

## 研究終了報告書

## 「動的シグナル勾配と生物時計による組織構築原理の解明」

研究期間:2020年11月～2024年3月

研究者:磯村彰宏

## 1. 研究のねらい

多細胞組織の構築・維持において、シグナル伝達や転写・翻訳を介した細胞間の動的コミュニケーションが正しいスケジュールで成立している必要がある。発生過程においては、ある細胞集団から送信されたシグナルが他の細胞集団に受信され、その集団が一斉に分化することで組織の分画化が達成される。例えばモルフォゲンモデルでは、濃度勾配の閾値を基準として下流の分化誘導因子の On/Off が制御されるといった、静的なシグナル勾配から、静的な分化スイッチへの情報の流れを仮定した説明がよく知られている。

一方で最近の研究から、FGF, Notch, Wnt シグナルなどの様々なシグナル伝達経路において、周期的なダイナミクスや確率的なパルス発振といった動的な描像が明らかとなってきた。これらの現象は、古典的なモルフォゲンモデルにおける勾配パターンが、それ自体が非常に動的であったり、あるいは何らかのルールによって動的な情報に変換されて細胞集団に伝達されていることを示唆している。このような動的なシグナル勾配が、発生過程や組織構築過程においてどのような情報をエンコード(包含)していて、どのように情報処理されているのかは未だ十分に明らかではない。

そこで本研究は、マウス ES 細胞から分化誘導した未分節中胚葉(Pre-somitic mesoderm, PSM)細胞の培養系において、転写因子やシグナル伝達分子の時空間パターンを自在に光制御・光計測するための技術基盤を確立することを試みた。そして、「動的なシグナル勾配パターンがどのような情報をエンコードしていて、どのように変換・解読されることで組織構築が実現しているのか」といった問いに答えることを目指して研究を行った。

## 2. 研究成果

## (1) 概要

本研究は FGF/Notch/Wnt などのシグナル伝達経路の動的なシグナル勾配が知られている未分節中胚葉(PSM)に着目して研究を行う。そこで、まず 2 次元および 3 次元 PSM 組織の大量生産を可能にする新規手法の開発を目指した。その結果、既存の手法と比べて培養液の体積換算で約 30 倍の効率で体節様組織を誘導可能な方法の開発に成功し、マトリゲル包埋によるオルガノイド誘導や、分散・再凝集による分節時計同期の解析などから、本手法がマウス胚における PSM 細胞集団・体節組織の性質をよく模倣していることがわかった。

次に、イメージング技術を開発した。体節形成過程において FGF/Wnt/Notch シグナルの制御因子の転写活性が細胞集団レベル様々な位相で振動しており、尾部と頭部側ではシグナル間の位相が異なることがわかっていたが、1 細胞ダイナミクスが組織レベルで観察されたのと同じダイナミクスを示すのかどうかは非自明であった。そこで PSM 組織における転写活性ダイナミクスの長時間の多色蛍光イメージング技術を開発して、この問題を解決することを目指した。その結果、転写活性を 3 色の蛍光レポーターで可視化可能なイメージング技術の開発に

成功した。

さらに、分節時計の光制御技術の開発・応用を試みた。マウスの体節形成過程では、Notchの下流因子である Hes7 の発現レベルが 2~3 時間周期で振動し、尾部から頭部方向へ波状の発現ダイナミクス(遺伝子発現波)を示すことが分かっている。このとき振動周波数や Wnt/FGF のシグナル活性などの空間勾配が存在するが、これらの情報が波の伝播速度や方向を決める原因なのかどうかという因果関係は不明である。そこで、Hes7 の振動周波数や FGF のシグナル勾配を光誘導して検証することを試みた。本研究で新開発した光遺伝学技術を活用した結果、Hes7 リズムの光誘導による分節時計の光操作が可能になり、遺伝子発現波の周波数勾配による伝播機構を支持するデータが得られた。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A: マウス ES 細胞由来の未分節中胚葉(PSM)組織の分化誘導技術の確立

