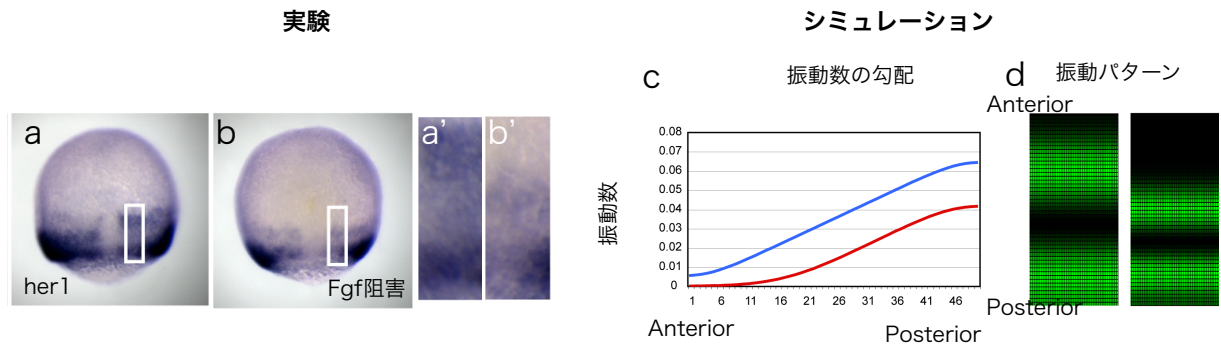


図5 Fgf阻害実験とシミュレーションの比較

上段: 薬剤処理によるFgf阻害時のher1の空間パターンの変化. a, b 正常胚、Fgf阻害胚におけるher1の発現. a', b'は白枠内の拡大. 下段: 振動周期の勾配を改変した場合に予想される振動パターン(シミュレーション). シミュレーションの条件は図3に同じ. c シミュレーションで用いた振動数(周期の逆数)勾配(横軸: 細胞の位置、縦軸: 振動数). d 各振動数勾配に対応する振動パターン. 左から、c中の緑、青、赤で表される振動数勾配をもって. 振動数を全体に減少させた時の振動パターンは、Fgf阻害胚におけるher1の振動パターンとよく一致する.

以上から、振動子集団の初期位相と振動周期がFgfによる制御を受けることによって(図6)、分節時計における移動波の発生が実現されていることが明らかになった。

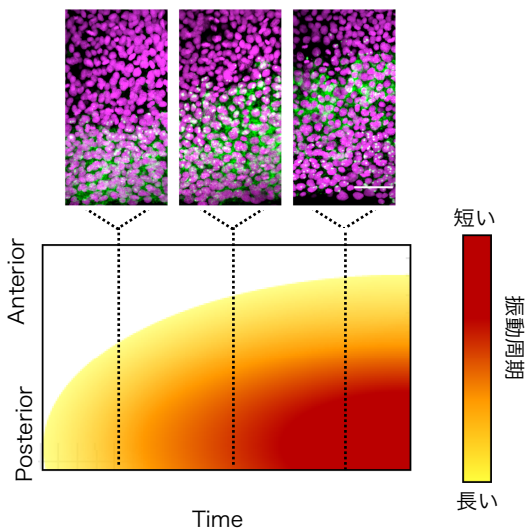


図6 移動波出現過程における初期位相・振動周期のモデル図

上段の移動波出現過程における振動の初期位相・振動周期を下段に模式的に示した. 下段の図中、白色の領域は振動していないことを示す. 振動開始位置が徐々に前方にシフトすることで、位相差が与えられる. 同時に、周期の空間勾配も形成される. これらは共にFgfによって制御される.

