

モデル多細胞生物発生の遺伝子システムの全体像解明と 計算機モデル化

◆近藤 滋^{1) 2)}

1) 名古屋大学生命理学 2) 理研CDB

〈研究の目的と進め方〉

多数の因子間の相互作用によって起きる生命現象は、複雑系としての特徴を持ち、単に要素としての遺伝子を同定するだけでは理解できない。「複雑」な現象の例として、動物の皮膚模様を取り上げ、数理シミュレーションと、その予測に基づく生物学実験を組み合わせた新しい手法を使ってパターン形成原理を解明する。ゲノム情報が完全に得られた後に顕在化するとと思われる「複雑さ」を克服する手法のプロトタイプになることを目指す。

具体的には、以下の4つのプロジェクトを平行して行う

- 1) ゼブラフィッシュの色素パターン形成原理の解明
- 2) 反応拡散原理がさまざまな皮膚模様を作ることができることの理論的証明
- 3) 哺乳動物の皮膚で反応拡散原理が働いていることを証明
- 4) 形態形成に反応拡散原理が働いていることの証明

〈研究開始時の研究計画〉

①ゼブラフィッシュの色素パターン形成原理の解明

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証明するためには、2つの事実が必要である。第一に、縞模様が、タテジマキンチャクダイと同じ様に「Turing Pattern」としての動的な特性を持つこと。次に分子細胞間相互作用の解明である。前者は、レーザー照射による部分的な模様破壊と、それに対する再生の様子を解析することにより、後者は、模様変異遺伝子のクローニングにより達成できると考えた。

②反応拡散原理がさまざまな皮膚模様を作ることができることの理論的証明

皮膚模様はゼブラフィッシュだけに存在するのではなく、多くの生物がいろいろなパターンの皮膚模様を持つ。いくつかの模様はRDモデルでも説明がまだなされていないものがある。模様形成原理の普遍性を証明するためには、それらの模様がどのような条件で出来るかを、少なくとも理論的なレベルで解明しておく必要がある。

③哺乳動物の皮膚で反応拡散原理が働いていることの証明

哺乳動物も多彩な模様を持つが、通常模様変異が起きないため、反応拡散の原理が働いているのかどうかを確かめることが出来ない。しかし、げっ歯類にはいくつかその可能性のある種、変異体が居るため、それらについて詳しく調べたい

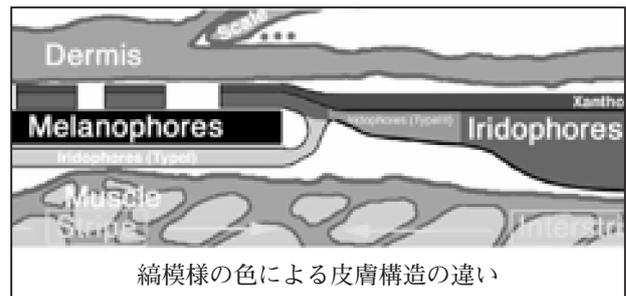
④形態形成に反応拡散原理が働いていることの証明

脊椎動物の体節形成など、等間隔の構造が自発的に形成されていく過程は、発生の中で多く存在する。ニワトリの体節形成を研究対象に選び、体節形成時に外力により変形を起こさせ、それに対する修正・再生の様子から、この系に反応拡散原理が働いているかどうか証明したい

〈研究期間の成果〉

1-1 ゼブラフィッシュの色素細胞の存在様態の解析

ゼブラフィッシュ色素細胞の皮下での存在様態を電子顕微鏡で詳細に解析した。色素パターン形成は色素細胞間の相互作用が重要な役目を果たすことがわかっており、それぞれの色素細胞が空間的にどのように接しているかを知ることは、パターン形成を理解する上で必須のことである。論文4,6



