

機関番号：14401

領域設定期間：2015.4～2019.3

領域番号：3705

研究領域名（和文） 生物の3D形態を作る原理

研究領域名（英文） Principle to Determine the 3D Morphology of Organisms

領域代表者

近藤滋 (Kondo Shigeru)

大阪大学大学院・生命機能研究科・教授

研究者番号：10252503

交付決定額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,173,600,000円

## 研究成果の概要

計画研究では、(1)細胞シートの折り畳みと展開による形態形成、と(2)細胞集団の回転が起こす形態変化をテーマとして、これまでの形態形成研究で扱えなかった「マクロなサイズの3D形態がどのような原理で生じるのか」を解明することを目的とした。

(1)の主な研究対象は、カブトムシとショウジョウバエである。カブトムシの角は、幼虫から蛹になるときに、一瞬で出現する。幼虫の頭部には角が「折りたたんだ」状態で格納されておりそれを一気に展開させて角を作るのである。つまり、蛹の巨大な角は、角前駆体の折り畳みパターンとしてコードされていることになる。角形成を理解するには、(1-A)折り畳みパターンと角の展開後の3D形態の関係と(1-B)細胞シートに折り畳みを作る原理の解明が必要である。(1-A)に関しては、角の前駆体の形態を計算機内に再現して、折り畳みパターンを人工的に変異させ、3D形態がどのように変わるかを調べることで、ほぼ解明することができた。角の形態を変異させる遺伝子を約20個発見しそれらがどのように折り畳みパターンに影響を与えるかを調べることで、解明への道筋ができていく。また、ショウジョウバエの幼虫や成虫原基のクチクラ形成を調べることで、折り畳み構造がどのようにして作られるのかについても、完全な解明につながる重要な知見が多く得られた。

(2)の主な研究対象は、ゼブラフィッシュの体節である。体節は約200個の細胞集団が球状に集まったものであるが、徐々に背腹軸方向に伸長し、特徴的な形態を作る。このとき、細胞集団が全体として回転していることが解っている。個々の細胞の位置、速度、形態を正確に測定した結果、それぞれの細胞は異なる速さで回転しており、その速度差により一部の細胞が前方の細胞の隙間に入り込むことで、背腹軸方向の伸長が起きることが明らかとなった。回転は伸長とその方向決めのため両方に必須である。また、培養細胞系でも、ほとんど同じ現象を再現することに成功しており、この原理が、別の形態形成現象にも使われる普遍的なものであることを示唆した。

公募研究、一部の計画研究では、上記以外の3D形態形成現象を扱い、様々な系での3D形態形成原理の解明、および理論、技術の開発を行った。

非常にチャレンジングな研究テーマであったが、全体として、(1)、(2)において3Dの形態形成を、次元を落とさず解析することができることを、実例を持って示し、また、実験技術を開発することで、形態形成研究に新しい道を開くことができたと考える。

研究分野:発生学、形態学、理論生物学

キーワード:形態形成、3次元、数理モデル、シミュレーション、カブトムシ

### 1. 研究開始当初の背景

生物の形態が、どのような原理でできるのかは、非常の多くの研究者や一般人の興味の対象でありながら、未だに理解には程遠い状態が続いている。その原因の一つは、現状の生命科学の研究が、「形態」(特にマクロな外部形態)を理解に、必ずしもつながらない対象に集中していることである。まず、発生研究は主に初期胚を中心に行われていること。特に脊椎動物の場合、咽頭胚まではほぼすべての生物種で同じ形態であり、後期発生で複雑な「形」ができる原理に迫ることはできない。次に、細胞レベルの反応が中心になっていること。個体の大きさは最低でも細胞数100個のレベルの大きさであり、細胞レベルの現象を理解しても、個体レベルの形態にはつながらない。さらに、扱う現象の次元が低い(1,2次元)こと。いうまでもなく、形態は3次元であり、1,2次元のパターン形成

の原理が解るだけでは「形」に迫ることはできない。

研究対象を3Dとして扱うことができなかった主な理由は、技術的な制限である。我々が見る画像は2Dであり、3Dの形態は記録すること自体が難しいし、正確に表現することは、さらに難しい。しかしながら、最近の技術的進歩は3Dの形態をそのまま扱うことを可能にしつつある。ライトシート顕微鏡やCTは、3D形態の記録を劇的に簡単にし、数理モデルを使った計算機シミュレーションは、3Dの形態を「操作する」ことを可能にしつつある。また、それらを駆使できる研究者が増えてきたことも大きい。つまり、環境が整いつつある今こそ、3Dの形態形成にチャレンジするタイミングとして最良である。

