

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301  
研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)  
研究期間：2017～2021  
課題番号：17KT0019  
研究課題名(和文)自己組織化によるカイメン骨片骨格機構が形態多様性を生み出す仕組みの構成的解析  
  
研究課題名(英文)Challenges for constitutive analysis of the mechanism of spiculous skeleton construction  
  
研究代表者  
船山 典子 (Funayama, Noriko)  
  
京都大学・理学研究科・准教授  
  
研究者番号：30276175  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究提案は非モデル生物であるカイメン動物を用いた、国内外に類似の研究が全くない当研究室の独自の「骨片骨格形成機構の研究」の更なる解明を目指し、全く新しい実験系を独自に開発・確立して行い、いずれも非常に挑戦的な3つのプロジェクトから成る。芽球形成過程における「芽球骨片」運搬に関する細胞・分子機構の解明を目指したプロジェクトでは、微細な組織の網羅的なRNAseqを行い、mRNA発現に統計的に差があると考えられる遺伝子候補群を得ることに成功した。その他のプロジェクトは技術的、生物学的な想定外の困難から計画通りの研究は遂行出来なかったが、取り組みの過程で今後の研究展開に重要な知見を多数得ることが出来た。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは非常に独創性の高いカイメン骨片骨格形成機構の研究から、「形作りの要素は細胞」という動物胚の研究によるこれまでの知見とは全く異なる、「細胞は作業員として働き、産生した物体(骨片など)を操作する形作り」という新規コンセプトの形態形成機構を発見した。近年、硬骨魚のヒレ形成でも、同様の機構が働くことが他のグループの研究から明らかになり、この形態形成機構は、動物の形作りの理解を拡張する、発生生物学の教科書に新しい章を開くような研究であると評価いただいている。本研究の成果は、カイメン骨片骨格形成機構のさらなる理解に留まらず、「作業員細胞による形作り機構」の理解に繋がる学術的に重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：This research proposal consists of three very challenging projects, all of which aim to "further elucidate the mechanism of spiculous skeleton formation" of non-model organisms, sponges. This is our laboratory's original research that has no similar studies in Japan or abroad. The project aimed at elucidating the cellular and molecular mechanisms of "gemmosclere" transport during gemmule formation, we have succeeded in obtaining a set of candidate genes might involve in this process by RNAseq. Other projects could not be carried out as planned due to unexpected technical and biological difficulties, but we were able to obtain many important findings for future research development in the course of our efforts.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 骨格形成 骨片骨格形成

## 1. 研究開始当初の背景

動物の外部形態を決定するのは骨格である。即ち、動物形態多様性の理解には、骨格形成機構の解明が必須である。申請者らは、長い間未解明のままであったカイメン動物における骨格の形成機構である「微細なガラス質の骨格構成要素(骨片)が、非常に多数結合、柱と梁構造の骨格を形成する仕組み」に着目して解析を進めた結果、脊椎動物・昆虫・棘皮動物など、既知の動物の骨格形成機構に共通する仕組み、すなわち「パタニングに沿って、軟骨など骨格構成要素が形成され、その場で繋げられ骨格が形成される」という機構とは根本的に異なる、新規の動物の骨格形成機構を見出してきた。

申請者らの研究により、カイメンでは、体内で骨片をダイナミックに運搬する細胞(transport cell と命名)が存在し、運搬した先で骨片1本1本建て・繋げるといふ、大工が建物の骨組みを構築する際と非常に似た工程による骨格構築が行われると明らかになった。非常に重要な点は、骨格形成機構が、パタニングというグローバルルールではなく、「骨片に結合したら運搬する」等「Aという状況ではBを行う」というローカルルールに細胞が従うことによる、一連の物理的な細胞作用で1本の骨片が骨格に加わり、その繰り返しの結果、自然に、その場の成長に合わせた骨格が構築されるという細胞作用による自己組織化によって実現している、ことである(図1, Nakayama et al. 2015 Current Biology)。このような仕組みは、植物やサンゴの様に種特異的な形態は持ちながらも、個体ごとの形態のバリエーションが大きく、また生育環境等によって形態が異なる可塑的な成長を行う固着性生物であるカイメンにとっての、成長に合わせた骨格形成を実現する、シンプルであるからこそ強固な優れた生存戦略であると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者らのカワカイメン骨片骨格形成機構の解析の上に、視点をカイメン動物全体に広げ、これら申請者の淡水棲のカワカイメンに学んだ骨片骨格形成機構から、カイメン動物の種特異的な形態多様性(即ち形成される骨格の多様性)を生み出す機構を統一的に理解することを目的とする。その為、人工的な操作により形成される骨格の形態を変化させ、骨格形成過程のどのパラメータの違いで、非常に多種多様なカイメン動物の外部形態が生み出されるか、構成的に解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### プロジェクト A 形成される骨格形態への骨片形状の関与

タワー型のカイロウドウケツの骨格骨片は十字型(平面上になく短辺が20°ほど内側入っている)であることに発想し、人工骨片など、カワカイメンの持つ針状骨片と異なる形状の骨片を作成、カワカイメン幼弱個体への顕微注入方を確立し、transport cells に運搬させ、形成される骨格の形態を解析、骨格形態への骨片形状の関与の有無を明らかにする。