縞模様の色による皮膚構造の違い

この解析から、2つの重要な特徴があることが明らかとなった。一つ目は黒色の部分には、3種類の色素細胞が全て存在すること、垂直方向の並びの順序が一定(irido-melano-irido-xantho)していることである。特に iridophore が常に melanophore と xanthophore の間にあることは、両者が互いに接することの内容にしていることをうかがわせる。また第2の特徴としては、それぞれの細胞は、常に1層でしか存在せず、多層にはなっていないことである。これは、縞模様を作っている部位の色素相棒にのみ見られる特徴であり、このことと色素パターン形成の因果関係があると考えられる。

1-2 色素細胞間の相互作用の解明

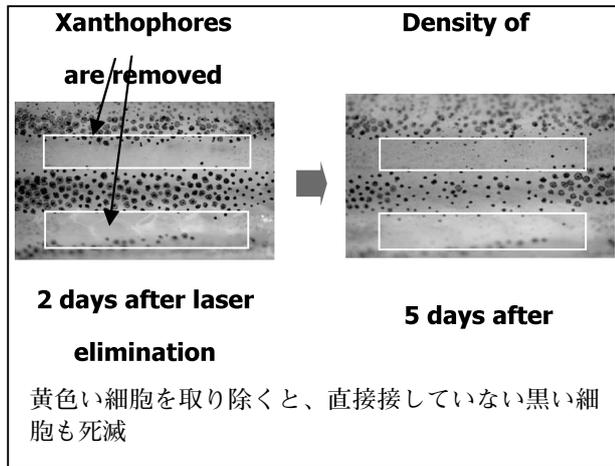
ゼブラフィッシュの色素細胞間相互作用を、レーザーを使った再生実験により解明した。具体的には、一部の細胞をレーザーを使って殺し、空白になった部分の再生の様子と、周囲に残っている細胞の比率から、細胞のあたらな分化・細胞死に対する影響、影響の到達距離等を推定する。通常、狭い範囲の色素細胞のみを殺しても、直ぐに新しい色素細胞が分化してきて、パターンを修復してしまうが、広い範囲の色素細胞を同時に殺してしまうと、パターンの消失が起きる。再生の経過は、初期には色素細胞は元の位置に関係なく出現し、後から melanophore と xanthophore の間で competition がおきて、最終的に分離したパターンに落ち着く。しかし、その場合、元の方向性を回復することは出来ず、ランダムな方向のストライプとなる。



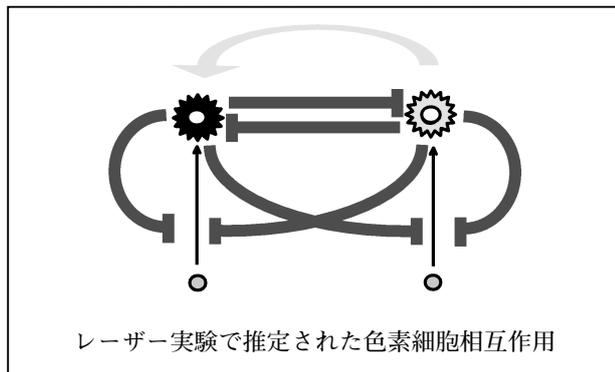
再生時に模様の方向性を失った魚

色素細胞を壊すと方向性がなくなるということは、模様の一情報が他の細胞に由来するのではなく、色素細胞の相互作用だけで形成・維持されていることを示しており重要である。

