

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命動態の理解と制御のための
基盤技術の創出」
研究課題「動物の形態形成の分子メカニズムの探
求と形を操る技術の創出」

研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者：近藤滋
（大阪大学大学院
生命機能研究科・教授）

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

研究の目的

本研究チームの目的は、生物のパターン形成原理を明らかにすることである。これまで近藤の研究グループは、皮膚模様を研究対象にして、皮膚に生じる2次元パターンが、チューリングの反応拡散原理による、という作業仮説の下に研究を進め、理論的、さらに分子レベルの解明を行い、成果を上げてきた。今回のCRESTのプロジェクトでは、模様研究の完成を目指すとともに、2次元パターンから3次元パターン理解へ発展させるため、骨の3D形態を新たな研究対象として選び、その3次元形態形成原理の解明を目指した。

研究チーム構成

大阪大学の近藤グループがメインに実験、理論計算を行い、東北大学の小椋グループは、研究の遂行に必要な技術開発を行う体制でスタートした。

研究経緯と成果

- 1) **模様に関しては**、実験から導かれた現実のメカニズムが、チューリングの理論の枠から外れることが問題となっていたため、それを理論的に解決することを目指した。チューリングの理論は2種類の拡散性分子を使っており、それらの拡散速度の違いが、パターン形成のコアになる。しかし実験から、細胞間のシグナル伝達には、拡散性の因子ではなく細胞突起が使われており、突起の長さが拡散の効果を代理していることが明らかになり、それを取り入れた理論の構築が必要であった。そこで、空間相互作用を、特定のシグナル伝達機構ではなく、距離と相互作用の強さのみで表現するカーネルモデルを構築するに至った。(2016年公開) このモデルは、パターン形成のためのいろいろな数理モデルを統合したメタモデルとして使うことができ、現在、それぞれの実験系ごとに提案され、やや乱立気味の数理モデルを統合し、パターン形成の基本原則を一つの考えのもとに統一することを目指し、現在、数学者との共同作業が進行中である。
- 2) **骨の3D形態に関しては**、研究開始時には、皮膚模様と同じ原理で起きているという作業仮説を持っていたが、実験結果から、変更を余儀なくされた。当初は、骨を作る骨芽細胞と、骨を溶かす破骨細胞の2種類が、骨の表面にチューリングの原理でパターンを作り、それが3D形態につながる、という作業仮説を持っていたが、実験系として持っていたゼブラフィッシュでは①骨形成時に破骨細胞の数が極めて少ないこと、②骨の形態変異の遺伝子を調べたところ、「力のセンサー」として働くと考えられているコネクシンのヘミチャンネルだったこと、から、やや方針を転換し、新たに、2つの角度から3D形態形成の原理を求めることとなった。結果的にはそれがうまく進み、当初のチューリング理論の流用よりも、斬新で独自性の高いモデルの構築につながった。一つ目は、骨の外形を再現する、計算理論である。骨の内部にあるスポンジ状の骨の構造が骨にかかる応力と対応(wolffの法則)しており、構造最適化という物理計算手法で再現できることはよく知られている。しかし、骨の外形に対しては説明がなかった。今回、ゼブラフィッシュの脊椎の側部構造を対象にし、従来の構造最適化に、成長を加味しつつ力をかける、という改良を加えることで、外形の再現に成功した。これにより、骨内部の微細構造だけでなく、骨の外形についても統一的に力との関係で説明する可能性を開いた。二つ目は、細胞と結晶性の軟骨の相互作用が3D形態を作る、という新しいモデルである。ゼブラフィッシュのひれには、アクチノトリアクというファイバー状のコラーゲン結晶が存在し、それが束ねられ、その上にリン酸カルシウムが沈着することで骨ができる。アクチノトリアクをどこにどうやって並べるかが、骨の形態の基礎になるのである。したがって、細胞がどうやってアクチノトリアクを作り、並べるのが、形態形成原理そのものとなる。実験では、アク

チノトリキア形成に関係しているとされていた2種類の細胞の一つを単離し、インビトロでアクチノトリキアを産生させることに成功しており、また、複数の細胞が、一本のアクチノトリキアを抱え込んで直列する様子や、アクチノトリキアを細胞突起で引き寄せ並べる様子も徐々に明らかになっている。比喩的に表現すると、建築作業員が規格化された材料を組み上げて「建築」しているようなものである。このイメージに近い細胞挙動は、海綿動物でも見つかっており、今後、形態形成の新たな原理として認知されていくのではないかと考えている。

- 3) 細胞を外部から操る手法の開発に関しては、物理的な手法は小椋グループで、工学的な手法は近藤グループで行った。細胞による空間パターンが、細胞の挙動から生まれる、という考え方に関しては、上記の方向転換後も変更はなく、それを実験的に証明するためにはこれらの手法が重要になる。また、これらの手法は、本研究テーマと切り離しても、産業的に重要であるため、進める価値があると考えた。成果としては、GUV liposome による細胞内への直接物体導入法、ミトコンドリア移植(ヒトミトコンドリアを持つマウス個体の作出への基礎技術)、マッシュマロゲルの3D組織作製への応用を小椋グループで、近藤グループでは、光感受性チャネルによる非侵襲的模様変化、骨形態変化の誘導に成功している。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. パターン形成の理論を統合するKTモデルの提唱

概要:

空間相互作用を、特定のシグナル伝達機構ではなく、距離と相互作用の強さのみで表現するカーネルモデルを構築するに至った。(2016年公開) このモデルは、パターン形成のためのいろいろな数理モデルを統合したメタモデルとして使うことができ、現在、それぞれの実験系ごとに提案され、やや乱立気味の数理モデルを統合し、パターン形成の基本原則を一つの考えのもとに統一することを目指し、現在、数学者との共同作業が進行中である。

2. 構造最適化による骨の外形の再現手法の確立

概要:

ゼブラフィッシュの脊椎の側部構造を対象にし、従来の構造最適化に、成長を加味しつつ力かける、という改良を加えることで、外形の再現に成功した。これにより、骨内部の微細構造だけでなく、骨の外形に関しても統一的に力との関係で説明する可能性を開いた。

3. コラーゲン結晶と細胞の相互作用による骨形態形成モデル

概要:

ゼブラフィッシュのひれの細胞は、アクチノトリキアというファイバー状のコラーゲン結晶が存在し、その上にリン酸カルシウムが沈着することで骨ができる。細胞がどうやってアクチノトリキアを作り、並べるのかが、形態形成原理そのものとなる。実験では、アクチノトリキア形成細胞を単離し、インビトロでアクチノトリキアを産生させることに成功しており、また、複数の細胞が、一本のアクチノトリキアを抱え込んで直列する様子や、アクチノトリキアを細胞突起で引き寄せ並べる様子も徐々に明らかになっている。比喩的に表現すると、建築作業員が規格化された部品をくみ上げて「建築」しているようなものである。このイメージに近い細胞挙動は、海綿動物でも見つかっており、今後、形態形成の新たな原理として認知されていくのではないかと考えている。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. GUV liposome による細胞内への直接物体導入法

概要:

内部に物体を封入した GUV liposome を作り、これを細胞と一過的に融合させることで、GUV 内の物体を直接、生きた細胞内へ入れることが可能となった(特許取得済)。電氣的融合条件、GUV の組成改良によって、現時点で、最大直径 2.8 ミクロンの物体を、培養皿に付着したままの生きた細胞に導入することが可能となっている。しかも、GUV にプラスミド、タンパク質も封入し、物体と同時に遺伝子発現、タンパク質の導入もできる。

2. ミトコンドリア移植(ヒトミトコンドリアを持つマウス個体の作出への基礎技術)

概要:

