

氏 名 庭山 律哉

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1521 号

学位授与の日付 平成 24 年 3 月 23 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 Characterization of cytoplasmic streaming in the
Caenorhabditis elegans zygote with live-cell imaging
and particle-based hydrodynamic simulation

論文審査委員 主 査 教授 荒木 弘之
教授 仁木 宏典
教授 城石 俊彦
教授 小原 雄治
准教授 野口 博司 東京大学

Cytoplasmic streaming is a type of intra-cellular transport widely seen in plant and animal cells. Cytoplasmic streaming has been proposed to govern the stirring of nutrients in a plant, *Chara*, and the spatial turnover of molecules required for cell migration in locomotive cells; thus, transportation by cytoplasmic streaming is important for organisms. In this study, I analyzed cytoplasmic streaming from the viewpoint of cell mechanics by using *Caenorhabditis elegans* one-cell stage embryos as a model system. Cytoplasmic streaming in *C. elegans* at the one-cell stage is bi-directional, i.e., the flow near the cell cortex ("cortical flow") is oriented toward the anterior, whereas the flow in the central region ("cytoplasmic flow") is oriented toward the posterior. Both cortical flow and cytoplasmic flow depend on non-muscle-myosin II (NMY-2), which is primarily located in the cell cortex. NMY-2 proteins move in the anterior direction on the cell cortex. The mechanism by which NMY-2 proteins moving in the anterior direction drive posterior-directed cytoplasmic flow from remote locations has not been characterized.

In the first chapter of this doctoral thesis, I addressed the mechanism underlying cytoplasmic flow in *C. elegans* one-cell stage embryos. I hypothesized that the anterior-directed force given to the cytoplasm by NMY-2 at the cell surface is sufficient for generating the flow in the entire cell. In this hypothesis, the hydrodynamic property of the cytoplasm mediates the cortical force into the entire cell and the posterior-directed flow in the central region can be explained as hydrodynamic flow. I validated my hypothesis by comparing flow dynamics *in vivo* and *in silico*. In order to quantify the flow dynamics *in vivo*, I acquired live images of flow dynamics. From these images, I quantified the flow velocity distribution of cytoplasmic streaming using particle image velocimetry (PIV) in collaboration with Dr. Kyosuke Shinohara at Osaka University. I conducted a three-dimensional hydrodynamic simulation using the moving particle semi-implicit (MPS) method. My simulation largely recapitulated the quantified flow velocity distribution of the PIV data. Surprisingly, although I used the simplest fluid model for the modeling of physical property of the cytoplasm, i.e., the Newtonian fluid model, the flow dynamics were recapitulated. I also tried to describe another mode of streaming using Newtonian fluid dynamics. This type of cytoplasmic streaming was detected using PIV during the pronuclear migration stage, a stage when NMY-2-dependent flow weakens. Treatment with nocodazole, which depolymerizes microtubules, revealed that this cytoplasmic streaming depended on microtubules, the requisite cytoskeleton for pronuclear migration. I simulated the pronuclear migration stage by introducing moving pronuclei as a driving force for cytoplasmic streaming. The flow of the entire cytoplasm was recapitulated again by Newtonian fluid dynamics. The agreement of the flow dynamics *in vivo* and *in silico* indicates that the hydrodynamic properties of the cytoplasm are sufficient to mediate

cytoplasmic streaming in *C. elegans* embryos. Furthermore, my analysis gave insights into the physical properties of the cytoplasm. The Newtonian fluid model, the simplest model, is a good approximation for the observed complex cytoplasmic streaming.