### プロジェクト B 骨片形状はカワカイメンと同一でも、分枝形態に成長するヌマカイメンの骨格形成過程の解析

ヌマカイメンを研究対象として新たに導入、申請者らが、独自に確立してきたライブイメージング等の解析手法を駆使し、骨格形成過程の、どのステップの、どの様な差異(パラメータ)が分枝型骨格形成を生み出すのかを解明する。得た知見から、様々な種のカイメンのマクロ形態、花瓶型、双曲幾何学的な波打つシート型等の骨格を生み出すパラメータを考察する。

### C. カワカイメン骨片骨格運搬の操作のための手がかり:「芽球骨片」運搬誘引分子の同定

骨格を形成する骨格骨片とは別タイプの芽球の殻の中に埋められる「芽球骨片」が、体内の不特定の場で形成され、形成中の芽球という特定の場に運搬されるという現象に着目、芽球骨片運搬を誘引する分子を、mRNAの網羅的解析(トランスクリプトーム、*in situ* hybridization法)や、培養細胞に産生させた候補分子をカイメンに作用させ、芽球骨片運搬誘引活性を解析するなどの方法により同定する。もし、期間内に平行して行う別プロジェクトでカイメン細胞への遺伝子導入法が確立出来れば、誘引因子受容体をTransport cellsに発現させ、本来ストカスティックな骨片運搬を操作、Bの考察を検証する。

## 4. 研究成果

プロジェクト A: 骨片の形状の形成される骨格形態への関与

工学系、生物系の様々な研究者と連絡をとり、人工的にカイロウドウケツ型骨片(十字型)の作成を検討したが、ナノスケール、ミリスケールの技術はあるものの、カイメン骨片のサイズ(200- $\mu\text{m}$ ほど)は、それぞれの技術で作成可能な範囲の狭間にあり、当初考えていた人工骨片の作成は技術的に困難と判明した。このため、カワカイメンの持つ、骨格に用いられない芽球骨片に着目した。芽球骨片は、針状の骨格骨片とは全く異なる形状:2枚の縁に多数の切り込みのあるディスクが軸で繋がった形状であり、骨格骨片(150-250 $\mu\text{m}$ )と比べ、非常に小型 長さ20-40 $\mu\text{m}$ である。また芽球のコートに用いられる為、通常の幼弱個体では産生されない。そこで、カワカイメン芽球から単離した芽球骨片を、カワカイメン幼弱個体への移植を試みた。この様に微細で複雑な形状の骨片を、直径1mm前後で体の高さ200-400 $\mu\text{m}$ 程度のカワカイメン幼弱個体への移植は、太いキャピラリーを用いると、芽球骨片を吸い込むことは容易な反面、大きな孔を開けるとカイメンへのダメージが大きい、細いキャピラリーでは芽球骨片の操作が困難かつ、カイメン上皮組織に孔を開けるだけの力が出せない、カイメン体内には水管系が発達し体内空間が狭いため水管に入れてしまいがちなどの難しさがあると分かった。工夫を重ねる事により、カワカイメン幼弱個体内に芽球骨片が移植されたと考えられる数例を得られたが、いずれも、芽球骨片の移動、Transport cellsの接着などは観察されなかった。

計画していた挑戦的な研究は進められなかったものの、Transport cellsがどの様にして骨片を認識・結合しているかという大きな疑問に関し、骨片はタンパク質を溶解させ単離するため失われているような、骨片表面には何らかのタンパク質のコーティングなどが存在し、Transport cellsによる認識・結合にはこのコーティングが必須なのでは無いかと示唆する重要な知見を得る事が出来た。この知見を、今後の解析に発展させる予定である。

プロジェクトB:骨片形状はカワカイメンと同一でも分枝状のマクロ形態に成長するヌマカイメンの骨格形成過程の解析

成体カイメンのマクロな形態が異なるヌマカイメンの芽球形成からの個体形成

ヌマカイメンの生息地は水温が低く、冬には結氷するようなヌマなどの底に生息する。また、カワカイメンは春から秋に芽球を形成し、体を退縮させ越冬するのに対し、ヌマカイメンは晩秋に一気に芽球を形成し、芽球で越冬する。私達はこれまでヌマカイメンを扱ったことが無く、カイメン分類学者等の協力を得て、ヌマカイメンの芽球を入手、非常に壊れやすい芽球の単離法を確立、培養温度など培養条件、骨片蛍光可視化のための条件などを確立した。幼弱個体の個体形成過程のステージング、及び、タイムラプス撮影によるプレリミナリーな骨格形成過程の観察を行った。数が足りず定量的な解析ではないが、カワカイメンと比較し骨格形成過程のいくつか、カワカイメンとの際があるのではないかと考える結果を得、今後の解析の足がかりを得た。しかし、ヌマカイメンは、2度、遮光保存であっても、冷蔵庫内で早春に一齐に個体形成を行ってしまうことが判明、詳細な解析を行うことが出来なかった。加えて、最近の温暖化のためか、研究期間内に新たな芽球が入手できず、詳細な観察をする事が出来なかった。

