

「遺伝と変化」研究領域延長研究者 事後評価報告書

- 平成 13 年度終了研究課題 -

領域総括 豊島 久真男

1. 研究領域の概要

種や個体の同一性を維持する「遺伝」の機能と、細胞、組織、器官、個体あるいは種における形態や生理的機能の多様性を生み出す「変化」の機能に着目するものである。具体的には、遺伝子の転写、細胞の複製、組織や器官の再生、個体の生殖などに代表される複製に関する研究、及び、突然変異、ウイルスの迅速な自発的变化機構、発がん代表される脱分化、免疫応答、遺伝子の選択的発現機構、細胞の組織や器官への分化などに代表される変化に関する研究を含む。

2. 延長研究課題・延長研究者名

| 研究者名 (参加形態) | 研究課題名 (研究実施場所) | 現職 (延長時所属) | 研究費* (百万円) |
|----------------|--------------------------------------|--|---------------|
| 近藤 滋 (兼任) | 動物の体に発生する化学反応の波：反応拡散波 (徳島大学総合科学部) | 理化学研究所 発生再生科学総合研究センター 位置情報研究チーム チームリーダー (徳島大学総合科学部 教授) | 10 |
| 西脇 清二 (兼任) | 細胞の移動方向を調節する遺伝子 (株)日本電気基礎研究所) | 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 細胞移動研究チーム チームリーダー (株)日本電気基礎研究所 主任研究員) | 10 |

*：研究費には研究者の人件費は含まず。

3. 延長研究について

事後評価を行って、領域総括から「3年間の研究結果を踏まえた上で、さらに一定期間の研究を行えば一層の展開が期待され、我が国の科学技術に大きな貢献をされると考えられる」との考察(別紙8)をもとに、事後評価の対象となった研究課題の一部について、研究期間の延長を試行的に行うこととした。具体的には、領域総括が必要に応じ領域アドバイザーの協力を得て選考を行い、事業団が引き続き研究を支援することとした。これらの課題についてはあらかじめ具体的な研究目標を明確化することとし、追加する研究期間は最長2年間とした。

4. 研究実施期間

平成 12 年 3 月～平成 14 年 2 月

5. 研究状況

各研究者は、各自研究を実施するとともに、関連する進行中の研究領域「素過程と連携」の領域会議、さきがけの研究報告会に積極的に参加し、研究進捗状況の報告と討論、研究交流を図るよう努めた。

6. 評価の手続き

領域総括が各研究者からの報告・自己評価を基に必要に応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。

(評価の流れ)

| | |
|---------------|---------------|
| 平成 14 年 2 月 | 研究終了 |
| 平成 14 年 4 月まで | 研究報告書及び自己評価提出 |
| 平成 14 年 6 月 | 領域総括等による評価 |

7. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じた新たな知見の取得など、研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

8. 研究結果

「遺伝と変化」領域の第3期研究者は、非常にユニークな研究が多かったが、その中でも特に新しい領域を目指しながら、個人で研究を進めている2人を延長対象に選んだ。幸い2人共その後の研究は順調に展開した。偶然にも2人共、発生に関連した研究課題であったが、その成果が発生学研究者から認められ、理化学研究所 発生・再生科学研究所センターの発足にあたり、厳しい競争に勝ち残ってチームリーダーとして採用され、さらに研究に弾みがつくものと期待している。ユニークな研究者の採用を心掛けた「さきがけ」の中でも、特にユニークな方だったので、これからの展開を見守りたい。

9. 評価者

領域総括 豊島 久真男 住友病院 院長

領域アドバイザー

| | |
|--------|----------------------------------|
| 江口 吾朗 | 熊本大学学長 |
| 喜多村 直実 | 東京工業大学大学院 生命理工学研究科 教授 |
| 谷口 維紹 | 東京大学大学院 医学系研究科 教授 |
| 中西 重忠 | 京都大学大学院 生命科学研究科 教授 |
| 廣近 洋彦 | 農業生物資源研究所 分子遺伝研究グループ 遺伝子機能研究チーム長 |
| 堀田 凱樹 | 国立遺伝学研究所 所長 |
| 松本 邦弘 | 名古屋大学大学院理学研究科 教授 |

(参考)

(1) 外部発表件数

| | 国内 | 国際 | 計 |
|-----|----|----|----|
| 論文 | 2 | 5 | 7 |
| 口頭 | 9 | 2 | 11 |
| その他 | 0 | 0 | 0 |
| 合計 | 11 | 7 | 18 |

