

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19265

研究課題名（和文）器官機能補償作用の存在実証とそのメカニズムの解明

研究課題名（英文）Organ function compensation and elucidation of its mechanism

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：多細胞生物の器官サイズは細胞数と細胞サイズの和で決まる。遺伝的異常などで細胞の数が減少した場合、残存する細胞が肥大化することで器官サイズを通常時と変わらないように維持するサイズの補償が起こる。しかし最近研究代表者は、ゼブラフィッシュの内臓の左右非対称な配置を規定する器官（クッペル胞）をモデルとして器官サイズ制御の機構を解析したところ、クッペル胞ではサイズのばらつきが許容され、機能が補償されるという既存の理念とは異なる制御機構の存在を発見した。本研究ではこのしくみを解析し、クッペル胞のサイズに依存した乱流発生が機能不全に関与し、ATAT1が機能補償に関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能補償作用のしくみを理解することは、これまでの器官サイズ制御に対する定説を覆し、新たな制御機構の発見の可能性を秘めている。そのため本研究の成果は、クッペル胞での機能補償のしくみの解明することで、今後、その他の器官、動物種へ研究を拡大して、器官の機能補償作用の特異性・普遍性を解明していくことに繋がる。

研究成果の概要（英文）：The number of cells and cell size determines the organ size of multicellular organisms. When cell number decreases due to genetic or other abnormalities, remaining cells enlarge and the organ size returns to normal. However, I analyzed the mechanism of size control of Kupffer's vesicle (KV) that regulates left-right asymmetry in zebrafish. I found that KV allows size variation and compensates for the function. Here I additionally revealed that size-dependent turbulence generation of KV is involved in its dysfunction and that ATAT1 is involved in the functional compensation.

研究分野：発生生物学

キーワード：器官形成 機能獲得 機能調節 ゼブラフィッシュ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の器官サイズは細胞数と細胞サイズの和で決まるため定常状態では一定である。しかし、遺伝的異常あるいは生理的・外因的攪乱によって細胞の数が減少した場合、残存する細胞が肥大化することで器官サイズを通常時と変わらないように維持するサイズの補償が起こる (Tsukaya, Plos Biol., 2008; Hisanaga et al., J. Exp. Bot., 2015)。しかし研究代表者は、ゼブラフィッシュの内臓の左右非対称な配置を規定する器官(クッペル胞)をモデルとして器官サイズ制御の機構を解析したところ、クッペル胞ではサイズのばらつきが許容され、機能が補償されるという既存の理念とは異なる制御機構の存在を発見した。

クッペル胞は、100 個程度の単一繊毛細胞 (monociliated cells) によって構成された球状(ゴムボール状)の器官で、その内腔には水が満たされている。それぞれの細胞の繊毛(シリア)は内腔に面して生えており、それが回転することによって、クッペル胞内に反時計まわりの水流(ノード流)が発生し、左右対称性の破れが誘導される(クッペル胞の機能) (Essner et al., Development 2005, Amack et al., Dev. Biol. 2007, Oteiza et al., Development 2008)。研究代表者は、数量的な定量解析とフェムト秒レーザーによる非熱的細胞除去実験を行った結果、クッペル胞は、細胞数(≒シリア本数)で 20~100 個、内腔の体積(≒満たされた水の量)では 25,000~200,000 μm^3 までのサイズのばらつきがあるにもかかわらず、一定速度(8~10 $\mu\text{m}/\text{s}$)のノード流を生み出し、心臓など内臓器官が正確に左右非対称に配置されることを突き止めた。つまり、サイズのばらつきが許容され、機能が堅守されることを発見したのである。しかも、ハイスピードカメラによるシリアの動態観察により、シリア(長さ一定)の回転は、内腔体積に応じて 30~60Hz の間で可変であり、器官サイズが大きいほど回転速度が早くすることで一定速度のノード流が担保されることを突き止めた。本研究では、この新規の器官サイズと器官機能を調和させるしくみを器官機能の補償作用と名付けた。

