

氏 名 山本 一徳

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1938 号

学位授与の日付 平成29年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 A study on inter-cellular forces for blastomere
configurations in developing embryos

論文審査委員 主 査 教授 澤 斉
教授 相賀 裕美子
教授 北川 大樹
准教授 小田 祥久
チームリーダー 大浪 修一 理化学研究所

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

At the early stage of embryogenesis of animals, embryonic cells are arranged into species-specific pattern in a robust manner. The patterns of cell arrangements are diverse among different organisms, so I wondered how the diversity and robustness are achieved in developing embryos. The purpose of the present study is to reveal a common mechanistic framework that accounts for the diversity and robustness of cell arrangements. As model organisms, I focused on nematode embryos because the patterns of cell arrangements are diverse even at the four-cell stage. All the nematode embryos I examined took one of the four following arrangements: “diamond-type,” “pyramid-type,” “T-character-type,” or “linear-type.” I hypothesized that the diversity is caused by differences in parameters of a common framework. As a candidate of such parameters, I initially focused on the shapes of the eggshell that surrounds embryos, because I noticed that there seems to be a correlation between eggshell shapes and the patterns of cell arrangements. To test this hypothesis, I changed the eggshell shapes of *Caenorhabditis elegans*, the best-studied model nematode species. *C. elegans* embryos take the diamond arrangement at the four-cell stage in the ellipsoidal eggshell.

I searched for genes that affect eggshell shapes. I succeeded in collecting embryos with rounder or slender shapes from mutants as well as RNA interference (RNAi)-treated strains. In rounder eggshells the pyramid arrangement was dominant, and slender eggshells embryos could take the T-character or linear arrangement. The results support my hypothesis that eggshell shapes contribute to produce diverse patterns of cell arrangements. At the same time, I found that the diamond arrangement was robust against deformations of the eggshell, because the arrangement was still dominant even in highly slender eggshell shapes.

To reveal a common mechanistic framework that accounts for the diversity and robustness of cell arrangements, I used a computational modeling approach. Previously, a mathematical model that accounts for the diamond arrangement in the normal eggshell shape in *C. elegans* was reported. This model considers two repulsion forces: repulsion from neighboring cells, and repulsion from the eggshell. By changing a parameter of the eggshell shape in the model, the linear arrangement as well as the pyramid arrangement was reproduced. However, the T-character arrangement was not reproduced, indicating that the existing model cannot fully account for the diversity of cell arrangements. In addition, the model failed to reproduce the diamond arrangement in slender shapes, as observed in my experiments that changed the eggshell shapes of *C. elegans* embryos. Therefore, the model was not enough to account for the diversity and robustness of cell arrangements. To unravel

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

missing mechanisms, I observed physical interactions between cells by removing the eggshell of the embryos. The cells attached each other to some extent and the degrees of their attachments looked different depending on the cell types. From the observations, I concluded that not only repulsion forces but also attraction forces exist, and the strengths of the attraction forces are anisotropic in *C. elegans* embryos. Next, I introduced anisotropic attraction forces into the existing model, by which I succeeded to account for both diversity and robustness of cell arrangements.

I further found that cell adhesion molecules were involved in the molecular mechanisms underlying the anisotropic attraction forces as follows. First, when I knocked down cadherin expression by RNAi, the attraction forces were significantly reduced. Second, the pattern of cadherin localization was consistent with the anisotropic attraction forces. Next, to test whether the attraction forces are required for the robustness, I reduced the attraction forces experimentally. By knocking down both cadherin and β -catenin simultaneously, most embryos did not take the diamond arrangement in slender eggshell shapes. I concluded that attraction forces are necessary to produce the robustness of the diamond arrangement against the deformations of the eggshell.

Thus, I succeeded to produce diverse patterns of cell arrangements observed in other nematodes in *C. elegans* embryos by changing the eggshell shapes. Additionally, I found that the *C. elegans* embryos take the diamond arrangement in different eggshell shapes, which suggests the robustness of cell arrangements against eggshell deformations. The robustness assures proper embryogenesis and hence, is critical for the survival of the embryos. Additionally, I demonstrated that the attraction forces derived from cell adhesion molecules are necessary for the robustness. The mechanistic framework that I proposed here accounts for the diversity and robustness of cell arrangements. Therefore my study will advance our understanding of how diversity and robustness are achieved in developing embryos.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

動物の初期発生において、割球の配置は種によって多様だが、特定の種では決まった配置を取ることが多い。山本さんは線虫を用いて、割球の配置を決める物理的な法則を調べた。まず、これまでに報告されている様々な線虫種の初期胚の写真、および彼自身が単離した野生の線虫種の初期胚などの観察結果から、4細胞期の割球配置を、ダイヤモンド型、ピラミッド型、T字型、直鎖型に分類し、これらの配置が卵殻の形（縦横比）と相関があることを示した。そこで、正常発生ではダイヤモンド型を示す *C. elegans* において、卵殻の形が変化する様々な変異体や RNAi による遺伝子阻害胚を用いて、卵殻の形と割球配置との関係を調べた。その結果、卵殻が丸ければピラミッド型が、卵殻が細長ければ、T字型や直鎖型が出現することを示した。この関係は様々な種での観察結果と同様であり、卵殻の形が割球配置の多様性に寄与していることが強く示唆される。また、細長い卵殻においても、ダイヤモンド型が高い割合で観察されたことから、この配置が卵殻の変形に対して頑強（ロバスト）であることも示した。

多様な割球配置がどのような物理法則で決まるのかを明らかにするため、山本さんは次に数理シミュレーションを行った。*C. elegans* 4細胞期の割球配置を説明する数理モデルは既に報告されていたが、このモデルを用いて卵殻の変形を試みたところ、正常なダイヤモンド型が、観察結果ほど、ロバストではなかった。また、実際には観察された卵殻変形による T字型の出現も、モデルでは再現されず、割球配置の多様性と頑強性を説明するのにこのモデルは不十分であることがわかった。このモデルは、割球同士の、および割球と卵殻との反発力を元に構築されており、それ以外の物理力の関与が予想された。そこで、初期胚の卵殻を外して、割球間の物理的相互作用を調べたところ、細胞分裂後、姉妹割球は完全には離れず、接着しており、割球の中心間の距離は、割球の半径の和よりも小さいことに気づいた。これは、割球間の力が反発力だけであるという従来のモデルでは説明できず、割球間に吸引力が働いていることが明らかになった。また、この吸引力はそれぞれの細胞間で異なっており、異方性があることも発見した。さらに、この異方性のある吸引力を導入した新しい数理モデルを構築することで、割球配置の多様性と頑強性をより正確に再現することに成功した。

さらに、山本さんは吸引力が接着分子カドヘリンに依存していることを明らかにした。カドヘリンの局在はそれぞれの割球接着面で異なり、吸引力の異方性を説明できる。またカドヘリンと β カテニンをともに阻害したところ、弱い卵殻の変形によっても、ダイヤモンド型の配置が維持されなくなり、割球配置の頑強性にカドヘリンによる吸引力が重要であることを明らかにした。

種特有の割球の配置は、特異的な細胞間相互作用を生み出すなど、正常発生に必須である。実際、山本さんは、変異体などを用いて卵殻を変形した実験において、割球配置の異常と、胚の致死率が相関することを明らかにしている。山本さんの研究結果は、正常発生に必須な割球配置の頑強性およびその多様性を作り出す新しい原理を明らかにしており、様々な動物の初期発生の理解に大きく貢献するものである。以上の理由から、山本さんの

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

博士論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。