

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14734

研究課題名(和文) 分節時計における細胞間遺伝子発現振動の同期化の分子機構

研究課題名(英文) The molecular mechanism of synchronization of oscillatory gene expression between cells in the segmentation clock

研究代表者

影山 龍一郎 (Kageyama, Ryoichiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：80224369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新たなHes7レポーターを持つ遺伝子改変マウスを作製し、分節時計における発現振動を単一細胞レベルでライブイメージングすることに成功した。さらに、NotchシグナルのリガンドであるDelta-like1 (Dll1)を光遺伝学的操作で発現誘導できる培養細胞の開発にも成功した。このDll1発現細胞と上述のマウスの未分節中胚葉細胞とを利用することで、光操作で発現振動の位相を変えたときに周囲の細胞に与える影響をライブ観察することが可能になり、分節時計における遺伝子発現振動の細胞間同期化を解析するシステムが構築できた。

研究成果の概要(英文)：We generated transgenic mice carrying a new Hes7 reporter, and succeeded in live imaging of oscillatory expression at the single-cell resolution in the segmentation clock. We also generated cells in which the expression of the Notch ligand Delta-like1 (Dll1) is induced by an optogenetic method. By using these tools, it is now possible to perform live-imaging analysis of the effect on cells by optogenetic perturbation of oscillation to analyze the mechanism of synchronization of oscillatory gene expression between cells in the segmentation clock.

研究分野：分子生物学

キーワード：分節時計 遺伝子発現振動 同期化 ライブイメージング 光遺伝学 Notchシグナル Hes7 Delta-like1

1. 研究開始当初の背景

体節は、未分節中胚葉の前端部分が分節し、頭尾軸に沿って一定のリズムで形成される。マウスにおいて Hes7 のネガティブフィードバックにより駆動される 2 時間周期の発現振動が分節リズムと位置を規定していることを明らかにしてきた。この振動の位相は、未分節中胚葉の細胞間で同期しているが、そのメカニズムは不明である。Notch シグナル関連因子 *Delta-like1 (Dll1)* 及び *Lunatic fringe (Lfng)* 欠損マウスにおいて Hes7 の発現レベルが細胞間でばらつき、分節構造が乱れることから、Notch シグナルを介した細胞間相互作用が同期に関与することが示唆された。しかし、いずれも組織の静的解析であり、発現動態観察ではないため、発現量のばらつきが位相、あるいは振幅のずれのどちらに起因するものであるかを区別できていない。また、Notch シグナルが実際に振動子の位相にどのように作用するかはよくわかっていない。

2. 研究の目的

当研究室で開発した青色光による遺伝子発現制御と単一細胞レベルのライブ・イメージング技術を導入することで、1) 位相の人為的操作による振動子間の位相応答測定、2) 個々の細胞における Hes7 の位相動態定量を行い、Hes7 振動子の性質と Notch シグナルの同期に果たす役割を明らかにする。

3. 研究の方法

培養細胞系での位相操作と位相応答の動態定量により、振動子の基本性質について解析した。また、今回構築した未分節中胚葉における Hes7 のライブ・イメージング系を使って、個々の細胞における Hes7 の位相動態定量を行った。さらに、*Lfng* 欠失胚を用いて Hes7 の位相動態定量を行い、Notch シグナルが振動子に与える作用を解析した。

光遺伝学的遺伝子発現制御システムである hGAVPO を使って *Dll1* の発現振動を送信細胞で誘導し、Hes1 の発光レポーターをもつ受信細胞と共培養した。受信細胞の反応は CCD カメラで測定した。

