

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19202

研究課題名（和文）異種間胚盤胞補完法を用いた器官サイズ創出機構解析

研究課題名（英文）Analysis of organ size morphogenesis by fish-interspecific blastocyst complementation

研究代表者

田村 宏治（Tamura, Koji）

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70261550

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、魚類の胸鰭をモデルとし、異種間胚盤胞補完という方法を用いて個体サイズの異なる比較的近縁な淡水魚種間でサイズ感知と器官サイズ調節のしくみを明らかにすることを目指した。本研究ではまず、ゼブラフィッシュとその大型の近縁種であるジャイアントダニオを用いて、卵から稚魚に至るまでに個体サイズと器官（眼、鰾、胸鰭）サイズに相関が見られることを明らかにし、飼育条件等も含めて両種が実験目的に適することを確認した。また、移植の宿主に用いるゼブラフィッシュの免疫寛容システムや器官欠損システムを入手し、異種間胚盤胞補完を行うための基盤を整えた。細胞の移植方法も確立し、移植細胞が生存することも確かめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異種間胚盤胞補完技術は、別種の動物に器官を作らせる夢のある技術で、哺乳類で確立されたものである。本研究ではこの技術を魚類に応用し、個体サイズの異なる近縁な淡水魚種の間で胚盤胞補完を行うことを目的とした。モデルに適した実験動物としてゼブラフィッシュとジャイアントダニオを選定し、体サイズや器官サイズなどの基礎データを集め、卵から稚魚に至るまでに個体サイズと器官（眼、鰾、胸鰭）サイズに相関が見られることを明らかにした。また胚盤胞補完に用いるシステムを確立するなどの基盤を整えた。本成果は、個体が自分の体のサイズをどのように感知して適切なサイズの器官をつくるのかの解明に繋がり、再生医療への応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanisms of size sensing and organ size regulation in relatively closely related freshwater fish species of different individual sizes. To this end, the interspecific blastocyst complementation technique was employed. First, using zebrafish and its large relative, the giant danio, we found a correlation between individual size and organ size (eye, swim bladder, and pectoral fin) from egg to juvenile. Furthermore, we confirmed that both species were suitable for our experimental purposes including rearing conditions. In addition, we prepared immune-tolerant and organ-deficient zebrafish lines to be used as hosts for transplantation, and established the basis for interspecies blastocyst complementation.

研究分野：発生生物学

キーワード：異種間胚盤胞補完法 器官サイズ ジャイアントダニオ ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

「動物形態の多様性創出」は動物学の根本命題の一つであり、発生学的な仕組みの研究から機能生態学的な意味の議論まで、さまざまなモデル系を駆使して数多くの研究がなされてきた。類似したパターンをもった器官でも、器官サイズが動物種によって異なる例は数多く見られるが、同一種の中では器官サイズは一定に保たれる。したがって、個体サイズを感知し、器官を一定の大きさに調節する仕組みが存在するはずだが、その感知メカニズムも、器官サイズの種間差成立の仕組みも明らかになっていなかった。

インシュリンや IGF などの細胞増殖因子や Hippo シグナル経路などいくつかの因子が、器官サイズを制御すると言われる。確かにこれらの因子が器官サイズを大きくしたり、逆に機能欠損が器官サイズを小さくしたりすることが示されてきた。しかし、器官サイズを一定の大きさに調節する仕組み、たとえば一定の時期に IGF の機能を停止させる仕組みは、IGF の機能とは別に考える必要がある。

良例として、異なる体サイズをもつサンショウウオ種間における、発生中の腕原基の交換移植結果がある。これによると、大きな体サイズの動物種から小さい動物種に移植された大きな腕原基は、小さい動物種においても大きな腕を形成する。ここでも、器官サイズを感知し、成長を停止する制御メカニズムは不明であるという状況は変わらない。

2. 研究の目的

上述の背景をもとに、本研究はサイズ感知メカニズムの解明によって動物種固有の器官サイズ創出機構を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、この動物種固有の器官サイズ創出機構の理解を目的に、魚類の胸鰭をモデルとし、異種間胚盤胞補完という方法を用いてアプローチした。異種間胚盤胞補完技術はほ乳類の初期胚を用いて確立された、別種の動物に器官を作らせる技術であり、この方法を用いると、たとえばラット由来の膵臓をもったマウスを発生させることができる。このとき興味深いのは、本来ラットの膵臓はマウスの膵臓より大きいにもかかわらず、マウス個体に作られたラット膵臓はマウス（宿主）のサイズになる。この結果は、前述のサンショウウオの実験とは異なり、異種の細胞が宿主のサイズを感知し器官サイズを宿主のサイズに調整していることを意味している。

この異種間胚盤胞補完技術を応用し、特定の細胞種を欠失させたり、特定の分子カスケードを機能欠損させたりすることで、動物種固有のサイズを感知して器官サイズを一定にする仕組みに分子的な理解をもたらすことが期待される。本研究では、さまざまな実験が容易かつ短期間にできる小型魚類に、異種間胚盤胞補完法を応用した。