GUV liposome による物体導入法の深化によって、例えば、マウスミトコンドリアをヒト細胞へ導入することが可能となった。これまで、マウスの組織から精製したミトコンドリアを Hela 細胞へ移植し、マウスとヒトミトコンドリアが共存する状態を作ることできるようになった。現在、1) 一方のミトコンドリア DNA を除去する方法、2) ミトコンドリアを持たない細胞(ρゼロ細胞)を効率良く作製する方法、の二つの技術確立を行っている。このどちらかが確立すると、ヒトミトコンドリアを持つマウス細胞が作出できる。これを元に、iPS 細胞を作れば、個体作製へと移行できる。

3. マッシュマロゲルの 3D 組織作製への応用

概要:

マッシュマロゲル(シリカをベースとした伸縮性の多孔性ゲル)に細胞を注入し、一定期間維持することができるようになった。用いる細胞によって、ポアサイズを調整し、ゲル内への注入方法、培養条件を検討する必要があるが、C2C12 細胞、MLO-Y4(マウス骨細胞様細胞株)、MIN6(インスリン分泌インスリノーマ細胞株)の 3 種を用いて、一定期間、3D 培養ができるようになり、加えて、圧縮などの力学刺激を加えることも可能となった。特に、MIN6 を使った実験では、正常膵頭細胞のような細胞塊の形成と、血糖に反応したインスリン分泌を観察できた。これまで、MIN6 細胞を用いた 3D 組織構築で、このような血糖応答性インスリン分泌能を示した例は、これまでにない、マッシュマロゲルの有用性を確認することとなった。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 近藤グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
近藤 滋	大阪大学大学院生命機能研究科	教授	H24.10～
渡邊 正勝	同上	准教授	H24.10～
宮澤 清太	同上	助教	H24.10～
荒巻 敏寛	同上	特任研究員	H25.4～
黒田 純平	同上	特任研究員	H25.4～
山中 洋昭	同上	特任研究員	H27.4～H27.7
山中 洋昭	同上	特任研究員	H28.4～
臼居 優	同上	D3～	H29.4～
坂下 美咲	同上	D2～	H28.7～
丸田 尚道	同上	D2～	H29.4～
谷本 瞳	同上	技術補佐員	H27.8～
川本 敦史	株式会社豊田中央研究所	主任研究員	H27.4～
野村 壮史	株式会社豊田中央研究所	主任研究員	H27.4～
杉森 唯益	株式会社豊田中央研究所	研究員	H27.4～

研究項目

- ・ 皮膚パターン形成原理の分子レベルでの解明
- ・ Turing の反応拡散原理の一般化
- ・ 骨形態変異遺伝子のクローニング
- ・ 骨3D 形態モデル
- ・ アクチノトリキアを基にした、新しい形態形成の原理
- ・ 鱗骨を等間隔に分節させる機構
- ・ 細胞の自律的な回転現象の発見
- ・ アンモナイト隔壁形成の3D 形態モデル

② 小椋グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
小椋 利彦	東北大学加齢医学研究所	教授	H24.10～
宮坂 恒太	同上	助教	H24.10～H28.9
渡邊 祐介	同上	D1～3	H24.10～H27.3
久保 純	同上	D1～3	H26.2～
松本 健	同上	D1～3	H29.3～

研究項目

- ・ 骨芽細胞、破骨細胞の in vitro 系の確立と力学制御
- ・ 骨関連遺伝子の変異マウスの樹立
- ・ 細胞の力学制御の技術基盤
- ・ 骨芽細胞、破骨細胞の力学刺激応答の解明

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

(主に小椋グループ)細胞内への物体直接導入法(ミトコンドリア移植を含む)、新素材としてのマッシュマロゲルやDNゲル、力学刺激印加装置の透明化、細胞圧縮装置の開発などの研究者と連携、共同研究を行い、研究ネットワークを拡大することができた。このネットワークは、今の活発に継続中であり、今後も新しい技術、装置、手法の開発が期待できる。

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 皮膚パターン形成原理の分子レベルでの解明(大阪大学 近藤グループ)

(1)研究実施内容及び成果

目的と方法:

色素細胞間の相互作用をインビトロ、インビボで測定し、チューリング波形成の分子レベルでの解明を目指した実験。Crest 以前から継続していたものであるが、crest 研究以後にデータの精度と完成度が上がり、発表にむすびついた。

実施内容1:

長距離細胞間相互作用を担う黒色素胞の動態を調べた。黒色素胞の長い突起が①細胞が移動している時には無く、移動を止めてから伸びる②最初、伸びる方向に特異性は認められない③突起が安定して存在するのは、黄色細胞の方向に伸ばした時(Development2014),であることが解った。これにより、Turingパターン形成の長距離刺激を伝達する突起がどの様に形成されるか推測できる。

実験内容2:

インビトロで起きる細胞間相互作用をより正確に記述するために定量化を行った。細胞培養条件下での黄色細胞と黒色素胞の挙動を調べる系をより精密化し、前年までの、ランダムに撒いたものを観察する方法から、個々の細胞をピックアップして任意の位置において調べる方法を確立し、「追いかけて運動」の定量化を行う事ができた。(PNAS2014)

実験内容3:

相互作用を行う分子として、重要であり、かつ作用の微妙な変異が、模様が大きく影響するのがレオパード変異の原因遺伝子である cx418 である。特に縞模様の幅に影響する突然変異M7の変異について詳しく調べた結果、細胞間の電気伝導度が落ちていたことから、ギャップジャンクションを通じてのシグナルのリレーが存在する可能性を見出した。(JBC,2016a)

成果:

上記のデータをまとめた内容の総説を、cell press の総説誌 Trends in Genetics に依頼されて発表した。雑誌の表紙は、人が魚の皮膚に筆で模様を描く様子がイラストで表現されており、模様原理が解明されたことを示している。(こちらからの提案で無く、雑誌側が自主的にデザイン)これで、模様形成の細胞・分子レベルの解明という項目に於いては、初期の目標に到達したと考える。

(2)成果の位置づけや類似研究との比較:

模様に関する研究は、本研究質が突出しているもので、類似の研究は無いと言ってよい。また、生物の形態形成にチューリング波が関わることが、かなり一般化してきたため、別の生物系において、反応拡散波形成の2因子であるアクチベーター、インヒビターを探す研究が数多く行われるようになっている。しかしながら、それらの研究は特に、理論との整合性において問題が多い。それを解決するために4. 2の研究を行った。

3.2 Turing の反応拡散原理の一般化(大阪大学 近藤グループ)

(1)研究実施内容及び成果

目的と方法:

既に Turing の原理に合致する細胞間相互作用を実験により確認している。しかし、理論から予想されていた「拡散」が存在しなかったため、実験事実に基づいた数理モデルの変更が

求められた。この問題は、フィロポディアなどの細胞突起によるシグナル伝達の存在が一般に知られるにつれ、他の系にも重要となる。そこで、細胞間相互作用の種類に依存しない、より一般化されたモデルの構築を試みた。

実施内容:

新しいモデルでは、特定の細胞作用に依存することなく、相互作用の強さと距離の効果のみを関数(カーネル)として入力し、計算する。このモデルは、どのような種類の細胞間相互作用にも適用可能であるため、多くの生命現象に利用できる拡張型の Turing model である。オリジナルの Turing モデルよりも単純であるにも関わらず、反応拡散系で出現する全ての安定な模様を作ることができ、さらに、拡散現象の制約(相互作用が距離により素早く減衰)が無い場合、反応拡散ではパターンは作らない条件でも、パターン形成が起きうることを証明できた。さらに良いことには、カーネルをフーリエ変換することで、出現するパターンを容易に予測することができる。

成果:

このモデルを使って考えることで、今までの反応拡散モデルでは説明のできなかったことがいくつか納得がいくようになった。例えば、拡散による濃度勾配はあまりにも物理的に不安定であるのに対し、実際の生物の模様やパターンは極めて安定である。この矛盾は、不安定な拡散の効果、安定な細胞突起に置き換えることで解消できる。また、KT モデルは理論としても、実験系の研究者に理解しやすく、今後、反応拡散モデルの代わりに普及するのではないかと期待している。(JTB, 2016)

