

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08588

研究課題名(和文) 三次元器官の構築と維持を司るHippo-Yapシグナル伝達系の解析

研究課題名(英文) Analysis of Hippo-YAP mediated 3D organogenesis

研究代表者

浅岡 洋一 (ASAOKA, Yoichi)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10436644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：メダカ胚の立体組織形成・維持において、組織の力学特性を統御するYAP分子ネットワークの実体を明らかにすることを目的に、RNA-seq法によりメダカ野生型とhir変異体との間の比較トランスクリプトーム解析を行い、hir変異体において顕著な発現変動を示す複数の遺伝子を明らかにした。さらにYAPメカノ分子ネットワークの候補分子について、CRISPR-Cas9法を用いてノックアウトフィッシュの作成を遂行した。現在までに、複数のノックアウトフィッシュが得られており、表現型の解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回のメダカhir変異体を用いたRNA-seq解析により、YAPの下流標的遺伝子群を網羅的に明らかにすることができた。特にhir変異体において顕著な発現変動を示す上位50遺伝子の中には、インテグリンシグナルやアクチンの重合・脱重合に関与する遺伝子群が含まれており、YAPメカノホメオスタシスを支える重要因子の可能性がある。今後、これまでに作出に成功したノックアウト変異体の詳細な表現型解析をさらに進めることにより、YAPメカノホメオスタシスの分子基盤の一層の理解につながるとともに、YAPメカノ分子ネットワークの破綻がどのように疾患の発症・増悪へ関与するのかを明らかにできると考えている。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the YAP molecular network that controls 3D organogenesis, we performed a comparative transcriptome analysis between the wild type and hir mutant medaka using the RNA-seq, and identified several genes that exhibited the characteristic expression pattern in hir mutant. KO fish were generated by using the CRISPR-Cas9 system for YAP molecular network candidates. To date, several KO fish have been established and their phenotypes are being analyzed.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞内シグナル伝達 三次元器官構築 YAP メカノホメオスタシス 小型魚類

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の体は複雑で立体的な形態をしており、組織や器官が正しく形作られ適切に配置されることにより初めて機能を発揮できる。こうした三次元的な形態形成の場には組織張力の制御が不可欠であるが、その詳細な分子機構については不明な点が多い。これまでに私たちは、初期胚形成不全メダカ変異体のスクリーニングの過程において、体全体が扁平化する *hirame* (*hir*) メダカ変異体を見出した [Mech Dev. (2004)] (図1)。これは器官サイズを制御する Hippo シグナル伝達系の核内標的分子 YAP の変異が原因であり、YAP がアクトミオシンネットワークの活性制御を通じて組織張力を調節し、三次元組織の構築と配置を統御していることが判明した [Nature (2015)] (図2)。従来、YAP は細胞外のシグナルを伝達し細胞の増殖・分化を制御するメカノトランスデューサーと考えられてきた。しかし、*hir* 変異体の解析により、YAP はアクトミオシンの形成を介した細胞張力により細胞が ECM を調整するメカノエフェクターであることが明らかとなり、組織メカニクスの相補性を統御するマスター分子の一つであると考えられる (図3)。私たちはこの YAP を中心とした組織メカニクスの恒常性維持機構を YAP メカノホメオスタシスと名付けた [Curr Opin Cell Biol. (2017)]。

