

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号: 12602

研究種目: 若手研究 (B)

研究期間: 2011~2012

課題番号: 23790079

研究課題名(和文) 小型魚類を用いた器官サイズ制御を司るHippoシグナル伝達系の解析

研究課題名(英文) *In vivo* analysis of the Hippo signaling pathway during small fish embryogenesis.

## 研究代表者

浅岡 洋一 (ASAOKA YOICHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号: 10436644

## 研究成果の概要(和文):

細胞周期可視化プローブ Fucci を組み込んだメダカを用いて、形態形成過程における細胞周期の時空間的パターンを解析した。その結果、形態形成後期に網膜と脳組織の一部において細胞増殖が盛んであることを確認できた。そこで、モルフォリノを用いて Hippo シグナル関連分子のノックダウン解析を行い、Hippo シグナルが形態形成過程に及ぼす影響を精査した。その結果、網膜組織において顕著な形態異常が認められたことから、Hippo シグナルが形態形成期の網膜組織の増殖分化制御に関与する可能性が示唆された。

## 研究成果の概要(英文):

To monitor the cell-cycle progression in the developing medaka embryos, we adapted the fluorescent ubiquitylation-based cell cycle indicator (Fucci) system. We observed that proliferating cells were concentrated in several organs, including the retina and brain during later morphogenesis. Next, we investigated whether the Hippo signaling pathway affects later morphogenesis during early zebrafish development. Knockdown of the Mst2, one of the major components of the Hippo pathway, induced morphological defects in the zebrafish eye, implying that the Hippo pathway plays a critical role in the retinal cell proliferation and differentiation.

## 交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

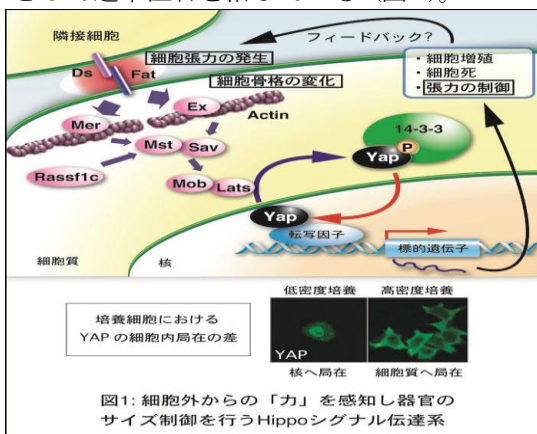
研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 薬学・生物系薬学

キーワード: 発生生物学、Hippo シグナル伝達系、蛍光イメージング、小型魚類、YAP、モルフォリノ

## 1. 研究開始当初の背景

受精卵から個体へと成長を遂げる発生過程においては、多様な細胞が増殖、分化、接着、移動、死などの素過程を積み重ねて個体形成を成立させている。こうした多彩な細胞の振る舞いはそれぞれが様々なシグナル伝達系によって時空間的に厳密にコントロールされている。研究代表者は、これまでに小型魚類のゼブラフィッシュおよびメダカを用いて種々のシグナル伝達分子のノックダウン解析および変異体解析を実施し、初期形態形成過程におけるシグナル伝達の重要性を明らかにした。すなわち、ストレス応答性MAPキナーゼであるJNKシグナル伝達系が原腸形成過程においてWnt11の発現レベルを適切に制御することにより協調的な原腸形成運動を生み出すこと [J. Cell. Biochem. (2010), J. Biochem. (2010)]、LIMファミリータンパク質Ajubaが繊毛形成の制御を通じて形態形成の左右性を生み出すNodalシグナル伝達系の活性化に寄与すること [Biochem. Biophys. Res. Commun. (2010)]、さらには肝臓形成不全メダカ変異体の解析により、レチノイン酸シグナルが下流に位置するwnt2bb遺伝子の発現を誘導し、肝臓の特異化を決定することを初めて明らかにした [Hepatology (2010)]。これに加え研究代表者は、初期胚形成不全変異体のスクリーニングの過程で、臓器形成とがん化の双方に重要なHippoシグナル伝達系の変異体メダカを同定した。Hippoシグナル伝達系は、隣接細胞間の接触情報に基づいて細胞増殖と細胞死の双方を制御することにより、組織や器官のサイズを規定する新しいシグナル経路として近年注目を浴びている (図1)。



Hippo系の下流標的分子Yapの変異メダカは、初期形態形成期より胚の厚みが扁平であり、組織の構築不全と維持不全という特徴的な表現型を示す。この表現型は、組織を構築する個々の細胞の増殖や細胞死の観点だけでは説明がつかず、組織化された臓器を形成するために必要な細胞間張力の統御機構の理解が急務であるとの認識に至った。

## 2. 研究の目的

Hippoシグナル伝達系による組織・器官サイズの制御機構を細胞増殖・細胞死・細胞張力の観点から個体レベルで解明することを目的とする。すなわち、可視化技術に適した小型魚類を用いて、Hippoシグナル伝達系が関与する細胞増殖・細胞死とともに細胞間張力をin vivoで解析する。この可視化技術を既に単離されたHippoシグナルのメダカ変異体に適用することにより、形態形成期のHippoシグナルがいかにして細胞間張力を統御し最終的なマクロスケールの組織構築に反映されるかを個体レベルで理解できると考えた。