また、このモデルは実際に骨の形成を考える時にも、非常に役に立った。(詳細は4. 4で)

(2) 成果の位置づけや類似研究との比較:

チューリングモデルが一般化して以降、3成分以上の因子が関わる反応拡散系の理論的な解析を行う論文が多く出版されている。これらは、実験の実験系に合わせる目的で作られたモデルであるが、複雑であり、計算はすることができても、理論的に「わかった」気分になれない、質の悪い、モデルである。KT モデルはこの困った状況を一層できる可能性があると考えている。もし任意の(複雑な)モデルの性質を KT モデルで入力するカーネルに変換できれば、すべてのパターン形成モデルを、KT モデルを使って計算できることになるからだ。現在、北海道大学理学部数学科の栄先生と共同で、任意のモデルをカーネルに変換する方法を構築している。成功すれば、パターン形成のモデルを統合できるだろう。

3. 3 骨形態変異遺伝子のクローニング(大阪大学 近藤グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

目的と実施方法:

ゼブラフィッシュの脊椎が短縮する遺伝子 STP のクローニングを行ったところ、模様変異の遺伝子と同じくギャップジャンクション(CX43)の遺伝子であった。このことから、研究開始当初は、この分子が細胞間の(骨芽細胞と破骨細胞)相互作用の主要因子であり、皮膚模様と同様の原理が働いていると予想し、詳しい分子機能を調べていった。

実施内容:

STP の変異を詳しく調べたところ、2つ目のイントロン部分のミスセンス変異であった。不思議なことに、この遺伝子は既に別のアリの報告があり、それでは、尾の骨が短くなり、脊椎の変異は起きない。同じ骨の形態変異ではあるが、アリによって変異が変わるという不思議な現象であり、その原因の特定に時間がかかった。いろいろ試してわかったのは、アリにより、破壊する分子機能が異なることであった。ギャップジャンクションはコネクシン分子の12量体である。2つの細胞に6量体のチャンネルができ、それが結合して、2つの細胞

をつなぐチャンネルとなる。しかし、6量体のままで、単に、細胞にできた低分子のチャンネルとして機能する場合もあり、その場合は、ヘミチャンネルと呼ばれる。STP 変異の機能を、電気生理を使って調べたところ、ギャップジャンクションとしての機能はある程度保たれているが、ヘミチャンネルとしての機能は1000倍以上に、異常に昂進していることが解った。一方、脊椎の短縮をもたらさない他のアレルは、ヘミチャンネル機能は正常(非常に低い)であるが、ギャップジャンクションの機能が無くなっていた。(JBC,2016b)

成果:

ゼブラフィッシュの CX43と騒動であるマウスの CX40は、骨細胞、骨芽細胞においてヘミチャンネルを作っており、それは、「力学刺激のセンサー」として働いていることが知られているからである。つまり、力学刺激に対する応答が異常になったものが STP の変異である可能性が高く、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用はたとえあったとしても、この変異体からは調べられないことになる。結局、STP 変異の原因はわかったが、この知見から作業仮説の転換を迫られることになった。

3. 4 骨3D 形態モデル(大阪大学 近藤グループ)

(1)研究実施内容及び成果

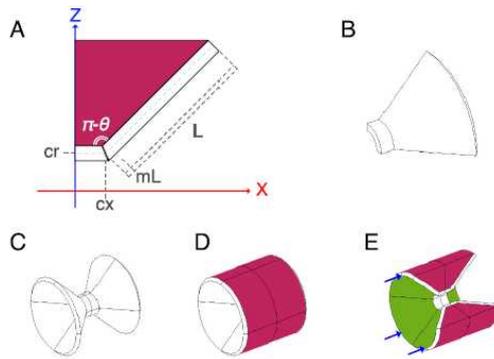
目的と実施方法:

上記の結果を受けて、改めて、ゼブラフィッシュの脊椎における骨芽細胞と破骨細胞の密度を測定したところ、破骨細胞のはずが非常に少なく、これだと、皮膚模様の時のようなチューリングパターンを作るのは難しい。そこで、それならば、「力」を中心としてモデルを組めるのではないか、という発想が浮かんだ。ちょうどそのころ豊田中央研究所の川本氏と知り合う機会があり、自動車や建築物の最適構造計算で使われるトポロジー最適化の考え方が、骨の生理と近い事に気がついた。トポロジー最適化は、三角メッシュで表現された剛体に力がかかった時に、最も変形の大きな部分を強化し、力のかからなかった部分を取り除く、という手法で最適な形態を求める手法である。変形が一番激しい場所にある骨細胞(骨芽細胞)が骨を成長させるのであれば、かなり似た状況になる。トポロジー最適化は、長骨の内部にある海綿状骨のパターンの形成の理論として使われているが、一般的な骨の外形に適用した例はほとんどない。そこで、このモデルを新たな作業仮説の一つとして用いることにした。

実施内容:

ゼブラフィッシュの脊椎は、稚魚では図の左の様な単純な円筒形であるが、成魚になると、右図中央の様な複雑な形態になる。この形を、トポロジー最適化による構造計算で自律的に生み出そうと言う目的を立て、最適な条件を探索した。細かい設定等は省くが、(ヒアリングにて詳しく説明します)円筒形構造の両端からの力を均等に加え、上下の脊髄神経と下部の血管部分を除いた計算空間でまた、成長を取り込むために、約3倍連続的に場が拡大する条件で、トポロジー最適化計算を行った。その結果、ある程度脊椎に似た形を作ることができたので、2015年に CREST 領域会議等で発表した。

シミュレーションの方法を図示したもの



しかしながら、実際の脊椎の形と、シミュレーションでできたものを比較すると、明らかに似ていない点があった。椎体の側部構造は多くの場合、中心から壁のように伸びてくる板状であるが、シミュレーションでできる構造は、どうしても、柱状になってしまうのである。これだと、いろいろな魚種ごとのバリエーションも作ることができない。

この問題の克服には、1年半ほどかかったが、2016年の末に解決することができた。きっかけは、KTモデルである。KTモデルは、任意の距離で活性のオンとオフをコントロールできるところに特徴があるが、これと同様の変更をトポロジー最適化に加えてみた。トポロジー最適化の通常の計算では、応力の閾値を一つ設定し、それ以上力がかかっている場合は、材料を加え、それ以下の場合は減らす、という操作をする。しかし、実験より破骨細胞の数が少ないことから、削る方の閾値だけを下げると、いう操作をすることが可能である。その効果を加えて計算をしてみると、予想通り、実際の脊椎とそっくりの側部構造を再現することができた。

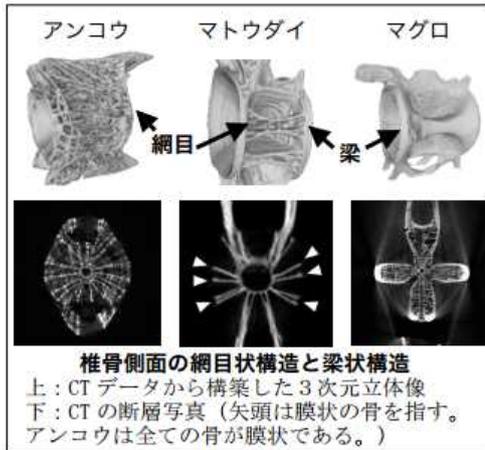
シミュレーション結果



また、ゼブラフィッシュの脊椎における破骨細胞の密度は、椎体部分では低い、背側の神経棘付近では高い。それに対応して、その部分の側部構造は、柱状のものが多いことも解った。

成果:

骨の外形を再現する初めてのシミュレーションモデルと作ることができた。このモデルは、これまでも行われていた骨梁形成の計算と基本的に似ているが、骨の外形(皮骨)と骨梁(スポンジ骨)の両方を再現することができる。皮骨もスポンジ骨も、作っているのは骨芽細胞と破骨細胞であるから、この2種類の骨を、基本手的に同じ方法でモデル化できることは極めて重要である。面白いことに、ある種の魚の脊椎では、骨梁構造が外部に露出しているものがある。