2. 研究の目的

研究代表者らが発見した器官機能補償作用のしくみを解明すること。

3. 研究の方法

これまでの研究結果から、クッペル胞における機能補償は、以下のように起こると予想している。クッペル胞の形成過程において、まず、1-1)細胞の浸透圧や水輸送に関与する分子(CFTR、アクアポリンなど)が活性化され内腔が膨らむ。1-2)シリアが回転することで内腔に水流が発生する。2-1)水量が増えることで膨圧が細胞にかかる。2-2)水流によってシェアストレス発生する。3-1)膨圧で生じた力がメカノチャネルによって受容され、シグナルが活性化する。3-2)シェアストレスがメカノチャネルによって受容され、シグナルが活性化する。4)2つの反応の片方、または、両方により、水輸送、シリア回転速度が変化することで、適切な内腔サイズと水流速度に近づける。5)水流が弱くなりすぎたり、内腔が小さくなりすぎた場合は、再び、1が活性化され、サイズの違いを許容しつつ一定速度のノード流が発生するようになると考えている。そのため、これは、複数の機械刺激の発生と細胞反応が複雑に相関するシステムで構成されていると考えられる。そこで本研究では、遺伝学的な解析、レーザー光学的解析、および数理解析を組み合わせた融合研究を展開した。

複数のメカノチャネルの阻害剤を処理して、機能補償が起こるか調べたところ、TRPCファミリーに属する TRPC1, TRPC3, TRPC6 分子の活性が阻害されたとき、機能補償されないという予備データを得た(未発表)。また、クッペル胞のサイズ(水量)を調節するには、浸透圧や水輸送に関与する分子(CFTR、アクアポリンなど)の関与が示唆されており、水流速度の調節には、シリア形成制御因子群(シリア形成開始因子 KCTD17 など)やシリアの回転速度が制御する遺伝子群(アセチル基転移酵素 ATAT1 など)の関与が示唆される。そこで、これら遺伝子のノックアウトゼブラフィッシュ(KO フィッシュ)を CRISPR/CAS9 システムを用いて作製し、これらが機能補償に関与するのかを解析するとともに、数理モデルを構築し、流体シミュレーションを行った。

4. 研究成果

TRPC1 KO ゼブラフィッシュ系統の作製

薬理学的な実験、発現パターン解析から、TRPC1 が機能補償へ関与する可能性が示唆されたため、CRISPR/Cas9 システムを用いて、TRPC1 の機能を破壊した KO 系統の作製を行った。gRNA は、エキソン 2 とエキソン 4 を標的として、large deletion を狙ったが、エキソン 2 にセットした gRNA 部分で編集は起きず、エキソン 4 に 13 塩基欠失(13del)、および、4 塩基挿入(4in)された 2 つの TRPC1 変異系統が得られた。野生型の TRPC1 は 796 個のアミノ酸で構成された 6 回膜貫通型のタンパク質をコードするが、Trpc1^{13del} 変異体では、フレームシフトが起こることで、168 個のアミノ酸 (TRPC1 N 末 152 個 + フレームシフトで生じた 16 個) から構成された変異タンパク質、Trpc1⁴ⁱⁿ 変異体では、N 末 153 個のみで構成された変異タンパク質をコードすることが示唆された。この 150 個付近のアミノ酸は、TRPC1 の第 1 膜貫通ドメインの途中に位置す

るため、これらの変異は、TRPC1 の機能喪失であると考えている。クッペル胞の機能不全が起こり、左右非対称な器官配置が起こらない可能性が示唆された。そこで、Trpc1^{13del} 変異体同士を交配して、24 時間胚で、心臓の配置を調べた。その結果、Trpc1^{13del/13del} の一部で、心臓が体の中央に位置し、ルーピングが起こらない個体が存在することが明らかになった(図1)。以上の結果から、Trpc1 が左右差の決定に関与する可能性が示唆された。

