

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00994

研究課題名(和文)細胞が材料を組み立てて体を「建築」する仕組みの解明

研究課題名(英文)How do cells assemble materials to build the body?

研究代表者

近藤 滋 (Kondo, Shigeru)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10252503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュのヒレとカワカイメンの形態形成過程では、細胞が、直線状の針状構造の組み立てて足場を作る。細胞が、その整然とした作業を、どうやって行うのかを解明するのが目的である。近藤チームは魚のヒレにおいて、アクチノトリキアの製造、移動、整列を行う細胞を特定し、一部の工程を、インビトロで再現することに成功した。また、アクチノトリキアの平面上の整列が、ヒレを背腹軸方向に進展させる力となっていることを明らかにした。船山チームは、骨片細胞の挙動を解析する手法を得るために、細胞種選択的な遺伝子導入法を開発に一部成功した。また、芽球の形成における骨片と細胞の役割を一部解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の形態を作る原理の解明は、形態学における究極の目的である。しかし、現状では、初期発生期の形態形成に研究が集中しており、成体の形ができる原理はほとんど解っていない。この研究では、「針状構造の組み立て」という現象に着目して、その原理の解明を目指した。発見された細胞の仕組みは、極めてユニークであり、発生学における新しい概念を創出するとともに、将来的には産業応用にも役に立つと考える。

研究成果の概要(英文)：During the morphogenetic process of zebrafish fins and kawakaimen, cells assemble linear needle-like structures to form scaffolds. The goal is to understand how cells perform this orderly process. In fish fins, Kondo's team identified the cells that manufacture, move, and align actinotrichia and successfully reproduced some of the processes in vitro. They also showed that the planar alignment of actinotrichia is the force that propels the fins along the dorsoventral axis. Funayama's team partially succeeded in developing a cell type-selective gene transfer method to obtain a method to analyze the behavior of bone fragment cells. They also partially elucidated the role of bone fragments and cells in the formation of blasts.

研究分野：形態学

キーワード：形態形成 ヒレ カイメン 針状結晶 骨片 アクチノトリキア

1. 研究開始当初の背景

(1) 大きな体の形状を、力学的な負荷に対抗して維持するには、細胞自体の剛性だけでは足りない。そのため、それ自体は細胞ではない「剛性の高いサポート材(例えば骨、鱗など)」を必要とし、結果として、個体の形態は、そのサポート材の構造に依存するのである。では、それらの形態が、どのような原理で作られるのか? それに対する情報は、今のところ極めて少ない。

(2) 上記の問題に対する1つの解答が、船山により提示された。カワカイメンの3D形態は、ほぼ同じ形・大きさのシリカ製の骨片が繋がったものだ。船山は、複数種の細胞が分業により、まさに柱を立てるよ

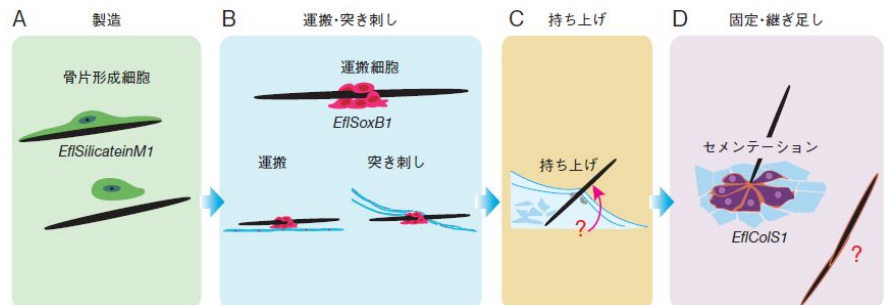


図2 カワカイメンの形態形成における作業員細胞の働き

うにしてカイメンの体を作ることを発見した。骨片は、骨片製造に特化した細胞により作られ、次に、輸送専門の transport 細胞によって、ポールを立てる位置に運ばれる。さらに、別の細胞が骨片の基底側をコラーゲンで直立させ、そのあとで、第4の細胞が骨片と骨片をつないでポールを伸ばしていく。

(3) 近藤は、ゼブラフィッシュのヒレ骨形成の研究を行っていたが、その過程で、カワカイメンと似た現象があることに気が付いた。魚類のヒレの成長末端には、アクチノトリキア(以下 AC)と呼ばれる槍状の構造体が放射状に配置している。ACはシリカではなく、コラーゲンの結晶体であるが、形状・大きさは、カイメンの骨片と良く似ており、骨片と同じ役割をしていると予想できる。

