

令和元年6月14日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14737

研究課題名(和文)脊椎動物の器官の大きさを規定するクオラムセンシング機構

研究課題名(英文)Quorum sensing in vertebrate organ size regulation

研究代表者

松井 貴輝(Matsui, Takaaki)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：60403333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの体には200種もの細胞が存在し、細胞が自律的に集まることできちんと機能する器官が形成される。しかし、器官を細胞レベルまで分解してしまうと、その高次機能は失われる。高次機能を有する細胞集団はどのようなしくみで形成されるのだろうか？本研究では、この問いにゼブラフィッシュの左右差器官クッセル胞をモデルに解析し、自律的集団形成にクオラムセンシングが関わる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、単細胞生物から多細胞生物の多くの生物種において、細胞が社会性を獲得するときに共通の基本原則が存在する可能性を示唆しているため、多くの研究分野に大きなインパクトを与えることができると考えている。また、本研究の成果は、再生医療に必須な「細胞や細胞集団を自由に操る」技術開発への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：200 types of cells are in the human body. functional organs are properly generated by self-organization of cell assemblies. However, if the organ is degraded into the cellular level, the high functions of the organ are lost. What kind of mechanism is working on the functional formation of cell assembly? In this study, we analyzed this question by using zebrafish organogenesis as a model, and showed the possibility that quorum sensing is involved in self-organization of cells during laterality organ formation.

研究分野：発生生物学

キーワード：自己組織化 ライブイメージング MAPK

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クオラムセンシングは、一部の細菌が持つ細胞社会性の獲得機構の一つである。化学物質 (autoinducer ; AI) を分泌する細菌が低い密度で生存しているときには、生成した AI は拡散してしまいが、細菌の密度が高くなると、AI の濃度が高くなり、その環境に存在する細菌すべてが、AI に依存して遺伝子発現などを一斉に開始するのである。数理モデルなどで、多細胞生物の細胞集団形成の過程で、クオラムセンシング機構が利用されていると予測されているが、これまで、それが実在する証拠は得られていない。

ゼブラフィッシュのクッペル胞は、内臓の左右非対称性を規定するための重要な器官であり、原腸陥入期に現れる 20-30 個のクッペル胞前駆細胞に由来する。20-30 個のクッペル胞前駆細胞は集団を形成し、植物極側へ集団移動しながら増殖・分化する。その後、移動先の尾部で 100 個程度のクッペル胞細胞からなる球状の小器官(クッペル胞)を構築する。クッペル胞の内部には、微繊毛が生えており、その回転により左方向への水流 (ノード流) が発生し、臓器/器官の左右差が規定される (業績 ; Matsui and Bessho, CMLS 2012)。これまでに研究代表者は、クッペル胞前駆細胞の集団形成は、FGF シグナルのポジティブフィードバックによって制御されることを明らかにした (業績 ; Matsui et al., PNAS 2011; 松井, 細胞工学 2012)。最近、研究代表者らがレーザーによる細胞除去実験を多数の個体に対して行ったところ、クッペル胞を構成する細胞数とクッペル胞器官の大きさには比例関係があり、クッペル胞の機能は細胞数が 20 個以上 (20-100) のときは正常であったが (ノード流、左右差共に正常)、細胞数が 10 個程度の個体のクッペル胞では、その機能が失われることが明らかになった (Ishikawa et al., 投稿準備中)。クッペル胞前駆細胞は Fgf8 を分泌し、Fgf8 のシグナルに応答して細胞集団形成が制御されるので (業績 ; Matsui et al., PNAS 2011、松井, 細胞工学 2014)、「Fgf8」=「AI」と捉えることができ、この自律的細胞集団形成の過程にクオラムセンシング機構が存在する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

ヒトの体には 200 種もの細胞が存在し、細胞が自律的に集まることできちんと機能する器官が形成される。しかし、器官を細胞レベルまで分解してしまうと、その高次機能は失われる。高次機能を有する細胞集団はどのようなしくみで形成されるのだろうか？これは現代科学の未解決な問題の一つである。クッペル胞前駆細胞は Fgf8 を分泌し、Fgf8 のシグナルに応答して細胞集団形成が制御されるので (業績 ; Matsui et al., PNAS 2011、松井, 細胞工学 2014)、「Fgf8」=「AI」と捉え、ライブイメージングを駆使して、そのしくみの理解を目指した。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュのクッペル胞の形成過程で、Fgf シグナルの活性と細胞の挙動を同時に計測する実験系を確立する。この実験系を用いて得られたタイムラプスの画像データから、動き、シグナル活性を定量する。また、遺伝学、逆遺伝学、レーザー工学などの手法を駆使して、細胞数を閾値付近まで減らしたとき、細胞挙動、シグナル活性などの細胞の振る舞いがどのように変動するのかを前述の手法により定量的に評価する。

