

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 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22370077
 研究課題名（和文）基本単位を組み上げ自発的に複雑な秩序構造を作る新たなモデル、カイメン骨片骨格形成
 研究課題名（英文） A new model of the self-organization of a complex ordered architecture, spiculous skeleton formation of demosponges
 研究代表者 船山 典子 (FUNAYAMA NORIKO)
 京都大学・大学院理学研究科・准教授
 研究者番号：30276175

研究成果の概要（和文）：

新たに個体融合実験系を確立し解析したところ、1 段目 1 列目の骨片が、ある程度間隔性を持って立てられる仕組みについて骨片は同時に立てられるのではなく、1 本 1 本立てられ、立つ順番に規則性はないことが明らかとなった。カワカイメンでも作用すると期待できる阻害剤をいくつか用い、1 段目 1 列目に立つ骨片の間隔性の制御にかかわるシグナル経路を探索、1 つの候補を得た。そのシグナル分子について、新たに 2 遺伝子を同定、合計 3 遺伝子の mRNA 発現を解析した結果、立つ骨片の間隔性は基底上皮における単純なプレパターンニングと誘導という様な単純な仕組みではないことが示唆された。基底上皮の広がりなど体内空間による何らかの制御がある可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We approached to clarify the mechanisms that regulate the roughly evenly spaced pattern of spicule held up points in the first tier. We succeeded to establish a new original experimental system (sponge fusion experiment) and revealed that the spicules are transported and held up one by one (not simultaneously held up). We selected the inhibitors for several signaling pathways that can be expected to work in *Ehydatia.fluviatilis* according to the amino acids of their action sites in *E.fluviatilis*. Using these inhibitors, we succeeded to get candidate signaling path way that affects the pattern of spicule held up points. Identification of genes of this signaling pathway and the examination of the mRNA expression pattern of these genes suggested that the pattern of spicule held up points can not be explained by the simple pre-patterning in basopinaoderm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：器官形成

1. 研究開始当初の背景

カイロウドウケツなどに特に顕著に見られる美しい建築物とも言えるパターンを持つ機能的な骨片骨格構造が、個々の細胞の反応のみで1つ1つ組み上げられてゆく仕組みは、全く未知のままであり、発生生物学的に興味深い仕組みが見出せると期待される。しかしこの研究は国内外を通じて全く手付かずであった。私達はすでに、骨片に蛍光色素を沈着させ、下から観察するタイムラプスイメージングの手法を確立、また骨片運搬細胞と名付けた骨片を運ぶ特殊な細胞種の存在を明らかにしていた。

2. 研究の目的

カワカイメン個体形成において骨格の柱となる骨片がほぼ等間隔に立てられパターンを持つ事を見出し、国内外で初めて骨片骨格形成の担い手「骨片を運ぶ細胞」の同定に成功しているこれまでの研究の上に、本研究は1) 骨片骨格の1段目1列目の骨片が、正確に等間隔であるというものではないが、およそ同じ位の間隔で、大まかには円周上に立つというパターンを制御する仕組みの細胞・分子レベルでの解析、2) 2段目以上を組み上げる仕組み解析の基礎として、48時間の長時間タイムラプスを可能にする培養及び撮影など実験系の工夫、3) これまでカイメンでは確立されていない遺伝子機能解析系 (RNAi 法) の確立、を目的とした。

3. 研究の方法

淡水性カワカイメンの芽球からの個体形成という無性生殖系の個体形成中の骨片骨格形成を、mRNA 発現、独自に開発した骨片形成中に蛍光色素を沈着、個体を下から撮影する長時間タイムラプス法など。

4. 研究成果

1段目1列目の骨片がほぼ等間隔に立てられる機構の解明を目指し、個体融合実験を独自に開発、タイムラプス動画撮影により解析を行ったところ、骨片は1本1本立てられ、その順番には、立った1本目の骨片を中心に等間隔に次の骨片が立ってゆく、1本目の骨片の反対側に次の骨片が立ち、立った二つの骨片の間を二分するように3番目の骨片が立つなどといったような、明確な規則性が見出せないことが分かった。

1段目1列目の骨片の立つパターンの制御に

関わるシグナル経路を同定することを目的として、いくつかの阻害剤を用いて探索した。カイメンは市販の阻害剤を通常用いている脊椎動物などとは進化的に非常に離れているため、使用する阻害剤を選択する際には、阻害剤のターゲットをコードする遺伝子を当研究室の EST ライブラリーの中から同定し、塩基配列を行い、阻害剤の作用部位のアミノ酸配列がカワカイメン分子でも保存されていることを確認した。即ち、その阻害剤がカワカイメンにおいても、他の動物と同様に特異的な分子を阻害し、特定のシグナル経路を阻害または増強すると強く期待出来る阻害剤のみを使用した。選択したいいくつかの阻害剤を、それぞれカワカイメンの無性生殖系の個体形成 (芽球からの個体形成) 中の培養液中に添加し、1段目1列目の骨片が立てられるパターンへの影響を解析することで、制御に関わるシグナル経路の候補を探索した。カワカイメンの個体形成は、個体ごとに体の広がり具合、成長の速度などが異なるため、多数の個体についての調べ定量的な解析が必要である。過去に例のない実験系であるため、阻害剤の適切な濃度の検討から独自に行った。シグナル経路は個体形成の過程で、複数の場、複数の段階で作用している可能性が高いため、最終的には1段目1列目の骨片が立つ時期に阻害剤添加のウインドウを狭め、1個体ごとの18-24時間タイムラプス動画観察及びその解析を行い、阻害剤の効果を検討した。その結果、1段目1列目に立てられる骨片の間隔が狭まるという効果のある阻害剤があり、骨片を立てる位置のパターン (間隔性の制御) に、なんらかの段階で関わる可能性の示唆されるシグナル経路を同定できた。このシグナル分子が、いつ、どの様な細胞で発現しているのかを解析するために、当研究室の EST, 新たに得たトランスクリプトームのデータを用い、5'、3' RACE を組み合わせ、すでに同定していた遺伝子に加えてさらにシグナル遺伝子を同定し、合計3遺伝子を得た。このタイプのシグナル分子の遺伝子は、ゲノム配列が解析されている他の種類のカイメンでも3つであることから、カワカイメンの持つ全てのこのタイプの遺伝子を得たと考えている。3つの遺伝子の mRNA 発現パターンの解析を、1段目1列目の骨片が立つ前の時期、及び立った後に関して詳細に行ったところ、1つの遺伝子に関しては特異的な発現を検出することに成功した。(他2遺伝子に関しては、シグナルが検出できなかった

