

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570226

研究課題名（和文）発生ロボラスネス（頑強性）を支える細胞間相互作用の定量的解析

研究課題名（英文）Quantitative analysis of cell-cell interaction responsible for the robustness of development

研究代表者

山本 卓（YAMAMOTO TAKASHI）

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90244102

研究成果の概要（和文）：

発生過程での細胞間相互作用を定量化する目的で、2種類のレポーター遺伝子を用いたウニ胚内での1細胞レベルでの蛍光の定量的システムの確立を試みた。その結果、細胞分化過程での遺伝子間の発現相関を検出することは出来なかった。そこで、人工酵素を利用したレポーターノックイン胚を利用して、間充織細胞での遺伝子発現を定量的に解析したところ、細胞間相互作用の変化に伴って発現のゆらぎが増大することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

To quantitate the cell-cell interaction during development, we tried to establish the system for quantification of two reporter genes in sea urchin embryo. However, we could not observe the relation between the levels of two reporter gene expressions. Next we analyzed the expression in mesenchyme cells using knock-in embryos generated by ZFN-mediated gene addition, and found that there was variations in expression levels among primary mesenchyme cells dependent on the changes of cell-cell interaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化、遺伝子、ゲノム、発生制御、ゆらぎ

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物を構成する多種多数の細胞は、発生過程での特異的な遺伝子発現によって生み出される。この特異的な発現は、細胞分裂で受け継がれる調節因子の非対称的な分配やシグナル因子を介した細胞間相互作用によって段階的に決定されていく。また、初

期胚では、調節因子やシグナル因子のわずかな濃度差を認識して運命の異なる細胞集団が安定して誘導されるだけでなく、環境変化に柔軟に対応し必要であれば失われた細胞を再分化させる。これらのことから、多細胞生物には発生をロボラス（頑強）に進行させる機構が備わっていると考えられる。一方、

生体内の遺伝子発現などの化学反応には、個々の細胞ごとに「ゆらぎ」が存在することが知られている(柴田達夫, 2006)。例えば、転写に関わる制御因子群の分子数や空間的分布は、時々刻々と変化し、細胞などの限られた空間では転写量は確率的な過程に影響を受けることが予想される。発生過程では、このゆらぎに曝されながらも、細胞集団として安定して分化を実行することから、ゆらぎを細胞間相互作用によって制御する機構が多細胞生物に備わっていると考えられる。しかしながら、個々の細胞のゆらぎが細胞間相互作用によってどのように制御されているのか、その機構については明らかにされていない。細胞ごとのゆらぎの存在は、単細胞生物を用いた1細胞イメージングの研究から明らかにされてきた。大腸菌では、同じゲノムをもつ細胞集団内において細胞間で異なる表現型を示す細胞が現れることが報告されている(Elowitz, MB. *et al.*, 2002)。また、大腸菌に人工遺伝子ネットワークを導入し、それらの相互作用の解析から細胞間相互作用とゆらぎの機能を明らかにする取組みが進行している(ERATO 複雑系生命プロジェクト, H16-H21)。この研究は、再構成したシステムからフレームとなる理論を構築する研究として意義深い、多細胞生物そのものをモデルとした解析が必要であることは言うまでもない。多細胞生物では、脊椎動物の体節の繰り返し構造を生み出す体節時計が、多数の細胞性振動子によって構成され、これらの振動子が Notch 依存的な細胞間相互作用によってゆらぎを抑え時計遺伝子の同調的な発現を維持することが示されている(Horikawa, K. *et al.*, 2006)。一方、発生初期の細胞分化において、ゆらぎがどのように制御されているのか、細胞間相互作用によってゆらぎは抑えられているのかなど申請者が知る限りほとんど調べられていない。その理由として、モデル多細胞生物の初期胚の多くは、細胞層が重なり、細胞運動もさかんなため、個々の細胞を3次元的に定量的に解析することが難しかったことがあげられる。

2. 研究の目的

多細胞生物の発生過程では、転写調節因子やシグナル因子のわずかな濃度差を認識して運命の異なる細胞集団が誘導されるだけでなく、環境の変化に柔軟に対応し必要であ

れば失われた細胞を再分化させる。これらのことから、多細胞生物胚には発生をロバスト(頑強)に進行させる機構が備わっていると考えられる。一方、遺伝子発現などの化学反応には「ゆらぎ」が存在することから、このゆらぎを細胞間相互作用によって制御する機構が多細胞生物には備わっていると予想されているが、その実体は明らかにされていない。