(2) 特許出願件数

| 国内 | 外国 | 計 |
|----|----|---|
| 0 | 0 | 0 |

(3) 受賞等

国内 1 件

(4) 招待講演

なし

研究課題別研究評価

1. 研究課題名：

動物の体に発生する化学反応の波：反応拡散波

2. 研究者名：

近藤 滋

3. 研究のねらい：

さきがけ研究 21 における研究期間（97年10月から3カ年）で、（1）魚類の模様は反応拡散波であること、（2）魚類以外の下等脊椎動物（爬虫類、両生類）でも同様の波が観察されること、（3）突然変異による模様変化が、反応拡散方程式の定数の違いで説明できること、を証明した。これらの結果は、生物の模様形成のために反応拡散のメカニズムが一般的に働いていることを示す点で重要ではあるが、反面、模様変化の観察と数理解析からの結論なので、分子レベルの実態に迫ることができていない。また、チューリングの理論のもっと重要な部分である「胚発生における波の存在」については手がつけられていない。

そのため、延長期間では、

（1）皮膚模様形成の分子メカニズムの解明

（2）形態形成期に反応拡散波が位置情報形成に働いていることの証明

に、直接つながる成果を出すことを目的とし計画を立てた。

4. 研究結果：

（1a）模様形成の場としての皮膚構造

ゼブラフィッシュの模様突然変異の遺伝子は、ゼブラゲノムの中心的な機関であるワシントン大のグループによりいくつか同定されている。そのほとんどが色素細胞の分化に関するものであった。しかし、それらの分子的な情報だけでは、波形成のメカニズムを理解（推定）することはほとんどできていない。特に「皮膚のどの細胞が模様を作っているか」についての情報が非常に決定的なものがないことが、分子メカニズムの理解を妨げている。今のところ、色素細胞のなかでメラノサイトがもっともパターン形成に重要と推測されている。その点を確認するためにキメラ実験を行った。模様の違う変異種（縞、斑点）と色素細胞の色（野生種、アルビノ）のさまざまな組み合わせでキメラを作ると、意外にもパターンと色素細胞の由来が一致しないことがわかった。これは予測に反して色素細胞（メラノサイト）がパターン形成に関与していないことを強く示唆している。メラノサイトがパターン形成の主体でないとすると、皮膚内の別の細胞が重要ということになるが、ゼブラフィッシュにおいては、皮膚の構造、存在する細胞の種類、組成、存在様態などが不十分な解析しかされていなかった。そのため基本に立ち戻り、皮膚構造と模様との関係について、電子顕微鏡を使った詳細な組織解析を行なった。またメラノサイトを位置情報のセンサーとして使うことにより、皮膚のどの層が位置情報を保持しているかを調べた。その結果、位置情報は色素細胞層だけでなく、（1）表層に近い真皮のコラーゲン層にも存在すること（2）この層に存在する繊維芽細胞が樹状突起を伸ばし、互いに連結していること、がわかった。現在この細胞がパターン形成の本体であるかどうかについて、引き続き検討中である。（論文 1）

（1b）皮膚構造と縞の縦横を決める皮膚構造

通常の反応拡散系では、縞模様を作ることではできても、その方向を決めることはできない。方向

を決めるためには、なにか追加因子が必要である。それが何かを推定するために、縞の方向が異なる近縁2種のキンチャクダイのパターン形成を経時的に観察し、シミュレーションによりその原因を探った。その結果、反応拡散の基質の拡散速度に方向による偏差（拡散の異方性）があるときに非常に似たパターン変異をすることがわかった。この結果から皮膚のなかで拡散に異方性を生む構造を探すと、すぐに「鱗」が見つかる。鱗は真皮層に突き刺さった方向性のある構造であるから、当然物質の拡散にも影響を与えると考えられる。また、鱗はゼブラフィッシュの色素細胞がある基底層までは達していないから、真皮層の上層には影響を与えても、ゼブラフィッシュで色素細胞のある基底層には影響を与えないはずである。このことから、位置情報が真皮上層で発生すると考えられ、(1a)実験の結果と矛盾しない。(論文2)