もの（有性生殖系で発現しているのかも知れない）と、全ての細胞弱いシグナルが検出されたもの（バックグラウンドである可能性もまだ残る）であった。発現パターンを得られた遺伝子を発現している細胞は、基底上皮細胞ではなく、骨片を立てる位置は「基底上皮におけるプレパターンニングにより、将来骨片が立てられる位置が決定される」という様な単純なものではなく、おそらくは複雑な細胞間、細胞-組織間相互作用が関与していると考えられる。この結果は、骨片を立てる場（規程上皮、または体内空間）が常に大幅に拡大している中での骨片を立てる場を制御するという、カイメン骨片骨格形成の特徴に大意応ずる、よりダイナミックな細胞間 細胞-組織間相互作用による制御を示唆するものではないかと考えるに至っている。現在、1 段目 1 列目の骨片を立てるために働く、どの細胞または組織がこのシグナルを受け取っているのか、また、このシグナルによりどのような事象が制御されているのか等さらに解析をすすめている。

カイメンの個体形成中に、常に次々と骨片は形成されており、常に蛍光色素を培養液に加える必要がある。しかし、5 分間に 1 度の頻度で撮影を行うと、毒性が生じてしまう点と、検出感度との兼ね合いで蛍光色素の最適濃度条件を決定した。さらに、蛍光色素に関しても再検討を行い、細胞での取り込みが非常に少なく、骨片へのケイ酸と共に沈着する特異性が高い色素を見つけることが出来た。これにより 画像及びタイムラプス動画での骨片がより容易に特異的に検出出来るようになり、動画での骨片の動きのトラッキングの精度を上げることが出来た。

カイメンの分子生物学的解析の為には、遺伝子機能解析法の確立が重要である。しかし、国内外を通じてまた遺伝導入法、RNAi 法などは確立されていなかった。そこで私達は RNAi 法に取り組んだが、国内外で未だ確立されていないこの方法の確立を確実に示すための指標となる遺伝子の選択が難しく、これまでのところ試みた遺伝子に関して qRT-PCR である程度の mRNA 量の低下が検出出来た段階である。ベストの候補とは言い難いが、当研究室で抗体の作成に成功している EflMusashiA 遺伝子をターゲットに、解析を進めている。

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 1 件）

Okamoto K, Nakatsukasa M, Alié A, Masuda Y, Agata A, and Funayama N.

The active stem cell specific expression of sponge Musashi homolog *EflMsiA* suggests its involvement in maintaining the stem cell state, *Mec. Dev.* 129:24-37 (2012) 査読あり doi: 10.1016/j.mod.2012.03.001.

〔学会発表〕（計 7 件）

1. Kazuko Okamoto, Kiyokazu Agata, Noriko Funayama Establishing the first gene functional analysis system in sponge: RNAi method in *Ephydatia fluviatilis* 第 44 回日本発生物学会 2011 年 5 月 19 日 沖縄コンベンションセンター（沖縄県）
2. Yudai Nakata, Kiyokazu Agata and Noriko Funayama Investigation of the molecular mechanism that recruit spicule-carrying transport cells to their holding-up points in a freshwater sponge 2011 年 5 月 19 日 第 44 回日本発生物学会 沖縄コンベンションセンター（沖縄県）
3. 中田裕大・中山創平・有馬和志・阿形清和・船山典子 カイメンの秩序立った骨片骨格形成に学ぶ起源的なパターン形成 日本動物学会近畿支部会 2011 年 5 月 14 日 京都大学(京都市)
4. Kazuko Okamoto, Mikiko Nakatsukasa, Kiyokazu Agata, Noriko Funayama Studies on the mode of cell division during differentiation of archeocytes (pluripotent stem cells) in sponge, *Ephydatia fluviatilis* VIII World Sponge Conference 2010 年 09 月 20-24 日 Auditorium Conference Centre (Spain, Girona)
5. Sohei Nakayama, Kazushi Arima, Kurato Mohri, Noriko Funayama Spiculous skeleton formation as a new model to clarify pattern formation in demosponges: The foughly spaced spicule holding up (SHU)points and the identification of spicule carrying cells VIII World Sponge Conference 2010 年 09 月 22 日 Auditorium Conference Centre (Spain, Girona)
6. Kazushi Arima, Sohei Nakayama, Kiyokazu Agata and Noriko Funayama

Spiculous skeleton formation as a new model to reveal positional information and mechanisms of response to it in sponges 第43回日本発生物学会 2010年6月22日 京都国際会館 (京都市)

研究者番号：

7. Kazuko Okamoto, Mikiko Nakatsukasa, Kiyokazu Agata, Noriko Funayama
Studies on the mode of cell division during differentiation of archeocytes (pluripotent stem cells) in sponge, *Ephydatia fluviatilis* 第43回日本発生物学会 2010年6月21日 京都国際会館 (京都市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船山 典子 (FUNAYAMA NORIKO)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：30276175

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()