

平成22年 5月21日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17017017
 研究課題名（和文） 動物の皮膚模様形成原理の分子レベルでの全容解明
 研究課題名（英文） Molecular level clarification of the mechanism for animal skin 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）：

動物における自律的なパターン形成の基本原則が Turing 波であるとの仮説を検証するため、ゼブラフィッシュの模様形成機構を分子レベルで解析した。その結果（1）ゼブラフィッシュの模様は、Turing 波と一致する動的な性質を持つこと、（2）色素細胞間の相互作用が Turing 波形成の条件を満たすこと、（3）Turing 波形成にかかわる分子が、ギャップジャンクション、Notch-Delta, Kir チャンネルであることを突き止めた。目標の90%は達成されており、Turing 波形成の完全解明も、目前に迫ったといえる。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the mechanism of skin pattern formation in zebrafish in order to have the substantial evidence to prove the hypothesis, “the basic mechanism of biological pattern formation is the Turing wave”. We found, (1) the skin pattern of zebrafish has the specific dynamics of Turing wave, (2) the interactions among the pigment cells satisfies the required conditions for the Turing pattern formation, and (3) the key molecules those critical to the wave formation are gap-junction, Notch-Delta and Kir channels. About 90% of the aim of this project is completed. Now our final goal, the detailed identification of the molecular network of Turing wave, should be very close.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	18,900,000	0	18,900,000
2006年度	18,700,000	0	18,700,000
2007年度	17,700,000	0	17,700,000
2008年度	19,200,000	0	19,200,000
2009年度	14,600,000	0	14,600,000
総計	89,100,000	0	89,100,000

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
 生体の空間パターン（形態）を構築する原理

を解明することは、発生学の究極の目的の一つである。これまでに行われた分子生物学的

な解析により、形態形成にかかわる遺伝子やシグナル伝達の種類に関する情報は蓄積されたが、形そのものを作る一般的な原理は知られていない。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、1995年に魚の縞模様は成長に伴って変化し、それが反応拡散波であることを強く示唆するデータを得た。その後、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。しかしながら、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。一方、純粋に遺伝学の立場から動物の模様形成をゼブラフィッシュで行う研究が欧米のいくつかの研究室で進んでおり、模様のメカニズムに関する関連遺伝子や突然変異のコレクションも徐々に整い始めていた。我々の研究室が持つ理論的なノウハウと、分子生物学的な解析を可能にするツールの結合により、一気にこの問題が解決する可能性が高まっている。しかも、我々以外の研究室では、理論的な背景がないために、単に分子の特定にとどまらざるをえず、この点で非常に有利なポジションにいるとあってよい。

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とする。

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。

3. 研究の方法

以下に挙げるプロジェクトを進める

- (1) 色素細胞の動態解明
- (2) 色素細胞の接触と移動
- (3) シミュレーションによる模様の再現
- (4) 遺伝子のクローニング
- (5) 遺伝子導入による模様のレスキュー
- (6) 改変遺伝子による模様の操作
- (7) 新たな模様遺伝子のスクリーニング

(8) インビトロでの色素細胞間の相互作用の観察

これらを遂行することで、模様形成にかかわる細胞間相互作用、分子ネットワーク等が明らかになっていくと考えた。

4. 研究成果

(1) 色素細胞の動態解明

ゼブラフィッシュの模様は、2種類の色素細胞（黄色、黒色）の相互作用で作られることが、突然変異の解析から予測されている。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。(論文9)

(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。(論文6)

(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。(論文8, 9)

(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。(論文3, 4)

(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。(論文3, 4)

(6) 改変遺伝子による模様操作
遺伝子を任意のプロモータ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。

(7) 新たな模様遺伝子のスクリーニング
新たな模様遺伝子を得る目的で、黄色、黒色素細胞間で発現に差のある遺伝子を遺伝子チップで選び出し、それを遺伝子導入することで新たな模様遺伝子を得ようと試みた。これまでにシグナル伝達因子とその受容体を中心に約40の遺伝子について、遺伝子導入によるテストを行ったが、残念ながら模様変異を誘導できるものは得られていない。この結果は、(6)のチャンネル分子が模様形成に重要であることと表裏の関係にあるのかもしれない。すなわち色素細胞間の相互作用は、通常の形態形成過程で使われるタンパク性のシグナルでなく、ギャップジャンクションか、イオン（電位変化）であるという考えを後押しする。