本研究は FGF/Notch/Wnt などのシグナル伝達経路の動的なシグナル勾配が知られている未分節中胚葉(PSM)に着目して研究を行った。以前に研究代表者らのグループによって、マウス ES 細胞を凝集させた胚様体(embryoid body)から PSM 細胞を試験管内分化誘導できることがわかっていた。しかし、分節時計の振動回数が 5 回程度と少なく、体節組織の形成が 1 個しか確認できないなど、in vivo の PSM を再現できていないという問題があった。また、96 ウェルプレートあたり 96 個しか作製できないため、細胞数のスケールアップが困難であった。そこで本項目では、2 次元および 3 次元 PSM 組織の大量生産を可能にする新規手法の開発を目指した。その結果、培養液の体積換算で約 30 倍の効率で体節様組織を誘導可能な方法の開発に成功した(図 1A)。この手法で胚様体から分化誘導した PSM 様細胞の 3 次元組織をマトリゲルに包埋すると組織伸長が起こり、分節マーカ―(Uncx4.1)陽性の体節オルガノイドが得られた。また、マトリゲルに包埋せずに分散させた後に再凝集させると分節時計の同期振動が回復すること(図 1B)、さらに同期に必須とされている Delta-Notch シグナルの欠損細胞株(Dll1-KO)では再凝集させた後の同期振動が著しく損なわれることがわかった(図 1C)。以上の結果から、本手法がマウス胚における PSM 細胞集団・体節組織の性質をよく模倣していることがわかった。

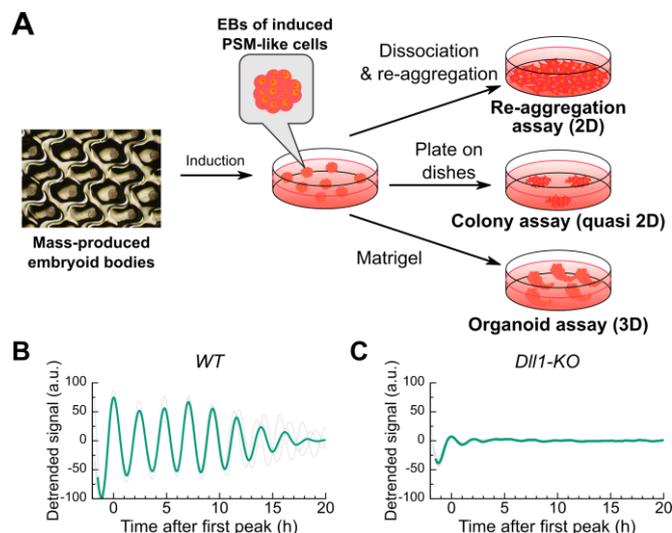


図 1: 未分節中胚葉(PSM)細胞の分化誘導技術。

## 研究テーマ B: 体節形成過程における転写活性の多色蛍光イメージング技術の開発

脊椎動物の体節形成期には、尾芽組織の尾部から頭部にかけて FGF・Wnt などのシグナル勾配が存在し、頭部側からは RA シグナルの勾配が存在する。このとき、Notch/FGF/Wnt の関連遺伝子が組織の位置に応じて様々な周期・位相で振動していることが、過去の研究で報告された(Dequéant et al. *Science* (2006).; Niwa et al. *Genes Dev.*(2011).; Sonnen et al. *Cell* (2018).)。一方で、1細胞レベルの視点に立つと、体節形成へと向かおうとしている未分節中胚葉 (PSM)細胞は、尾部組織の伸長に従って徐々に頭部側に移動し、やがて体節組織に分化する。このとき、1細胞ダイナミクスが組織レベルで観察されたのと同じダイナミクスを示すのかわくは非自明である。そこで PSM 組織における転写活性ダイナミクスの長時間の多色蛍光イメージング技術を開発して、この問題を解決することを目指した。

マウスの体節形成過程においては、転写活性の振動が 2~3 時間周期で起こる。このような比較的短時間のダイナミクスを追跡するためには、蛍光レポーターが早期に On/Off 制御できる必要がある。一方で、蛍光タンパク質は発色団の成熟に一定の時間を要することが知られている。そのため、研究開始時点においては、発色団が早期に成熟できる最新の黄色蛍光タンパク質(YFP)である Achilles だけが分節時計の中心的な遺伝子 Hes7 の転写発現リズムを捉えることができる状況であった。そこで、転写活性ダイナミクスの可視化が期待される様々な蛍光レポーターの候補を検討した結果、YFP と波長帯の分解が可能な 2 色の蛍光レポーターにおいて Hes7 振動の可視化に成功した。そのため、YFP を合わせて 3 色での転写活性ダイナミクスの蛍光イメージングが可能になった。