このことから、2種類の骨の形態を同じ原理でモデル化することは必須であり、それが、実験モデルとして手に入る魚の脊椎は貴重な存在であるといえる。

(2) 成果の位置づけや類似研究との比較:

力による骨の変形を予測できるモデルは、将来的に、骨の矯正等にも使える可能性があるため、実用的な価値も十分に存在する。

骨の外形を再現するシミュレーションは、これまでほとんど例がなく、画期的なものといえる。実は、2016年に、骨梁の計算をしていたグループの一つから、骨にかかる力の方向を変動させると、安定な円筒構造を作れるという発表があった。かなり抽象的なレベルの話なので、具体的な骨を対象としている我々の研究とは色合いが異なるが、同じ方向を求めていることは間違いない。今後、このグループとの競争になると思われる。

3.5 アクチノトリアを基にした、新しい形態形成の原理(大阪大学 近藤グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

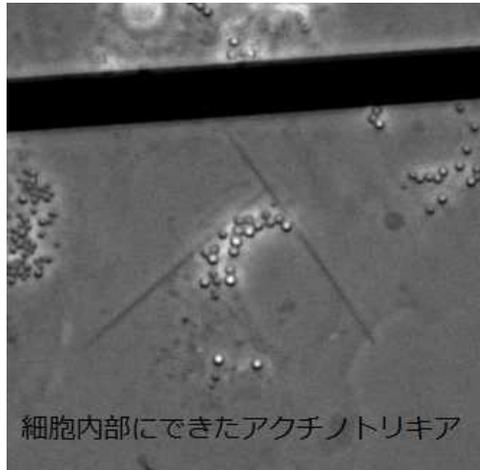
目的と方法: STPと同じ遺伝子の変異で、ひれ骨の長さが短くなるのが解っており、鰭骨も研究対象として、改めて骨の形成過程を詳しく解剖学的に調べた。その結果、鰭骨が直線状の構造をとること、また、それが一定の間隔で分岐することに関しては、骨そのものの形態というよりも、アクチノトリアというコラーゲンの結晶構造が並んだり、束ねられたりすることで決まり、その後、骨細胞の働きで、カルシウムが沈着し骨になる。すなわち、形を決めているのは、骨を作る細胞ではなく、骨の心棒になるコラーゲンのファイバー構造である。



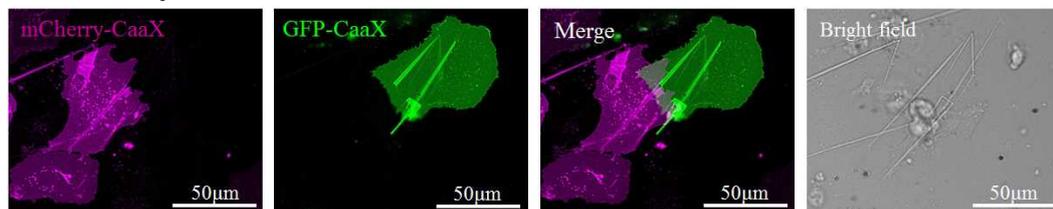
アクチノトリアは、完全に直線状であり、長さ、太さもほぼ一定である。この規格化された直線状部材を作り、並べることができれば、鰭骨のだいたいの形はできる。それならば、それを行う細胞の挙動を知ることが必要という結論に至った。

アクチノトリアをどのような細胞が作り並べるのかを調べるため、関与すると思われる細胞の一つである BK 細胞を特異的に蛍光ラベルし、その挙動とアクチノトリアの関係を調べた。

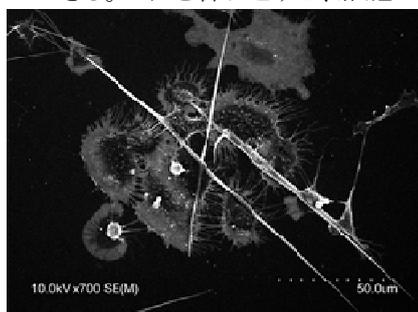
実施内容:インビボでアクチノトリアと接触している細胞である BK(basal keratinocyte)を特異的なプロモーターand1 を使い蛍光ラベルした。その細胞を、蛍光を指標にしてひれから単離し、培養した結果、小さいアクチノトリアを内部に作る事が解った。



アクチノトリアは、細胞よりもはるかに長いので、それを作るには複数の細胞が協力する必要がある。どのようにしてそれが行われるのかについても、細胞培養での挙動から明らかになっている。



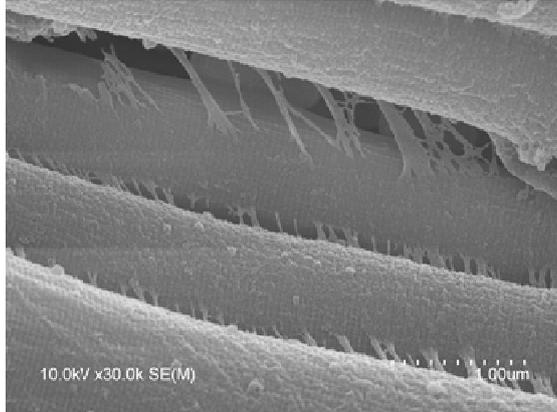
上図は2種類の蛍光たんぱくでラベルした BK 砂防が2本のアクチノトリアを半分ずつ抱え込んでいることを示す動画の一部である。BK 細胞は極めて活動的であり、アクチノトリアをホールドすると、それを振り回したり、細胞の外に突き出したりする。そこに他の細胞が存在すると、その細胞もアクチノトリアの一部をホールドし、多数の細胞で共有する状態ができる。これを繰り返すと、細胞よりも長いアクチノトリアを作ることが可能である。



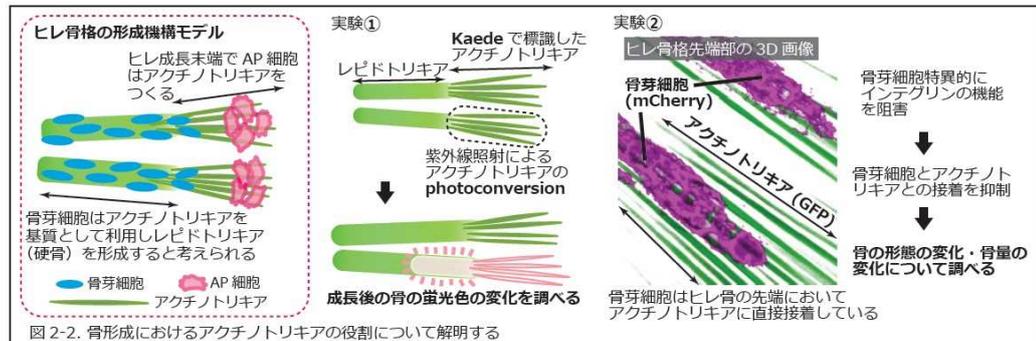
また、B 走査電顕の観察によれば、BK 細胞は、周囲に非常に長い突起を持ち、それでアクチノトリアをつかんでいる。突起が何も触れていない場合、その突起は湾曲しているが、何かをつかんでいると、直線的になるため、引っ張る力が生じていることが推測できる。

アクチノトリアは、最初扇型に配置しているが、徐々に、平行に束ねられて、骨の鋳型に

なる。このときに束ねる力の源が解らなかった。電顕による観察の結果、アクチノトリキアの間をつなぐ分子の存在が明らかになった。この分子のクローニングを進めている。



アクチノトリキアの動態をモデル化してシミュレーションすることを計画していたが、上記のような分子的なデータが次々と判明したため、モデル化は様子見の状態が進めていない。束ねる分子のクローニングができた時点で再開する予定である。



成果:かなり遅れてしまったため、論文は現在投稿中のものが一つあるのみであるが、データはかなりたまっているので、今後3年間くらいで、ある程度まとまった結果が出ると考えている。

