

分節時計における移動波の出現メカニズム

東京大学・理学系研究科生物科学専攻 石松 愛 (Kana Ishimatsu)
Department of Biological Sciences, Graduate School of Science,
University of Tokyo

はじめに

多くの生命システムでは、多数の動的要素が複雑に相互作用し合うことで、高次な機能が生み出される。例えば、遺伝子産物が相互作用し合うことで細胞のダイナミクスが決定されているし、細胞が相互作用し合うことで組織として統制のとれた機能がもたらされる。しかしながら、個々の要素を支配するネットワークやダイナミクスですら非常に複雑であるため、それらが相互作用し合う実際の生命システムの研究には、莫大な資金と労力と時間を要するのが一般的である。一方、多数の振動子が相互作用し合う、結合振動システムは、多数の動的要素（振動子）が相互作用し合うシステムにもかかわらず、その要素やシステムのダイナミクスを比較的シンプルに記述する理論的枠組みが整えられており、複雑な生命システムを研究するにはよいモデルシステムである (1, 2)。本研究では、そのような結合振動システムの利点を生かし、ゼブラフィッシュを用いて、生きた結合振動システムにおける時空間ダイナミクスの出現メカニズムに焦点を当てた研究を行った。

我々が研究材料として用いた結合振動システムは、脊椎動物の繰り返し構造（背骨やあばら）の基礎（体節と呼ばれる節構造）を作るのに利用される、分節時計と呼ばれる生物時計である。体節形成は、未分節中胚葉（presomitic mesoderm; PSM）と呼ばれる連続した組織から、ブロック状の構造が、繰り返し切り出されることでおこる。この切り出しは、一定時間（マウスで 120 分、ニワトリで 90 分、ゼブラフィッシュで 30 分）おきに一定の間隔で生じるため、体節形成は、時間的にも空間的にも周期的な現象といえる（図 1a）。この時間的／空間的周期性を支配しているのが、PSM で機能する分節時計である。振動の実体は細胞内での *hairy* という遺伝子の発現の ON/OFF であり（図 1b）、各細胞（=振動子）内での *hairy* の ON/OFF が協調することで、移動波

が形成される（前方の細胞ほど振動の位相が遅れている）（図 1c）。移動波は PSM の後端から前端に向かって移動し、前端に達すると停止する。波の停止する位置／タイミングで、体節が切り出される。すなわち、移動波の発生頻度、停止間隔によって、体節形成の時間的／空間的周期性が決定されるのである。先行研究により、細胞レベルの振動が *hairy* のネガティブフィードバックに駆動されていること、細胞間での位相同期が、細胞膜上で働く Notch/Delta という分子を使って実現されていること等が明らかになってきている（図 1d）(3-6)。しかし、移動波形成に関する研究は進んでいなかった。

生物はその発生過程において、外部からの情報なしに、つまり自己組織的に、統制のとれた構造を作り出すことができる。したがって、構造や秩序がどのように「出現」するか、というのは重要な問いである。にもかかわらず、その出現過程に焦点をあてた研究はあまり行われていない。本研究では、分節時計における移動波をモデルにして、その出現メカニズムに迫るために、実験と数理解析を組み合わせた研究を行った。