## 2. 研究の目的

複雑な3D形態形成原理を解明するためには、現状の技術で対応できる単純な生命現象を見つけて必要がある。本研究では、以下の2つを主なテーマとして選んだ。

### (1) 細胞シートの折り畳みと展開による形態形成

特にカブトムシの幼虫から蛹にかけておきる角形成に注目する。カブトムシの角原基は、幼虫の頭部に「折りたたまれた細胞シート」として存在し、それが体液の圧力により展開されて角が出現する。これが良いモデルシステムである理由は、脱皮は1時間以内におき、その間細胞の分裂、移動、変形、細胞死はほとんど起きない事である。つまり、折り畳みの展開だけに注目すればよく、それであれば計算機で扱えるレベルである。また、折り畳みを作る細胞レベルの原理は、ショウジョウバエや培養細胞で解析可能である点も重要である。

具体的な課題は、以下の2つ。

(1-A) 折り畳みパターンと角の展開後の3D形態の関係を明らかにする

(1-B) 細胞シートに折り畳みを作る原理を明らかにする

### (2) 細胞集団の回転が起こす形態変化

脊椎動物の体節は、約200個の細胞集団が球状に集まったものであるが、徐々に背腹軸方向に伸長し、特徴的な形態を作る。このとき、細胞集団が全体として回転していることが解っている。体節の回転が起きない場合、体節の変形も起きないため、この回転に意味があることは推測されていたが、それがどのような原理に基づくものなのかは、全くわかっていなかった。また、昆虫にも回転現象が伴う形態形成は存在する。その一つが、ショウジョウバエの中腸の回転である。これらの現象で、回転と変形が起きる理由の解明が進んでいなかったのは、生体内で多数の細胞が同時に動く状態の計測自体が難しかったからである。そのため、計画の中心的課題は、

(2-C) 全ての細胞の動態を同時に計測することで変形の原因を解明する

事とした。さらに、インビトロの条件下で細胞集団が協調的に形態変化を起こす現象があることから、それを利用して、

(2-D) 体節内で起きている形態変化のインビトロで再現する

事も目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1-A) 折り畳みパターンと角の展開後の3D形態の関係

脱皮直前のカブトムシ幼虫の角原基の3D形態をマイクロCTおよび、連続切片から再構成し、それを計算機内で、内側から圧力をかけて膨らませ、リアルな蛹と同じ形態になるかどうかを調べる。さらに、計算機内の物理モデルに対し、人為的操作により皺を消すなどの操作を行う。それをふくらませた結果できる3D形態と正常な個体の差から、各部位の皺が3D形態に与える寄与を知り、折り畳みと3D形態の関係を理解する。また、コスタリカで様々な角形態を持つツノゼミの幼虫を採取し、カブトムシで行った解析を行い、多様な形態の形成原理を推定する。

### (1-B) 細胞シートに折り畳みを作る原理

RNAiを使い、関連遺伝子をノックダウン形態に与える影響を見る。また、皺形成直前の細胞の動態から、背後にある原理を推測する。

### (2-C) 全ての細胞の動態を同時に計測することで変形の原因を解明

ライトシート顕微鏡を使い、発生途中のゼブラフィッシュ胚において体節を構成するすべての細胞の位置形態を記録し、変形の原因を推測。その後、数理モデルによる検証を行う。

### (2-D) 体節内で起きている形態変化のインビトロで再現

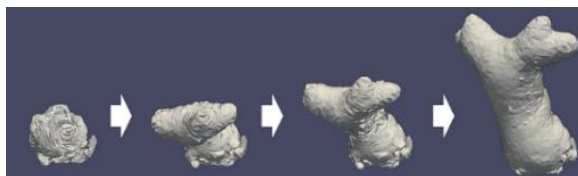
集団的な動きをすることが解っているMDCK細胞などを、様々な細胞外マトリックスでコートした培養皿や、マトリゲルなどの3D培地で培養し、その形態変化を記録。培養条件と、細胞集団の形態との相関から、そのロジックを探る。ひとつの目的は、体節の変形を再現することである。

## 4. 研究の成果

(1-A) 折り畳みパターンと角の展開後の3D形態の関係(近藤グループ、井上グループ、秋山グループ、新美グループ:公募)