2. 研究の目的

(1) カワカイメンとゼブラフィッシュのヒレで、同じ形態を持つ針状構造が、どのように組み上げられて、形を作るかを解明する。

(2) 2つの系は、針状構造の成分も作られる構造の形態も異なるが、棒状構造の組み立て、という点については共通であり、共同して行うことで進捗が促進されることが期待できる。また、より一般的な原理の発見につながる可能性もある。

3. 研究の方法

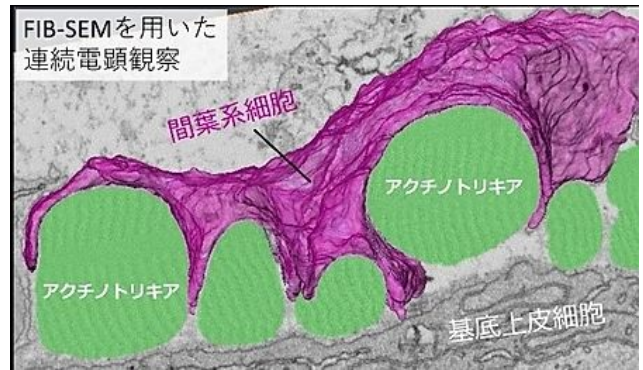
(1) ヒレ形成に関しては、FIB-SEMによるアクチノトリキアと各種細胞の位置関係の解析、インビトロ系でのアクチノトリキアと細胞の挙動の解析、新たなイメージングツールを使ってのインビトロにおけるアクチノトリキアの移動の解析、アクチノトリキア配列異常変異個体の解析。

(2) カイメンに関しては、基本的な細胞挙動は既にある程度解っているため、主に実験技術の開発がメインになる。具体的には、ゲノムへの遺伝子導入法の開発、特定の細胞の実をイメージングするプロモータの発見、芽球形成過程の可視化とマーカー遺伝子の発見。

4. 研究成果

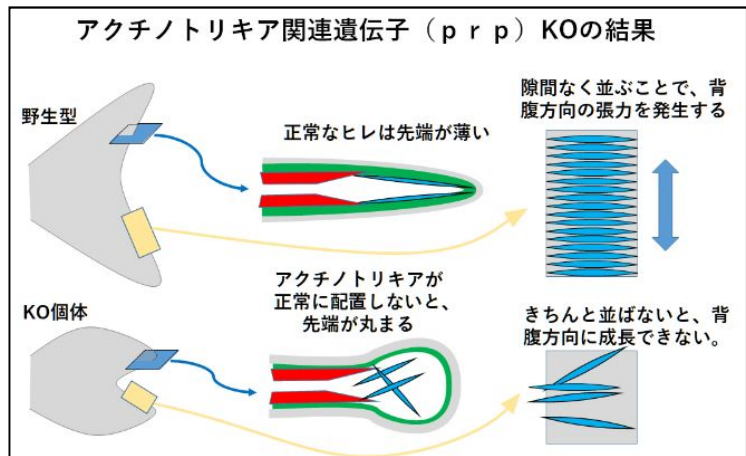
(1) インビボでは、ACとMCの空間的な位置関係を詳細に調べるために、SIB-SEMを使い、ヒ

レ先端部において、AC と MC がどのような位置関係にあるのかを調べた。その結果、平行に並んだ AC の一本一本に MC の膜状突起が包むように絡みついていることが解った。その形状から、MC の膜状突起が、AC の隙間に入り込むことで、AC 間の直接の接触を阻止しており、そのため、AC の融合を阻害している可能性が示唆された。さらに、膜状突起の先端部が基底膜と接していることから、MC と基底膜に挟まれるように AC が整列することが示唆された。



- (2) インビトロ実験では、MC と AC の挙動を観察した。複数の AC を MC と培養すると、MC が巻き付いていく過程で、複数のランダムに配置した AC がきれいに整列するさまが観察された。この事実は MC による AC の整列をインビトロで再現できたことを示し、大きな発見となった。
- (3) MC で、膜状突起形成を阻害するドミナント遺伝子変異を導入することで、その遺伝子が導入された部位で AC の配向が乱れ、バラバラの並びになることが確認された。これにより、AC をヒレの先端部において整列させるのが MC であるということが、インビボ、インビトロの両方で証明された。
- (4) AC をパルス染色し、個々の AC の動態を観察したところ、AC が先端部に向かって常に移動していることを見出した。これにより、AC を産生する細胞が存在しない鰭最先端部 AC が存在する仕組みが説明できる。