(2) 成果の位置づけや類似研究との比較:

当初想定していた、反応拡散をベースにした作業仮説とは異なるが、より、斬新で面白い形態形成モデルができたと思う。アクチノトリキアが、規格サイズの構造部材として使われ、鉄筋構造を組んでいく作業員の役目を細胞が行い、それができたのちに、別の細胞がコンクリートを流して構造体を作る、というイメージである。数学的な表現には苦労するかもしれないが、いかにも生物的である。実はこのモデルは生物系では実例が一つ存在する。京都大学の船山准教授が行っているカワカイメンという海綿の研究では、細胞がやはり直線状のつかえ棒を作り、それを立てることにより、テントのように海綿の体を立体化することが解っている。

3. 6 鱗骨を等間隔に分節させる機構 (大阪大学 近藤グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

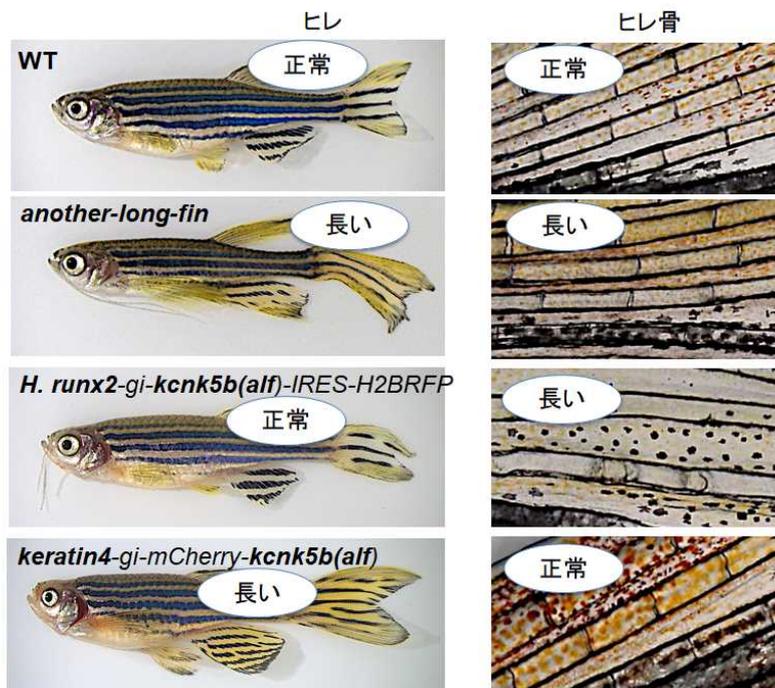
目的と方法:

上記の研究では、ひれの骨の「直線性」「分岐」は説明できるが、分節性に関しては説明できない。鱗骨は一定間隔で節(関節)があり、それによりしなやかなひれの動きを保証している。面白いことに、成長に伴い、鱗が長くなっても、分節の間隔は変わらず、節の数が増

えていく。何らかの「一定間隔を作る仕組み」が働いているはずで、これに関しては、チューリングと相同の原理が働いていると考えることができる。これまでの近藤グループの研究で、皮膚模様の幅に異常を及ぼす遺伝子にはギャップジャンクションのほかにも、イオンチャンネルなどの膜電位が変化するものが多かった。また、鰭や分節の長さが変化する突然変異の遺伝子にもイオンチャンネル性のものがいくつかある。分節に関しては、分節が「できる・できない」に働く遺伝子に関する研究はすでに存在するが、長さを決める因子についての研究はほとんどない。そこで、鰭の変異遺伝子の一つである *alf* を研究対象にして間隔を決める原理に迫ろうと考えた。

実験内容:

Alf (another long fin) は、鰭が長くなり、かつ、分節の間隔も長くなる変異である。遺伝子は *kcnk5b* というリークチャンネルである。変異はドミナントネガティブであり、変異遺伝子を持つと、リークチャンネルが働かなくなるので、膜電位が過分極に移行する。最初に、鰭の長さと同様に分節の長さが、同じ原理で決められているのか、あるいは別々ののかを調べるため、*alf* を皮膚のみ、骨芽細胞のみで発現するプロモータで発現させたところ、興味深いことに、活性を分離できた。



これがイオンチャンネルの活性の結果であることは、チャンネルロドプシンを使い、非侵襲的に、当該の細胞を脱分極させることで、鰭・ひれ骨の長さを短くできることから、確かめられている。

さらに、ヒレとひれ骨を短くする *cx43* 遺伝子についても、同じ実験結果を得ている。*CX43* 遺伝子の loss-of-function アレルは、ヒレとひれ骨両方の短縮をもたらす。どちらが原因かを知るために、変異遺伝子を様々な特異的なプロモータで発現させたところ、皮膚細胞で発現させた場合には、ひれ全体が短縮するが、骨は短縮しない(骨セグメントの数が減る)。骨芽細胞で発現させた場合には、骨が短縮するが、ヒレは短縮しないことが解った。また、それぞれで過剰発現させると、少なくともひれ骨に関しては長くなる。つまり、ひれ全体と骨の長さを決めるシステムは独立(働いている細胞が異なる)であり、しかし、同じ分子系を使っていることになる。この事実は、骨の形態(プロポーション)と器官全体のプロポーションを決める原理が同じであること。それを決めるのがギャップジャンクシ

ン遺伝子であることを示しており、今後の研究の進展に極めて重要であると考え。

(2) 成果の位置づけや類似研究との比較:

実験では、チャンネルロドプシンを使うと、非侵襲的に、骨の長さを調節できるようになっている。原理は今のところ詳しくはわからないが、発現させているのが骨芽細胞であることから、骨芽細胞の膜電位が関与していることは間違いない。これは、皮膚模様で黒色素細胞の膜電位の変化により、縞模様の幅が変わったのと相似であり、ある程度同じ原理が働いていると考えられる。骨の長さを変えることができると、いろいろと応用できるかもしれないので、今後も研究を進めていきたい。

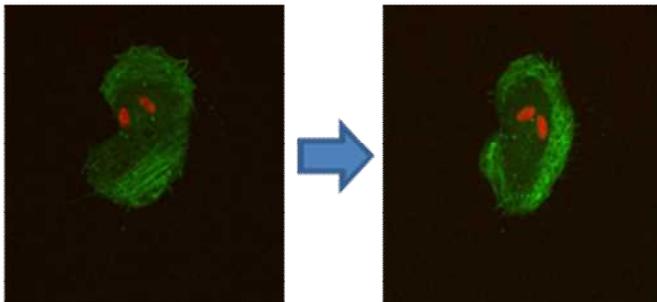
骨の形状に関する研究はマウス、ヒトでは多く存在するが、ほとんどが、関係する因子の列挙にとどまっている。また、その多くは、発生初期の形状に関するものである。ゼブラフィッシュを使うと、アダルトになってからの成長に関する変異を扱うことができ、また、非侵襲的に遺伝子発現をコントロールできるという有利さがあり、貴重な実験系を確立できたと考え。

3. 7 細胞の自律的な回転現象の発見(大阪大学 近藤グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

目的と方法:この研究は、色素細胞の動態の観察中に偶然発見されたもので、直接、パターン形成と関係するものではないが、領域会議と中間評価の際に、白いので続けるように、というアドバイザーからの勧めで、2016年末まで続けた。

実験内容:インビトロ系での色素志望の動態を解析する研究の中から、細胞核がキメリックな(下から見て反時計回り)の回転をしている事実を発見した。また、この回転を、細胞骨格の各種阻害剤を使う事で速くも遅くもコントロールできることから、この回転が、色素細胞にのみ存在する特殊な現象ではなく、細胞骨格の特性に由来する普遍的なものである可能性も考えられる。(下図)これまで、細胞や個体に左右性を与える元の細胞反応としては、繊毛の回転が考えられているが、もし細胞全体にキメリックな回転をする能力があれば、繊毛運動よりもはるかに容易に、左右性を創りだすことができる。極めて重要な発見であり、またアドバイザーの指摘もあるため、今後研究項目に加える。色素パターン形成との関係では、細胞の位置の入れ替えをスムーズに行うために役に立つ可能性が考えられる。