In the second chapter of this doctoral thesis, I estimated the cortical force distribution that generates cytoplasmic streaming in *C. elegans* one-cell stage embryos. I established a method to estimate the forces that was based on a data assimilation method in collaboration with Drs. Hiromichi Nagao and Tomoyuki Higuchi at the Institute of Statistical Mathematics. In this method, I once again utilized PIV data and MPS simulation. I conducted MPS simulations under various force distributions. Using the Bayesian statistical method, I estimated the likely force distribution *in vivo*. I confirmed that the simulation using estimated force distribution recapitulated the flow dynamics of the streaming *in vivo* more quantitatively than the simulation shown in the first chapter in which the force was roughly modified via manual fitting. The estimated force distribution showed a peak in the posterior region of the cell where the streaming velocity was fast. I found that the estimated cortical force was not always spatially proportional to the cortical velocity, i.e., more force was required to drive the same speed of flow in the anterior region compared to the posterior region. The effect of pressure, which counteracts the anterior-directed active force, could explain this result. A pressure gradient existed not only in the posterior region but also in the anterior region. Since the pressure gradient in the anterior region severely counteracted the active force in the anterior region, the resultant flow became weak in the anterior region in simulation. I demonstrated that the influence of pressure depended on the geometry of the cell. Thus, my method offers a powerful tool to characterize the forces that drive cytoplasmic streaming.

In typical cytoplasmic streaming, the cytoplasm accepts active forces. To understand the dynamics of cytoplasmic streaming, it is crucial to characterize the active force generator and the cytoplasm (the force acceptor). In the first chapter, I proposed the possibility that the cytoplasm behaves like a simple fluid during cytoplasmic streaming. In the second chapter, I developed a method that will be useful to characterize the location of the active force. Thus, my research should contribute to the comprehensive understanding of cytoplasmic streaming.

細胞質流動は、細胞内での栄養分の攪拌や細胞移動に必要な物質の局所的入れ替え等に必要である。従って、細胞質流動による細胞内輸送は細胞に重要であると考えられている。庭山律哉君は、線虫受精卵1細胞期をモデルとして、細胞質流動の生じる機構に迫ろうとした。そのため、実験による流動粒子速度の測定とコンピューターシミュレーションによる理論的解析を行った。

本論文は2章からなり、第1章では流動粒子の測定とそのシミュレーションについて述べられている。線虫受精卵1細胞期には、細胞表層(Cortical)の細胞質は後部から前部に流れ、細胞中心部では前部から後部へと流れる。この細胞質流動を、卵全体にほぼ均一に分布する卵黄顆粒をGFPにより可視化し、Particle Image Velocimetry (PIV)法により粒子の動きとして記録し、自動的に速度の計測を行った。次に流体力学で用いられるNavier-Stokesの式に、Moving Particle Semi-implicit (MPS)法を応用し、シミュレーションを行った。これらの結果から、MPS法により細胞質流動がニュートン流体としてよくシミュレーション出来ることが分かった。そして、細胞質流動はCorticalのミオシンによる後部から前部に向かう力によって起こり、この力によって前部に運ばれた細胞質は中央部で前部から後部に押し返されていることが分かった。実際、細胞質流動にはミオシンが必要であることが知られていたが、ミオシン(NMY-2)をRNAiにより抑えると、細胞質流動は起こらなくなった。さらに、受精卵の雄核と雌核が細胞中央に移動する時期には、ミオシンに依存せず微小管に依存した細胞質流動がおこることも示しているが、これは、両核の移動が起こしたものであると考察している。

第2章では、流動粒子のシミュレーションにデータ同化法を用いることにより、より精度の高いシミュレーションを目指した。このシミュレーション解析からは、予想される流動を起こす力は流動の早い後部で一番大きくなるが、流動速度と力の大きさは必ずしも一致せず、一定の流動速度にするには前部の方がより大きな力を必要とする。これは、前部においては圧力差が大きく、力に対抗するためである。さらに、この圧力は細胞の形状によって変化することを示している。

庭山君の研究は、粒子速度の測定を自ら行うとともに、細胞質流動に流体力学的手法を初めて用い、細胞質流動の機構を明らかにするとともに、データ同化法がこの現象の解析において有効であることを示している。これらの研究は、細胞質流動の機構を明らかにしたのみならず、その解析法を開拓し、今後の関連分野の発展に大きく寄与するものである。以上の理由から、庭山律哉君の学位提出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。