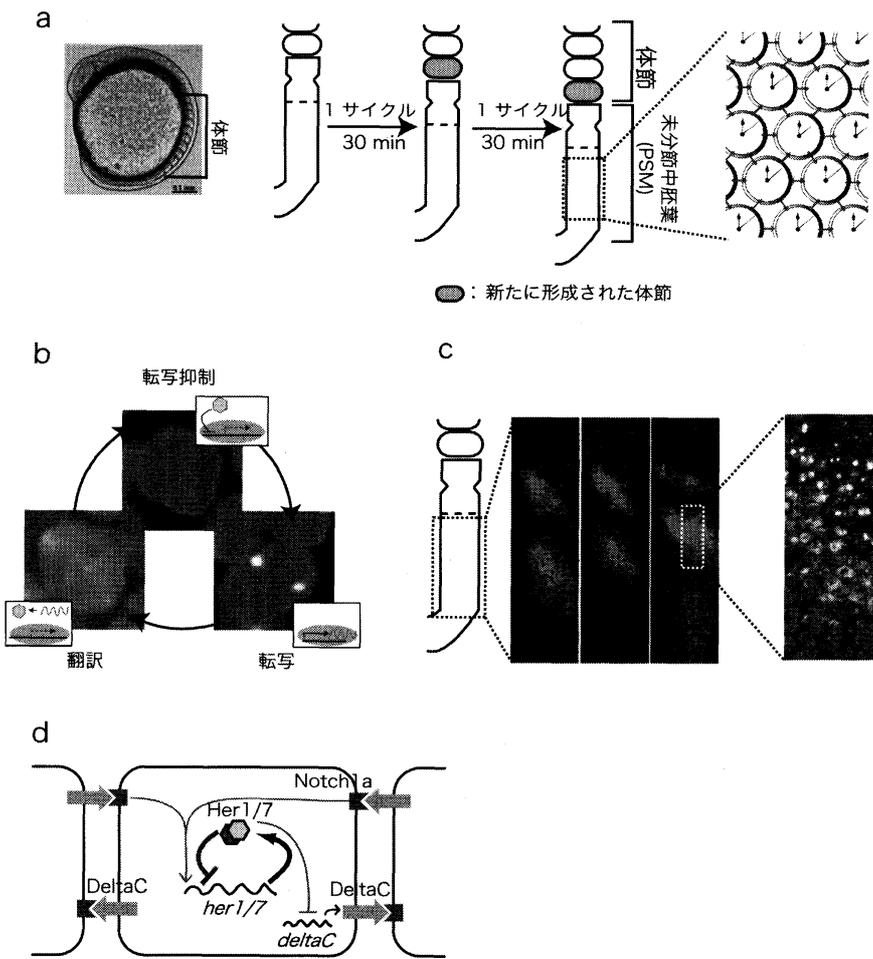


図 1. 分節時計

a 左：ゼブラフィッシュにおける体節。中：体節形成の模式図。右：分節時計の模式図。分節時計は細胞を単位とする振動子（時計）の集合体。b 細胞レベルの振動。各細胞内で、*hairy* は図の 3 状態を繰り返す。*Hairy* タンパクによる自己転写抑制状態のときは、*hairy* RNA は検出されず、転写状態のときには核内にドット状のシグナルが、翻訳状態のときには細胞質のみにシグナルが検出される。c 細胞集団が示す時空間振動パターン。*hairy* 遺伝子の発現は、マクロには移動波を示す。右の拡大図から、前に向かって位相遅れが存在することがわかる。後方から、転写抑制中、翻訳中、転写中の細胞が並んで検出される。d 分節時計における、現在わかっている分子ネットワーク。四角が細胞を表す。マゼンタは核、緑または白のシグナルは *hairy* RNA を表す。

移動波の出現過程

移動波は、どのような状態から、どのような過程を経て出現するのだろうか？つまり、移動波はランダムな振動が徐々に秩序化することで形成されるのだろうか、それとも移動波出現以前には他の秩序構造が存在するのであるだろうか？まず我々は、移動波の出現過程の詳細な記載を行った。*hairy* のライブイメージングは現時点では技術的に困難であるため、多数の、発生段階を厳密に揃えた個体を用いることで、時系列データを再構築した。その結果、移動波出現前には局所的同調振動が起こっており、その後状態遷移を経て、移動波が出現することが明らかになった。

移動波の出現は、体節形成が始まる約3時間前におこる。移動波の出現が観察される、ゼブラフィッシュの発生初期段階においては、胚体が卵黄を包み込むような運動を示す(図2a)。この半球状の胚体の縁の領域で、まず *hairy* の発現が開始する(図2b)。このとき、細胞間の *hairy* の発現に位相差はほとんど存在せず、縁の領域だけで、同調した振動が観察される(図2c(6h))。この時期の胚体では、形態形成のため、細胞運動が盛んにおこっており、縁領域近辺の細胞は内側に入り込み、その後、前方に移動する(図2a 黄色矢じり)。したがって、ある時点で縁領域の同調振動に参加していた細胞は、内側に移動すると、*hairy* の発現を停止すると考えられる。