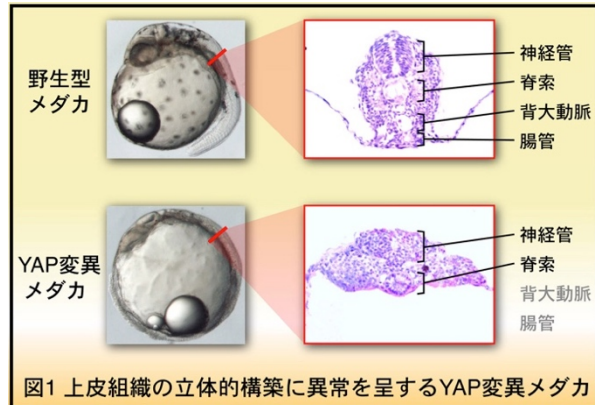


図1 上皮組織の立体的構築に異常を呈するYAP変異メダカ

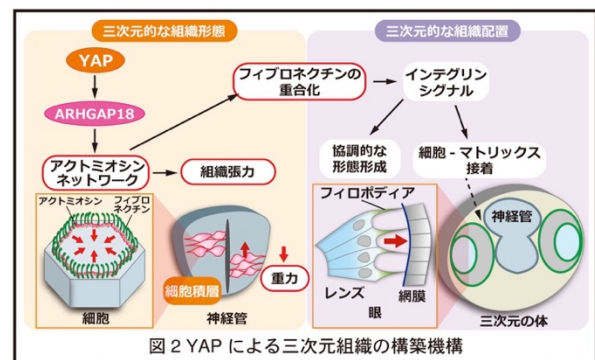


図2 YAPによる三次元組織の構築機構

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の知見をさらに掘り下げ、組織メカニクスと細胞増殖・分化を統合する YAP メカノ分子ネットワークの全貌を解明することである。そこで、メダカ *hir* 変異体の RNA-seq 解析により、YAP メカノネットワークの構成分子を網羅的に同定することを試みた。さらに生きたメダカ個体の中で、YAP 下流遺伝子の機能解析を行い、Hippo-YAP シグナル活性化の上皮組織形成・維持過程における役割を明らかにすることを目的として研究を進めた。最終的には得られた知見をもとに、YAP メカノ分子ネットワークの破綻がどのように疾患の発症・増悪へ関与するのかを明らかにし、メカノホメオスタシスという新しい視点の臨床応用の実現化を目指す。

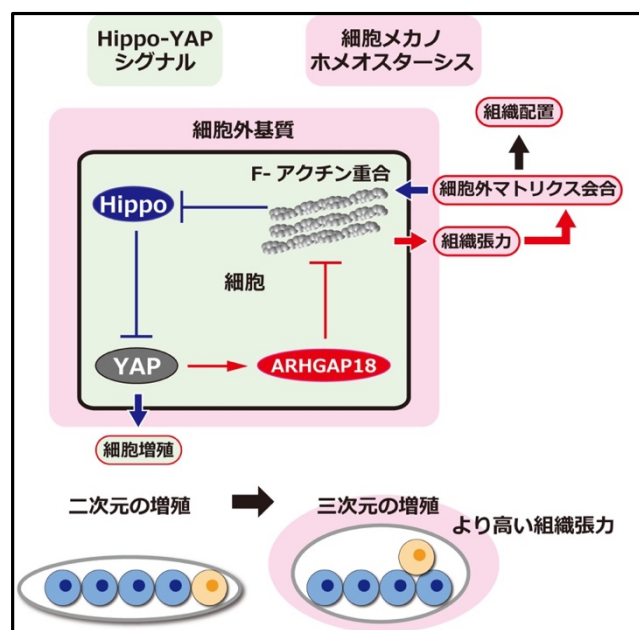


図3 YAPによるメカノホメオスタシスの制御機構

YAP を中心としたネガティブフィードバック機構の存在により、細胞は自ら置かれた力学環境を常に感知し適応できる。

3. 研究の方法

(1) YAP のメダカ変異体である *hir* 個体を用いたトランスクリプトーム解析を行った。具体的には、明確な表現型が確認できる 9 体節期のメダカ野生型胚 20 匹および *hir* 変異体胚 20 匹から、それぞれ RNeasy Mini Kit を用いて total RNA の抽出を行った。3 回ずつ独立して抽出を行い合計 6 つの RNA サンプルを得た。これらの RNA サンプルを用いて RNA-seq 解析を行った。

(2) YAP メカノホメオスターシスの分子基盤を明らかにする目的で、モルフォリノを用いた遺伝子ノックダウン法によりメダカのアクチン脱重合分子群 (Capz, Gelsolin, Cofilin) の機能解析を行った。