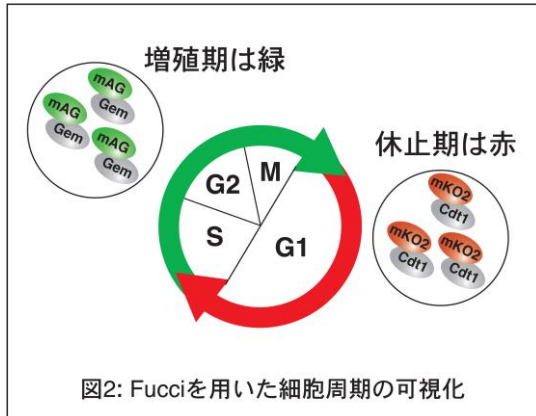
## 3. 研究の方法

本研究では、(1)細胞増殖・細胞死および細胞張力の時空間的変化をリアルタイムで検出可能な蛍光プローブをメダカ胚に導入し、これを利用して細胞増殖・細胞死に加え新たに細胞張力の観点から総合的にYap変異メダカと野生型メダカとの比較解析を行う。(2)上記の可視化システムをゼブラフィッシュに適用し、Hippoシグナル構成分子のノックダウン解析を行う。(3)上記の蛍光バイオプローブを全身に発現したトランスジェニック・メダカおよびゼブラフィッシュを樹立し、Hippoシグナル伝達系の破綻による組織崩壊の詳細をタイムラプス顕微鏡にて観察する。

## 4. 研究成果

本研究では、生きた個体全体の中で、細胞周期・細胞死に加え細胞張力をリアルタイムに可視化し、Hippoシグナル活性化の形態形成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。まず、既に作出済

みの Fucci メダカを用いて、形態形成過程における細胞周期の時空間的パターンを解析した (図 2)。その結果、形態形成後期に網膜と脳組織の一部において細胞増殖が盛んであることを確認できた。



そこで、ゼブラフィッシュを用いてモルフォリンによる Hippo シグナル関連分子のノックダウン解析を行い、Hippo シグナルが形態形成過程に及ぼす影響を精査した。その結果、網膜組織において顕著な形態異常が認められたことから、Hippo シグナルが形態形成期の網膜組織の増殖分化制御に関与する可能性が示唆された。

一方、細胞張力の可視化システムの構築に向け、張力のセンサープローブをメダカ胚に導入し、蛍光タイムラプス顕微鏡により細胞-細胞間張力の組織分布を FRET の蛍光強度の変化として捉えられるか否かを検討した。現在までのところ期待どおりの FRET 効率が得られていないが、リンカーの種類や長さの変更による改良型張力センサー分子群の作製を現在進行させており、FRET 効率の最適化を培養細胞にて検討する予定である。また、これら改良型張力センサー分子が個体レベルで使用可能であるかどうかを、今後トランスジェニック・メダカおよびゼブラフィッシュの作出により検討したいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Yoichi Asaoka, Shuji Terai, Isao

Sakaida and Hiroshi Nishina [review]. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dis. Model. Mech.* (査読あり) in press (2013).

<http://dmm.biologists.org>

(2) 浅岡洋一: 初期発生期における JNK シグナル伝達経路の多様な生理的役割; *比較生理生化学* (査読あり) 印刷中 (2013)

<http://jscp.org/ja/archive/>

(3) Hiroshi Yukiura, Kotaro Hama, Keita Nakanaga, Masayuki Tanaka, Yoichi Asaoka, Shinichi Okudaira, Naoaki Arima, Asuka Inoue, Takafumi Hashimoto, Hiroyuki Arai, Atsuo Kawahara, Hiroshi Nishina, and Junken Aoki. Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *J. Biol. Chem.* (査読あり) 286: 43972-43983 (2011). doi: 10.1074/jbc.M111.301093

(4) 浅岡洋一、仁科博史: メダカとゼブラフィッシュを用いた肝研究; *実験医学* (査読なし) 29: 2090-2095 (2011)

<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758100748/>

[学会発表] (計 3 件)

(1) 浅岡洋一: 器官サイズ制御因子 YAP の網膜分化における機能解析 第 5 回 RRM (レチナ・リサーチミーティング) 2012 年 12 月 8 日/東京

(2) 浅岡洋一、仁科博史: Analysis of the Hippo signaling pathway regulating neuronal differentiation in the retina. 第 18 回小型魚類研究会 2012 年 9 月 22 日/京都

(3) 浅岡洋一: Analysis of signaling networks governing the vertebrate body plan formation. 日本比較生理生化学会第 21 回吉田奨励賞受賞講演 2012 年 7 月 7 日/葉山

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/index.html>  
1#

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅岡 洋一 (ASAOKA YOICHI)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教  
研究者番号：10436644