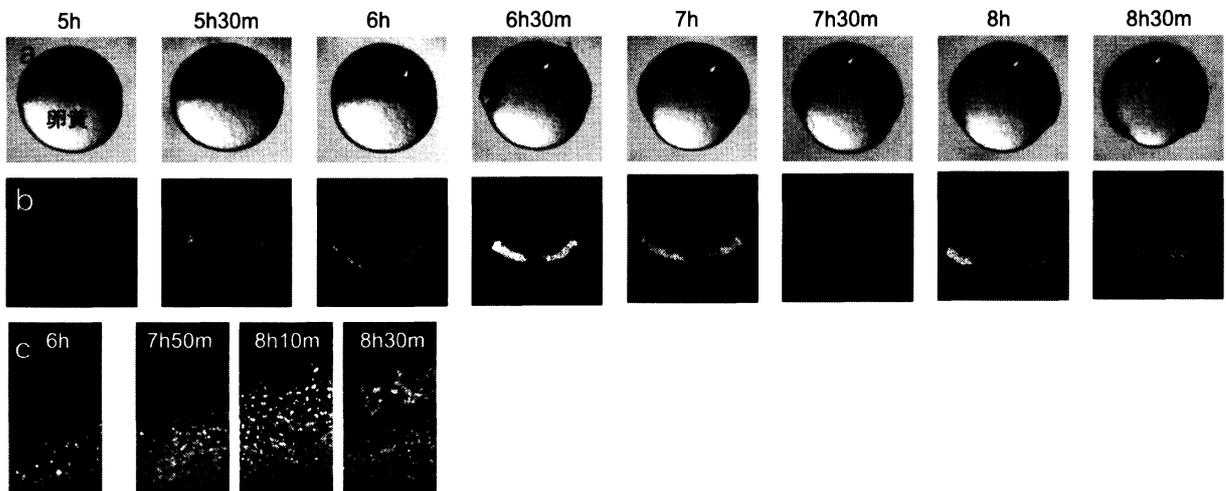


図2. 移動波出現過程

a ゼブラフィッシュ初期発生過程。球状の卵黄を胚体が徐々に包み込む運動を示す。同時に胚体の一部は、内側に入り込み、中胚葉を形成する。入り込んだ細胞の先端を黄色矢印で示す。b aと同じ時間における *hairy* の発現。c 移動波出現前(左)、出現中(左3つ)の拡大図。*hairy* の発現は、移動波出現前には縁領域のみで検出されるが、出現時には、それより前方領域にも検出される。また、移動波出現時には、前方にむかって位相遅れが観察される。最上段はa, bにおける受精後経過時間を表す。cにおける受精後経過時間は図中に記載。

4 サイクルの縁領域での同調振動の後、位相差をともなった振動領域の拡大がおこることにより、移動波が出現する (図 2b, c (7h50m~8h30m))。移動波の形成は、前述の、前方への細胞移動によっておこるのではない。なぜなら、前方への細胞移動によって、前方の細胞の位相が進むことはありうるが、前方ほど位相が遅れる (=前方向への移動波) は起こり得ないからである。したがって、局所的な同調振動から移動波が出現するには、細胞移動以外のメカニズム必要であると考えられる。

分節時計における移動波の基本性質

移動波出現のメカニズムを明らかにするため、まず我々は、分節時計が興奮場なのか、もしくは振動場なのかを、実験的に区別することを目指した。興奮場は、神経細胞に代表されるように、外部からの刺激をリレー方式に伝搬させる場のことであり、外部からの刺激がない限り静止状態が保たれる。一方振動場は、心臓のペースメーカー細胞に代表されるように、自励振動できる素子 (振動子) からなる場である。分節時計がどちらの性質をもつかを明らかにするには、二つの方法があると考えられる。一つは、細胞間相互作用がない状態で移動波の進行がおこるかを調べる方法である。興奮場における波の伝搬は、素子 (ここでは細胞) 間の相互作用がなければおこらない。そこで、分節時計における細胞間相互作用を担う分子として現在唯一知られている、Notch/Delta を薬剤により阻害したところ、移動波が正常に発生することが確認された。このことから、分節時計は、振動場としてふるまうことが予想される。しかし、Notch 以外の相互作用因子が存在する可能性は否定されない。

したがって、我々は、二つめの方法として、外部からの刺激がなくても振動が生じるか調べることにした。分節時計において外部刺激になりうるのは、縁領域での振動と考えられる。