(1c) マウスにおける「移動する縞模様」形成

物理における波には「定常波」と「移動波」があり、この2つは境界条件の違いにより、容易に移り変わる場合が多い。反応拡散系による波も同じである。そうすると、皮膚の縞模様が反応拡散波であれば、理論的には「移動波」も存在するはずである。なぜ移動する波を持った生物がないのか不思議に思っていたが、偶然にも移動する縞模様を持つ変異マウスを発見することができた。このマウスは Whn 遺伝子に変異を持ち、体毛の形成過程に異常がある。毛形成の初期に毛が脱落してしまうため、毛形成周期のうち短い期間だけ毛胞内にたまったメラニンが黒く見える。皮膚形成は同時に起きるのではないため、形成時期のパターンが移動波として観察されるのである。そのダイナミクスは、2次元の非平衡反応の代表的なものである BZ 波と非常によく似ており、反応拡散系のシミュレーションでも簡単に再現できた。

一見、毛形成のサイクル自身が「波」を作っているように思われるが実はそうではなく、毛形成が「波」にコントロールされている可能性が高い。その理由は、他のげっ歯類で、まったく同じダイナミクスのメラニン合成活性の「波」が毛形成とは関係なく観察されたからである。

シミュレーションでは、定常波と移動波は基質の拡散速度の違いのみで簡単にスイッチできることがわかっており、このマウスで見つかった皮膚の移動波が、魚の定常波を作るメカニズムと基本的に同じである可能性が高い。

もしそうであれば、今後関連する分子の同定はマウスを使って行うことも可能であり、マウスの遺伝学的知識の蓄積や、研究者の数が今後の分子機構の同定に、非常に有利に働くものと期待している。

(2) にわたりの体節形成の自律性

胚発生時に反応拡散波が働いている証拠を得るために、鶏の体節形成に注目し、体節の等間隔性が反応拡散波と関係しているかどうかを調べた。

具体的には、体節形成期の胚を物理的に伸張させた状態で固定し、その後どのような変化をするかを観察した。その結果、胚を伸張させて場合、伸びた体節ができるのではなく、正常な大きさの体節が数多くできることがわかった。この結果は、体軸の基本単位である体節の等間隔性が、全体的な座標によって決められているのではなく、ローカルな相互作用によって自律的に発生していることを示しており、またこの結果は反応拡散波が体節の位置情報を決められていると考え、非常にうまく説明できる。

5. 自己評価

この延長期間での研究は、さきがけ研究 21 における研究期間に比べ得るものが大きかったように思う。それは運によるところも大きいも知れないが、小さいとはいえグループで研究を進められるようになったおかげだと思う。理論だけをやっているのなら、一人でも可能かも知れないが、実

験は時間的労働的な投資が大きいために人数の効果がはっきりと現れることを実感した。現時点では反応拡散系をテーマに実験を主体に研究しているグループはほとんどないが、今後マウスの系が注目されればもっと多くの人が興味を持つようになり、分子メカニズムの解明も進むのではないかと期待している。その意味でもマウスの発見が最大の成果であったと思う。

6. 領域総括の見解：

近藤研究者の取組んだ動物のパターン形成はチューリングの理論があったとはいえ、現実には全く手のつけられていない新しい分野であった。近藤研究者は研究活動で評価の高い研究室の中心的研究者から「さきがけ」を足場として敢えて未開拓分野に研究の目標を移した。「さきがけ」の3年間で数種の動物においてチューリングの理論を裏付けるパターン形式の過程と、突然変異による模様の変化を見出した。これで一応研究対象としての重要性と面白さは打出せたものの、第三者を納得させる為には分子レベルにおける実態を明らかにする必要がある。そのため2年間の期間延長を行い、実験系の開発を行ってきた。その成果が次第に出はじめ、実験を有効に進め得る系の開発を行うと共に、外部よりもその独創性の高い研究に対する高い評価を得て、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センターの位置情報研究チームのチームリーダーとして採用され、今後更なる発展が十分に期待出来る状態となった。

7. 主な論文等：

論文

- (1) The reaction-diffusion system: a mechanism for autonomous pattern formation in the animal skin
Shigeru kondo
Genes and cells, in press
- (2) Directionality of stripe formed by anisotropic diffusion.
Hiroto Shoji, Atsuhiko Mochizuki, You Iwasa and Shigeru Kondo
Journal of Theoretical Biology, 2002,214,549-561

国際学会

近藤滋 " the first international symposium on molecular synchronization for design of new materials system " (Tokyo,JPN), 2000、9月11日

