

平成22年5月21日現在

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2004～2008

課題番号：16GS0307

研究課題名（和文） 生体パターン形成原理の実験的ならびに数理解析的解明

研究課題名（英文） Experimental and mathematical analyses of biological pattern formation

研究代表者

近藤 滋 (KONDO SHIGERU)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：10252503

研究成果の概要(和文)：

ゼブラフィッシュの皮膚模様形成機構に関して、以下の結果を得た。

- 1) 色素細胞間の相互作用のネットワークを明らかにした。
- 2) 上のネットワークを組み込んだ計算機シミュレーションが、模様形成の過程を正確に再現した。
- 3) 模様変異突然変異2種の遺伝子クローニングした。
- 4) クローニングされた遺伝子は、Kチャンネルとギャップジャンクションであった。
- 5) クローニングされた遺伝子、または改変した遺伝子を導入することで、模様がさまざまに変化することを発見した。
- 6) 5の事実から、模様形成のためのシグナル伝達には、イオンや低分子が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

以上により、ゼブラフィッシュの皮膚模様形成に関して、多くの事実が発見され、模様形成原理の解明に大きく近づくことができた。

研究成果の概要(英文)：

The following results were obtained for Zebra fish's skin pattern formation mechanism.

- 1) The network of the interaction among the pigment cells was clarified.
- 2) The computational simulation that built in the network reproduced the process of skin pattern formation accurately.
- 3) The responsible genes for the mutants were identified
- 4) The cloned genes were K channel and a gap junction.
- 5) By making the transgenics fish with the genes or modified ones, the pattern was changed in many different way, suggesting that the genes were core factors of the pattern formation.
- 6) The ion channels and the small molecules play the key role in the pattern formation. From above, we have come close to the clarification of the mechanism of pigment pattern formation.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	44,100,000	13,230,000	57,330,000
2005年度	44,500,000	13,350,000	57,850,000
2006年度	44,700,000	13,410,000	58,110,000
2007年度	44,400,000	13,320,000	57,720,000
2008年度	47,200,000	14,160,000	61,360,000
総計	224,900,000	67,470,000	292,370,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：ゼブラフィッシュ、反応拡散、チューリング、パターン形成、色素細胞

#### 1. 研究開始当初の背景

イギリスの数学者チューリングが提唱した反応拡散波原理と呼ばれる数理モデルが存在し、それによれば形態形成に必要な位置情報が「波」として自然に発生するとの、数理理論が存在しているが、発生が学者の間では分子レベルの証拠がないのでほぼ無視されている状態であった。近藤は、ゼブラフィッシュを使い、模様が反応拡散波であることの状況証拠を積み重ねてきたが、ゼブラフィッシュの模様形成を研究している研究者の間でも、実験的な証拠の少なさから、一つの仮説として扱われていた。

#### 2. 研究の目的

本プロジェクトでは、ゼブラフィッシュの縞模様形成がどのような仕組みで行われているかを細胞レベル、分子レベルで明らかにすることを目的にする。

#### 3. 研究の方法

研究は、(1) 皮膚の中での色素細胞動態を測定する研究、(2) 模様変異を起こす突然変異のクローニングと遺伝子の作用の解析、(3) 新しい模様変異遺伝子をスクリーニング、の3つの方向から進められた。また、それぞれのデータを常に計算機シミュレーションにフィードバックすることで、細胞ベースの詳細なシミュレーションにより、模様形成を再現することを目的とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 色素細胞の動態解明

レーザーを使って一部の細胞を消去すると、それに誘導されて、模様が移動することから、ゼブラフィッシュの模様が、基本的に反応拡散波であることが強く示唆された。次に、細胞集団の周辺にある細胞を消去したときに、消去する細胞の数、位置によって再生してくる細胞の種類数が変化することを利用して、2種類の色素細胞間の相互作用のネットワークを解明した。

##### (2) 色素細胞の接触と移動

インビボの状況において、色素細胞間の移動傾向を測定した結果、細胞は常に近傍の細胞から離れる傾向があることが

明らかになった。この事実は従来の予測に反していた。

##### (3) シミュレーションによる模様の再現

(1)、(2)の細胞動態を組み込んだ、細胞レベルのシミュレーションを行うと、正常個体や突然変異個体のすべての模様を再現することができた。抽象的な数値計算でなく、実際の測定結果を細胞に組み込んでパターン形成を再現できたのはこれが初めてであり、我々の考えが正しいことが証明されたと考えている。