本研究では、発生のロバストネス(頑強性)を支える細胞間相互作用を、生体内1細胞イメージングによって定量的に解析することを目的とする。細胞間相互作用と細胞ごとの遺伝子発現のゆらぎとの相関を解析し、個々の細胞での発現ゆらぎが細胞集団として統合され、細胞運命が決定される理論的フレームワークを解明する。本研究の成果は、多細胞生物の発生および再生に見られる柔軟性を理解することにつながるとともに、分化の安定しない幹細胞を調節する新しい技術の開発へとつながる可能性が高い。

3. 研究の方法

1) 2種類のレポーター蛍光遺伝子を用いたゆらぎ解析システムの確立と計測...ウニ胚 Tb 遺伝子の時空間的な発現制御領域に CFP 遺伝子および YFP 遺伝子を連結した構築を作製し、補正用の蛍光色素と共にウニ胚へ導入する。本構築には、導入した遺伝子の発現安定化を図るため、インスレーター配列を導入する遺伝子の両端に付加した。また、ウニ胚では導入遺伝子がモザイク的に発現するが、申請者が最近ウニ胚に適用することに成功した I-SceI メガヌクレアーゼを用いた方法によって、高効率に発現構築をゲノム中に導入した。さらに、導入された2種類のレポーター遺伝子の発現を、発生過程を追って1細胞単位で共焦点レーザー顕微鏡によって計測するシステムの確立を行った。本研究ではウニ胚 Tb 遺伝子の時空間的な発現制御領域に GFP 遺伝子および RFP 遺伝子を連結した構築を作製し、補正用の蛍光色素と共にウニ胚へ導入する。導入された2種類のレポーター遺伝子の発現を、発生過程を追って1細胞単位で共焦点レーザー顕微鏡によって計測した。

2) 2種類のプロモーターを用いたゆらぎ解析システムの確立...ウニ胚一次間充織細胞の遺伝子ネットワークにおいて調節転写因子

である Tb 遺伝子プロモーターと下流の構造蛋白質である SM50 遺伝子プロモーターにそれぞれ異なるレポーター遺伝子 (CFP 遺伝子および YFP 遺伝子) を連結した構築を作製し、これをウニ胚に導入して発生過程を追って 1 細胞単位で共焦点レーザー顕微鏡によって 2 種類の蛍光を計測した。

3) 人工酵素 ZFN を用いたレポーター蛍光遺伝子のノックインおよび 1 細胞単位での定量化... Ets 遺伝子を切断する ZFN を用いて GFP 遺伝子をウニ胚へノックインした。このノックイン胚を用いて、共焦点レーザー顕微鏡による 1 細胞単位での蛍光量を測定した。さらに、2 種類の蛍光レポーター遺伝子 (GFP および mCherry) を ZFN と共導入し、両蛍光を観察した。

4. 研究成果

1) 2 種類のレポーター蛍光遺伝子を用いたゆらぎ解析システムの確立と計測

ウニ胚 Tb 遺伝子の時空間的な発現制御領域にレポーター遺伝子 (CFP 遺伝子あるいは YFP 遺伝子) を連結した構築を作製し、補正用の蛍光色素と共にウニ胚へ導入した。導入胚においてレポーター蛍光を発する細胞の蛍光を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて発生過程を追って複数の胚において定量的に解析した。しかしながら、CFP 蛍光が弱く、ウニ胚ではバックグラウンドの蛍光が高いため定量的な解析が難しいことが明らかになった。現在、レポーター蛍光が強くバックグラウンドの低いレポーター遺伝子に変更する検討を行っている。

2) 2 種類のプロモーターを用いたゆらぎ解析システムの確立... 2 種類の異なる遺伝子プロモーターを異なるレポーター遺伝子でモニターし、遺伝子発現のゆらぎと細胞分化の関係を調べる実験を開始した。この方法によって、ネットワーク上流の Tb 遺伝子に対して下流の SM50 遺伝子がどのように発現応答するのかその相関を定量的に解析することが可能である。それぞれの遺伝子プロモーターに異なるレポーター遺伝子 (GFP および YFP) を連結した構築を、ウニ胚に導入して 2 種類の蛍光量を測定した。平均 15 個体の胚を受精後 10 時間から 24 時間かけて 1 細胞レベルで計測したところ、明確な相関を示さない胚が多数観察されたことから、Tb 遺伝子の発現量と一次間充織細胞の分化には明確な相関は見られないことがわかった。

3) 人工酵素 ZFN を用いたレポーター蛍光遺伝子のノックインおよび 1 細胞単位での定量化... ZFN 利用して GFP 遺伝子をウニゲノムの HpEts 遺伝子座へをノックインし、胚発生