" Turing patterns on the fish: the relationship between the patterns and gene activity "

近藤滋、international meeting for developmental biology、2001,july 8th kyoto

" reaction-diffusion mechanism in the somite formation "

(特許、受賞、招待講演等)

学会等 (招待)

- (1) 近藤滋、日本発生学会ワークショップ (高知大学)、2000年5月24日
「自発的パターン形成の数理と実験」
- (2) 近藤滋、日本生化学会シンポジウム (横浜) 2000年10月12日
「複雑な現象を理解するための構成的アプローチ」
- (3) 近藤滋、日本分子生物学会、2000年12月16日 神戸
「高次生命現象を、分子生物学でどこまで理解可能か」

- (4) 近藤滋、日本人類遺伝学会 2000年11月24日 アクロス福岡
「動物の携帯形成にかかわる動的メカニズムとその遺伝子制御」
- (5) 近藤滋、電顕皮膚科学会 2000年9月28日 アクロス福岡
「チューリング波と形態形成の位置情報」
- (6) 近藤滋、細胞生物学会 2000年11月28日 アクロス福岡
「動物の体に位置情報を作り出すメカニズム」
- (7) 近藤滋、奈良分節会議、2001年7月14日
体節形成における反応拡散メカニズム
- (8) 尾崎淳、近藤滋、時間生物学会シンポジウム、2001年11月14日
ニワトリ体節形成と反応拡散系
- (9) 近藤滋、ゲノムサイエンス講演会、2001年12月1日、東京日本未来館
発生における自発的パターン形成

研究課題別研究評価

1. 研究課題名：

細胞移動を制御する形態形成場遺伝子の同定

2. 研究者名：

西脇清二

3. 研究のねらい：

3年間のさきがけ研究では線虫の生殖巣先端のリーダー細胞 (distal tip cell: DTC) の移動に関する mig-17 遺伝子の分子解析を行い、その挙動が次第に明らかになってきた。MIG-17 タンパク質は分泌型メタロプロテアーゼであり、基底膜に局在することにより器官形成過程での細胞移動を調節していると考えられる。MIG-17 の働きや相互作用分子を明らかにするために、mig-17 と類似の DTC 移動異常を示す変異体の原因遺伝子の解析と mig-17 抑圧変異体の解析を進める。

4. 研究結果：

1) mig-23 遺伝子の解析

mig-23 遺伝子は apyrase family に属する 2 回膜貫通タンパク質をコードする。MIG-23 はゴルジでの分泌タンパク質の糖鎖付加に関する Golgi UDPase に最も相同性が高い。遺伝的モザイク解析および組織特異的プロモーターを用いた解析から、正常な DTC 移動には mig-23 が筋肉細胞で発現する必要があることが分かった。また mig-23 変異体では実際に UDPase 活性が低下していた。さらに mig-23 cDNA を酵母の apyrase 変異体で発現させたところ、変異体の凝集表現型を部分的に相補した。これらの結果から MIG-23 は活性のある apyrase であると結論された。mig-17 は mig-23 と類似の表現型を示すこと、弱いアレル同士の組み合わせで明らかな増強効果が見られること、および MIG-17 と MIG-23 はともに筋肉細胞で発現することから、mig-23 変異体では MIG-17 の糖鎖付加が異常となっている可能性が考えられる。種々のレクチンをプローブとした解析の結果、野生型と mig-23 変異体のバックグラウンドで MIG-17 分子の糖鎖に違いがあることが分かった。これらのことから mig-23 変異体での DTC 移動異常は MIG-17 の糖鎖修飾の異常に起因する可能性が考えられる。

2) mig-29 遺伝子の解析

mig-29 遺伝子を SNP によるマッピングとトランスポゾンタギング法によりクローニングした。MIG-29 タンパク質はヒトおよび酵母の SEC34 と高い相同性がある。SEC34 は ER から Golgi あるいは Golgi 内での小胞輸送に必要なタンパク質であり、タンパク質の分泌に働く。mig-29 と mig-17 変異体の DTC 移動異常の相同性は MIG-29 が MIG-17 の分泌に関する可能性を示唆する。今後、MIG-29 が実際に Golgi に存在するのか、mig-29 変異体で MIG-17 の分泌に異常があるのかなどをさらに検討して行く。