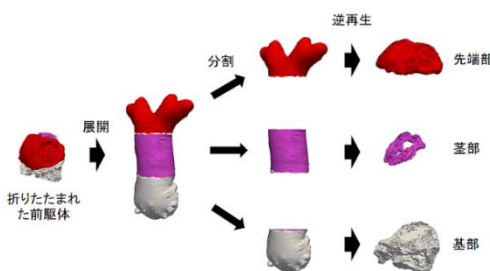
まず、角の3D 形態が、本当に折り畳みの展開だけで起きるかを確認した。右図上が、原基の CT 像である。この画像から、計算機内に3D 形態を構築し、それを、内側から圧力をかけることによって展開させたのが下図である。このように、畳まれた形態から、蛹角の形態に正確に変化した。この結果は、予測されたように、変態過程においては、折り畳みの展開以外のマイクロなレベルの現象は起きていないことを証明している。

### 計算機内での折り畳み展開

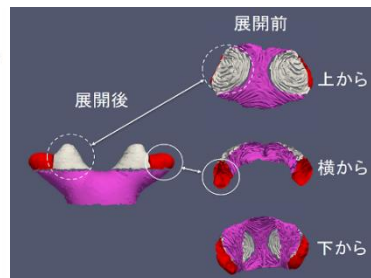


次に、折り畳みと3D 形態を繋ぐロジックの解明に着手した。その過程を図3~6に示す。まず、展開後の角形態を3つに分け、それを逆再生して折り畳まれた状態を先端部、茎部、基部、の3つに分割し、それぞれについて詳しく調べた。スペースの都合により、ここでは先端部についてのみ説明する。先端部を、折り畳みのパターンを基準に、さらに3つの領域に分けたものが図4である。この後それぞれの領域の折り畳みを人為的に消し、展開後の形態が正常な角とどの用に異なるかで、各部分の折り畳みの意味を調べていく。例として以下に2つ挙げる。上部の同心円状の折り畳みパターンを消した場合、内側の突起が低くなる。

### 原基を3分割

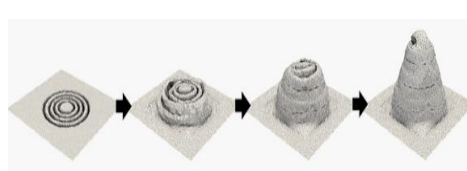


### 先端部をさらに3分割



同心円折り畳みの削除 同心円の折り畳みは突起を作る

底面の折り畳み削除 下面の折り畳みが立ち上がりを作る



同心円状の折り畳みの形態変化をシミュレーションすると、円錐状の突起を作ることから、この部分の折り畳みパターンが、突起と対応していることが解る。次に、原基下面の折り畳みを消すと分岐部分の立ち上がりが小さくなる。上面と下面の折り畳みの向きの違いで、両側の立ち上がりを作っていることが解る。

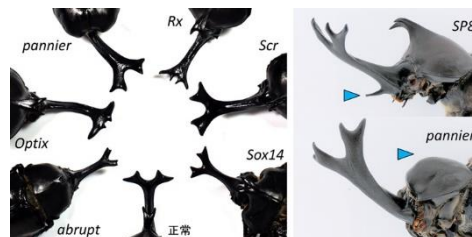
このような解析により、角各部分の折り畳みパターンが異なるやり方で3D 形態形成に参与していることが解った。これらのパターンをアレンジを変えて組み合わせることで、多様な形態の角が作れることが明らかとなり、そのルールに従って任意の角形態を、折り畳みパターンを使ってデザインすることも、可能になっている。また、発見された原理がどの程度の形態的な多様性を作れるかを調べるため、コスタリカ産ツノゼミを研究対象としてさらに解析を進めている。

### ヨツコブツノゼミの角形成



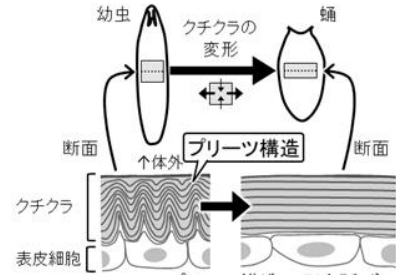
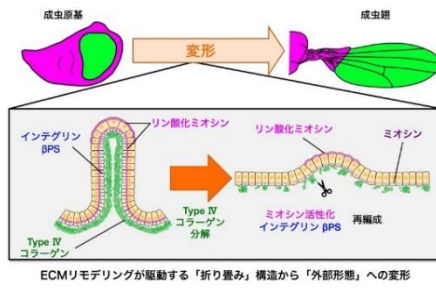
### (1-B) 細胞シートに折り畳みを作る原理 (近藤グループ、新美グループ、大澤グループ、上野グループ)