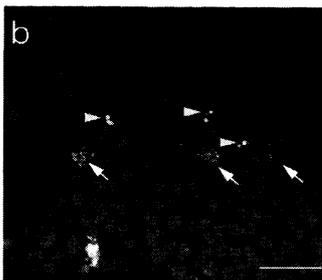
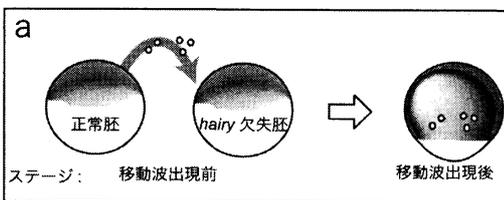


図3. *hairy* 欠失変異体中でも正常細胞は *hairy* の振動を開始できる

a 移植実験の模式図。移植は移動波出現前に行われ、数時間培養後、移動波が発生しているステージで固定し、*hairy* RNA 検出を行った。b 移植サンプルにおける *hairy* の発現。白矢印は翻訳中の細胞を、黄色矢じりは転写中の細胞を示す。*hairy* 欠失変異体バックグラウンドのなかでも、正常細胞(*hairy* 発現細胞)は、位相差をともなって、振動を開始している。

つまり、もし分節時計が興奮場であれば、波の発生には、縁領域での振動が伝搬されることが必須である。一方、もし分節時計が振動場であれば、縁領域より前方の細胞は、縁領域での振動とは独立に振動を開始することができる。我々は、*hairy* を欠失する変異体に、正常細胞を移植し、移植細胞が振動を開始するかを観察することで、分節時計の性質を調べた (図 3)。ここで用いた *hairy* 欠失変異体は、ゲノム中の *hairy* 遺伝子領域を完全に欠失した変異体であり、したがって、縁領域を含む *hairy* の振動は全くおこらない。この胚の、縁より前方の領域に、*hairy* の振動が開始する前のステージの正常型細胞を数個移植した (図 3a)。これらの正常型細胞は縁領域での同調振動が完全に失われた環境にさらされていることから、もし、これらの細胞が振動を開始できれば、分節時計は振動場であるといえる。この移植実験の結果、図 3b に示すように、移植された正常型細胞は振動を開始できることがわかった。注目すべきことに、振動を開始した正常型細胞の間には、正常な移動波と同じように後ろから前に向かった位相差が確認できる。この結果から、分節時計における移動波の出現は、縁領域からの刺激を必要としないことがわかった。すなわち、分節時計は振動場としてふるまうことが明らかになったのである。

振動場における波の発生は、初期位相差、もしくは振動周期の空間勾配などによってもたらされる。次に我々は、これら二つのメカニズムが同時に働くことで、分節時計における移動波出現が実現されていることを明らかにした。

hairy の振動は Fgf によって誘起される

移動波出現時には、それまで振動を示していなかった、縁領域より前方の領域で新たに振動が開始する。このことから、移動波出現には振動の誘起が重要と考え、振動を誘起することができる物質を探索した。過去の研究から、Fgf という物質が有力な候補として考えられた。

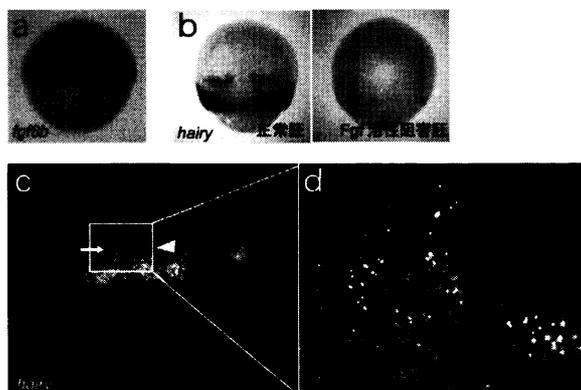


図 4. Fgf は *hairy* の振動を誘起する

a *fgf* の発現 (黒)。 *hairy* と同様に、縁領域に発現する。 b Fgf 活性阻害胚における *hairy* の発現は、ほぼ完全に消失する。 c, d Fgf ビーズ移植によって異所的な *hairy* の振動が誘起される。 c 全体像。白矢印が異所的な *hairy* の発現を、黄色矢じりが Fgf ビーズを示す。 d 拡大図。ビーズから遠ざかる方向に、*hairy* の位相遅れが確認される。