4. 研究成果

(1) Hes7 発光レポーターを用いた一細胞ライブイメージング

体節形成遺伝子 *Hes7* の未分節中胚葉 (PSM) における 2 時間周期の発現振動 (オシレーション) を可視化することによって一細胞レベルでのオシレーション位相を定量することを目的とし、より迅速にかつ明るい蛍光を出すタンパク質 Achilles (YFP 変異体; 未発表) を宮脇敦史先生より御供与いただき、*Hes7* 発光レポータートランスジェニックマウス (*Hes7-Achilles*) を作製した (図 1A)。このレポーターは、*Hes7-UbLuc* 発光レポーター (Takashima et al. 2011 PNAS) と同様の周期で、発光レポーターとほぼ同じタイミングで

振動した。

さらに、内在性 Hes7 の発現動態をより正確に定量するため、Achilles-Hes7 融合タンパク質を発現するタンパク質発現レポーターを作成した (図 1B)。このレポーターは、*Hes7-UbLuc* 発光レポーターより 40 分程度遅いタイミングで振動した (図 2、図 3)。この遅延は、発光レポーターが転写のレポーターであることから、mRNA 成熟・タンパク質への翻訳の遅延時間を反映していると考えられた。



図 1 : Achilles-Hes7 発光レポーターマウス作製のコンストラクト

pH7-UbLuc (Transcription) pH7-AchillesH7 (Protein) Merged

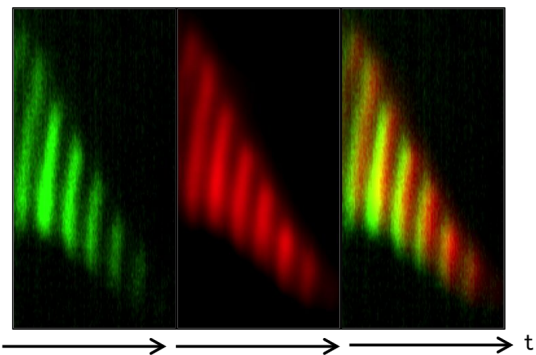


図 2 : Achilles-Hes7 レポーター及び pH7-UbLuc レポーターのイメージング

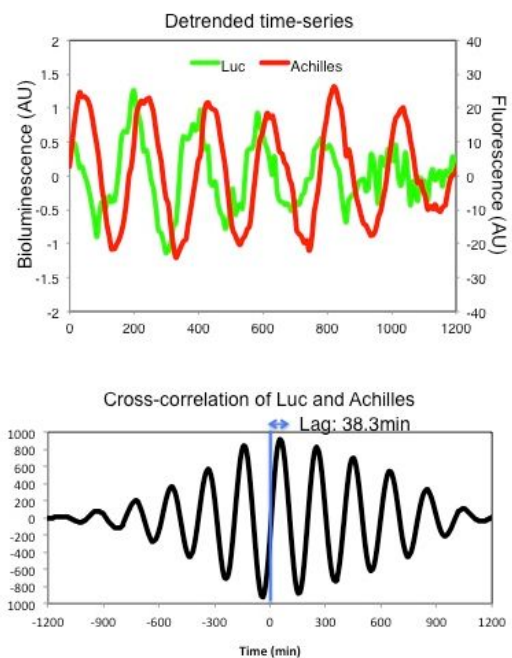


図 3 : Achilles-Hes7 レポーター及び pH7-UbLuc レポーターの振動のタイミングの比較

(2) *Hes7* 蛍光レポーターの一細胞ライブイメージングを元にしたオシレーション位相定量法の確立

このマウスの PSM 組織を共焦点顕微鏡でタイムラプス観察し、細胞の 3D トラッキング後、蛍光強度をヒルベルト変換することで、シングルセルの位相を定量することに成功した。この *Hes7-Achilles* マウスを *Lunatic Fringe* 変異マウスと交配し、Notch シグナルと *Hes7* オシレーションの位相調節について解析を行ったところ、*Lunatic fringe* 変異体においても、シングルセルレベルで安定的にオシレーションが起こっていることがわかった (図 4)。