RNAi の手法により(カブトムシでは、新美により技術が確立) 遺伝子スクリーニングを行い、20 の関連遺伝子を特定した。これが、今後の分子レベルの研究の基礎となる。その中でも、特に興味深いのが notch とサイクリン E である。notch をノックダウンすると、折り畳みが浅く、間隔も狭くなるが、方向性は変化しない。逆にサイクリン E のノックダウンでは、折り畳みの深さは変化しないが、方向性に異常が出る。





大澤グループは、ショウジョウバエを対象に折り畳み構造の安定化に、インテグリンがキーになっており、原基の展開のタイミングを決めることを示した。田尻グループは、クチクラ

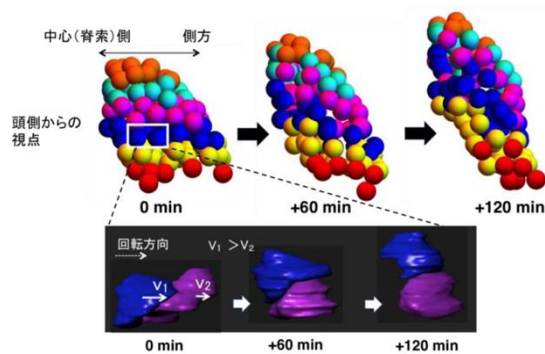


を産生する細胞表面の働きが、クチクラの折り畳みを作ること、さらに、折り畳み構造の方向性を決めていていることを証明している。今後、詳細な分子メカニズムの解析は、実験の容易なショウジョウバエを中心に行う方が、効率的であろうと考える。

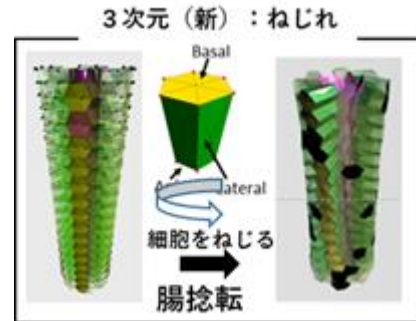
上野グループ(井上、澤井と共同)は、脊椎動物の神経上皮細胞シートの折りたたみの機構を解析し、細胞の先端に形成されるラメリポディアの性質(長さ、方向性)と細胞の粘弾性の変化が、キーになることを発見した。培養細胞の実験は、実験システムとして昆虫の系と相補するため、今後、両社の実験を統合していくことで、さらなる理解につながるだろう。

(2-C) 全ての細胞の動態を同時に計測することで変形の原因を解明する。(武田グループ、秋山グループ、松野グループ、松本グループ)

ゼブラフィッシュ体節は約200個の細胞からなるほぼ球形の細胞塊である。各細胞が、全体として体節が自転するように移動し、同時に、ほぼ球形から背腹方向に長い構造に移行する。外部からの力がかかっていないため、細胞の回転移動が体節変形の原因であると予想された。ライトシート顕微鏡を用いて体節の全細胞核をトラッキングし、3次元動態を定量的に調べたところ、移動速度に違いがあり、速い細胞が遅い細胞の隙間に乗り上げるように入り込むことが、背腹方向の伸長の原因であることが解った。



松野グループ(理論系の秋山と共同)は、後腸上皮の in vivo 3次元(3D)ライブイメージングと、3Dモデル後腸を用いた消化管回転のシミュレーションから、細胞キラリティが後腸の回転を誘発する機構を理解することを目的とした。3Dデータとシミュレーションから、個々の細胞の「捻じれ」が、腸全体の回転の原動力であろう、という予測を立て、後腸上皮の in vivo 3Dライブイメージングを実施し、in vivoでも細胞のねじれを確認した。結果として、ショウジョウバエの腸の回転原理は、ほぼ理解された。



(2-D) 体節内で起きている形態変化のインビトロで再現

芳賀グループ(理論系の秋山と共同)は、上皮細胞シートの3D構造を培養シャーレ内で作り出すことを目的にしている。ゼラチンゲルの球殻状のカプセルの表面にヒト皮膚繊維芽細胞(HDF細胞)を播種すると、細胞が増殖するにつれてカプセルが原腸陥入そっくりの変形を起こすことを発見した。原腸陥入は、脊椎動物の初期発生で最も重要なプロセスであるが、それを単一の細胞がビトロの条件で再現できることで、これまでは未知であった原腸陥入の力学的な説明が可能になる。さらに、A431細胞をマトリゲルとコラーゲンゲルを混合したゲル中で培養すると、細胞塊が基質中で回転しながら長軸方向に伸長することを発見した。この現象は、体節形成の際に観察される回転伸長運動と酷似しており、秋山による数理モデル構築のベースとなった。また、この発見により、武田の解析していた体節の回転現象が、特異な現象ではなく、細胞集団がある一定の大きさになると必然的に生じるものであることを示唆している。