4. 研究成果

(1) Fgf8 は、クッペル胞前駆細胞に発現する FGF 受容体 (Fgfr1) に結合し、Ras-ERK カスケードを活性化する。キャノピー 1 (Cnpy1) とシャペロン分子が共役することで、Fgfr1 の成熟が起こり、KV 前駆細胞では、FGF シグナル (Ras-ERK カスケードの活性化) が維持される。これにより、接着因子 (Cdh1; Cadherin1) の発現が誘導され、細胞集団が形成される (図 1、業績 ; Matsui et al., PNAS 2011; 松井, 細胞工学 2012; 松井, 細胞工学 2014)。Fgf8 を介したクオラムセンシング機構の存在を実証するためには、Fgf8a の局在とその細胞

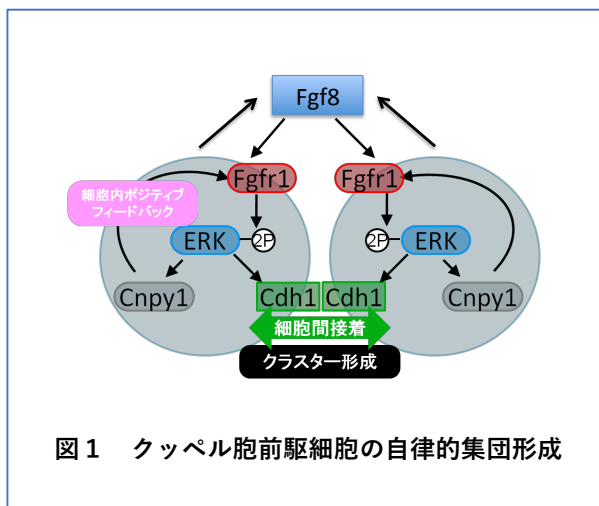


図 1 クッペル胞前駆細胞の自律的集団形成

内シグナル (Ras-ERK カスケード) の活性化を定量的に評価する実験系を確立する必要がある。

まず、Fgf8 の細胞外局在を認識する抗 Fgf8 抗体を購入し、クッペル胞前駆細胞付近に分泌された Fgf8 の検出を試みた。しかし、特異的なシグナルを検出することができなかった。そこで本研究では、異なる方法を試みた。ゼブラフィッシュには、*ace* という *fgf8a* 変異体が存在し、クッペル胞の形成不全によって左右差異常を発症することが知られている。そこで本研究では、Fgf8-mVenus の融合タンパク質 (オリゴマーを形成しないでも蛍光を発する。つまり、分泌されたらすぐ光る性質を持つ。) を発現させ、*ace* の表現系がレスキューされる系統の樹立を試みた。Fgf8 の発現を制御するプロモーター/エンハンサー領域はゲノムに複雑に織り込まれていて、200kb 以上のゲノム領域を含む Bac クローンを使用しても、*Fgf8* ノックアウトマウスの表現系を完全にはレスキューできないことが知られている。そこで、クッペル胞前駆細胞と内胚葉細胞で発現する *sox17* 遺伝子のプロモーターの下流に、Fgf8-mVenus を連結し、クッペル胞前駆細胞と内胚葉細胞のみで Fgf8-mVenus を発現させる Tg の作製を行った。*sox17:Fgf8-mVenus* のコンストラクトを、*ace* ヘテロ同士の交配で得られた胚にインジェクションした。Fgf8-mVenus の発現を一部の細胞に限局させているにもかかわらず、インジェクションした個体は、特に尾部に形態異常を示し、大人まで成長する個体は得られなかった。これは、Fgf8-mVenus が一部の細胞から分泌されたとはいえ、過剰発現になってしまったため、Fgf の受容体を持つ細胞に異所的なシグナル活性を誘導したことが原因であると考えられた。残念ながら、この方法では、Fgf8a の局在を調べることはできないと判断した。