ATAT1 KO ゼブラフィッシュ系統の作製

クッペル胞細胞は、1 本の動毛(シリア)をもち、その動きによって、クッペル胞内腔に逆時計周りの水流(ノード流)を発生させることで、左右対称性の破れを誘導する。シリアは主にチューブリン細胞骨格で構成され、そのチューブリンはアセチル化されていることが知られている。研究代表者らは、チューブリンのアセチル化酵素である ATAT1 がノード流の発生、シリアの形成、動態などに影響を与える可能性があると考え、CRISPR/Cas9 システムを用いて、ATAT1 の機能を破壊した KO 系統の作製を行った。ATAT1 は 3 種類のスプライシングバリエントが存在するが、転写開始点以降の第一エクソンはすべてのバリエントで共通しているため、gRNA は第一エクソン内に設計した。得られた変異体では、第一エクソン内に存在する転写開始点下流に 29 塩基が挿入されることで(29in)、このエクソン内に終止コドンが生じる。これにより野生型では 453 アミノ酸が合成される配列が、25 アミノ酸しか合成されない配列になっていることから、機能的な ATAT1 は発現しないと考えられた。アセチル化チューブリン抗体を用いた免疫染色、および、ウエスタンブロッティングにより、ATAT1^{29in/29in} では、チューブリンのアセチル化は検出されなかったことから、ATAT1^{29in/29in} は ATAT1 が破壊された変異体(KO)であると結論づけた。また、ATAT1^{29in/29in} の母性・胚性 KO 個体を得て、その個体の心臓の配置を調べたところ、左右差異常を示す個体が存在することが確認できた(図1)。よって、ATAT1 も左右差決定に関与する可能性が示唆された。

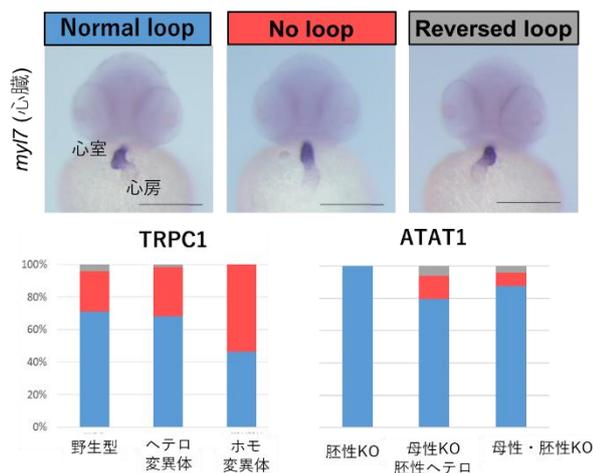


図1 TRPC1、ATAT1変異体での心臓のルーピング
TRPC1 KOとATAT1母性・胚性KOでは心臓の配置、ルーピング異常が誘導される。

機能補償への影響

TRPC1、ATAT1 の KO で、心臓の左右差に影響を与える表現型が観察されたので、実際に、クッペル胞の機能補償(シリア形成、シリア運動、内腔サイズ)、左側板中胚葉での Nodal (*southpaw*, *spaw*) の発現、心臓ルーピングのどこに作用しているのかを解析した。TRPC1 KO では、クッペル胞の機能補償に関する表現型が認められず、しかも、*spaw* の発現は左側の LPM にのみであった(表1)。これらを合わせて考えると、TRPC1 KO で認められる心臓が中央にでき、ルーピングしないという表現型は、左右差異常によって起こるのではなく、心臓のルーピングのみが影響を受けた可能性が示唆された。心臓のルーピングには細胞の移動等に伴う力学的な応答が関与していることが知られており、これに TRPC1 が関与するという新たな可能性を見出した。

ATAT1 の母性・胚性 KO では、側板中胚葉での *spaw* の発現がランダム化しており、左右差異常があることが明らかになったので、クッペル胞の機能補償に関して調べてみると、シリアにあるチューブリンのアセチル化は阻害されたものの、シリア長さ、本数、回転は対照群と同じように起こっていることが明らかになった(表1)。一方、クッペル胞のサイズは小さくなり、形態不全が観察されたため(表1)、クッペル胞のサイズを微調整するため、すなわち、機能補償に関与する可能性が示唆された。

機能補償に関する数理モデルの作製

クッペル胞の機能補償に関する数理モデル研究にも着手した。蛍光ビーズを打ち込みノード流を可視化すると、クッペル胞内では一般に反時計回りのノード流が発生するが、サイズが小さいとよく発生しないので、その差がどのように生じるのかを明らかにするため、数理モデルを構築して流体シミュレーションを試みた。ノード流は細胞表面のシリアの回転によって発生し、ク