過程における 1 細胞レベルでの蛍光量測定発現を解析した (下図)。その結果、予定一次間充織細胞および一次間充織細胞に検出される蛍光強度は発生に伴ってその差が大きくなることが分かった。さらに、GFP 遺伝子と mCherry 遺伝子の 2 種類の蛍光遺伝子をノックインしたところ、1 つの細胞に両蛍光を検出することができないことから、レポーター遺伝子は片対立遺伝子にノックインされていることが明らかになった。これらの結果から、胚性の Ets 遺伝子の発現は、一次間充織細胞に分化して細胞間相互作用が変化する過程において、ばらつきが大きくなっていくことが明らかになった。

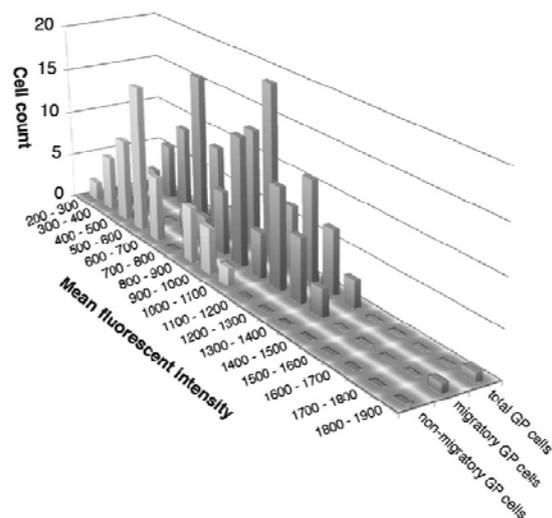


図 Ets 遺伝子発現の定量的解析

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 16 件)

1. Takagi H, Inai Watanabe SI, Tatemoto S, Yajima M, Akasaka K, Yamamoto T, Sakamoto N. Nucleosome exclusion from the interspecies conserved central AT-rich region of the Ars insulator. *J. Biochem.* 査読有, 151(1), 75-87, 2012
2. Hibino K, Shibata T, Yanagida T, Sako Y. Activation Kinetics of RAF Protein in the Ternary Complex of RAF, RAS-GTP, and Kinase on the Plasma Membrane of Living Cells: SINGLE-MOLECULE IMAGING ANALYSIS, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 286, 36460-36468, 2011
3. Sakuma T, Ohnishi K, Fujita K, Ochia H, Sakamoto N, Yamamoto T. HpSumf1 is involved in the activation of sulfatases responsible for regulation of skeletogenesis