次に一部の色素細胞を殺した場合に周囲の細胞がどのような影響を受けるかを、これもレーザーを使って調べた。下の写真はその実験例である。

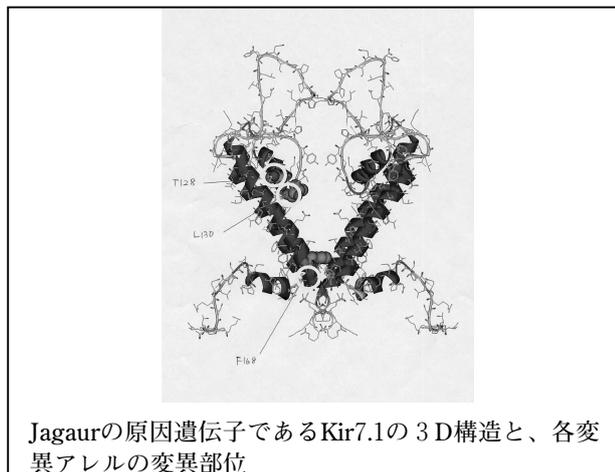


結果から、melanophoreとxanthophoreの間には、近距離で相手を排除しあい、遠距離で相手を助ける、という相互作用が働いていることが推定された。この相互作用は、反応拡散原理がパターン形成のために必要とする条件と一致している。したがって、細胞レベルの相互作用では、反応拡散仮説は証明されたといつてよい。



1-3 模様変異遺伝子のクローニング

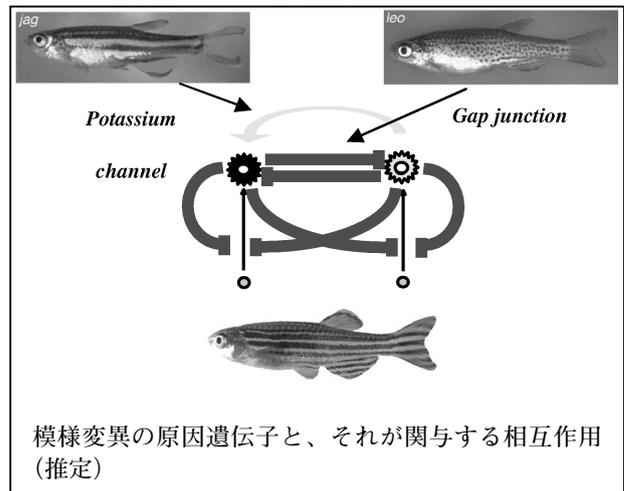
反応拡散波形成の分子レベルの解明を目指し、模様の変異を持つミュータントの遺伝子クローニングを試み、jaguar遺伝子(幅が広がる)を特定した。(論文投稿中)



変異部位に存在した遺伝子はKir7.1というカリウムイオンのイオンチャンネル分子であった。突然変異アレルの配列を見ると、3つのアレルの全てについて、イオン通過にかかわる部分に変異アミノ酸が存在することがわかった。このことから、変異遺伝子ではKイオンの透過性がなくなっていることが示唆された。変異遺伝子を培養細胞に導入して、電気生理実験によって調べてみると、予想通りイオンを通さないことが証明された。また、最近、変異個体にこの遺伝子を導入することで変異形質のrescueされることも証明された。

イオンチャンネルが模様変異にかかわっているということは、細胞間相互作用の媒体が、タンパク質のリガンドではなく、イオンの濃度、電気的な状態などである可能性を示唆するため非常に興味深い。この遺伝子に関して現在解析を続けている。シミュレーションを用いた解析を行うと、この遺伝子は遠距離で働く黄色色素細胞から、黒色素細胞へのsurvival効果に働いていることが示唆されている。

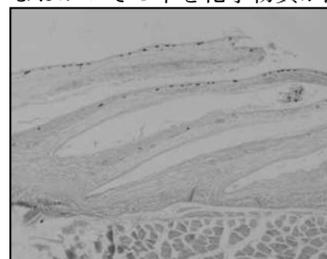
また、最近、ストライプパターンが斑点に変わる変異(レオパード)遺伝子を、クローニングの結果connexin40(gap junction)であることを見出した。これもイオン等の低分子の膜通過に働くため、相互作用が低分子によって伝達されることを示唆している。(論文投稿中)