公募研究、一部の計画研究では、上記以外の3D形態形成現象を扱い、様々な系での3D形態形成原理の解明、および理論、技術の開発を行った。

全体として、非常にチャレンジングな研究テーマであったが、(1)(2)において3Dの形態形成を、次元を落とさず解析することができることを、実例を持って示し、また、実験技術を開発することで、形態形成研究に新しい道を開くことができたと思う。

## 5. 主な発表論文等(受賞等を含む)

それぞれのテーマ別に、発表論文数と代表的な論文を1つ挙げる。

(1-A) クチクラ折り畳みの理論: 論文 2 報

Matsuda K, Gotoh H, Tajika Y, Sushida T, Aonuma H, Niimi T, Akiyama M, Inoue Y, \*Kondo S:  
Complex furrows in a 2D epithelial sheet code the 3D structure of a beetle horn. *Sci Rep.*,  
7,13939, 2017

2017年のScientific Reports誌に掲載された約6000報の論文中、アクセス数が16位となり表彰された。

(1-B) クチクラを作る細胞シートの折り畳みを作る原理(論文数15)

Ohsawa S, Vaughen J, \*Igaki T: Cell Extrusion: A Stress-Responsive Force for Good or Evil in  
Epithelial Homeostasis. *Dev. Cell*, 44, 284-296, 2018

上皮細胞にかかる力学的なストレスと細胞の安定性の関係の解明

Kinoshita N, Hashimoto Y, Yasue N, Suzuki M, Cristea MI. and \*Ueno N: Mechanical Stress  
Regulates Epithelial Tissue Integrity and Stiffness through the FGFR/Erk2 Signaling Pathway  
during Embryogenesis. *Cell Rep.*, 30, 3875-3888, 2020

神経上皮細胞シートの折りたたみの機構について力学的な解析

(2-C) 全ての細胞の動態を同時に計測することで変形の原因を解明する(論文数:18)

Cell chirality: its origin and roles in left-right asymmetric development. Inaki, M., Yang L. J., and (代)  
\* Matsuno K. *Phil Trans B* 371, 20150403 (2016) 10.1098/rstb.2015.0403 .

組織全体の回転が、構成する細胞集団のキラルなねじれにより誘発されることを証明

(2-D) 体節内で起きている形態変化のインビトロで再現(論文数:4)

M. Akiyama, T. Sushida, S. Ishida, H. Haga, A Mathematical model of collective cell migrations based  
on cell polarity. *Develop. Growth Differ.* (2017).

培養細胞の回転運動がどのようなメカニズムでできるかについて数理モデルにより推定

### 【受賞】計画、公募班員による受賞の主なものを以下に挙げる

大澤 志津江：科学技術分野の文部科学大臣表彰 (2017)

松本 健朗：Papers of the Year 2016, Journal of Biomechanical Science and Engineering (2016.)

柳澤 実穂：お茶の水女子大学 第2回保井コノ賞(2018)

大学女性協会 第20回守田科学研究奨励賞(2018)

日本物理学会 第1回米沢富美子記念賞(2020)

科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞(2020)

田村 宏史：日本動物学会賞「脊椎動物付属肢の発生・再生・進化の研究」(2018)

日本進化学会賞「脊椎動物の付属肢を対象とした進化発生学的研究」(2018)

堀田 浩司：Oral Presentation Award The 9th International Tunicate Meeting, New York, USA  
(2017)

Best Poster Award 10th International Tunicate Meeting, France (2019)

小沼 健：日本動物学会奨励賞 (2020)

萩原 将也：第39回化学とマイクロナノシステム学会優秀発表賞 (2020)

戎家 美紀：第1回輝く女性研究者賞 (ジュン アシダ賞) (2019)

鈴木 孝幸：日本遺伝学会奨励賞 (2019)

### ホームページ等

領域 HP

<https://www.3d-logic.info/>

ブルーボックスで紹介された川瀬公募班員の研究

<https://gendai.ismedia.jp/articles/-/57613>

井上計画班員による折り畳みが作る3D形態の計算ができる HP

<https://bit.ly/3cWKMX5>