(8) インビトロでの解析

成体から分離した色素細胞を使って、インビトロでの細胞の動態を解析するために、培養条件の最適化1を行った。その結果約7日間は、色素細胞をカルチャー条件下で買うことができるようになった。細胞の動態を観察すると、黒色素細胞は突起を伸ばし、盛んに他の細胞に接触しようとしているように見える。この突起による接触に興味があるかどうかは、今のところ不明であるが、突起の長さが縞の半分近くもあり、この突起の先端部での接触が長距離効果になっているのであれば、拡散性のシグナルは必要でなくなる。今後、この接刺激についての解析を進めていく予定である。

(9) 結果の概要と今後の計画

当初の目的のうち、細胞レベルの模様形成の仕組みについては解明することができた。特に、細胞レベルのシミュレーションによって模様形成が再現できたことは、重要である。分子レベルでシグナルの正体を明らか

かにすることはできなかったが、Kチャンネルやギャップジャンクションの重要性が明らかになり、今後の研究の方向性が絞られてきており、解明には確実に近づいていると考えている。

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8件)

1. Nakamasu A, Takahashi G, Kanbe A, Kondo S: Interactions between zebrafish pigment cells responsible for the generation of Turing patterns. Proc Natl Acad Sci U S A 106:8429-8434 (2009) 査読有

2. Kondo S, Shirota H: Theoretical analysis of mechanisms that generate the pigmentation pattern of animals. Semin Cell Dev Biol 20:82-89 (2009) 査読無

3. Takahashi G, 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 Melanoma Res 21:677-686 (2008) 査読有

4. Yamaguchi M, Yoshimoto E, Kondo S: Pattern regulation in the stripe of zebrafish suggests an underlying dynamic and autonomous mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 104:4790-4793 (2007) 査読有

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

6. Iwashita M, Watanabe M, Ishii M, Chen T, Johnson SL, Kurachi Y, Okada N, Kondo S: Pigment pattern in jaguar/obelix zebrafish is caused by a Kir7.1 mutation: implications for the regulation of melanosome movement. PLoS Genet 2:e197 (2006) 査読有

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

8. Hirata M, Nakamura K, Kondo S: Pigment cell distributions in different tissues of the zebrafish, with special reference to the striped pigment pattern. Dev Dyn 234:293-300 (2005) 査読有

[学会発表] (計9件)

1. Kondo S, Turing Pattern in the skin of animals., GRC, 2009.6.21, Boston, USA (2009)

2. Kondo S, Multi-Cell Simulations of Gastrulation and Somitogenesis in Chick., Mathematical Biosciences Institute Workshop, 2008.11.18, Ohio, USA (2008)

3. Kondo S, Cell-cell interaction network that generates the skin pattern of zebrafish., Frontier in Development Biology meeting, 2008.9.16, Gien, France (2008)

4. Kondo S, Zebras did not get the stripes, but lost the uniform color., Society for Mathematical Biology Conference, 2008.8.1, Toronto, Canada (2008)

5. Kondo S, Interaction among the zebrafish pigment cells that makes the stripe pattern., IPCC-IMRC2008, 2008.5.7, Sapporo, Japan (2008)

6. Kondo S, Pigment Cells Generates the Stripes in Animal's Skin., 2nd International Systems Radiation Biology Workshop, 2008.1.25, Washington, USA (2008)

7. 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 (2007)

8. Kondo S, Interactions among the pigment cells give rise to the Turing pattern in the skin of zebrafish., IUBMB 2006, 2006,6,18, Kyoto, Japan (2006)

9. Kondo S, Interactions among the pigment cells that give rise to the stripe pattern., 2005 West Coast Zebrafish Meeting, 2005.9.26, Eugene, USA (2005)

[図書] (計2件)

1. 近藤滋、学研メディカル秀潤社、細胞工学7月号 (Vol.26 NO.7)、「振動現象の生物学：リズムと波が生み出す動的な世界」、746-749 (2007)

2. 近藤滋、東京化学同人、現代化学6月号、「たかがゲノム、されどゲノム」、46-47 (2007)

[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

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