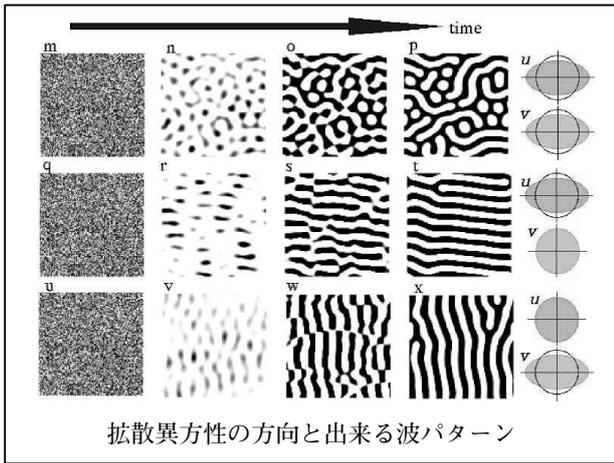
2) 反応拡散系によるパターン形成の理論的な発展

ほとんどの縞模様を持つ動物では、縞の走行方向は一定している。通常反応拡散系では、縞の間隔を決めることは出来ても方向を決めることは出来ない。縞の方向が決まるには、理論的にどのような条件が居るのか、また、現実の動物では何がその方向を決める原因となっているのかを調べた。

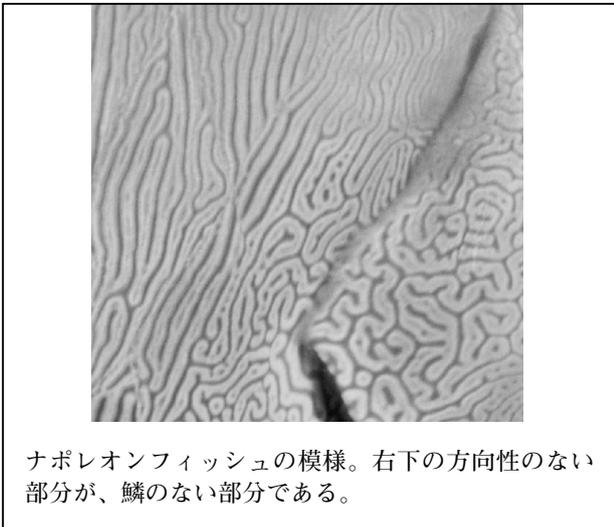
反応拡散の式において方向性に関するのは拡散項しかないため、拡散に異方性を生じさせる原因を探した。鱗は、皮膚の中で唯一方向性を持って存在する構造であり、なおかつその中を化学物質が通過できる。



反応拡散の原理を使って計算してみると、2種類の分子のうち一方に拡散異方性を入れると、うまく方向性のある波が作れることがわかった。



この結果に基づいて実際の魚を再チェックしてみると、鱗のある部分では方向性があるのに、ない部分では方向性のないストライプが形成されている場合が多いことを発見することが出来た。論文1,3



3) 哺乳動物の皮膚で反応拡散原理が働いていることの証明

哺乳動物の場合、さまざまな皮膚模様が存在するが、これまで観察したところでは、生まれたときには既に皮膚に固定した模様になっており、反応拡散波特有の動的な性質は示さない。しかし、いくつかの例では実際に動く模様が観察できる。我々は、三重大学の動物実験施設で分離されたTWマウスが、反応拡散の波と同じ動態を示す皮膚模様を持つことを見出した。

このマウスは、毛を作るために必要な遺伝子 (Whm遺伝子) に欠損があり、毛根の形成が途中で止まってしまう。毛根の形成に失敗した毛胞細胞は、不完全な毛根を皮膚外に放出して、休止状態に入ることなく、再び1から毛根形成を始めるので、約30日周期で延々と毛形成の過程を繰り返すのである。しかも、毛形成の初期に作られる色素でその部分の皮膚が黒くなるので、外から見るだけで振動の位相が一目両全でわかる。BZマウスの毛根形成サイクルの振動は、常にわきの下あたりから始まり、全ての方向にリング状に広がっていく。肩から体側に広がった波は首で二つに分かれる。背中に進んだ波は、背中の中心で左右の波が合体し、首を頭部へ向かう波と、腰を尾部に進む波を形成する。首からほほに伝わった波は、これも顔の中心で左右が合体し、複雑なパターンを作る。尾部に進んだ波は最後に尾に達し、次第に薄くなりながらも、3重か4重のリングを作る。この変化は、