##### (4) 遺伝子のクローニング

分子レベルでの解明を行うため、模様が斑点になる変異体(レオパード)と縞の幅が広がる変異体(ジャガー)の遺伝子を、ポジ所なるクローニングにより同定したところそれぞれ、コネキシン418、Kir7.1をコードしていた。

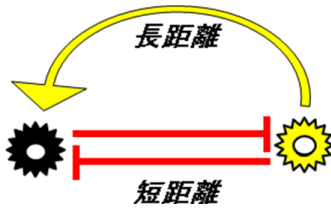
##### (5) 遺伝子導入による模様のレスキュー

クローニングされた遺伝子を、エンドのプロモーターで発現させたところ、模様変異をレスキューした。したがってこれらの遺伝子が原因遺伝子であることが証明された。

##### (6) 改変遺伝子による模様の操作

遺伝子を任意のプロモーターの制御の下で導入したり、改変したものを導入することで、これらの分子の働きがある程度明らかになった。たとえばKir7.1は黒色素細胞のみに発現させることで模様のレスキューを行うので、この遺伝子が黒色素細胞でのみ働いていることがわかる。また、Kirの内向き清流性をなくすと、模様が大きめの斑点に変化することが見つかった。コネキシン418を黒色素細胞で発現させると、縞の幅が減り、本数が2倍になった。これらのことは、2つのチャンネル活性が模様形成を行うシグナルそのものに非常に近いところにあることを強く示唆する。

以上のデータから



このような分子ネットワークが明らかになりつつある。分子レベルでの Turing 波解明は目前に迫った。

#### 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 33 件)

1. Takeuchi M, Kaneko H, Nishikawa K, Kawakami K, Yamamoto M and Kobayashi M, Efficient transient rescue of hematopoietic mutant phenotypes in zebrafish using Tol2-mediated transgenesis, *Development Growth & Differentiation*, 52, 245-250 (2010) 査読有
2. Nakamasu A, Takahashi G, Kanbe A, Kondo S, Interactions between zebrafish pigment cells responsible for the generation of Turing patterns, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 8429-8434 (2009) 査読有
3. Kondo S, Iwashita M, Yamaguchi M, How animals get their skin patterns: fish pigment pattern as a live Turing wave, *International Journal of Developmental Biology*, 53, 851-856 (2009) 査読無
4. Kobayashi N, Watanabe M, Horiike T, Kohara Y and Okada N, Extensive analysis of EST sequences reveals that all cichlid species in Lake Victoria share almost identical transcript sets, *GENE*, 441, 187-191 (2009) 査読有
5. Asakawa K and Kawakami K, The Tol2-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebrafish, *Methods*, 49(3), 275-281 (2009) 査読有
6. Urasaki A and Kawakami K, Analysis of genes and genome by the tol2-mediated gene and enhancer trap methods, *Methods in Molecular Biology*, 546, 85-102 (2009) 査読無

7. Kikuta H and Kawakami K, Transient and stable transgenesis using tol2 transposon vectors, *Methods in Molecular Biology*, 546, 69-84 (2009) 査読無

8. Takahashi G and Kondo S, Melanophores in the stripes of adult zebrafish do not have the nature to gather, but disperse when they have the space to move, *Pigment Cell Research*, Volume 21 Issue 6:677 - 686 (2008) 査読有

9. Kondo S and Shirota H, Theoretical analysis of mechanisms that generate the pigmentation pattern of animals, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, Feb;20(1):82-89, Epub 2008 Oct 19 (2009) 査読無

10. Urasaki A, Asakawa K, Kawakami K, Efficient transposition of the Tol2 transposable element from a single-copy donor in zebrafish, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 19827-19832 (2008) 査読有

11. Urasaki A, Mito T, Noji S, Ueda R, Kawakami K, Transposition of the vertebrate Tol2 transposable element in *Drosophila melanogaster*, *GENE*, 425, 64-68 (2008) 査読有

12. Asakawa K, Kawakami K, Targeted gene expression by the Gal4-UAS system in zebrafish, *Development Growth & Differentiation*, 59, 391-399 (2008) 査読有

13. Kotani T, Kawakami K, Misty somites, a maternal effect gene identified by transposon-mediated insertional mutagenesis in zebrafish that is essential for the somite boundary maintenance, *Developmental Biology*, 16, 383-396 (2008) 査読有