(2) クオラムセンシング機構の存在を実証するためには、Fgf8 によって誘導される FGF シグナル (Ras-ERK カスケードの活性化) を定量的に評価する実験系を確立する必要がある。そこで、研究代表者は、Fgf の下流で活性化される Ras、ERK の活性をライブイメージングするための実験系の確立を行った。具体的には、クッペル胞前駆細胞で発現する *sox17* 遺伝子のプロモーターの支配下で Ras、ERK の活性をライブイメージングできる FRET プローブ (*Raichu*、*ERK biosensor*) を組み込み、To12 トラスポゼースの活性を利用してトランスジェニックフィッシュを作製した。*Tg[sox17:Raichu]* および *Tg[sox17:ERK biosensor]* はともに数ライン樹立できたが、いずれも、発現レベルが低く、クッペル胞前駆細胞で FRET を観察するには不十分であった。そこで、代替案として、ゼブラフィッシュ胚の全ての細胞で遺伝子発現を誘導できる *Efla* プロモーター下に *ERK biosensor* を繋いだコンストラクトを作製し、*Tg[Efla:ERK biosensor-nes]*、*Teen* 系統を作製した。その結果、初期胚で、抗リン酸化 Erk 抗体による免疫染色した領域で、高い FRET シグナルを検出することに成功した (図 2 上段)。検出された FRET シグナルが Fgf/Erk シグナルの活性をモニターできているのかを確認するため、Fgf 受容体阻害剤、および、Mek 阻害剤を処理し、FRET シグナルの変化をタイムラプス観察した。その結果、FRET シグナルが徐々に低下していくことが観察されたので、*ERK biosensor* がゼブラフィッシュ胚で機能していることが確かめられた (図 2 下段)。研究代表者は、この *Teen* 系統を利用して、Erk シグナル活性の時空間マップの作成に成功した。この成果は、学術雑誌の表紙に取り上げられるなど (図 3)、学術的に注目度が高いものとなった (発表論文②)。

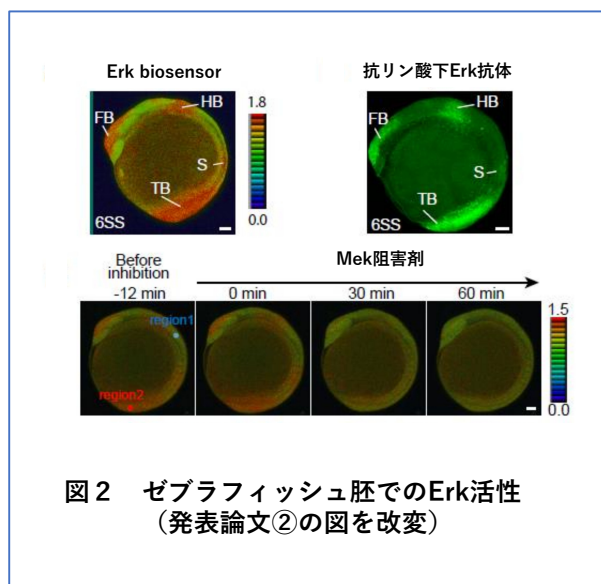


図2 ゼブラフィッシュ胚でのErk活性 (発表論文②の図を改変)

(3) *Tg[sox17:GFP]*胚で、GTP 陽性のクッペル胞を構成する細胞の数と器官サイズを定量的に調べたところ、予想に反し、大きなばらつきがあることを発見した。同じステージの個体に存在するクッペル胞前駆細胞の数は、20-60 個で 3 倍程度、器官のサイズは、40,000-200,000 μm^3 の範囲で 5 倍程度違っていたのである。しかも、驚いたことに、大きさがバラバラにもかかわらず、全てのクッペル胞は正常な機能を持っていたため、心臓などの器官の左右非対称の配置は正常に起こることが明らかになった。また、*Tg[sox17:GFP]*胚のクッペル胞前駆細胞をフェムト秒

(3) *Tg[sox17:GFP]*胚で、GTP 陽性のクッペル胞を構成する細胞の数と器官サイズを定量的に調べたところ、予想に反し、大きなばらつきがあることを発見した。同じステージの個体に存在するクッペル胞前駆細胞の数は、20-60 個で 3 倍程度、器官のサイズは、40,000-200,000 μm^3 の範囲で 5 倍程度違っていたのである。しかも、驚いたことに、大きさがバラバラにもかかわらず、全てのクッペル胞は正常な機能を持っていたため、心臓などの器官の左右非対称の配置は正常に起こることが明らかになった。また、*Tg[sox17:GFP]*胚のクッペル胞前駆細胞をフェムト秒

