

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K15127  
研究課題名(和文) 器官サイズを制御する新規ロバスト性獲得機構の解明  
  
研究課題名(英文) Analysis of robustness for organ size control  
  
研究代表者  
秋山 隆太郎 (Akiyama, Ryutaro)  
  
奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教  
  
研究者番号：00790403  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、器官サイズのゆらぎを機能レベルで補償する新規ロバスト性獲得メカニズムについて解明することを目的とした。ゼブラフィッシュ胚のクッペル胞をモデルとし、器官サイズと機能の同時評価やライブイメージングを組み合わせた解析を行った。その結果、クッペル胞では器官サイズに応じて繊毛の回転運動をファインチューニングすることにより器官機能を維持するという、新たな制御機構の一端が見えてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
本研究で得られた成果は、生命が個体や器官の大きさをどのように制御・維持しているのかについて、特に機能との関連からその仕組みを考える上で、重要な知見となる可能性がある。また、本研究による器官サイズ制御機構の理解は、再生医療に必須な「器官の大きさを自由に操る技術」などの応用面への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate a novel type of organ robustness where the fluctuations of organ size are compensated at the functional level. Using the zebrafish Kupffer's vesicle as a model system, we performed simultaneous evaluation of organ size and function, and combined them with live imaging. We propose that the Kupffer's vesicle maintains its function by fine-tuning the cilium property according to organ size.

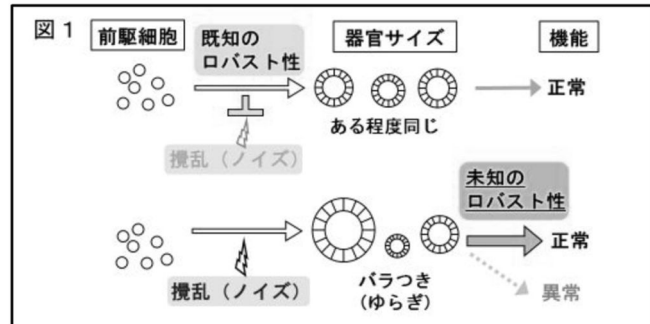
研究分野：発生生物学

キーワード：クッペル胞 器官形成 器官サイズ

## 1. 研究開始当初の背景

生物の生命維持に必要な臓器や器官は、身体の中の限られたスペースに収納される必要があるため、発生過程では、それぞれの臓器や器官が特有の形や大きさになるように調節されている。しかも、温度変化・栄養状態の変動などの攪乱が発生過程に加わったとしても、器官は、ある程度、決まった形やサイズで形成されることから、器官形成にはロバスト性があると考えられている。しかし、実際の器官サイズにはある程度のゆらぎが見られ、それにもかかわらず正常に機能している。

したがって、器官サイズのゆらぎを機能レベルで補償する、未知のロバスト性獲得メカニズムが想定される(図1)。本研究では、器官の大きさを定量的に操作し、同時にその機能を評価することが可能なゼブラフィッシュのクッセル胞(KV)をモデルとし、この未知のロバスト性について検証することにした。



## 2. 研究の目的

ゼブラフィッシュ内臓の左右非対称性を規定する器官であるクッセル胞(KV)は、原腸陥入期に現れる数十個のKV前駆細胞に由来している。KV前駆細胞の集団は、増殖・分化しながら植物極へ移動し、移動先で100個程度の細胞からなる球状のKVとなる。KV細胞は内腔側に微繊毛を有し、その回転によって反時計回りの水流(ノード流)が発生することで、内臓の左右差が規定される。このことから我々は、器官サイズ(内腔の容積)とその機能(ノード流・内臓の左右差)を同一個体で評価できる実験系としてKVを活用し、上記の問題に取り組むことにした。

研究を開始するにあたって、我々は、出力、照射範囲を微調整したフェムト秒レーザーを用いることで、KV前駆細胞の数を自在に操作する実験系を確立した。この系を用いてKVの細胞数を実験的に操作したところ、20個から100個の範囲であれば、KVの機能(ノード流・左右差)は正常に保たれる、つまり機能レベルでロバストであることを見出していた。さらに、KV前駆細胞数を減少させていくと、KVの内腔容積も同時に減少することや、微繊毛の形成動態が変化することを示唆するデータを得ていた。このことから、KVは構成細胞数を感知し、繊毛形成や繊毛の回転運動を調節することで、内腔容積に応じた機能的なノード流を生成しているとの仮説を立て、本研究ではこれを検証することにした。

## 3. 研究の方法

KV形成における微繊毛形成の主制御因子としてFGFシグナルが知られている。また、我々のグループは以前、KV前駆細胞がFgf8aを分泌し、自身のFGFシグナルを活性化することで、KV前駆細胞が自律的に集合し、KVの大きさ、形、微繊毛の形成を制御することを報告している。これらのことから、KV前駆細胞の数の変動が周囲に拡散するFgf8a量に変動を与え、場のFgf8a量を感じて繊毛形成が調節されるのではないかと予想した。これを確かめるため、KV前駆細胞でのFgf8aの局在や、FGFシグナル活性の変化を定量する系の構築を試みた。さらに、KVサイズが繊毛形成やノード流形成へ及ぼす影響についても解析を行った。