14. Kawakami K, Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates, *Genome Biology*, 8, P7(2008) 査読有

15. 浦崎明宏, 川上浩一 「脊椎動物におけるトランスポゾンを用いた遺伝学的方法論」 *実験医学*, 25, 2507 - 2512 (2007) 査読無

16. 浅川和秀, 川上浩一 「Tol2 トランスポゾンを用いたゼブラフィッシュ Gal4 エンハンサートラップ法の確立」 *バイオテクノロジー*

ージャーナル, 7, 603 - 606 (2007) 査読無

17. Yamaguchi M, Yoshimoto E and Kondo S, Pattern regulation in the stripe of zebrafish suggests an underlying dynamic and autonomous mechanism, PNAS, vol.104, no.12, 4790-4793 (2007) 査読有

18. Watanabe M, Hiraide K, and Okada N, Functional diversification of kir7.1 in cichlids accelerated by gene duplication, GENE, 399, 46-52 (2007) 査読有

19. 近藤 滋 「たかがゲノムされどゲノム」現代科学 6月号, 46-47 (2007) 査読無

20. 近藤 滋 「振動現象の生物学:リズムと波が生み出す動的な世界」細胞工学 7月号 vol. 26, no. 7 (2007) 査読無

21. Iwashita M, Watanabe M, Ishii M, Chen T, Stephen L. Johnson, Kurachi Y, Okada N and Kondo S, Pigment Pattern in jaguar/obelix zebrafish is caused by a Kir7.1 mutation: implications for the regulation of melanosome movement, PlosGenetics Nov 24;2(11):e197 (2006) 査読有

22. Horikawa K, Ishimatsu K, Yoshimoto E, Kondo S and Takeda H, Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock, Nature, 441, 719-723 (2006) 査読有

23. Watanabe M, Iwashita M, Ishii M, Kurachi Y, Kawakami A, Kondo S and Okada N, Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene, EMBO Rep. Sep;7(9) 893-897 (2006) 査読有

24. 川上浩一 「私が名付けた遺伝子 hagoromo」実験医学, 24, 4, 540-542 (2006) 査読無

25. Kotani T, Nagayoshi S, Urasaki A and Kawakami K, Transposon-mediated gene trapping in zebrafish, Methods, 39, 199 - 206 (2006) 査読有

26. Urasaki A, Morvan G, and Kawakami K, Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal

region essential for transposition, Genetics, 174, 639 - 649 (2006) 査読有

27. Kondo S, Cell-cell Interaction Network That Generates the Skin Pattern of animal, Genome Informatics 2005, vol.16, No.2, 287-291 (2005) 査読無

28. Hirata M, Nakamura K, Kondo S, Pigment cell Distributions in Different Tissues of the Zebrafish, With Special Reference to the Sriped Pigment Pattern, Dev. Dyn, 234, 293-300 (2005) 査読有

29. Kawakami K, Transposon tools and methods in zebrafish, Developmental Dynamics, 244 - 254 (2005) 査読有

30. 近藤 滋 「Turing 波」(反応拡散波), 生体の科学 55 巻 5 号・10 月, 498-499 (2004) 査読無

31. 近藤 滋 「生物のパターン形成と振動現象」計測と制御 8月号, vol.43, 594-598 (2004) 査読無

32. 小谷友也、川上浩一 「ゼブラフィッシュの時空間特異的遺伝子発現」蛋白質核酸酵素, 49, 2111 - 2116 (2004) 査読無

33. Kawakami K, Transgenesis and gene trap methods in zebrafish by using the Tol2 transposable element, Methods in Cell Biology 77, 201 - 222 (2004) 査読無

[学会発表] (計 37 件)

1. Kawakami K, From gene to function a quest with a transposon, zebrafish 2010 11th Australia& NewZealand Workshop, 2010. 2. 3, Sydney, Australia

2. Kawakami K, Genetic methods using the Tol2 transposable element in zebrafish, International symposium on Marine Genomics 2009, 2009. 12. 16, 沖縄県那覇市

3. 渡邊正勝, Connexin41.8による体表模様の制御, 第32回日本分子生物学会, 2009. 12. 10, 神奈川県横浜市

4. 渡邊正勝, コネキシンはゼブラフィッシュのストライプ幅も規定する, 日本動物学会第80回大会静岡, 2009. 9. 19, 静岡県静岡市

5. Kawakami K, Transposon-mediated gene trapping, enhancer trapping and

insertional mutagenesis, The4th Asia-Oceania Zebrafish Meeting, 2009. 8. 31-9. 2, 濟州島, 韓国