3) mig-22 遺伝子の解析

mig-22 遺伝子を SNP によるマッピングとインジェクションレスキューによりクローニングした。予想される MIG-22 タンパク質は N 末端に分泌シグナルと考えられる配列を持つ新規タンパク質である。ホモロジー検索の結果、MIG-22 と相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子がヒトのゲノム中にもあることが分かった。MIG-22 は種間で保存されたタンパク質であるが、今回これが細胞移動に必要であることが初めて示された。今後、本タンパク質の組織分布、相互作用分子の探索などを行っていく方針である。

4) mig-17 抑圧変異体の分離

mig-17 と相互作用する分子を同定するためにナンセンス変異である mig-17(k174)から EMS 処理により抑圧変異体を分離した。10 株の抑圧変異体は少なくとも 6 種類の遺伝子に分類された。これらは mig-17 ナンセンス変異を抑圧するものとして分離されたが、複数のミスセンス変異も抑圧することから単純なナンセンスサプレッサーではなく、おそらく MIG-17 の下流かあるいは並列の経路に影響し、MIG-17 の必要性をバイパスすると思われる。興味深いことに mig-17 抑圧変異のいくつかは mig-17 と遺伝的相互作用がある mig-6 変異をも抑圧できることが分かった。この結果は mig-6 と mig-17 が同じ経路で働くことを強く示唆している。mig-6 遺伝子はカナダのグループによりクローニングされ、進化的に保存された基底膜タンパク質をコードすることが分かっている。

5. 自己評価：

2 年間の延長期間に 2 個の細胞移動遺伝子のクローニングに成功し、また抑圧変異についても分離と初期解析を行うことができた。現時点でさらに 2 個の新規遺伝子がクローニングに近づいている。当初の計画をほぼ達成できたと思っている。非常に幸いであったことは、3 年間のさきがけ研究の成果が延長期間に入ってからではあるが Science 紙に掲載され、理化学研究所に職を得て研究室を主催することができたことである。遺伝子クローニングは手間と時間のかかる仕事であり、一人でやっているかぎり限界があった。細胞移動メカニズムを理解するという意味ではまだまだ研究が不十分であり、今後もさらに精力的に分子レベルでの解析を進めていかなければならないと考えている。

6. 領域総括の見解：

西脇研究者の研究は動物体内における細胞移動を制御し、形態形成を行う遺伝子の解析で、線虫を用い、生殖巣形成のリーダー細胞の解析を進めていた。「さきがけ」期間には線虫変異株を用いての解析から、いくつかの制御遺伝子の候補を見出したが、その中の mig 17 を解析し、分泌型のメタロプロテアーゼであることを明らかにした。他の候補遺伝子の解析の重要性も認められた為、延長期間に入ったが、mig 23 mig 29 mig 22 等、順調に解析が進み、mig 17 とも機能上有機に関連するものであることも次第に明らかにしつつある。これらの成果が認められ、第 9 回化学、バイオつくば賞を受賞すると共に、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センターの細胞移動研究チームのチームリーダーに採用され、更なる進展を見せつつある。

7. 主な論文等：

論文

- (1) Nishiwaki, K., Hisamoto, N., and Matsumoto, K. (2000). A metalloprotease disintegrin that controls cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 288: 2205-2208.
- (2) Suzuki, N., Buechner, M., Nishiwaki, K., Hall, D. H., Nakanishi, H., Takai, Y., Hisamoto, N. and Matsumoto, K. (2001). A putative GDP-GTP exchange factor is required for development of the excretory cell in *C. elegans*. *EMBO Reports* 21: 530-535.
- (3) Gumienny, T. L., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A.-C., Kinchen, J. M., Haney, L. B., Nishiwaki, K., Walk, S. F., Francis, R., Schedl, Y. Q., Van Aelst, L., Hengartner, M. O. and Ravichandran, K. S. (2001). CED-12/ELMO, A novel member of the CRKII/DOCK180/RAC pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* 107: 27-41.
- (4) 西脇清二、久本直毅、松本邦弘 (2000). ADAM プロテアーゼによる細胞移動の制御 *実験医学* 18:1825-1827.

(5) 西脇清二 (2001). 分泌型 ADAM ファミリーによる細胞移動と形態形成の制御 実験医学
19: 458-462.

(特許、受賞、招待講演等)

受賞

第9回化学・バイオつくば賞「動物の器官形成を制御する新しいタンパク質分解酵素の発見」