## 研究テーマ C: 分節時計細胞の光制御による遺伝子発現波の伝播機構の解明

マウスでは、Notch シグナル下流の転写因子 Hes7 の発現レベルが 2~3 時間周期で振動し、尾部から頭部方向へ波状の発現ダイナミクス(遺伝子発現波)を示す。このとき、尾部側の Notch/Hes7 の振動周期が頭部側の周期よりも短く、尾部から頭部方向への周期(周波数)の空間勾配が存在する。同時に、FGF や Wnt などのモルフォゲン濃度の尾部から頭部方向への空間勾配も存在することが知られている。しかし、これらは相関関係であり、周期勾配や濃度勾配のどれが波の伝播速度や方向を決める原因なのかという因果関係は全く明らかでない。そこで、光遺伝学技術を使って分節時計における Hes7 や FGF シグナルの時空間パターンを光操作して遺伝子発現波を再構成することで、伝播機構を解明することを目指した。

まず、これまで研究代表者が開発・活用してきた光遺伝学技術を使って Hes7 の転写発現リズムを局所的に光誘導することを試みた。しかし、分節時計リズムの光操作による周期・位相変調を確認することができなかった。そこで、遺伝子工学を使って光誘導効率が向上した光遺伝学装置を新規に開発した。その結果、Hes7 の光誘導による分節時計の人工操作に成功した。さらに、遺伝子発現波の人工誘導を示唆するデータが得られ、その結果は周波数勾配に起因して遺伝子発現波が伝播するシナリオをサポートするものであった。一方で FGF シグナル活性の空間的制御による分節時計の人工操作を試みたが、周期の変調や遺伝子発現波の人工誘導を示唆するデータは得られなかった。

### 3. 今後の展開

本研究では、分化誘導、イメージング、光制御といった主に 3 種類の技術の確立とその応用を目指した研究を行った。未分節中胚葉(PSM)の分化誘導技術については、他のグループの手法と比べて、培養液の使用量が少ないだけでなく作業工程も簡略化されている。そのため、分節時計の研究における簡便な基盤技術としての普及が期待される。イメージング技術と光制御については、本研究の手法は分節時計に限らない様々な転写活性ダイナミクスを可視化・光制御する汎用性を備えている。これまで NF- $\kappa$ B や p53 などの転写因子の周期的な転写活性ダイナミクスが報告されており、免疫や DNA 修復などの様々な生命現象におけるイメージング技術への展開を通じた波及効果が期待される。

### 4. 自己評価

本研究では、分化誘導、イメージング、光制御の技術の確立とその応用を目指した研究を行った。分化誘導については研究開始時は固まっていなかったプロトコルが確立し、その技術を応用した論文を投稿準備中である。イメージング技術については、転写活性の多色蛍光レポーターの開発に成功したが、目的であった複数のシグナル因子の同時可視化まで辿り着くことができなかった。光制御に関しては新規光遺伝学技術の開発と分節時計の光操作に成功し、遺伝子発現波の伝播機構に関する一定の知見を得た。一方で、分節時計における FGF/Wnt シグナルと Hes7/Notch シグナルの動的相互作用に関しては課題が多く残されており、今後は本研究で開発したイメージング・光制御技術を応用して解決を目指す。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:1 件

1. Yuki Maeda, Akihiro Isomura, Taimu Masaki, Ryoichiro Kageyama, “Differential cell-cycle control by oscillatory versus sustained Hes1 expression via p21”, *Cell Rep.*, 2023, 42, 112520.

マウスの神経幹細胞において、転写抑制因子 Hes1 による発現動態依存的な細胞増殖の制御機構を分子レベルで解明した。活性状態の神経幹細胞では Hes1 の発現振動がサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21 の発現を抑制して細胞増殖を促進する一方、休眠状態の神経幹細胞では Hes1 の持続的な高発現が Dusp7 とその標的である Erk1/2 のリン酸化を介して間接的に p21 の発現を活性化し、細胞増殖を抑制することを明らかにした。

#### (2) 特許出願

該当なし

#### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

著作物

1. “Biological significance of the coupling delay in synchronized oscillations”, R. Kageyama, A.

Isomura, H. Shimojo, *Physiology* **38**, 63-72 (2023).

2. “Light Control of Gene Expression Dynamics”, \*A. Isomura, “Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications in Neuroscience and Beyond”, 235-246 (2021).

学会発表

1. 「人工遺伝子回路による分節時計の再構成と操作」, 磯村彰宏 第 46 回日本分子生物学会年会, 2023 年 12 月 7 日 (神戸ポートアイランド)

2. "Illuminating oscillatory gene expression in cell-cell communications", Akihiro Isomura ”International workshop: Complex motile matter from single agents to collective behaviors”, 2023 年 7 月 22 日 (明治大学)

3. 「分節時計における遺伝子発現振動波の制御機構」, 磯村彰宏 第 75 回日本細胞生物学会大会, 2023 年 6 月 30 日 (奈良県コンベンションセンター)