しかし、1度だけ、成体ヌマカイメンを入手出来、餌も水槽での培養条件も不明であるため、次第に体が退縮したものの、水槽である程度個体を維持、マクロな観察を行う事が出来た。得られた知見から、異なるマクロ形態を生み出す骨片骨格形成の仕組みのヒントを得ることが出来た。

プロジェクトC カワカイメン骨片骨格運搬操作の手がかり:「芽球骨片」運搬誘引因子の同定 私達は淡水棲カイメンと一部の海産カイメンが持つ芽球形成、即ち、全能性幹細胞が集合し、周囲にコラーゲンの殻を形成、低温耐性を獲得し厳しい生息環境に耐える機構に着目し、解析を進めている。カワカイメン幼弱個体に人工的に芽球形成を誘導出来ることは1974年にRasmontにより報告されたが、詳細な芽球形成過程については、明視野顕微鏡、及び電子顕微鏡(TEM)を用いた組織学的なド報告(Langenbruch 1981 written in German)があるのみであり、細胞・分子機構の殆ど全てが未解明のままであった。

本研究では、芽球形成過程における網羅的な遺伝子発現解析(RNAseq)を行うことを目的とし、以下の研究成果を得た。1)通常は個体ごと、また同一個体内でも、非同調的にバラバラと形成が開始され、形成過程の進行速度もそれぞれ異なる芽球形成過程を、1つの個体で1芽球のみ、複数個体で日のオーダーで同調的な開始・進行を可能にする培養条件の確立。2)芽球骨片が、芽球形成細胞内に保持されたまま、小型細胞と共に芽球骨片を運搬する様子の顕微鏡下でのライブイメージングによる観察に成功、3)独自の工夫による芽球骨片蛍光可視化と長時間タイムラプス撮影による芽球骨片運搬の軌跡の詳細な解析。これにより、成中の芽球に近づくにつれ芽球へ向かう傾向が強まることを示す結果を得た。また、芽球骨片配置における細胞機構の存在を示唆する知見も得ている。4)芽球骨片運搬細胞複合体、芽球骨片運搬の誘導に関わる細胞・分子機構を解明する足がかりとするため、直径約0.5ミリの芽球の周囲の組織を単離し、RNAseqを行った。非常に少量の組織を用いること、目的とは関係ない多種類の細胞が多く存在する組織であることから、非常に挑戦的な試みであるが、遺伝子発現解析に興味があるが素人である学部学生を本研究費でアルバイトとして雇用、その学生の努力により候補遺伝子群の配列を得ることに成功した。非モデル生物であるカワカイメンにおいては、RT-PCRにより候補遺伝子をクローニングする必要がある。本研究で遺伝子の一部をクローニング出来たのは2遺伝子であるが、本プロジェクトは別の研究提案に引き継いでおり、クローニングと芽球形成中のカワカイメン

幼弱個体を用いた whole-mount in situ hybridization (WISH) を用いて、mRNA 発現解析を行っている。即ち、本研究により、芽球骨片運搬とその運搬方向の制御、芽球骨片配置などに関する、細胞・分子機構の足がかりと期待される一連の候補遺伝子群を得ることが出来た。これは今後の研究展開への大きな基盤になったと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Kishimoto Kouji, Sugano Yasunaga Wakana, Taniguchi Atsushi, Agata Kiyokazu, Nonaka Shigenori, Funayama Noriko	4. 巻 61
2. 論文標題 Skeleton construction upon local regression of the sponge body	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 485 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12636	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 Funayama Noriko	4. 巻 57
2. 論文標題 Produce, carry/position, and connect: morphogenesis using rigid materials	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Genetics & Development	6. 最初と最後の頁 91 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2019.08.001	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 Funayama Noriko, Frank Uri	4. 巻 42
2. 論文標題 Meeting Report on "At the Roots of Bilaterian Complexity: Insights from Early Emerging Metazoans," Tutzing (Germany) September 16?19, 2019	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 1900236 ~ 1900236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.201900236	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakagawa K., Okawa M., Nakazawa J., Kinjyo K., Kondo T*. and Funayama, N.
2. 発表標題 Distinct from the morphogenesis based on the reconfiguration of a mass of cells: Morphogenesis in which cells manipulate rigid materials
3. 学会等名 第53回 日本発生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Noriko Funayama
2. 発表標題 Morphogenesis in which cells act as builders to manipulate rigid materials: skeleton construction of sponges
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 N. Funayama, K. Nakagawa, K. Kinjyo
2. 発表標題 Produce, carry/position, and connect:morphogenesis using rigid materials
3. 学会等名 International Workshop "At the roots of bilaterian complexity:insights from early emerging metazoans" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Mukai, Noriko Funayama
2. 発表標題 Attempt to make a breakthrough for live imaging of cells or proteins, and for gene functional analysis, in sponges by establishing a method for gene introduction
3. 学会等名 第51回 日本発生生物学会
4. 発表年 2018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
---------	---------