Fgf は、その機能阻害によりマウス *hairy* 遺伝子の発現が消失すること、その空間分布の改変により *hairy* の空間振動パターンが変化することが知られる、細胞外拡散性因子である(7-10)。我々はまず、*fgf* が移動波出現時期に発現していることを確かめた(図 4a)。次に、Fgf 活性を薬剤(SU5402; Fgf 受容体の阻害剤) 処理により阻害したところ、*hairy* の発現がほぼ完全に失われたことから、ゼブラフィッシュにおいても Fgf は *hairy* の発現に必須であることを確認した(図 4b)。さらに、Fgf を異所的に分布させることで、異所的な *hairy* の振動を誘起できるかを調べた。具体的には、Fgf に浸したヘパリンビーズを、移動波出現前のステージの正常胚に移植し、*hairy* の発現に対する影響を検討した。その結果、ビーズの周囲に、異所的なバンド状の *hairy* の発現が誘導された(図 4c)。我々はこの異所的な *hairy* の発現が確かに振動していることを、細胞レベルの観察により確かめた。図 4d に示すように、ビーズに近いほうから順に、*hairy* mRNA のシグナルは、なし、細胞質、核内と観察されることから、たしかにこの発現領域は、振動しながらビーズから遠い方向へ進行している(すなわち移動波である)ことが確認された。以上から、*hairy* の振動の誘起には、Fgf が中心的な役割を果たしていることが明らかになった。

Fgf の活性領域拡大が移動波に初期の位相差を与える

Fgf は、個々の細胞における振動の開始だけでなく、移動波という空間パターンの形成にも寄与しているのだろうか? 移動波をつくるひとつの方法として、*hairy* の振動を、後方から前方へ徐々に開始させる、というものがある。開始のタイミングが前方ほどわずかに遅れていれば、結果として前方に向かった位相遅れが生じ、移動波が形成されるはずである。前節で、*hairy* の振動は Fgf によって誘起されることが明らかになった。このことから、もし、Fgf の空間分布が、後方から前方へ徐々に拡大していれば、*hairy* の振動も後方から前方へ徐々に開始されるはずである。

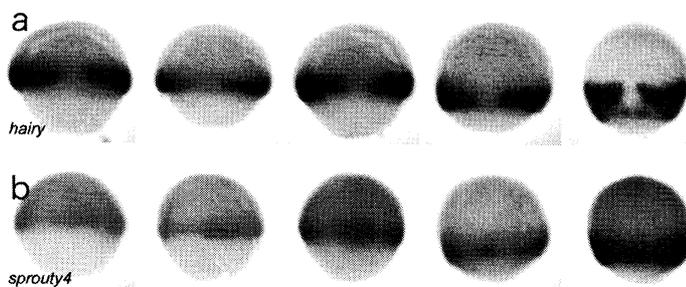


図 5. *hairy* 発現領域と Fgf 活性領域の比較

a *hairy* 発現の時系列変化。b 同じステージの胚における Fgf 活性 (*sprouty4* でモニター)。*hairy* の発現領域と Fgf 活性領域は、ともにステージの進行に伴って拡大し、両者はよく一致している。

この仮説を検証するため、我々は、Fgf 活性と *hairy* の空間パターンの時系列変化を詳細に観察した (図 5)。Fgf 活性は下流遺伝子としてしられる *sprouty4* によりモニターした。その結果、予想通り、Fgf 活性は、後方から前方へ徐々に拡大することがわかった。Fgf 活性と *hairy* 発現を比較すると、拡大のタイミング、領域がよく一致していることがわかる。このことから、Fgf 活性領域の前方への拡大が、移動波出現の引き金を引く一因であることが明らかになった。

Fgf は *hairy* の振動周期を制御する

分節時計における移動波は、前に行くほど遅く、細くなるという特徴的な空間パターンを示す。このようなパターンは振動数に前後方向の勾配 (前ほど振動数が小さい) を持たせれば再現できることが先行研究からわかっている (11-14)。出現直後の移動波もこのような特徴的な空間パターン (前に行くほど遅く、細くなる) を示すこと、Fgf の濃度勾配が *hairy* の空間パターンに影響を与えるという過去の知見から (7, 9)、Fgf が *hairy* の振動数勾配の確立にも重要な役割を担っていると考え、その可能性の実験的検証を行った。この目的のために、Fgf 阻害剤で胚を弱く処理することにより、胚全体の Fgf 活性レベルを一様に低下させ、*hairy* の空間パターンがどのような影響を受けるかを調べた。*hairy* のストライプが最初に観察されたタイミングで比較すると、ストライプの位置はより後方にシフトしており、幅は細くなっていた (図 6a, b)。この変化は、細胞移動や細胞分化の変化によるのではなく、*hairy* の振動ダイナミクスの変化によることが確かめられた。