アクチンファイバーの傾きが反時計回りの回転している

成果:論文発表を行った。(Genes and Cells, 2015)

(2) 成果の位置づけや類似研究との比較: 個々の細胞に回転のキラリティが存在することは、いくつかの実験で示唆されていたが、本実験ほどはっきりした証拠はこれまで存在せず、文字通り、初めての発見・発表となった。発見した山中 PD は各地のシンゴ等に招待されている。実は、シンガポールのグループが、ほぼ同時に、単一細胞の回転現象を nature communication に報告している。細胞のキラリティは、器官や臓器のキラリティの根源である

可能性が高く、今後注目の分野になると考える。この実験を担当していた PD が外部に転出予定なので、今後はそちらで続けるため、近藤グループからは離れる予定。

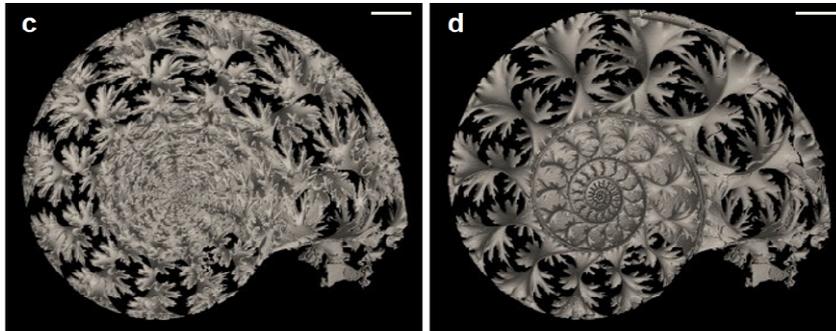
3. 8 アンモナイト隔壁形成の3D 形態モデル(大阪大学 近藤グループ)

(1)研究実施内容及び成果

目的と方法:これも、本来の骨の形態形成の研究とは異なるが、研究室セミナー等で他の生物の骨の形成原理を調べているうちにアイデアが思いついたもの。貝殻は軟体動物の骨であることから、アンモナイトの複雑な隔壁形状に興味を持ちマイクロ CT できれいに形状を再現できるかもしれないと考えた。



実験内容:大学院生の一人(井上)がアンモナイトの蒐集グループの一員であり、さらに彼は自分の経験から、特定の種の化石に極めて隔壁構造が精密に残されているものがあることを知っていた。そこでそのサンプルを化石の3D データ取得の技術を持つ民間の研究所に依頼し、CT データを取得した。その3D データに対し、各種3D ソフトを使って隔壁の再現を行った結果、非常に見事な構造が浮かび上がった。



また、この画像から、これまでうまく説明のなかった隔壁の3D 構造を作る原理についての新しいモデルを提唱した。

成果:Scientific Reports に論文発表を行った。

(2)成果の位置づけや類似研究との比較:まず、化石の3D 構造の再現手法として、非常に優れた技術を確立できたと思う。論文のレビューアーからは、The CT scans are absolutely SPECTACULAR and by far the best illustrations of ammonite septa ever produced. The scanning and not least the post-processing of these data must have been an arduous task and has been carried out with enormous skill. The images are almost guaranteed a prominent place in paleontological text books, and the paper could have been published for this reason alone.という最大級の賛辞をいただいている。

3.8 細胞の力学制御のための基盤技術開発(東北大学 小椋グループ)

(1)研究実施内容及び成果

目的と方法:近藤グループでは細胞動態と形態形成の関係を調べている。そのためには、細胞の動きを、外部から任意に操作する手法があると極めて有利である。また、もしそのような技術があれば、他の用途に応用することも十分に可能なはずだ。そこで、種々の細胞への力学刺激印加法を新規に確立する目的で、まず、固形微小物体の細胞内直接導入法を開発し、例えば、細胞内に付置した鉄粒子を磁力で引っ張って力学制御を加える、また、光ピンセットで捕捉して細胞内の任意の場所に配置し、さらに動かす実験を行った。

実験内容:この導入法では、当初、直径でナノからマイクロサイズの種々のビーズを GUV liposome に封入し、電気融合装置で特定の電気パルスを加え、一過的な細胞/GUV 間の融合を起こした。その結果、ナノサイズの蛍光ビーズでは、80~90%の高効率で細胞に導入することが可能となった。また、現時点で、最大 2.8 ミクロンのビーズの導入に成功している(通常、1 ミクロンのビーズで 10%弱の効率)。細胞内に導入されたビーズは、ナノサイズのビーズで、細胞 1 個あたり 1000 個を超え、細胞分裂で細胞あたりの蛍光強度が半減すること、1 週間超にわたって細胞内に蛍光が維持されることから、直接に膜で覆われずに細胞内に導入された固体は、exocytosis されずに細胞内にとどまることが示唆された。

成果:特許申請に至った(発明の名称:細胞内へ物体を導入する方法、出願人:野村慎一郎、小椋利彦、齋藤明、科学技術振興機構、出願番号:特願2014-059898)。

(2)成果の位置づけや類似研究との比較:現時点で、GUV、電氣的融合条件に新たな改良を加え、細胞を培養皿から剥がさず、培養皿に接着させたままで直接、物体を入れることが可能となった。これによって、細胞への影響を最小限に抑えることが可能となり、選択できる細胞種が大きく拡大したと言える。また、細胞内に磁性鉄ビーズを入れた細胞は、ネオジム磁石で動かすことも可能で、さらに、細胞内でも動くことが確認された。また、GUV に、Plasmid DNA やタンパク質を加えて、同時に導入することも可能であった。したがって、我々の方法は、これまでに困難であった、任意の抗体、巨大タンパク質複合体の細胞内への直接導入の手法でもある。本法を用いてタンパク質などを細胞内に直接、しかも高効率で入れることが可能となり、in cell NMR への適用が可能となったと考えている。安定同位体でラベルしたタンパク質を細胞内に入れて NMR によってタンパク質の構造解析を行える可能性があり、共同研究者を探している。

3.9 GUV liposome 基盤技術の応用的展開(東北大学 小椋グループ)

(1)研究実施内容及び成果

目的と方法:上記の手法により直径 2 ミクロンまでの固形物体の導入が可能となったことで、様々な粒子を細胞に入れる実験を行った。

実験内容:シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株を Hela 細胞に導入した。その結果、PCC6803 株は Hela 内で光合成を行いつつ約 1 週間維持することが可能であった。これは、強制的な細胞内共生 (artificial symbiogenesis) と言える。シアノバクテリアの維持には、重金属が必須でありながら、重金属は Hela 細胞に toxic であるため、長期の維持には培養液の工夫が必要であると思われる。しかし、シアノバクテリアの形質転換は極めて容易で、培地に添加された DNA をそのまま取り込むことが知られている。したがって、Hela 細胞内のシアノバクテリアは、Hela 細胞の遺伝情報を取り込んでいる可能性がある。今後、Hela 細胞、シアノバクテリア間で遺伝情報の horizontal transfer が起こるかどうかが、確認したい。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表(国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 13 件)