BZ反応と呼ばれる反応拡散の原理で出来る移動波と同じである。



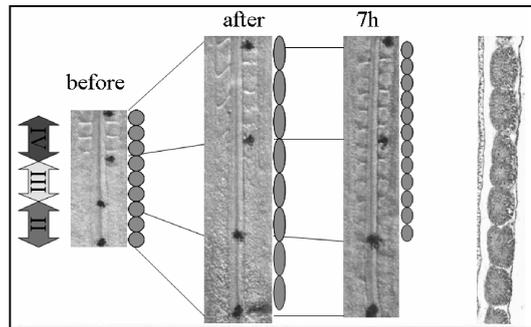
この移動波を作るためには、系が振動を起こすこと、蠢動状態を隣に伝えられることが必須である。系の振動は、毛根の周期性が、伝達物質に関してはSHHが働いていると考えられる。

論文5

4) 形態形成に反応拡散原理が働いていることの証明

脊椎動物の体節形成現象に反応拡散原理が使われていることを証明するために、発生過程の胚に物理的な摂動を加え、再生の様子を解析した。

体節形成時 (6~7体節期) の胚を、物理的に引っ張り伸ばす。未分化の前体節中はいよいよ引き伸ばされるが、直ぐに修復され、体節形成を継続する。出来る体節は、もし未分化中胚葉に位置情報がセットされていれば長くなり、後から位置情報が作られるのであれば正常の長さの物が出来るはずである。結果は後者であり、大切形成に関して、体節の長さを自発的に決めることの出来る仕組みが存在することがわかった。この結果は、反応拡散説で説明するのに都合が良いが、現在主流となっているclock-and-wavefront modelでもある程度説明できる。また、実験に伴う技術的な難しさもあり、例数を簡単に増やせないこともあって、中断したままになっている。しかし、体節形成は脊椎動物の形態形成でも最重要なイベントであること、現在定説となっているclock-and-wavefront modelには、論理的な欠陥がある事などから、反応拡散モデルが適応できる可能性は極めて高いと考えられ、ゼブラの縞模様が一段落したら、再挑戦したいと考えている。



<国内外での成果の位置づけ>

我々のグループは、1995年に魚類の皮膚模様がチューリング波であることを証明して以来、一貫して模様形成の原理が波を起こす反応の動的なメカニズムによることを示してきた。海外の他のグループも、模様形成には関心を示しているが、クラシカルな視点で関与遺伝子を探しているのみで、我々のように全てを説明できるモデルを提出するにいたっていない

哺乳動物におけるBZパターン様の縞模様に関しては、特に物理学関係者からの注目が目立った。この論文は

PNASの表紙にとりあげられ、Nature誌のnews欄でも紹介された。また、この論文発表後は、ゴードンカンファレンスなど、海外の学会より招待講演の依頼が相次いだ。また、本研究は、と嘘あまり意識していなかったが、「システムバイオロジー」の実際的な応用という面を持つ。システムバイオロジーは、複雑な生命現象を理解する上での、ひとつの方法論であるが、現実の生命現象があまりにも複雑すぎるため、実際にはその求めるレベルに達していないものが多い。本研究計画のような、複雑ではあるが程度数理的に扱いやすい系を用いるやり方は、システムバイオロジーの成功例のひとつとして認識され、最近はその方面の国際学会からの招待も多い。(GIW2005, Plenary lecture)