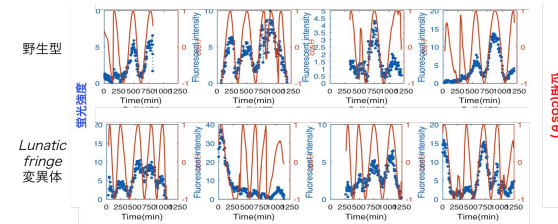


図 4 : 一細胞トラッキングデータからの位相の推定

また、シングルセルレベルで定量した位相をカラーマップで示すことができた (図 5)。

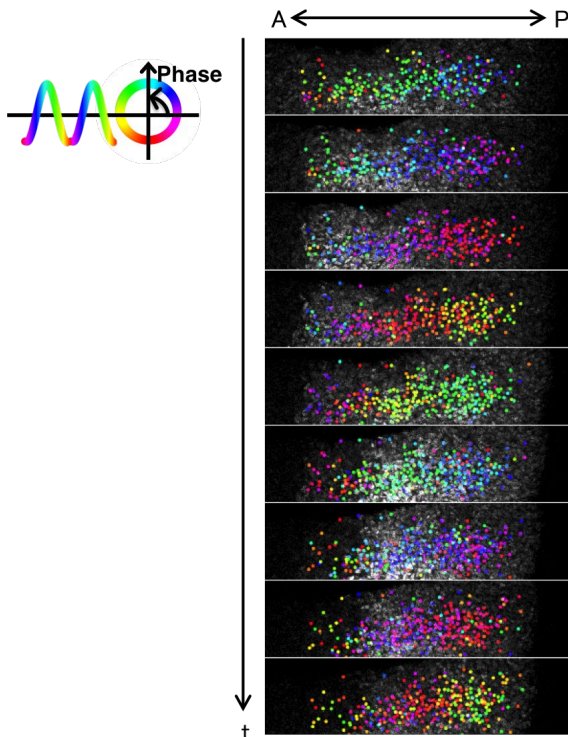


図 5 : *Achilles-Hes7* レポーターのオシレーション位相マップ

このように、PSM 組織全体の観察を行いながら、それぞれの細胞の位相の定量が可能になったことで、位相同期率、振幅、周期のローカルな変化を観察することができ、分節時

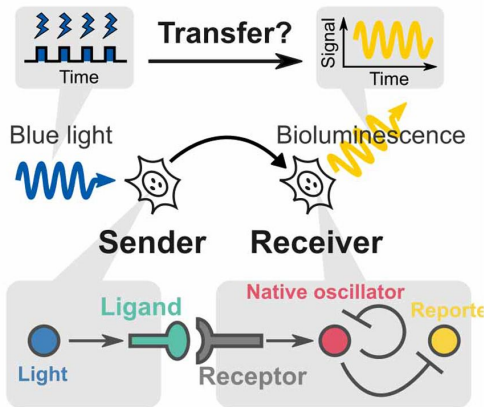
計の位相調節メカニズムの解明に有用なツールが開発できた。

(3) 光遺伝学的手法を用いた振動子間の位相応答測定

以上の解析から、オシレーションの細胞間同期に Notch シグナルが重要な役割を担うことが示された。また、以前の解析から Notch シグナルのリガンドである Delta-like1 (Dll1) の発現振動が細胞間同期に重要であることが分かっていたので、次に Dll1 の発現振動が隣接細胞に振動情報を伝えて同期化に導くことが可能かどうかを検討することにした。