- (5) PRP 変異は、ヒレが先端部で縮小し、かつ、ヒレ骨の分岐が起きないという特徴を持つ。精査の結果、PRP 蛋白は、AC を間葉系細胞が認知するマーカーとしての働きがあること、AC が整列した面状構造が、間葉系細胞の固い足場として機能し、ヒレを背腹方向に押し広げることが解った。1 ~ 5 の結果により、細胞と AC の足場組立の概要が明らかになったと考える。



- (6) 船山チームの主な進展は、技術面でのブレイクスルーである。インバースPCR法で EflSoxB 遺伝子上流約 600bp のゲノムDNA を取得、さらにドラフトゲノムデータから検索したところ、得たゲノム DNA 配列を含む約 1.2kb の配列データを得た。現在この配列がプロモーターとして働くことを期待した蛍光タンパク質発現ベクターを作成中である。これまでにプレリミ

ナリーながら融合タンパク質の一過的な発現を確認出来た。

(7) カワカイメンの芽球形成過程においてコラーゲンを主成分とする芽球コート形成過程の細胞・分子メカニズムを明らかにすることを目的に、当研究室の EST クローンの中からコラーゲン遺伝子と考えられる複数の遺伝子を得たため、芽球形成を誘導した個体を用い、Whole-mount in situ hybridization を行ったところ、1 遺伝子で形成中の芽球の周囲に発現が認められた。カイメン体内の深部に位置するため、さらに詳細な解析が必要であるが、細胞形態から芽球コートを分泌していると考えられてきた芽球上皮細胞での発現である可能性が高く、今後の解析の足がかりを得ることが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kuroda Junpei, Itabashi Takeshi, Iwane Atsuko H., Aramaki Toshihiro, Kondo Shigeru	4. 巻 8
2. 論文標題 The Physical Role of Mesenchymal Cells Driven by the Actin Cytoskeleton Is Essential for the Orientation of Collagen Fibrils in Zebrafish Fins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.580520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi-Sun Jingjing, Yamamori Shiori, Kondo Mao, Kuroda Junpei, Ikegame Mika, Suzuki Nobuo, Kitamura Kei-ichiro, Hattori Atsuhiko, Yamaguchi Masaaki, Kobayashi Isao	4. 巻 3
2. 論文標題 Uptake of osteoblast-derived extracellular vesicles promotes the differentiation of osteoclasts in the zebrafish scale	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0925-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ramli
2. 発表標題 Mechanosensitive piezo1 channel mediates vertebral bone morphogenesis 力学的刺激受容体 piezo1 が、脊椎動物の骨形態形成を調節する
3. 学会等名 第22回日本骨粗鬆症学会・第38回日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

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 Junpei Kuroda, Noriko Funayama
2. 発表標題 The architectural style of the body depending on the physical properties of the materials
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 黒田純平, 板橋岳志, 岩根敦子, 近藤滋
2. 発表標題 魚類ヒレの骨格形成に必須なコラーゲン繊維の配向をつくり出す細胞依存的な新規メカニズム
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田純平, 板橋岳志, 一ノ瀬孝子, 近藤滋, 岩根敦子
2. 発表標題 Attempt to understand the cellular function during developmental process from 3D structural model
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田純平, 板橋岳志, 岩根敦子, 近藤滋
2. 発表標題 The mechanism about the growth of collagen crystal involved with fin skeletal development.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飛石佳穂, 黒田純平, 岩根敦子, 近藤滋
2. 発表標題 Role of collagen crystals as a scaffold for fin-ray bone formation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田純平, 板橋岳志, 岩根敦子, 荒巻敏寛, 中川日々紀, 近藤滋
2. 発表標題 魚類ヒレ骨の形態形成に必須なコラーゲン結晶の成長メカニズム
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2019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
研究分担者	船山 典子 (funayama noriko) (30276175)	京都大学・理学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	岩根 敦子 (iwane atsuko) (30252638)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	

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
---------	---------