- during sea urchin development. *Development Genes and Evolution*, 査読有, 221(3), 157-166, 2011
4. Kobayashi Y, Shibata T, Kuramoto Y, Mikhailov AS. Robust network clocks: Design of genetic oscillators as a complex combinatorial optimization problem, *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 査読有, (6 Pt 1):060901, 2011
 5. Ooyama S, Shibata T. Hierarchical organization of noise generates spontaneous signal in Paramecium cell. *Journal of Theoretical Biology*, 査読有, 283, 1-9, 2011
 6. Ochiai H, Fujita K, Suzuki K, Nishikawa M, Shibata T, Sakamoto N, Yamamoto T. Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases. *Genes to Cells*, 査読有, 15, 875-885, 2010
 7. Okamitsu Y, Yamamoto T, Fujii T, Ochiai H, Sakamoto N. Dicer is required for the normal development of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Zoological Science*, 査読有, 27, 477-486, 2010
 8. Fujita K, Teramura N, Hattori S, Irie S, Mitsunaga-Nakatsubo K, Akimoto Y, Sakamoto N, Yamamoto T, Akasaka K. Mammalian arylsulfatase A functions as a novel component of the extracellular matrix. *Connective Tissue Research*, 査読有, 51, 388-396, 2010
 9. Yajima M, Umeda R, Fuchikami T, Kataoka M, Sakamoto N, Yamamoto T, Akasaka K. Implication of HpEts in gene regulatory networks responsible for specification of sea urchin skeletal primary mesenchyme cells. *Zoological Science*, 査読有, 27, 638-646, 2010
 10. Arai Y, Shibata T, Matsuoka S, Sato MJ, Yanagida T, Ueda M. Self-organization of the phosphatidylinositol lipids signaling system for random cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 107, 12399-12404, 2010
 11. Nishikawa M, Shibata T. Nonadaptive fluctuation in an adaptive sensory system: bacterial chemoreceptor. *PLoS One*, 査読有, 5, e11224, 2010
 12. Fujita K, Takechi E, Sakamoto N, Sumiyoshi N, Izumi S, Miyamoto T, Matsuura S, Tsurugaya T, Akasaka K, Yamamoto T. HpSulf, a heparin sulfate 6-O-endosulfatase, is involved in the regulation of VEGF signaling during sea urchin development. *Mechanisms of Development*, 査読有, 127, 235-245, 2009
 13. Matsuoka S, Shibata T, Ueda M. Statistical analysis of lateral diffusion and multistate kinetics in single-molecule imaging. *Biophysical Journal*, 査読有, 97, 1115-1124, 2009
 14. Fujii T, Sakamoto N, Ochiai H, Fujita K, Okamitsu Y, Sumiyoshi N, Minokawa T, Yamamoto T. Role of the nanos homolog during sea urchin development. *Developmental Dynamics*, 査読有, 238, 2511-2521, 2009
 15. Karasawa K, Sakamoto N, Fujita K, Ochiai H, Fujii T, Akasaka K, Yamamoto T. Suppressor of hairless (Su(H)) is required for foregut development in the sea urchin embryo. *Zoological Science*, 査読有, 26, 686-690, 2009
 16. 柴田達夫, 理論生物学の可能性をバクテリアの走化性を例に考える, 蛋白質核酸酵素, 査読無, 54, 1890-1898, 2009
- [学会発表] (計 40 件)
1. Yamamoto Takashi, Targeted insertion of reporter gene by zinc-finger nuclease mediated homologous recombination enables quantitative imaging of endogenous gene expression in living sea urchin embryo, CDB symposium 2012 Quantitative biology, 2012 年 3 月 27 日, 神戸
 2. Watanabe Takahito, Efficient production of knockout crickets using zinc-finger nucleases, The 2nd International Conference on the Cricket, 2012 年 3 月 22 日, 徳島
 3. Yamamoto Takashi, Genome editing using artificial nucleases, The 2nd International Conference on the Cricket, 2012 年 3 月 22 日, 徳島
 4. 柴田達夫, 走化性シグナル伝達系の自己組織化と応答に実験と理論からアプローチする, 日本発生生物学会秋季シンポジウム, 2011 年 12 月 20 日, 岡崎
 5. 山本卓, 様々な生物での標的遺伝子改変を可能にするゲノム編集技術とその可能性, 日本発生生物学会秋季シンポジウム, 2011 年 12 月 20 日, 岡崎
 6. 坂本尚昭, バクテリア CTCF ホモログ (HpCTCF) の Ars インスレーター結合能および機能の解析, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日, 横浜
 7. 山口真央, バクテリア初期発生におけるコヒーレンスサブユニット Scc1 の機能解析, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日, 横浜
 8. 高木春奈, Ars インスレーター種間保存配列(ArsInsC)のインスレーター活性の解析, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日, 横浜
 9. Mito Taro, Exploring molecular mechanisms of early embryogenesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 14 日, 横浜
 10. Watanabe Takahito, Making knockout crickets with zinc-finger nucleases, 第 34 回日