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

①反応拡散原理の分子レベルの解明が完成しなかった。ひとつにはクローニングが順調に進まなかったことがあるが、もっと本質的な問題は、各因子（遺伝子）の活性を調べるための*in vitro*のアッセイ系が存在しないことである。クローニングについては、研究機関中の後半に、ゲノム配列のより正確なデータベースが公開になったことである程度計算どおりに進めることが出来たが、ネットワークの全貌を知るには、まだ5～6個の遺伝子を特定しなければならないだろう。

②ひとつの問題は、模様変異の突然変異が意外と少ないことである。何らかの方法で、模様関連遺伝子を新たにスクリーニングする必要がある

③クローニングによって特定できた遺伝子が、Kチャンネルであったことは、想定外であった。当初期待していたのは、タンパク性のリガンドか受容体であり、それにより分子間ネットワークが描けることを予期していたが、イオンチャンネルになると、シグナル伝達の手段を特定することがやや難しくなる。他の模様変異遺伝子もクローニングしてみないと伝達経路を特定するのはむずかしいかもしれない。

④ニワトリの体節形成に関して、外力への修正作用を調べることにより反応拡散原理が働いている証拠を得ようとした。ある程度の修正作用は見つけることが出来たが、十分に説得力のあるものが得られなかった。今後、ターゲットを変えて、再チャレンジしたい。

〈今後の課題〉

①模様変異を起こすミュータントは現在までにわずか5種ほど発見されているに過ぎず、実際にははるかに多くの遺伝子が関与しているはずである。これは、今までに行われたスクリーニングで、模様のような成魚でしか観察できない変異は見落とされがちであったことが大きく影響している。そのため、我々はトランスポゾンを利用したジレントラップシステムを使い、トランスポゾン進入部位付近の遺伝子を温度依存的に活性化することにより、優性に模様変異を作り出すシステムを作った。このシステムを利用することにより出来るだけ多くの模様変異遺伝子の同定をおこなう。

②今までの解析では、主に*in vivo*の系を用いていたが、今後分子・細胞間の相互作用を特定していくためには、*in vitro*の系を構築していくことが重要である。そのためには、色素細胞の分離、培養技術を確立することが必要である。また、*in vitro*系が確立できれば、DNAチップなどで特定した、各色素細胞特異的に発現する遺伝子・遺伝子産物を培養系に加えることにより、よりの確な反応経路の同定が行えるだろう。

③模様以外の形態形成で、反応拡散の原理が働いていることを証明することが必要である。そのためには、系（形態）の動的な性質が、RD波としての性質を持つかどうかを調べる必要がある。実験・理論（数理計算）の両方がやりやすい生命現象という観点から。現在、昆虫の翅脈形成、クラゲの水管形成などの系に絞り、パターン形成の過程を調べている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0305141814 Shoji, S., Iwasa, Y., Mochizuki, A. and Kondo, S.' Directionality of stripe formed by anisotropic reaction-diffusion models.' J. Theor. Biol. 214, 549-561(2002)
2. 0305141756 Kondo, S.' The reaction-diffusion system: a mechanism for autonomous pattern formation in the animal skin.' Origin of the directionality in the fish stripe pattern.' DEVELOPMENTAL DYNAMICS. 226, 627-633(2003)
3. 0403301247 Masashi, H., Kei-ichiro, N., Takaaki, K., Yosaburo, S., and Kondo, S' Pigment cell organization in the gypodermis of zebrafish' DEVELOPMENTAL DYNAMICS. 227, 497-503(2003)
4. 0403301253 Noboru Suzuki, Masashi Hirata, and Kondo, S' Traveling stripes on the skin of a mutant mouse' PNAS 100, 9680-9685(2003)
5. 0602101641 Shoji, H., Iwasa, Y., and Kondo, S.' Stripes, spots, or reversed spots in two-dimensional Turing systems.' J Theor Biol. Oct 7;224(3):339-50(2003)
6. 0601311305 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)
7. 0601311331 Kondo, s.' cell-ce-Interaction Network That Generates the Skin Pattern of animal' Genome Informatics 2005, vol.16, No.2, 287-291(2005)