1. Toshihiro Banjo, Janin Grajcarek, Daisuke Yoshino, Hideto Osada, Kota Y. Miyasaka, Yasuyuki S. Kida, Yosuke Ueki, Kazuaki Nagayama, Koichi Kawakami, Takeo Matsumoto, Masaaki Sato, Toshihiko Ogura(2013) Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21. Nature Communications 4 Article number 1978.
2. Shinya Inoue, Shigeru Kondo, David M. Parichy, Masakatsu Watanabe (2014) Tetraspanin 3c requirement for pigment cell interactions and boundary formation in zebrafish adult pigment stripes. Pigment Cell Melanoma Res 27:190-200.
3. Hiroaki Yamanaka, Shigeru Kondo (2014) In vitro analysis suggests that difference in cell movement during direct interaction can generate various pigment patterns in vivo. PNAS Feb 4;111(5):1867-72.
4. Hiroki Hamada, Masakatsu Watanabe, Hiu Eunice Lau, Tomoki Nishida, Toshiaki Hasegawa, David M. Parichy and Shigeru Kondo (2014) Involvement of Delta-Notch signaling in zebrafish adult pigment stripe patterning. Development 2014 Jan;141(2):318-24.
5. Akira C. Saito, Toshihiko Ogura, Kei Fujiwara, Satoshi Murata, and Shin-ichiro M. Nomura(2014)Introducing Micrometer-Sized Artificial Objects into Live Cells: A Method for Cell-Giant Unilamellar Vesicle Electrofusion. PLoS ONE 9 e106853.
6. Masakatsu Watanabe and Shigeru Kondo (2015) Fish pigmentation. Comment on "Local reorganization of xanthophores fine-tunes and colors the striped pattern of zebrafish. Science 2015 Apr 17;348(6232):297.
7. Hiroaki Yamanaka and Shigeru Kondo (2015) Rotating pigment cells exhibit an intrinsic chirality. Genes to cells 20(1):29-35.
8. Masakatsu Watanabe, Risa Sawada, Toshihiro Aramaki, I. Martha Skerrett and Shigeru Kondo (2016) The physiological characterization of Connexin41.8 and Connexin39.4, which are involved in the stripe pattern formation of zebrafish. J Biol Chem 2016 Jan 15;291(3):1053-63.
9. Shigeru Kondo (2016) An updated kernel-based Turing model for studying the mechanisms of biological pattern formation. J Theor Biol. 2016 Nov 10;414:120-127.
10. Shinya Inoue, Shigeru Kondo (2016) Suture pattern formation in ammonites and the unknown rear mantle structure. Science Report 2016 Sep 19;6:33689.
11. Akihiro Misu, Hiroaki Yamanaka, Toshihiro Aramaki, Shigeru Kondo, I. Martha Skerrett, M. Kathryn Iovine, and Masakatsu Watanabe (2016) Two different functions of Connexin43 confer two different bone phenotypes in zebrafish. J Biol Chem. 2016 Jun 10;291(24):12601-11.
12. Atsushi Kubo, Yasuyuki S. Kida, Osamu Nakagawa, Yoshikazu Hirate, Hiroshi Sasaki, Toshihiko Ogura (2017) Notch and Hippo signaling converge on Strawberry

Notch 1 (Sbno1) to synergistically activate Cdx2 during specification of the trophectoderm. Scientific Reports 7:46135.

13. Yusuke Watanabe, Miyasaka Y. Kota, Atsushi Kubo, Yasuyuki S. Kida, Osamu Nakagawa, Yoshikazu Hirate, Hiroshi Sasaki, Toshihiko Ogura (2017) Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (Sbno1) to synergistically activate Cdx2 during specification of the trophectoderm. Scientific Reports 2017 (April, 12), 7:46135.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Masakatsu Watanabe and Shigeru Kondo (2015) Is pigment patterning in fish skin determined by the Turing mechanism? Trends in Genetics 2015 :31(2):88-96.

2. Masakatsu Watanabe and Shigeru Kondo (2016) Genetics of body shape: Connexin43 is the key to two zebrafish mutants with shorter backbones and fins. Atlas of Science (Website) September 26.

3. 小椋利彦 (2014) 特集 新メカトランスダクション(工学との融合が明らかにする力学刺激センサーの動作とシグナル伝達). 細胞工学 Vol 33 No. 9, p.914-916.

4. 渡邊正勝 (2017) ゼブラフィッシュのチューリングパターン形成メカニズムの解析. 実験医学(増刊), Vol.35, No.5, 192(852)-194(854).

5. 小椋利彦 (2015) 第六章 発生のメカノバイオロジー. In: 化学同人 メカノバイオロジー Dojin Bioscience Series(曾我部正博 編), p.73~84, 京都:(株)化学同人

6. 宮坂恒太、久保純、小椋利彦 (2016) エクササイズピル、エクササイズミメティクスの可能性 メカノバイオロジーからメカノメディシンへ(企画 曾我部正博) In: 医学のあゆみ vol. 257, No. 10, 1051-1057, 東京:医歯薬出版(株)

7. 宮坂恒太、久保純、小椋利彦 (2016) 生体システムにおけるメカトランスダクションー特に、遺伝子発現に注目してーIn: Clinical Calcium 23 特集 メカノバイオサイエンスー力の科学と医療の最前線), p.79, 大阪:(株)医薬ジャーナル社

8. 宮坂恒太、久保純、小椋利彦 (2017) エクササイズピル、エクササイズミメティクスの可能性ー運動療法の新たな展開へーIn: 別冊 医学の歩み メカノバイオロジーからメカノメディシンへ(曾我部正博 編), p.85~91, 東京:医歯薬出版(株)

9. 宮坂恒太、久保純、松本健、小椋利彦 (2017) 運動と代謝の関係ー運動模倣薬(Exercise pill)は可能か?ーIn: 医薬ジャーナル(6月号、特集・新しい医療を拓くメカノバイオロジー) vol. 53, No. 6, p.89-93, 大阪:(株)医薬ジャーナル社

10. 久保純、宮坂恒太、松本健、小椋利彦(2017) 第2章 難病の病態モデル作製 1、ゼブラフィッシュ In: 遺伝子医学 MOOK 32 難病研究 up-to-date (臨床病態解析と新たな診断、治療法開発をめざして)(監修 松原洋一), p.66~71, 大阪:(株)メディカル ドゥ

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演(国内会議 21 件、国際会議 22 件)

1. Shigeru Kondo (大阪大学). Turing pattern without diffusion. Swiss Japanese Development Biology Meeting, Kyoto, 2012/11/5-7.
2. Shigeru Kondo (大阪大学). Turing pattern without diffusion. The 23rd CDB Meeting, Kobe, 2013/1/22-23.
3. Shigeru Kondo (大阪大学). Collaboration of mathematical theory and experimental biology. USGEB Annual Meeting 2013, Zurich, Switzerland, 2013/1/31-2/1.
4. Shigeru Kondo (大阪大学). Turing Pattern Formation in the Real Biological System. Computational approaches to networks, cells and tissues, Barcelona, Spain, 2013/4/8-13.
5. Shigeru Kondo (大阪大学). Turing Pattern Formation without diffusion. Workshop on Patterns and Hydrodynamic Instabilities in Reactive Systems, Brussels, Belgium, 2013/5/14-17.
6. Shigeru Kondo (大阪大学). Turing pattern formation without diffusion. 2013 International Symposium on Development, Morphogenesis and Stem Cells & 9th Annual Meeting of Taiwan Society for Stem Cell Research, Taipei, Taiwan, 2013/10/5-6.
7. Shigeru Kondo (大阪大学). Mechanism of skin pattern regeneration in zebrafish. International Symposium on Wound Regeneration and Repair, Tainan, Taiwan, 2013/10/8.
8. Shigeru Kondo (大阪大学). Turing pattern formation in the skin of living fish. 2nd Annual Winter qBIO meeting, Hawaii, USA, 2014/ 2/14-20.
9. Shigeru Kondo (大阪大学). Another mechanism to make the stripe pattern. Molecular Mechanisms in Development and Evolution, Basel, Switzerland, 2014/3/22.
10. Shigeru Kondo (大阪大学). Turing pattern without diffusion. JSMB/SMB 2014, Osaka, Japan, 2014/7/28-8/1.
11. Shigeru Kondo (大阪大学). A more generalized mechanism that can produce the Turing patterns. JSMB/SMB 2014, Osaka, Japan, 2014/7/28-8/1.
12. Toshihiko Ogura (東北大学). Hemodynamic forces as a regulator of Cardiogenesis and circulatory homeostasis. The 62nd NIBB Conference "Force in Development", Okazaki, 2014/11/17-19.
13. Shigeru Kondo (大阪大学). Mechanism of skin pattern formation in living organisms. MBI-Japan Joint Symposium, Singapore, Singapore, 2014/12/1-4.
14. Toshihiko Ogura (東北大学). Physical force sensed by cells and generated by cells. HeKKSaGOn University consortium 4th German-Japanese University Presidents' Conference "Building venues for the creation of new knowledge and values", Sendai,

2015/4/16-17.