- 本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜
11. Sakuma Tetsushi, A simplified method for the rapid construction and evaluation of TALE nuclease, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜
 12. Ansai Satoshi, Targeted gene disruption in medaka using zinc-finger nucleases – knock out of GFP gene, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜
 13. 河合成道, カタユウレイボヤ胚における ZFN を用いた eGFP 遺伝子への変異導入, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜
 14. Ochiai Hiroshi, Zinc-finger nuclease-mediated targeted transgene integration enables quantitative imaging of endogenous gene expression in living sea urchin embryo, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜
 15. Song Xiaohong, Functional analysis of Equarin during eye formation, 第 44 回日本発生生物学会年会, 2011 年 5 月 20 日, 沖縄
 16. Sakuma Tetsushi, HpSumf1, the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* homolog of sulfatase modifying factor 1, is involved in activation of sulfatases required for control of skeletogenesis, 第 44 回日本発生生物学会年会, 2011 年 5 月 20 日, 沖縄
 17. Suzuki Ken-ichi, Targeted mutagenesis of thyroid hormone receptor beta gene by engineered zinc finger nuclease in amphibian embryo, 第 44 回日本発生生物学会年会, 2011 年 5 月 20 日, 沖縄
 18. Watanabe Takahito, Targeted manipulation of genes with zinc finger nucleases in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, 第 44 回日本発生生物学会年会, 2011 年 5 月 19 日, 沖縄
 19. 日高大佑, 人工酵素 ZFN タンパク質の発現と機能解析, 日本動物学会中国四国支部・広島県例会, 2011 年 3 月 5 日, 東広島
 20. Yamamoto Takashi, Targeted gene modification via non-homologous end-joining-mediated and homology-directed repairs of ZFN-induced DNA double-stranded breaks, 1st international symposium on Genome damage and Non-cancerous disease, March 3, 2011, Hiroshima.
 21. Watanabe Takahito, Targeted manipulation of genes with zinc finger nucleases in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, 第 33 回日本分子生物学会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸
 22. Ochiai Hiroshi, Genetic manipulation in sea urchin embryo using zinc-finger nucleases. 第 33 回日本分子生物学会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸
 23. 吉田隆也, バフンウニ初期発生における HpNanos mRNA の翻訳調節機構の解析, 第 81 回日本動物学会, 2010 年 9 月 23 日, 東京
 24. Ochiai Hiroshi, Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases, Society for Developmental Biologist 69th Annual meeting, August 8, 2010, New Mexico, USA
 25. 落合博, Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases, 第 43 回日本発生生物学会, 2010 年 6 月 20 日, 京都
 26. 西川正俊, 適応反応のゆらぎと応答, 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 II」, 2010 年 4 月 8 日, 埼玉
 27. 藤田和将, Mammalian arylsulfatase A as a novel component of the extracellular matrix, 第 32 回日本分子生物学会, 2009 年 12 月 10 日, 横浜
 28. 山下香, Cloning and analysis of Dnmt3 homolog of sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*), 第 32 回日本分子生物学会, 2009 年 12 月 10 日, 横浜
 29. 山口真央, Cloning and analysis of Scc1 homolog of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* (HpScc1), 第 32 回日本分子生物学会, 2009 年 12 月 10 日, 横浜
 30. 西川正俊, Bacterial chemotaxis is enhanced by nonadaptive fluctuation in sensory system, 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日, 徳島
 31. 難波利典, What determines the accuracy of bacterial chemotaxis? 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日, 徳島
 32. Nishikawa Masatoshi, Nonadaptive fluctuation in adaptive sensory system of bacterial chemotaxis, International Symposium on Complex Systems Biology, September 29, 2009, Tokyo
 33. 藤井孝吉, バフンウニ胚における Nanos の機能, 第 79 回日本動物学会, 2009 年 9 月 19 日, 静岡
 34. 藤田和将, バフンウニ Sulf は骨片形成における VEGF シグナルの調節に関与する, 第 79 回日本動物学会, 2009 年 9 月 19 日, 静岡
 35. 柴田達夫, Stochastic signal transduction of bacterial chemotaxis, 第 19 回日本数理生物学会年会・企画シンポジウム, 2009 年 9 月 9 日, 東京
 36. 山本卓, 多細胞生物の発生過程における遺伝子発現のゆらぎ, 数理生命科学の形成と発展, 2009 年 9 月 3 日, 東広島
 37. 西川正俊, バクテリアの適応反応で生じるノイズと走化性, 数理生命科学の形成と発展, 2009 年 9 月 3 日, 東広島
 38. 西川正俊, Nonadaptive fluctuation in adaptive sensory system of bacterial chemotaxis,

数理生命科学の形成と発展, 2009年9月3日, 東広島

39. 西川正俊, バクテリアの適応反応で生じるノイズと走化性, 理研シンポジウム・細胞システムの動態と論理, 2009年4月9日, 埼玉

40. Nishikawa Masatoshi, Relationship between the noise in adaptation reaction and the chemotactic performance in bacterium, Gordon Research Conference on Gradient Sensing & Directed Cell Migration, April 2, 2009, Galveston, Texas, USA

[図書] (計3件)

1. 柴田達夫, 生命科学の新しい潮流 理論生物学, 共立出版, 290, 2011

2. Shibata Tatsuo, Noisy signal transduction in cellular systems "Cell Signaling Reactions", 300, 2010

2. 坂本尚昭, Shall We 遺伝学, 講談社サイエンスフィック, 182, 2009,

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 新規 DNA 結合ドメインおよびそれを含む新規 DNA 切断酵素

発明者: 山本卓・坂本尚昭・佐久間哲史・野地澄晴

権利者: 広島大学

種類: 特許 (通常)

番号: 特願 2011-242250

出願年月日: 2011年11月4日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 卓 (YAMAMOTO TAKASHI)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 90244102

(2) 研究分担者

坂本 尚昭 (SAKAKIMOTO NAOAKI)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 00332338

柴田 達夫 (SHIBATA TATSUO)

理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・ユニットリーダー

研究者番号: 10359888

(3) 連携研究者

()

研究者番号: