

平成18年度 学術創成研究費 研究進捗状況報告書（中間評価用）

平成18年3月31日現在

ふりがな	こんどう しげる		所属研究機関・ 部局・職	名古屋大学・大学院理学研究科・教授				
研究代表者 氏名	近藤 滋							
研究課題名 (英訳名)	生体パターン形成原理の実験的ならびに数理解析的解明 Experimental and mathematical analyses of biological pattern formation							
研究経費 (千円未満切捨) <small>平成16,17年度使用内訳は支出額、平成18年度以降の交付額は内約額、使用内訳は支出予定額を記入</small>	年度	研究経費(千円)		使用内訳(千円) <平成18年度以降は支出予定額>				
		交付額	支出額	設備備品費	消耗品費	旅費	謝金等	その他
	平成16年度	44,100	44,100	24,832	18,577	377	285	26
	平成17年度	44,500	44,500	3,353	29,718	1,206	5,623	4,597
	平成18年度	44,700	-	10,000	18,300	3,000	12,500	900
	平成19年度	44,400	-	9,000	18,900	2,500	13,000	1,000
	平成20年度	47,200	-	9,000	19,700	3,000	14,000	1,500
	総計	224,900						
研究組織 (研究代表者及び研究分担者)								
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)					
近藤 滋	名古屋大学・大学院理学研究科・教授	数理生物学 発生生物学	研究全体の総括、模様形成の原理の分子レベルの解明					
宮沢清太	名古屋大学・大学院理学研究科・助手	分子生物学	模様関連候補遺伝子のスクリーニング					
川上浩一	国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系初期発生部門・助教授	分子生物学	トランスポゾンベクターの開発、遺伝子のクローニング・解析					

当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)

ゲノム情報の整備と実験技術の飛躍的な進歩により、莫大な量の分子情報が得られるようになった。しかし、高次の生命現象は、非常に多くの要素が複雑に絡み合った結果としておきるため、要素の情報を持っていても、現象の理解には必ずしもつながらない。そのため、シミュレーションを含めた数理的な手法に注目が集まっているが、現状では、実験と数理の融合には必ずしもうまくいっていない。最大の原因は、両方の分野に精通した研究者が少ないことであるが、そうしたバイリンガルの研究者が増えない最大の理由は、数理と融合することによって新しい理解にいたるような実験の成功例が非常に少ないことである。

本申請研究では、動物の色素パターン形成の原理を分子レベルの解明を目指している。動物の皮膚模様は誰でも目にする現象ではあるが、発生学で通常用いられる「濃度勾配」モデルでは説明することが不可能な現象である。一方、数理の世界では、模様が Turing の反応拡散原理で説明できることが知られていたが、証明する方法がなかった。抽象的な数理の理論と、実際の実験を結びつけるのは、大きな困難があるが、逆にもし解決出来れば、数理と実験を融合する手法の実例として大きな意味を持つであろうし、Turing の原理自体が、「発生における位置情報の不足」の問題を解決できるミッシングリンクとしての意味を持つ。色素パターン形成原理が分子レベルで解明されれば、実験研究者には「未解決の問題が数理の力で解決した」例として、数理系の研究者には「抽象的な理論モデルを実証することが可能になった」というインパクトを与えることが出来るはずである。唯一の縞模様を持つ実験動物であるゼブラフィッシュの系を用いることで、理論と実験が融合した研究の成功例を生み出せると考えている。

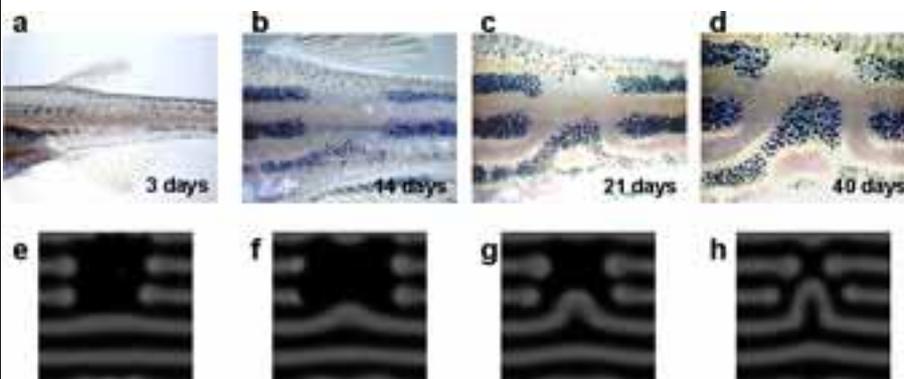
これまでの研究経過

1. 本研究は、学術創成研究費の趣旨の3つの観点のうち、どの観点到に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。
2. 研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。

本研究は、今まで数理の理論でしかなかった反応拡散原理が現実の生物で作用していることを、理論とゼブラフィッシュの分子遺伝学の手法を使って分子レベルで解明することを目的とする。抽象的な反応拡散原理と、具体的な分子レベルの原理の間をつなぐために、研究は3つのレベル(パターンの持つ性質の解明、パターンを作る細胞間相互作用の解明、パターンを作る遺伝子メカニズムの解明)で行っている。最終段階では、細胞培養系での縞模様形成を行いたい。

1) パターンの持つ性質の解明(理論的研究:近藤・宮沢)

ゼブラフィッシュの色素パターンが反応拡散の原理で出来ていることを示すには、パターンが反応拡散系特有の「動的な性質」を持つことを示す必要がある。そのため、色素細胞をレーザーで部分的に消去しその回復過程を記録し、それが反応拡散原理のシミュレーションとの予測と合うかどうか調べた。

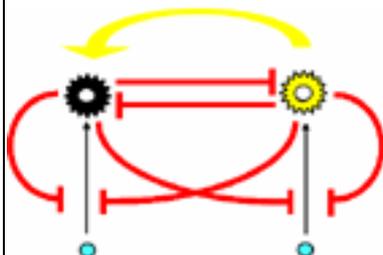


その結果、ゼブラフィッシュでも色素パターンを変化させると、理論的に予測される変化が起きることが解った。これは、ゼブラフィッシュの皮膚模様が反応拡散原理で出来ていることの直接的な証明である。(論文投稿中)

これまでの研究経過 つづき

2) パターンを作る細胞間相互作用の解明 (理論 + 実験: 近藤・宮沢)

これまでのミュータントの解析から、黄色・黒の2種類の色素細胞間の相互作用がパターン形成の主役であることが予想されている。そこで、レーザーを用いて、いろいろなパターンで色素細胞を消去し、その再生過程から、色な相互作用が存在するかを、インビボで調べた。結果の概略を下図に示す。



黄色細胞は、黒色細胞に対し近距離で抑制の、遠距離で促進の効果を持つ。この関係は、反応拡散原理から導かれる予測と一致し、実際にシミュレーションでも、このネットワークがあれば、縞模様の形成、維持が可能であることが示された。

3) パターンを作る遺伝子メカニズムの解明 (実験: 近藤・宮沢・川上)

上の実験で明らかになった細胞間相互作用を、どのような細胞が担っているかを特定し、分子・遺伝子でネットワークを完成させ事を目指す。そのために、模様変異のミュータント遺伝子の特定を目指した。ゼブラフィッシュの模様変異の中でも、特に模様形成原理と関係していると考えられる jaguar (幅が広がる) と leopard (斑点になる) のクローニングを行った。結果は Kir7.1(K channel) と connexin42(gap junction)であり、両者ともイオンなどの小さい分子の膜の透過にかかわる分子で合った。最初、タンパク性のリガンドか受容体を予測していたので、意外であったが、2つともある意味似た性質の分子であったため、原理の解明に重要と考え、詳しい解析を行っている。現在までに、特に Kir7.1 に関して、神経からのノルエピネフリンによる神経刺激をコントロールしていること、エピネフリンによる神経刺激が、模様変異を生み出せることを見出した。これらは、模様形成のためのシグナル伝達系に、アドレナリン受容体系がどこかでかかわっているという意外な事実を示唆している。今後、leopard ともども解析を進め、どのように模様形成にかかわっているのかを解明したい。

一方、既に存在する模様変異突然変異だけでは、模様形成のネットワーク再構成に十分でないことが考えられること、さらに、模様形成に関与する分子の作用を解析するために、縞模様の特定の部位にのみ任意の遺伝子を発現させることの出来るテクニックが必要になる。そのために川上 (遺伝研) は、トランスポゾン Tol2 を使った、挿入突然変異の作成、および、Gal4-UAS を用いた縞模様の部位特異的に活性化するプロモータのスクリーニングを行っている。現時点では、トランスポゾンの挿入効率がそれほど高くないため、あたらしい模様変異株の創出には至っていないが、Gal4-UAS 系では3系統の縞模様の部位特異的な発現を示すプロモータを特定している。今後、クローニングされた遺伝子などを発現させるのに、有効に使えるはずである。

特記事項

これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。

近藤研究室と東大の武田洋幸研究室で、反応拡散原理に基づくと思われる他の現象（体節形成）に関する共同研究を行い、武田研が実験を、近藤研が理論面を担当した。この結果は、最近 Nature 誌にアクセプトされ、現在インプレスとなっている。

ゼブラフィッシュの色素パターン解明を目指す本研究と直接の関係はないが、本研究の目的である、「理論と実験の共同作業が有力な方法であること」を示す一つの実例になると考えられる。

こうした共同作業が増やすことが、学際的な分野を中核的な分野に成長させるための最良の方策であろう。

研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)及び国際会議、学会等における発表状況について、2頁以内に記入してください。

- 1) 近藤 滋, 「生物のパターン形成と振動現象」, 計測と制御 8月号 (vol.43) 594-598 (2004)
- 2) 近藤 滋, 「Turing 波」(反応拡散波), 生体の科学 55巻5号・10月 498-499 (2004)
- 3) Kawakami, K. and Noda, T, Transposition of the *Tol2* element, an *Ac*-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells. *Genetics* 166, 895-899 (2004).
- 4) Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., and Mishina, M, A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Developmental Cell* 7, 133-144 (2004).
- 5) Kawakami, K., Imanaka, K., Itoh, M., and Taira, M, Excision of the *Tol2* transposable element of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Gene* 338, 93-98 (2004).
- 6) The MGC project team (Gerhard, D.S. and other 113 authors), The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: The mammalian gene collection (MGC). *Genome Research* 14, 2121-2127 (2004)
- 7) Koichi Kawakami, Transgenesis and gene trap methods in zebrafish by using the Tol2 transposable element. *Methods in Cell Biology* 77, 201-222 (2004)
- 8) 小谷友也、川上浩一, ゼブラフィッシュの時空間特異的な遺伝子発現, 蛋白質核酸酵素 49巻、2111-2116頁、2004年。
- 9) Hirata, M., nakamura, K., Kondo, S, Pigment cell Distributions in Different Tissues of the Zebrafish, With Special Reference to the Striped Pigment Pattern, *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 234, 293-300(2005)
- 10) Kondo, S, Cell-cell Interaction Network That Generates the Skin Pattern of animal, *Genome Informatics* 2005, vol.16, No.2, 287-291(2005)
- 11) Kazuki Horikawa, Kana Ishimatsu, Eiichi Yoshimoto, Shigeru Kondo and Hiroyuki Takeda Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature* in press.
- 12) Taylor, M. R., Kikkawa, S., Diez-Juan, A., Ramamurthy, V., Kawakami, K., Carmeliet, P., and Brouwer, S. E. The zebrafish *pob* gene encodes a novel protein required for survival of red cone photoreceptor cells. *Genetics* 170, 263-273 (2005)
- 13) Miskey, C., Izsvak, Z., Kawakami, K., and Ivics, Z. DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 629-641 (2005)
- 14) Koichi Kawakami, Transposon tools and methods in zebrafish. *Developmental Dynamics* 234, 244-254 (2005)
- 15) 川上浩一、私が名付けた遺伝子「*hagoromo*」 *実験医学* 24巻、540-542頁、2006年

学会発表等(国際学会での招待講演のみ)