(3) CRISPR-Cas9 法を用いて、アクチン脱重合分子のひとつである Capz のノックアウトフィッシュの樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) RNA-seq 解析の結果、*hir* 変異体において顕著な発現上昇を示す 191 遺伝子および顕著な発現減少を示す 339 遺伝子を見出した。*hir* 変異体胚において発現上昇を示す遺伝子群について Gene ontology 解析を行ったところ、MHC class II 分子に関連する遺伝子が多く存在していることが明らかとなった。一方、*hir* 変異体胚において発現減少を示す遺伝子群についても Gene ontology 解析を行ったところ、“Extracellular region” や “BMP signaling pathway” に関連する遺伝子が多く見出された。さらに、*hir* 変異体において顕著な発現変動を示す上位 50 遺伝子に着目し、ヒートマップ解析を行った。*hir* 変異体胚において顕著に発現が減少していた遺伝子には integrin alpha 3b や integrin beta 3a が含まれていた。私たちは、インテグリンシグナルがレンズや網膜などの組織の三次元配置を規定すると考えており (図 2)、今回の解析から *hir* 変異体におけるインテグリンシグナルの減少を裏付ける結果が得られた。また、アクチンの重合・脱重合に関わる遺伝子の発現が *hir* 変異体において大きく変化していた。私たちは、YAP が ARHGAP18 を介してアクトミオシンの活性を制御し組織張力を生み出すと考えている (図 3)。今回の解析結果から、YAP が転写レベルでもアクチンのターンオーバーに関わる遺伝子群の発現を調節し、組織張力を制御している可能性が考えられる。

(2) アクチン脱重合分子群のモルフォリノオリゴをメダカ受精卵にインジェクションした結果、Capzb と cofilin2 のモルフォリノオリゴをインジェクションしたメダカ胚は原腸形成期の後まで生存した。Capz はアクチンの+端に結合することでアクチン重合を阻害する働きを持つことがわかっている。そこで Capzb のモルファントにおいて qPCR 解析を行った結果、YAP の標的遺伝子である CTGF および CYR61 の発現量がコントロールのメダカと比べて大きく上昇していることを見出した。さらに Capzb が組織構築の制御に関与する可能性を検討するため、Capzb のモルファントの詳細な観察を行った。その結果、Capzb のモルファントでは耳胞が拡大している傾向が認められたが、観察したサンプル数が少ないので今後サンプル数を増やして検討する予定である。

(3) YAP-アクチンシグナルによる三次元組織構築の制御メカニズムを明らかにするために CRISPR-Cas 9 システムを用いた Capza1aK0 ゼブラフィッシュの作出を試みた。当初予定よりノ

ックアウトホモ系統の樹立に時間を要した。今後、これまでに作出に成功したノックアウト変異体の詳細な表現型解析をさらに進めることにより、YAP メカノホメオスタシスの分子基盤の一層の理解につながることが期待されるとともに、YAP メカノ分子ネットワークの破綻がどのように疾患の発症・増悪へ関与するのかを明らかにできると考えている。