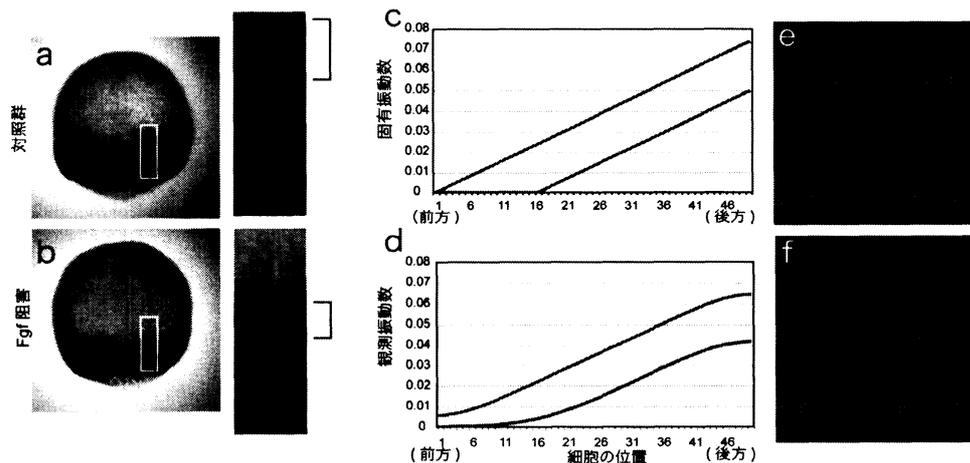


図 6. Fgf 阻害によって *hairy* の振動数の減少がおこる

a, b 対照群、Fgf 阻害胚における *hairy* の発現。Fgf 阻害胚では、*hairy* のストライプの位置が後方にシフトし、幅が細くなっている。c, d シミュレーションにおいて与えた固有振動数と、観測振動数。青が対照群、赤が振動数を減少させたもの。e 対照群における空間振動パターン。f 振動数を減少させたときの空間振動パターン。e と f を比較すると、ストライプの位置が後方にシフトしており、幅も細くなっている。この変化は、Fgf 阻害胚の表現型とよく一致する。

では、この変化は振動数が変化した結果なのだろうか？残念ながら現段階では *hairy* のライブイメージングは困難であるため、空間パターンから推測する必要がある。そこで、振動数の現象によって、どのような空間パターンの変化が引き起こされるかを、シミュレーションにより調べた。本研究で用いたのは、振動をもっとも一般的に記述する方法のひとつである、位相モデルである。位相モデルを用いることで、化学反応が複雑に絡み合った細胞内ダイナミクスを、位相というたった一つの変数で記述することができる。位相モデルにおける各振動子は次の式に従う。

$$d\theta_{i,j}/dt = \omega_{i,j} + \epsilon \sin((\theta_{i-1,j} - \theta_{i,j}) + \sin(\theta_{i+1,j} - \theta_{i,j}) + \sin(\theta_{i,j-1} - \theta_{i,j}) + \sin(\theta_{i,j+1} - \theta_{i,j})),$$

シミュレーションでは振動子を縦 50 個、横 50 個の正方形に配置し (縦の位置を j , 横の位置を i で表現)、振動子は上下左右最近傍の振動子 4 個と相互作用するとした (相互作用関数は $\sin(\cdot)$ とした)。ただし、頂点の振動子は隣り合う 2 個と、4 辺の振動子は隣り合う 3 個と相互作用するとした。 $\theta_{i,j}$ は位相を、 $\omega_{i,j}$ は固有振動数をそれぞれ表す。

まず、対照群として、後方から前方に向かってリニアに減少する固有振動数を与え、空間振動パターンを観察した (図 6c, d 青)。この結果、予想通り、前に行くほど遅く・細くなるという生体のものと似通った移動波が再現された (図 6e)。次に、この固有振動数を一様に減少させ、空間振動パターンを調べた (図 6c, d 赤)。その結果、Fgf 阻害実験の結果がよく再現された。すなわち、固有振動数を一様に減少させると、その結果生じる移動波は、ストライプの位置が後方にシフトし、幅が細くなったのである (図 6f)。この結果は、Fgf 活性が下がると振動数が減少する、すなわち、Fgf は *hairy* の振動数を制御している、ということを強く示唆している。