6. Watanabe M, Connexin41.8 contributes melanophore development in zebrafish, 第36回国際生理学会世界大会, 2009. 7. 30, 京都府京都市

7. Watanabe M, Functional analysis of Zebrafish connexin41.8 for pattern formation, 6<sup>th</sup> European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009. 7. 15-19, Roma, Italy

8. Kawakami K, Tol2-mediated transgenesis in zebrafish and mice, Conference on Genome Engineering, 2009. 6. 25-27, Minneapolis, USA

9. Kondo S, Turing pattern in the skin of animals, Gordon Research Conference, 2009. 6. 21-26, Boston, USA

10. Kawakami K, Recent advances in the Tol2 transposon technology in zebrafish, 3rd Strategic Conference of Zebrafish Investigators, 2009. 1. 24, Asilomar, USA

11. 近藤 滋、渡邊正勝, Pigment Pattern Formation in Zebrafish, BMB 2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会), 2008. 12. 10, 神戸市

12. Kondo S, Multi-Cell Simulations of Gastrulation and Somitogenesis in Chick, Mathematical Biosciences Institute Workshop, 2008. 11. 18, Ohio, USA

13. Kondo S, Cell-cell interaction network that generates the skin pattern of zebrafish, Frontiers in Development Biology 2008. 9. 16, Gien, France

14. 近藤 滋、渡邊正勝「イオンの波がゼブラフィッシュのストライプ形成に重要である」日本動物学会第79回大会, 2008. 9. 5, 福岡市

15. Kondo S, Zebras did not get the stripes, but lost the uniform color, Annual Meeting of Society for Mathematical Biology Conference, 2008. 8. 1, Toronto, Canada

16. Kondo S, Interactions among the zebrafish pigment cells that makes the

stripe pattern, IPCC-IMRC2008, 2008. 5. 7-12, Sapporo, Japan

17. Kondo S, Interaction Network of Pigment Cells Generates the Stripes in Animal's Skin, 2nd International Systems Radiation Biology Workshop, 2008. 1. 25, Washington DC, USA

18. 近藤 滋、高橋 豪「ゼブラフィッシュの黒色素細胞に自己集合しようとする性質があるか？」第21回日本色素細胞学会年次学術大会, 2007. 12. 8, 愛知県豊明市

19. Kondo S, Nonlinear dynamics in biological pattern formation Interactions between pigment cells give rise to Turing patterns in zebrafish, Shanghai NSA' 07 2007. 6. 7, Shanghai, China

20. 近藤 滋 「皮膚に発生する化学反応の波=動物の模様」第6回皮膚科 EBM フォーラム, 2007. 7. 14, 北海道札幌市

21. 近藤 滋 「動物の皮膚にできる移動波と定在波」日本物理学会 2007 年春季大会, 2007. 3. 19, 鹿児島県鹿児島市

22. Kondo S, Interactions among the pigment cells give rise to the Turing pattern in the skin of zebrafish, 20th IUBMB, 2006. 6. 18-23, Kyoto, Japan

23. 石松愛、堀川一樹、吉元英一、近藤 滋、武田洋幸, How does the developmental system reduce the effect of noise? - A case study in the segmentation clock, 日本発生生物学会第39回大会, 2006. 6. 1, 広島県広島市

24. Kondo S, Interactions among the pigment cells of zebrafish give rise to Turing Pattern, PACIFICHEM 2005, 2005. 12. 15-20, Hawaii, USA

25. Kondo S, Interactions among the pigment cells that give raise to the stripe pattern, 2005 West Coast Zebrafish Meeting, 2005. 9. 9-10, Eugene, USA

[図書] (計1件)

1. Kawakami K, Essential zebrafish method: genetics and genomics, Academic Press, 153-173, 2009

[その他]

ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/skondo/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 滋 (KONDO SHIGERU)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授  
研究者番号：10252503

### (2) 研究分担者

川上 浩一 (KAWAKAMI KOICHI)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系  
初期発生研究部門・教授  
研究者番号：70195048

渡邊 正勝 (WATANABE MASAKATSU)

大阪大学・大学院生命機能研究科・  
准教授  
研究者番号：90323807

宮澤 清太 (MIYAZAWA SEITA)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教  
研究者番号：10377905