<引用文献>

- ① Makoto Furutani-Seiki, Takao Sasado, Chikako Morinaga, Hiroshi Suwa, Katsutoshi Niwa, Hiroki Yoda, Tomonori Deguchi, Yukihiro Hirose, Akihito Yasuoka, Thorsten Henrich, Tomomi Watanabe, Norimasa Iwanami, Daiju Kitagawa, Kota Saito, Satoshi Asaka, Masakazu Osakada, Sanae Kunimatsu, Akihiro Momoi, Harun Elmasri, Christoph Winkler, Mirana Ramialison, Felix Loosli, Rebecca Quiring, Matthias Carl, Clemens Grabher, Sylke Winkler, Filippo Del Bene, Ai Shinomiya, Yasuko Kota, Toshiyuki Yamanaka, Yasuko Okamoto, Katsuhito Takahashi, Takeshi Todo, Keiko Abe, Yousuke Takahama, Minoru Tanaka, Hiroshi Mitani, Toshiaki Katada, Hiroshi Nishina, Noboru Nakajima, Joachim Wittbrodt and Hisato Kondoh. A Systematic Genome-Wide Screen for Mutations Affecting Organogenesis in Medaka, *Oryzias Latipes*. **Mech Dev.** 121:647-658 (2004)
- ② Sean Porazinski#, Huijia Wang#, Yoichi Asaoka#, Martin Behrndt#, Tatsuo Miyamoto#, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S F Gabriel Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B Miesfeld, Brian A Link, Takeshi Senga, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina, Carl-Philipp Heisenberg and Makoto Furutani-Seiki. YAP Is Essential for Tissue Tension to Ensure Vertebrate 3D Body Shape. **Nature** 521:217-221 (2015) (#equally contributed)
- ③ Yoichi Asaoka and Makoto Furutani-Seiki. YAP Mediated Mechano-Homeostasis - Conditioning 3D Animal Body Shape. **Curr Opin Cell Biol.** 49:64-70 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiroaki Mano, Yoichi Asaoka, Daisuke Kojima and Yoshitaka Fukada	4. 巻 2
2. 論文標題 Brain-specific homeobox Bsx specifies identity of pineal gland between serially homologous photoreceptive organs in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0613-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoichi Asaoka, Hitoshi Morita, Hiroko Furumoto, Carl-Philipp Heisenberg, and Makoto Furutani-Seiki	4. 巻 1893
2. 論文標題 Studying YAP-Mediated 3D Morphogenesis Using Fish Embryos and Human Spheroids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 167-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8910-2_14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirayama J, Alifu Y, Hamabe R, Yamaguchi S, Tomita J, Maruyama Y, Asaoka Y, Nakahama K, Tamaru T, Takamatsu K, Takamatsu N, Hattori A, Nishina S, Azuma N, Kawahara A, Kume K, Nishina H.	4. 巻 9
2. 論文標題 The clock components Period2, Cryptochrome1a, and Cryptochrome2a function in establishing light-dependent behavioral rhythms and/or total activity levels in zebrafish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37879-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 北川 孝雄, 浅岡 洋一, 古谷-清木 誠	4. 巻 50
2. 論文標題 重力拮抗遺伝子YAPによる三次元臓器形成メカニズム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊 細胞 臨時増刊号	6. 最初と最後の頁 532-535
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoichi Asaoka, Makoto Furutani-Seiki	4. 巻 49
2. 論文標題 YAP mediated mechano-homeostasis conditioning 3D animal body shape	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 64-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceb.2017.11.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 浅岡 洋一, 古谷-清木 誠	4. 巻 30
2. 論文標題 再生医療-重力に抗した複雑な立体臓器の構築機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 季刊 腎と骨代謝	6. 最初と最後の頁 227-232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina and Makoto Furutani-Seiki.	4. 巻 59
2. 論文標題 YAP is essential for 3D organogenesis withstanding gravity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 52-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimi Okamoto-Uchida, Ruoxing Yu, Norio Miyamura, Norie Arima, Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Makiko Nawa, Takeshi Kasama, Yoichi Asaoka, Reiner Wimmer Alois, Ulrich Elling, Josef M. Penninger, Sachiko Nishina, Noriyuki Azuma and Hiroshi Nishina	4. 巻 6
2. 論文標題 The mevalonate pathway regulates primitive streak formation via protein farnesylation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 37697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep37697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoichi Asaoka, Yoko Nagai, Misako Namee, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina	4. 巻 474
2. 論文標題 SLC7 family transporters control the establishment of left-right asymmetry during organogenesis in medaka by activating mTOR signaling.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 146-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.04.087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 浅岡 洋一
2. 発表標題 小型魚類メダカを用いた3次元臓器形成機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅岡 洋一, 要 匡, 古谷-清木 誠
2. 発表標題 YAPとPTPN11の変異フィッシュを用いたNoonan症候群の発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅岡 洋一, 仁科 博史, Carl-Philipp Heisenberg, 古谷-清木 誠
2. 発表標題 重力拮抗遺伝子YAPによる三次元臓器形成メカニズム
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅岡 洋一, 荻野 英賢, 白井 睦訓
2. 発表標題 宇宙環境における宿主-病原体の相互作用の解析に向けた感染モデルの構築
3. 学会等名 第70回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅岡洋一, 白井睦訓
2. 発表標題 宇宙環境における宿主-病原体の相互作用変化の解析に向けたメダカ感染モデルの構築
3. 学会等名 第86回日本感染症学会西日本地方会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 浅岡洋一, 仁科博史, Carl-Philipp Heisenberg, 古谷-清木誠
2. 発表標題 YAPは組織張力の制御を通して立体臓器を構築する
3. 学会等名 日本遺伝学会第88回大会(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yoichi Asaoka, Yoko Nagai, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina
2. 発表標題 SLC7 family transporters control the establishment of left-right asymmetry during organogenesis in medaka by activating mTOR signaling.
3. 学会等名 第22回小型魚類研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	清木 誠 (SEIKI Makoto) (50226619)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	