以上から、移動波の出現は、Fgf による初期位相と振動数の制御により、実現されていることが明らかになった。

固定端によりロバストな移動波形成が可能になる

前節では、振動数勾配を表現するためのシンプルな仮定として、固有振動数に勾配を持たせた。前節では観測振動数 (相互作用存在下で計算した場合の、位相の変化率) が勾配を持っていることが本質的であり、それがどう作られるかの詳細は重要でなかったからである。現時点では固有振動数を計測することが技術的に困難であるため、本当に固有振動数が勾配を持っているのか、Fgf によって制御されているのかは不明である。しかし、観測振動数の空間勾配がどの

ように実現されているかは、興味深い問いである。固有振動数に勾配を持たせる以外の方法で、観測振動数に勾配を作ることは可能なのだろうか。

本研究では、前方境界条件に注目して、このメカニズムの探索を行った。前節では、前方境界条件として、自由端（後方、同列の細胞としか相互作用しない）を用いていた（図 7c）。この境界条件下では、固有振動数が、0 近くまで落ちるような空間勾配を持っていることが、生体で観測されるような移動波を作るには必要である（図 8a）。もちろん、固有振動数に空間勾配が全く存在しない、すなわち空間一様であるような条件下では、すべての細胞が同調した振動を示す（ノイズなどの影響は考えていない）（図 8b）。したがって、もし生体における境界条件が自由端であれば、固有振動数の勾配は厳密に制御される必要があると考えられる。

一方、今回我々が注目した固定端条件では、固有振動数に空間勾配が存在しなくても、観測振動数に勾配が生じ、生体に近い形の移動波が形成されることが明らかになった。ここでは固定端条件として、前端の細胞一列のみの位相を固定（シミュレーションでは $-\pi/2$ に固定）した。そして、前端の位相を固定した細胞列と、後方の振動する細胞列の間にはカップリングを導入した（図 7d）。実際の分節時計においても、最前端の細胞では *hairy* の振動が検出されないことから、この仮定は妥当なものと考えられる（図 7a, b）。この条件下では、固有振動数が勾配を持っている場合に加え（図 8c）、固有振動数に勾配を入れない場合にも、前端の振動数 0 の細胞が周囲を引き込むことで観測振動数に空間的な勾配が生じうる（図 8d）。そしてその結果生じる空間パターンは、生体で観測されるものに近い、すなわち、前方に行くほど遅く、細くなるタイプの移動波であることがわかった（図 8d）。

以上から、固定端により、よりロバストな移動波形成が可能であることが明らかになった。今後、生体を用いた検証実験により、分節時計の境界条件が明らかにされることが期待される。

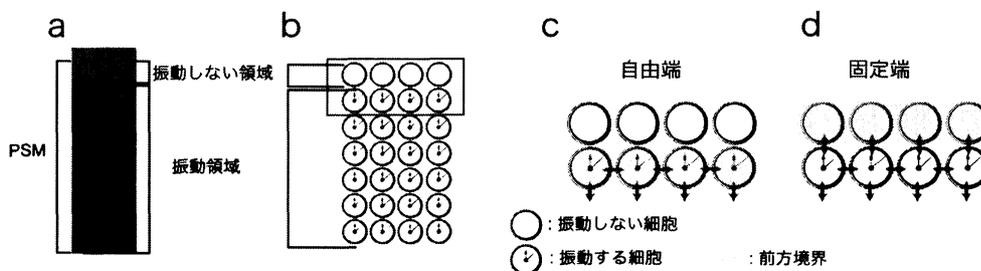


図 7. 自由端と固定端
a, b PSM 内には振動領域と振動しない領域がある。振動しない領域と振動領域の間に相互作用がなければ、自由端 (c)、相互作用があれば固定端である (d)。