- 1) "How stripe patterns emerged on the skin of fish and mammals?" Kondo, S. *Oscillations & Dynamic Instabilities In Chemical Systems*, Bates College Lewiston, ME, USA, 2004
- 2) Transgenesis and gene trap approaches in zebrafish using the Tol2 transposon system (Oral)
Kawakami, K., Ito, A., Kotani, T., Morvan, G., Nagayoshi, S., Sasaki, T., Urasaki, A., Kishimoto, Y.
6th International Conference on ZEBRAFISH Development&Genetics
Madison, USA (2004)
- 3) Trapping of maternal genes in zebrafish. Kotani, T. and Kawakami, K. 6th International Conference on ZEBRAFISH Development&Genetics Madison, USA (2004)
- 4) A transposon-mediated gene trap approach in zebrafish. (Oral), Kawakami, K. The 11th CDB meeting: Asia-Oceania Fish Meeting, Kobe, Japan (2004)

- 5) The Tol2 transposable element and its application in gene trapping in zebrafish. (Oral), Kawakami, K. EMBO workshop:molecular mechanism of transposition, its regulation and evolution, Roscoff, France (2004)
- 6) Development of Gal4-enhancer trap system using the Tol2 transposon in zebrafish. Asakawa, K., Ito, A., Urasaki, A., Morvan, G., Kotani, T., Sasaki, T., Nagayoshi, S., Kishimoto, Y., Hibi, M., and Kawakami, K. The 10th Japanese Medaka and ZebraFish Meeting ,Kobe, Japan (2004)
- 7) Integration and remobilization of a gene trap transposon construct in zebrafish. Urasaki, A., Kotani, T., Nagayoshi, S., and Kawakami, K. The 10th Japanese Medaka and ZebraFish Meeting, Kobe, Japan (2004)
- 8) The Tol2 transposable element: efficient gene and enhancer trapping in vertebrate (Oral), Kawakami, K. FASEB SUNNER RESEARCH CONFERENCES "Mammalian Mobile Elements" Tucson, Arizona (2005)
- 9) Kondo,S. Iwashita, M. Yamaguchi,M. Studies about the zebrafish skin pattern formation. 4th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, Dresden, Germany(2005)
- 10)Kondo,S. Interactions among the pigment cells that give rise to the stripe pattern. West Coast Zebrafish Meeting, Oregon(2005)
- 11) Kondo,S. Interactions among the pigment cells of zebrafish give rise to Turing Pattern. The 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies Honolulu,Hawaii,U.S.A,2005
- 12) Cell-cell Interaction Network That Generattes the Skin Pattern of animal, Kondo,S. The 16th International Conference on Genome Informatics ,Yokohama(2005)
- 13) The Tol2-mediated genetic methodologies in zebrafish: gene trapping, enhancer trapping and remobilization (Oral), Urasaki, A., Asakawa, K., Kotani, T.,Nagayoshi, S.,Kishimoto, Y.,Kawakami, K. 4th European Zebrafish Genetics and Development Meeting , Dresden, Germany (2005)
- 14) The transposon-mediated gene trap approach identifies novel genes that expressed maternally and involved in embryogenesis. Kotani, T., ,Urasaki, A., ,Nagayoshi, S., Kawakami, K. 4th European Zebrafish Genetics and Development Meeting , Dresden, Germany (2005)
- 15) Transposon-mediated enhancer trapping in zebrafish, Nagayoshi, S.,Hayashi, E.,Asakawa, K.,Urasaki, A.,Horikawa, K.,Takeda, H.,Kawakami, K. 4th European Zebrafish Genetics and Development Meeting ,Dresden, Germany (2005)
- 16) Development of the Gal4-enhancer trap system using the Tol2 transposable element in zebrafish (Oral), Asakawa, K.,Ito, A.,Urasaki, A.,Kotani, T.,Nagayoshi, S.,Kishimoto, Y.,Hibi, M.,Kawakami, K. West Coast Zebrafish Meeting , Eugene, Oregon (2005)
- 17) Gene and enhancer trapping using the Tol2 transposon system (Oral), Kawakami, K. Strategic Conference of Zebrafish Investigators ,Salisbury Cove, Maine (2005)
- 18) The Tol2 transposable element: minimum cis-requirements and remobilization (Oral), Kawakami, K. ASM conferences: Mobile DNA , Banff, Alberta, Canada (2006)