## 4. 研究成果

(1)まず、予備実験で得られていたKV細胞数とKV内腔サイズの関係について、より詳細な検証を行った。KV細胞でGFPを発現するゼブラフィッシュ(Tg[Sox17:EGFP])を用いてKV細胞数とKVサイズを定量したところ、KV細胞数はKVサイズに比例することが確かめられた。また内腔サイズが約20000 $\mu\text{m}^3$ を下回るとKVは正常に機能しなくなるもの

の、これより大きな KV はほぼ正常に機能しており、そのサイズは約  $20000 \sim 110000 \mu\text{m}^3$  と大きくバラついていることも確かめられた。

一般的に、多くの器官は体の大きさにあったサイズに調節されていることから、KV サイズの変動は単に体の大きさの違いを反映している可能性もあった。この可能性を検証するために、KV 以外の器官の例として胚の体長や眼のサイズを測定し、そのばらつきを KV と比較した。その結果、体の大きさも目の大きさも個体間でのバラつきは KV に比べて一定であり、KV サイズのバラつきは単に体全体のサイズを反映したものではなく、KV に特徴的なものであることが分かった。

( 2 ) KV 前駆細胞での Fgf8a の局在を定量するために Fgf8a-mVenus 融合タンパク質 ( 分泌されたらすぐ光る性質を持つ ) を KV 前駆細胞で発現するトランスジェニック ( Tg ) ラインの作製を試みた。具体的には、KV 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 Fgf8a 変異体ゼブラフィッシュ ( *ace* ) 背景で、Tg[sox17:Fgf8a-mVenus] ( KV 前駆細胞で Fgf8a-mVenus を発現する ) を作製し、*ace* の左右差異常がレスキューされる系統を選抜しようとした。Tol2 ベクターに挿入した Fgf8a-mVenus とトランスポゼーストを受精卵に注入し、成魚まで育て野生型と交配し、蛍光陽性の胚を選抜しようとしたが、目的の胚を得ることができなかった。そこで方法を変更し、KV 細胞において FGF シグナル下流で活性化する Erk シグナルをライブイメージングすることにした。

( 3 ) KV サイズと FGF - Erk シグナル量の間を捉えるため、Erk センサーを発現する Tg ゼブラフィッシュを作製した。具体的には、全身の細胞で働く Efl プロモーター下で、Erk の FRET センサーである EKAREV を発現する Tg を作製した。この Tg 胚では、FRET センサーが示すシグナル活性化領域と、抗リン酸化 Erk 抗体で検出される Erk 活性化領域がほぼ一致していたことや、Erk 経路の阻害剤に対する応答も一致していた。つまり、ゼブラフィッシュ胚での Erk 活性のライブイメージングに成功した ( Wong et al., 2018 )。また、KV 前駆細胞における Erk 活性を捉える事にも成功した。今後、KV 特異的に GFP を発現する Tg と組み合わせることで、KV サイズと FGF - Erk シグナルの変化を同時に計測し、次項で述べる繊毛形成・機能との関連について検証する予定である。

( 4 ) KV サイズが繊毛形成やノード流形成へ及ぼす影響についても解析を行った。その結果、内腔サイズが  $20000 \mu\text{m}^3$  を下回る KV では、繊毛の形成率 ( 繊毛数/細胞数 ) が有意に低下していた。このことから、KV サイズが繊毛形成に影響を及ぼすことが示唆されたので、繊毛の機能についても KV サイズによる違いが観察されるのではないかと予想し、繊毛の回転運動を観察・解析することにした。様々な KV サイズの KV 細胞において、ハイスピードカメラを用いて繊毛の回転運動を撮影したところ、小さい KV ほど回転数が低下している傾向がみられた。これらの事から、KV サイズに応じて繊毛の回転運動をファインチューニングすることによって、適切なノード流を維持している可能性が見えてきた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Naoki Honda, Akiyama Ryutaro, Sari Dini Wahyu Kartika, Ishii Shin, Bessho Yasumasa, Matsui Takaaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Noise-resistant developmental reproducibility in vertebrate somite formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1006579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pcbi.1006579	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 Wong Kah-Loon, Akiyama Ryutaro, Bessho Yasumasa, Matsui Takaaki	4. 巻 20
2. 論文標題 ERK Activity Dynamics during Zebrafish Embryonic Development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 109 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20010109	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 Sari Dini Wahyu Kartika, Akiyama Ryutaro, Naoki Honda, Ishijima Hannosuke, Bessho Yasumasa, Matsui Takaaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Time-lapse observation of stepwise regression of Erk activity in zebrafish presomitic mesoderm	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-22619-9	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 Tahara Naoyuki, Akiyama Ryutaro, Theisen Joshua W.M., Kawakami Hiroko, Wong Julia, Garry Daniel J., Kawakami Yasuhiko	4. 巻 434
2. 論文標題 Gata6 restricts Isl1 to the posterior of nascent hindlimb buds through Isl1 cis-regulatory modules	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 74 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryutaro Akiyama
2. 発表標題 A role of extracellular environment in collective migration of organ progenitors.
3. 学会等名 2nd KRIPIK-SciFiMaS 2018 International Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----