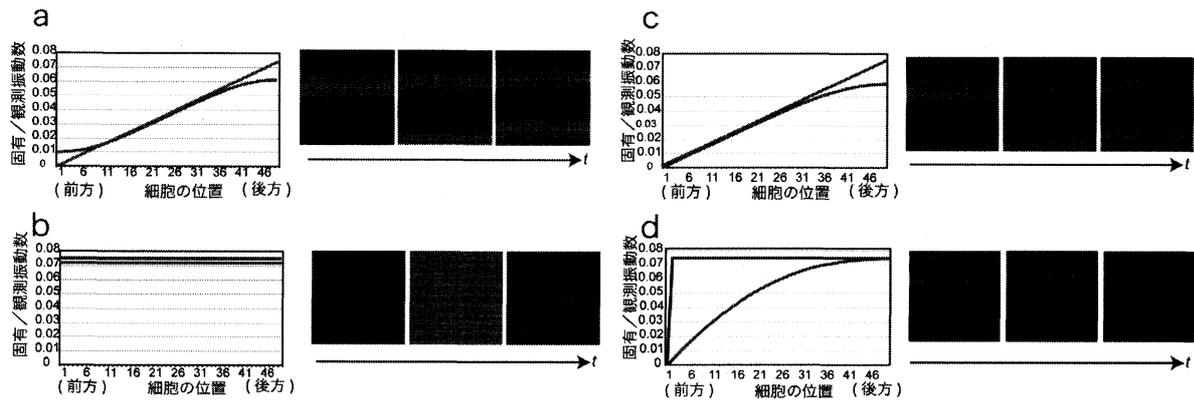


図7. 自由端と固定端における空間パターン

a, b 自由端。自由端の場合には、固有振動数がaのような勾配を持っていれば、生体に近い移動波が現れる(a)。一方、固有振動数に勾配がなければ移動波は現れない(b)。c, d 固定端。固定端の場合には、固有振動数に空間勾配があっても(c)、なくても(d)、空間振動パターンは生体に近い移動波となる。それぞれ、左は固有振動数(青)と観測振動数(赤)。右の3つのパネルが空間振動パターンの時系列。

おわりに

本研究では、動的システムのモデルとして、結合振動システムを用いて研究を行った。結合振動システムを研究する利点の一つは、今回用いた位相モデルをはじめ、ダイナミクスの本質だけを記述する理論的枠組みが整っていることである。この単純化によって、システムのふるまいをより直感的に理解できるし、シンプルな仮定のもとでシミュレーションを行い、実験の解釈やデザインをすることが比較的容易である。それでも、位相モデルも、分節時計のふるまいを全て再現できるわけではない。今後、本研究のような理論と実験の融合によって、分節時計の理解はさらに深まるだろう。同様に、理論家と実験家、双方の努力と相互作用によって、(結合振動システムに限らず)生命システムをより正確に、かつシンプルに理解できる枠組みの確立が加速することを期待する。

謝辞

本稿で紹介した研究は、早稲田大学・高松敦子研究室と東京大学・武田洋幸研究室の共同で行われたものです。共同研究者の皆様にお礼申し上げます。

参考文献

1. S. Strogatz, (Hyperion Books, New York, 2003).

2. A. T. Winfree, (Springer, New York, 2000).
3. M. L. Dequeant, O. Pourquie, *Nature Reviews Genetics* **9**, 370 (May, 2008).
4. K. Horikawa, K. Ishimatsu, E. Yoshimoto, S. Kondo, H. Takeda, *Nature* **441**, 719 (Jun 8, 2006).
5. Y. J. Jiang *et al.*, *Nature* **408**, 475 (Nov 23, 2000).
6. O. Pourquie, *Science* **301**, 328 (Jul 18, 2003).
7. J. Dubrulle, M. J. McGrew, O. Pourquie, *Cell* **106**, 219 (Jul 27, 2001).
8. Y. Niwa *et al.*, *Dev Cell* **13**, 298 (Aug, 2007).
9. A. Sawada *et al.*, *Development* **128**, 4873 (Dec, 2001).
10. M. B. Wahl, C. Deng, M. Lewandoski, O. Pourquie, *Development* **134**, 4033 (Nov, 2007).
11. F. Giudicelli, E. M. Ozbudak, G. J. Wright, J. Lewis, *PLoS Biol* **5**, e150 (Jun, 2007).
12. L. G. Morelli *et al.*, *Hfsp J* **3**, 55 (Feb, 2009).
13. I. Palmeirim, D. Henrique, D. IshHorowicz, O. Pourquie, *Cell* **91**, 639 (Nov 28, 1997).
14. K. Uriu, Y. Morishita, Y. Iwasa, *J Theor Biol* **257**, 385 (Apr 7, 2009).