レーザーで1つ1つアブレーションして、機能を持つ器官を形成するために必要な最小細胞数、サイズを調べたところ、クッペル胞前駆細胞数が13個、器官サイズが $20,000\mu\text{m}^3$ の以下になると機能なくなることがわかった (Ishikawa et al., 投稿準備中)。しかも、Teen系統で、クッペル胞の前駆細胞のErk活性を、集団サイズの違う胚で比較してみたところ、大きい集団(20-30個程度)では、Erk活性が高かったが、小さい集団(5-10個)では、Erk活性が弱い傾向があることがわかった。この小さい集団では、細胞数がクオラム(器官形成に必要な最低細胞数)以下になっているため、クッペル胞の機能が失われた可能性が示唆された。この結果は、Fgf/Erkによるクオラムセンシングがクッペル胞形成に関与することを示唆することになるので、今後さらなる検討を加え、メカニズムの詳細を解明していきたいと考えている。

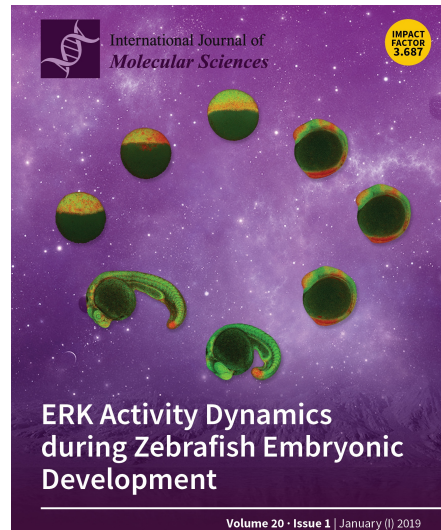


図3 TeenによるErkライブイメージング (IJMSの表紙に採用された)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3件)

- ① Naoki H., Akiyama R., Sari DWK., Ishii S., Bessho Y., and Matsui T. Noise-resistant developmental reproducibility in vertebrate somite formation. *PLoS computational biology* 15, e1006579, 2019. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006579 査読あり
- ② Wong KL., Akiyama R., Bessho Y., Matsui T., ERK Activity Dynamics during Zebrafish Embryonic Development. *International journal of molecular sciences* 20, 109, 2019. DOI: 10.3390/ijms20010109 査読あり
- ③ Sari D., Akiyama R., Naoki H., Ishijima H., Bessho Y., and Matsui T. Time-lapse observation of stepwise regression of Erk activity in zebrafish presomitic mesoderm. *Scientific Reports*, 8: 4335, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-22619-9 査読あり

[学会発表] (計 8件)

招待講演のみ記載

- ① 松井貴輝 フェムト秒レーザー細胞制御による生体組織の治癒メカニズムの解明 第89回レーザー加工学会大阪, 2018.
- ② Takaaki Matsui A previously unidentified role of the segmentation clock in zebrafish somite patterning. TLL-NAIST Joint Symposium, シンガポール 2017.
- ③ Takaaki Matsui Size regulation of the laterality organ in zebrafish. International Meeting of the MSMBB & 23rd Scientific meeting of MSMBB, マレーシア 2016.
- ④ 松井貴輝 レーザーアブレーション法を用いたゼブラフィッシュ発生過程の細胞組織機能の解明. 新学術領域「植物の環境感覚」ワークショップ, 奈良 2015

[図書] (計 1件)

- ① Matsui T., and Bessho Y. Analyzing ERK Signal Dynamics During Zebrafish Somitogenesis *Methods in Molecular Biology (ERK Signaling: Methods and Protocols)*, 1487, 367-378, 2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

https://researchmap.jp/taka_matsui/

<https://loop.frontiersin.org/people/190625/overview>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：別所 康全

ローマ字氏名：(BESSHO, Yasumasa)

研究協力者氏名：秋山 隆太郎

ローマ字氏名：(AKIYAMA, Ryutaro)

研究協力者氏名：山田 壮平

ローマ字氏名：(YAMADA, Sohei)

研究協力者氏名：細川 陽一郎

ローマ字氏名：(HOSOKAWA, Yoichiroh)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。