表1 TRPC1、ATAT1のクッペル胞機能補償への関与

	TRPC1 KO	ATAT1 母性・胚性KO
シリア形成	○	○
シリア数	○	○
シリア運動	○	○
クッペル胞サイズ、形	○	小さく歪
ノード流	○	一部の個体で×
Spawの左側特異的発現	○	ランダム化
心臓ルーピング	異常	ランダム化

クッペル胞内全体の流れを生む。本研究ではまず2次元空間の仮想的なクッペル胞モデルを構築した。正方形の辺に沿ってシリアを想定した回転状の小さな速度場を与え、シリアの密度を正方形の辺の長さに比例させてクッペル胞のサイズを0.5、1、2にして比較した。クッペル胞内の速度場は数値流体力学シミュレーションを行って推定し、視覚化した(図2)。その結果、小さい

サイズのモデルクッペル胞では中心部に乱流が発生し、それ以外のサイズでは中心部に回転状の速度場が発生した。サイズが小さい場合、シリアのない空間が狭く、複数のシリアによる速度が複雑に影響して乱流が発生したものと考えられる。実験データから、小さいクッペル胞におけるシリアの回転周波数がわずかに小さくなる事がわかっているが、この乱流による抵抗がシリアの回転周波数を下げる可能性が考えられる。今後、モデルを3次元に展開し、定量的なシミュレーションを行う予定である。それにより、クッペル胞サイズに依存するいくつかの定量データを説明できるものと思われる。

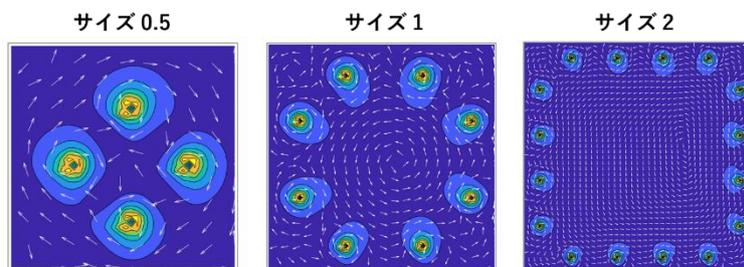


図2 クッペル胞の異なる3つのサイズと内部水流の速度場
正方形の辺に沿ってシリアによる回転状の速度場を与えた。
白矢印が速度の方向を表し、色は速度の大きさを表す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okochi Yasushi, Matsui Takaaki, Naoki Honda	4. 巻 -
2. 論文標題 Zero-shot reconstruction of mutant spatial transcriptomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2022.12.16.520397	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 Matsui Takaaki	4. 巻 76
2. 論文標題 Calcium wave propagation during cell extrusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 102083 ~ 102083
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceb.2022.102083	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 Yamada S, Bessho Y, Fujita Y, Hosokawa Y, Matsui T	4. 巻 -
2. 論文標題 A Ca ²⁺ wave generates a force during cell extrusion in zebrafish.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2021.07.14.452309	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 Yasukuni R., Minamino D., Iino T., Yamada S., Bessho Y., Matsui T., & Hosokawa Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Pulsed laser activated impulse response encoder (PLAIRE): Sensitive evaluation of surface cellular stiffness on zebrafish embryos.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 1366-1374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/BOE.414338	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takaaki Matsui
2. 発表標題 Mechanism of apoptotic cell extrusion in zebrafish
3. 学会等名 17th International Zebrafish Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井貴輝
2. 発表標題 動物におけるショートレンジの情報伝播による変異細胞の排除
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 調、秋山 隆太郎、別所 康全、白水 崇、西村 有平、松井 貴輝
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ左右差形成におけるatat1 の役割
3. 学会等名 第7回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamamoto H., Akiyama R., Bessho Y., Matsui T.
2. 発表標題 A role of hair cell function in homeostasis of the lateral line neuromast
3. 学会等名 27th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshida S., Akiyama R., Bessho Y., Shiromizu T., Nishimura Y., Matsui T.
2. 発表標題 Functional analyses of atat1 in zebrafish
3. 学会等名 27th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
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
---------	---------