A

Dynamic sender-receiver assay



B

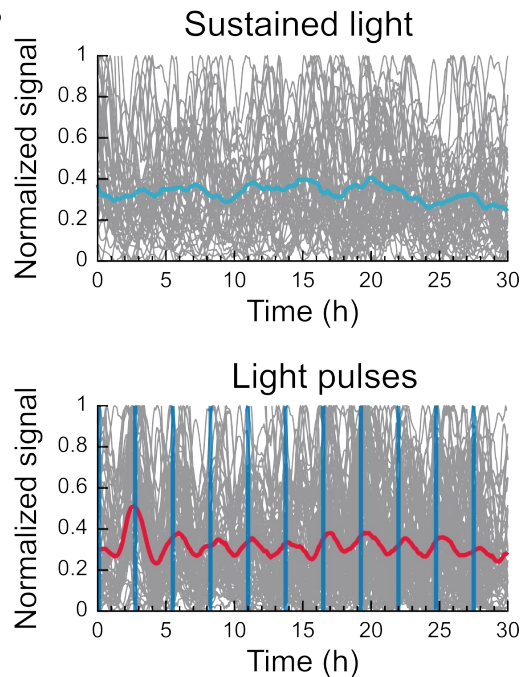


図 6 : 送信細胞における Dll1 の光遺伝学的発現制御と受信細胞における周期的な応答。

遺伝子発現リズムの周期・位相といった動的情報の細胞間伝達を可能にする最小要素を同定するため、Notch シグナルを介した

遺伝子発現リズムの細胞間位同期現象を光遺伝学技術によって再構成することを試みた。具体的には、Notch シグナルの制御に関わる生体分子の振動ダイナミクスを光遺伝学技術によって人工的に誘導・再構築した。それと同時に、遺伝子活性の生細胞観察を可能にする生物発光レポーターを用いることで、光振動に対する細胞の動的応答を1細胞経時イメージングによって定量計測した。

その結果、受信機能に関しては、通常2~3時間周期で振動している Hes1 の遺伝子発現リズムが様々な周期(1.8~5.5 時間)の外部刺激に応答・同期できること、特に Hes1 リズムの自然周期(約2.6時間)に近い周期の外部刺激で最も効率的に同期できること、そしてその動的応答は位相情報だけを考慮した確率的位相モデルを使った数値シミュレーションによって再現可能であることが明らかになった。この数理モデルは、自然周期に伴う位相の前進、外部刺激に伴う位相変調、及び確率的な位相の前進・後退といった、非常に単純な位相ダイナミクスだけで構成されている。この結果は、多数の分子種からなる複雑かつ確率的な1細胞レベルの遺伝子制御についても、詳細を捨象した少数自由度の数理モデルによって定量的に記述可能であることを実証している。

また、リガンド分子の Dll1 の発現を光制御可能な送信細胞と、隣接細胞の Dll1 からの刺激に伴う応答を発光によって光計測可能な受信細胞の2種類の細胞を混在させて培養して周期的光刺激を与えた結果、受信細胞の周期的な応答が観察できた(図6)。この動的情報伝達の再構成実験の結果は、リガンド分子の Dll1 の発現ダイナミクスが周期・位相の動的情報の細胞間伝達を実現するのに十分であることを示している。

以上のことから、光遺伝学による制御技術と生細胞イメージング技術を組み合わせることによって、遺伝子発現の動的情報が細胞間で送信・解読されるための情報処理機構を解明できることがわかった。本研究は、様々な生体分子による遺伝子活性の動的制御機構を解明するために基盤技術として有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Akihiro Isomura, Fumiko Ogushi, Hiroshi Kori, Ryoichiro Kageyama. Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information. *Genes & Development*, 査読有, 31, 2017, 524 - 535. <http://genesdev.cshlp.org/content/31/5/524.abstract/>
DOI: 10.1101/gad.294546.116

Kyogo Kawaguchi, Ryoichiro Kageyama, Masaki Sano. Topological defects control collective dynamics in neural progenitor cell cultures, *Nature* 査読有, 545, 2017, 327 - 331.

<http://www.nature.com/nature/journal/v545/n7654/full/nature22321.html>

DOI: 10.1038/nature22321

Souilhol C, Lendinez JG, Rybtsov S, Murphy F, Wilson H, Hills D, Batsivari A, Binagui-Casas A, McGarvey AC, MacDonald HR, Kageyama R, Siebel C, Zhao S, Medvinsky A. Developing HSCs become Notch independent by the end of maturation in the AGM region. *Blood* 査読有, 128, 2016, 1567-1577.