小型魚類モデル生物・ゼブラフィッシュが属する骨鰾類（コイ目コイ科）の複数種を用いて、異種間胚盤胞補完を計画した。この方法は魚類では胞胚期細胞移植として知られ、ゼブラフィッシュでは確立された実験系である。これを異種間で行う。モデル系としては胸ビレを対象とし、ゼブラフィッシュにおいて、胸鰭欠損を起こす変異体 (*fgf24-/-* など) を宿主として用いる。これらの初期胚に、異種魚の胞胚期の細胞を注入移植し、それぞれの細胞（間充織 or 上皮 or 両方が欠損の原因）で置換した場合に、宿主あるいはドナー種どちらのサイズの胸ビレが形成されるかを調べる。さらに、さまざまな摂動や多種の変異体と組み合わせることで胸鰭サイズの変更を行い、特定の動物種の大きさに器官サイズを制御する仕組みがどの細胞に備わり、どのようなシグナル系・分子メカニズムが関与するかを特定する。

4. 研究成果

まず、用いる魚種の体サイズおよび器官サイズを比較するには、それぞれの種において成長に伴う形態や発生についての情報が必要であった。しかし、このような観点の記載報告がほとんど無かったため、ジャイアントダニオとゼブラフィッシュを同条件で飼育して比較を行った。その結果、ジャイアントダニオとゼブラフィッシュでは受精後 3

日目から受精後 45 日目まで体サイズに差があることが判明した。このことは、両者の体サイズ差は発生のかかなり早い段階で生み出されていることを示唆する。ただし成魚の体サイズの差が 2 - 3 倍であることと比べると、初期の差は小さいものであった。このことから、2 種の成魚に見られる大きな体サイズ差が生じるメカニズムには、本研究で対象とした時期以降に働くものも存在すると考えられる。その時期に存在するメカニズムとして、成長様式の違いがある。ジャイアントダニオはエサが不足しない条件下で成長し続ける「非制限成長」を示すのに対し、ゼブラフィッシュは成長がある大きさで止まってしまう「有限成長」を示す。この 2 種の違いが、ゼブラフィッシュとジャイアントダニオの成魚の最終的な体サイズ差を生み出す要因となっている可能性が考えられる。発生初期から体サイズに差があるという結果は同時に、体サイズの差が生じるメカニズムが受精後 3 日目より以前に存在する可能性が示唆している。これについては、より早期の受精卵や割球・卵黄のサイズ差の有無を定量的に比較することで、さらに理解を進める手がかりが得られるだろう。

さらに、各日数における、発生段階（形態形成段階）はおおむね等しいこと、にもかかわらず胸鰭サイズに差があることが観察された。これらのことから、器官サイズ差比較の系としてゼブラフィッシュとジャイアントダニオの比較が有用であることが分かった。胸鰭以外の器官を比較対象とする場合にも、それぞれの器官ごとに今回のように比較を行って適切な飼育日数を検討することで、実験系として適切に用いることが出来ると考えられる。

次に、ジャイアントダニオとゼブラフィッシュの種間移植実験により器官サイズ制御の自律性について調べるため、種間移植実験系の確立に向けて必要な準備と検証・検討を行った。移植の宿主に用いるゼブラフィッシュの免疫寛容系統や器官欠損系統を入手・確立し、異種間胚盤胞補完を行うための基盤を整えた。細胞の移植方法も確立し、移植細胞が生存することも確かめた。今回の研究で器官欠損系統として準備したのは fgf24 欠損系統であったが、fgf24 遺伝子は体内において細胞外へ分泌されるタンパク質をコードしているため、野生型の細胞で表現型を補完したとき、作られた胸鰭の中に含まれるドナー細胞の割合が小さくなる可能性も予想される。今後は、移植実験系に適した変異体系統として受容体や転写因子など細胞内で働く分子をコードする遺伝子を欠損した系統を用いることも検討する必要がある。

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tanaka, Y., Miura, H., Tamura, K. and Abe, G.	4. 巻 8
2. 論文標題 Morphological evolution and diversity of pectoral fin skeletons in teleosts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-022-00198-y	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 Miyamoto Kazuhide, Abe Gembu, Tamura Koji	4. 巻 -
2. 論文標題 The dwarf neon rainbowfish <i>Melanotaenia praecox</i> , a small spiny rayed fish with potential as a new <i>Acanthomorpha</i> model fish: <i>l</i> . <i>Fin</i> ray ontogeny and postembryonic staging	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.699	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 Miyamoto Kazuhide, Abe Gembu, Kawakami Koichi, Tamura Koji, Ansai Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 The dwarf neon rainbowfish <i>Melanotaenia praecox</i> , a small spiny rayed fish with potential as a new <i>Acanthomorpha</i> model fish: <i>ll</i> . Establishment of a microinjection procedure for genetic engineering	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.698	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 Kudoh Hidehiro, Yonei Tamura Sayuri, Abe Gembu, Iwakiri Junichi, Uesaka Masahiro, Makino Takashi, Tamura Koji	4. 巻 66
2. 論文標題 Genomic screening of fish specific genes in gnathostomes and their functions in fin development	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 235 ~ 247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12918	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 速水一、阿部玄武、田村宏治
2. 発表標題 サイズの異なるゼブラフィッシュとジャイアントダニオの形態形成の比較
3. 学会等名 日本動物学会・令和3年度東北支部大会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------