2. 振動周期に空間勾配を与えうる2つのメカニズム

現在までに、Fgfがどのようにして振動周期に勾配を与えているかは全く不明である。そこで、数理モデルを用いて振動周期に勾配を与えうる方法を探索したところ、2つの方法が見つかった。

一つめは、単純に、個々の細胞がもつ固有の振動周期に空間的勾配を与えるというものである。この結果、観測される振動周期にも空間的勾配が生じる(図7 a)。

もう一つは、境界条件を利用する方法である。具体的には、PSM前端に振動しない細胞を配置し、振動する領域と相互作用させる。この相互作用の結果、たとえ細胞固有の振動周期には空間的勾配を与えなくとも、観測される振動周期には空間的勾配が生じることが予測された(図7 b)。どちらの場合にも、結果として生じる空間振動パターンは、her1の振動パターンをよく再現する。

さらに、これら2つの可能性を生体で検証するための実験も提唱する。これは、振動しない細胞の一部を、振動する細胞集団内に異所的に配置する、というものである。これにより、振動しない細胞と振動する細胞の間に積極的な細胞間相互作用があるかを検証することができる。もし、相互作用がなければ、細胞固有の振動周期にもとから勾配が与えられている可能性が高く、相互作用があれば、境界条件が重要であることが示唆される。今後、この予測をもとに、モデルの検証がおこなわれ、her1の空間振動パターンを形成するメカニズムの理解がさらに進むことを期待する。

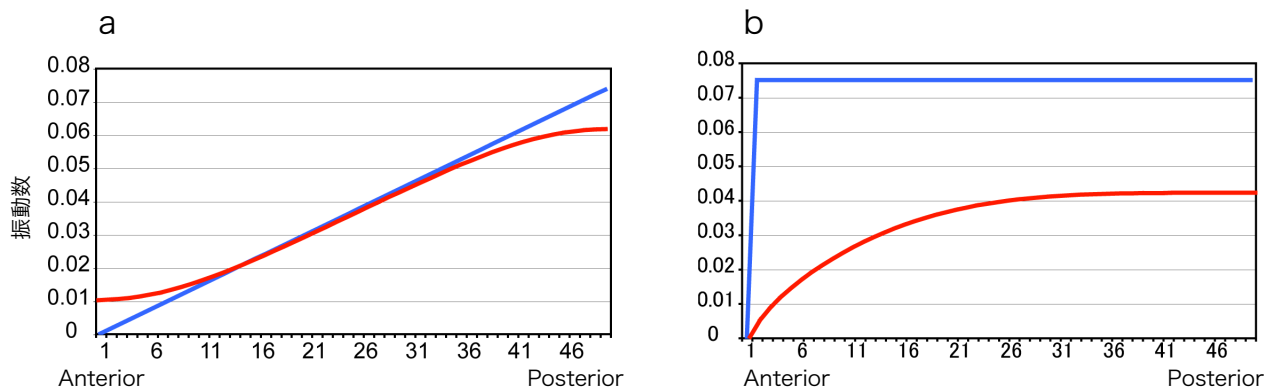


図7 振動周期に空間勾配を与える2つのメカニズム

a 細胞ごとの固有の振動数 (周期の逆数、青線) に空間的な勾配を与えた場合。実際に現れる振動数 (赤線) も空間勾配を示す。b 細胞ごとの固有の振動数は一定で、前端の細胞のみ固有振動数を0した場合 (青線)。前端の細胞とそれ以外の細胞に相互作用があれば、実際に現れる振動数 (赤線) は空間的勾配を示す。

以上のように、数理解析を、実験結果の解釈・実験のデザインのツールとして用い、実験的解析と組み合わせることで、多数の振動子からなる波という複雑な空間ダイナミクスの理解を大きく進めることができた。

参考文献

- Horikawa, K., Ishimatsu, K., Yoshimoto, E., Kondo, S., & Takeda, H. (2006) Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature* 441, 719-723.
- Ishimatsu, K., Horikawa, K., & Takeda, H. (2007) Coupling cellular oscillators: A mechanism that maintains synchrony against developmental noise in the segmentation clock. *Dev Dyn* 236, 1416-1421.
- Ishimatsu, K., Takamatsu, A., & Takeda, H. (2009) Emergence of Traveling Waves in the Segmentation. *Development* submitted