<http://www.bloodjournal.org/content/128/12/1567.long?sso-checked=true>

DOI: 10.1182/blood-2016-03-708164

[学会発表](計10件)

Hiromi Shimojo, Hiroshi Kori, Akihiro Isomura, Toshiyuki Ohtsuka, Hitoshi Miyachi, and Ryoichiro Kageyama. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. Gordon Research Seminar. Lewiston, USA. 2016.7.30-31.

Kumiko Kobayashi and Ryoichiro Kageyama. Single-Cell Quantification of Synchronized Oscillation in the Mouse Segmentation Clock. Gordon Research Conference. Lewiston, USA. 2016.7.31-8.5.

影山龍一郎: 数理モデルを使って生命現象を理解する、第28回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、高遠、2016.8.25-26.

小林久美子、新野祐介、宮脇敦史、影山龍一郎: 分節時計遺伝子 Hes7 の発現同期機構の解明、第28回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、高遠、2016.8.25-26.

Hiromi Shimojo, Hiroshi Kori, Akihiro Isomura, Toshiyuki Ohtsuka, Hitoshi Miyachi, and Ryoichiro Kageyama. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. The 10th Notch meeting, 三島、2016.10.5-6.

Kumiko Kobayashi, Yusuke Niino, Atsushi Miyawaki, and Ryoichiro Kageyama. Single-Cell Quantification of Synchronized Oscillation in the Mouse Segmentation Clock. The 10th Notch meeting, 三島、2016.10.5-6.

Hiromi Shimojo, Hiroshi Kori, Akihiro Isomura, Toshiyuki Ohtsuka, Hitoshi Miyachi, and Ryoichiro Kageyama. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. 日本発生生物学会 秋季シンポジウム 2016、三島、2016.10.19-21.

Hiromi Shimojo, Hiroshi Kori, Akihiro

Isomura, Toshiyuki Ohtsuka, Hitoshi Miyachi, , and Ryoichiro Kageyama. Ultradian oscillations in Notch signaling during tissue morphogenesis. Sapporo Symposium on Biological Rhythm. 札幌、2016.11.9-10.

Hiromi Shimojo, Hiroshi Kori, Akihiro Isomura, Toshiyuki Ohtsuka, Hitoshi Miyachi, , and Ryoichiro Kageyama. Notch signaling dynamics during murine morphogenesis. 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016.11.30-12.2.

Ryoichiro Kageyama. Oscillatory control of neural stem cells. Keystone Symposium: Neurogenesis during development and in the adult brain, Olympic Valley, USA. 2017.1.8-12.

〔図書〕(計1件)

田村 隆明 他、東京化学同人、遺伝子発現制御機構、2017、251

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

動く細胞集団の作る新しいパターンの発見～神経幹細胞はトポロジカル欠陥を選別する～

<http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/achievements/post-1807/>

光遺伝学による遺伝子発現の細胞間リズム同期の再構成

<http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/achievements/post-1819/>

アウトリーチ活動：

影山 龍一郎：文部科学省にて WPI10 周年記念講演会「日本の科学の未来に向けて」において、高校生や一般の方約 500 名を対象に講演。「受精から体ができるまで」

2016 年 12 月 17 日

<https://www.youtube.com/watch?v=U2dnsKIMX70>

Ryoichiro Kageyama : Kyoto University International Symposium, Bangkok, Thailand. How to rejuvenate your brain. 2017 年 2 月 4 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

影山 龍一郎 (KAGEYAMA, Ryoichiro)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号： 8 0 2 2 4 3 6 9

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

小林 久美子 (KOBAYASHI, Kumiko)

(医学研究科大学院生)

磯村 彰宏 (ISOMURA, Akihiro)

(さきがけ研究員)