15. Shigeru Kondo (大阪大学) Turing pattern formation in real biological systems. EMBO workshop "Cellular synapsis and cell-cell signaling", Madrid, Spain, 2015/5/26-29.
16. Shigeru Kondo (大阪大学) Turing patterns in biology. EMBO Practical Course "Multilevel Modelling of Morphogenesis", Norwich, UK, 2015/7/12-24.
17. Shigeru Kondo (大阪大学) Turing pattern formation in real biological systems. 2015 EPFL Life Science Symposium, Lausanne, Switzerland, 2015/9/2-4.
18. Shigeru Kondo (大阪大学) Turing pattern formation without diffusion. 2015 Cell Biology ASCB Meeting, San Diego, USA, 2015/12/12-16.
19. Shigeru Kondo (大阪大学). The mechanism of Turing patternformation in the zebrafish skin. NYUAD-CGSB Symposium, Abu Dhabi, United Arab Emirates, 2016/2/23-25.
20. Shigeru Kondo (大阪大学). The detailed mechanism of Turing pattern formation in the skin of zebrafish. Combined ASBMB, ASPS and ANZSCDB Annual Meetings, Brisbane, Australia, 2016/10/3-7.
21. Shigeru Kondo (大阪大学). How to Present an Unbelievable Experimental Result. Gordon Research Conference-Visualization in Science & Education, Lewiston, USA, 2017/8/6-11.
22. Shigeru Kondo (大阪大学). A new simpler version of Turing model that does not depend on any specific cellular mechanism. The BIRS workshop "Mathematics for Developmental Biology", Banff, Canada, 2017/12/10-15.
23. 近藤滋 (大阪大学). Turing pattern without diffusion. 国際高等研究所 研究プロジェクト「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」 2012 年度第一回研究会, 京都市, 2013 年 2 月 22-23 日.
24. 小椋利彦 (東北大学). Physical forces as a regulator of morphogenesis and homeostasis – paving a way to medical application. 第 8 回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 京都市, 2013 年 6 月 27 日.
25. 小椋利彦 (東北大学). 力を視点に、生命現象を再解釈する. 第 19 回創発システムシンポジウム(創発夏の学校 2013), 大阪市, 2013 年 8 月 31 日-9 月 2 日.
26. 小椋利彦 (東北大学). 細胞は力をどのように感知し、どのように反応するか. 日本人類遺伝学会大8回大会特別講演, 仙台市, 2013 年 11 月 21 日.
27. 小椋利彦 (東北大学). 生命現象を力を視点に再解釈するために. 生物物理学会東北支部会, 仙台市, 2013 年 12 月 13 日.

28. 小椋利彦 (東北大学). 生命現象を力学的に再解釈する、そして、生命現象を再構築する??? 東京工業大学生体システム専攻バイオサイエンスシンポジウム, 横浜市, 2014年2月18日.
29. 近藤滋 (大阪大学). Mechanisms of pattern formation in animal skin. 第27回高遠シンポジウム, 大津市, 2015年8月26日.
30. 近藤滋 (大阪大学). 反応拡散の修行を極めると、どんな悟りに到達するか. 山田研究会「生物と非生物をつなぐ」, 伊豆市, 2015年11月16-18日.
31. 近藤滋 (大阪大学). 数理モデルと現実の境目. 基生研研究会「物理学は生物現象の謎を解けるか」, 岡崎市, 2016年1月5-6日.
32. 近藤滋 (大阪大学). 動物の皮膚に模様を描くしくみ. 第79回日本皮膚科学会, 東京都, 2016年2月20-21日.
33. 近藤滋 (大阪大学). 生物の知恵～形態形成の原理と応用～. 16-1 バイオミメティクス研究会, 京都市, 2016年6月20日.
34. 近藤滋 (大阪大学). 「シマウマは、縞模様を得たウマ、ではなく、均一中間色を失ったウマ、である」というお話し. 日本進化学会第18回大会, 東京都, 2016年8月25-28日.
35. 近藤滋 (大阪大学). Simpler modelling of the biological pattern formation. 2016年日本数理生物学会年会. 福岡市, 2016年9月7-9日.
36. 小椋利彦 (東北大学). 力学刺激が直接遺伝子発現を調節するシステムについて. 日本遺伝学会 第88回大会, 三島市, 2016年9月7-10日.
37. 近藤滋 (大阪大学). 動物の形態形成の分子メカニズムの探求と形を操る技術の創出. 第26回非線形反応と共同現象研究会, 東京都, 2016年12月10-11日.
38. 近藤滋 (大阪大学). シマウマの模様をヒョウ柄に変える方法. 第29回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋市, 2017年1月19日.
39. 小椋利彦 (東北大学). 遺伝子発現を制御するメカトランスダクション. 第94回日本生理学会大会, 浜松市, 2017年3月28日.
40. 小椋利彦 (東北大学). 遺伝子発現を制御するメカトランスダクション. Molecular Cardiovascular Metabolic Conference, 神戸市, 2017年9月1-2日.
41. 近藤滋 (大阪大学). An updated kernel-based Turing model for studying the mechanisms of biological pattern formation. Satellite workshop of JSMB in 2017: Patterns and dynamics with nonlocal effect, 札幌市, 2017年10月4-5日.
42. 近藤滋 (大阪大学). A simple logic generating the positional information in organisms. 北海道大学電子科学研究所国際シンポジウム「極」, 札幌市, 2017年11月29日-12月1日.
43. 近藤滋 (大阪大学). 生物の形を作る物理的な原理. 徳島大学先端酵素学研究所シンポジウム「医学研究のインパクトと健康長寿社会への貢献」, 徳島市, 2018年2月1日.

② 口頭発表 (国内会議 22 件、国際会議 3 件)

1. Masakatsu Watanabe (大阪大学). Zebrafish skin pattern variation depends on current value through gap junction. 9th European Zebrafish Meeting, Oslo, Norway, 2015/6/28-7/2
2. Masakatsu Watanabe (大阪大学). Do gap junctions contribute to the diversification of teleost? 7th Asia Oceania Zebrafish Meeting Singapore 2016, Singapore, Singapore, 2016/10/1-4.
3. Toshihiro Aramaki (大阪大学). Bioelectrical signal controls skin pattern formation of zebrafish. 18th International Congress of Developmental Biology, Singapore, Singapore, 2017/6/18-22.
4. 宮澤清太 (大阪大学). $\circ \times \bullet = ?$ 交雑が新しい模様をつくる? 第 28 回個体群生態学会大会, 東京, 2012 年 10 月 20-21 日.
5. 渡邊正勝 (大阪大学). ゼブラフィッシュの色素細胞間相互作用とパターン形成. 第 117 回関西実験動物研究会, 京都市, 2013 年 3 月 1 日.
6. 渡邊正勝 (大阪大学). ゼブラフィッシュの体表模様形成機構. 第 46 回発生生物学会年会, 松江市, 2013 年 5 月 28-31 日.
7. 井上新哉 (大阪大学). Tetraspanin 3c is required for migration and boundary formation of pigment cells in zebrafish skin pattern formation. 第 19 回小型魚類研究会, 仙台市, 2013 年 9 月 20-21 日.
8. 渡邊正勝 (大阪大学). ゼブラフィッシュ縞模様の作り方、作られ方. 日本動物学会第 84 回岡山大会, 岡山市, 2013 年 9 月 26-28 日.
9. 井上新哉 (大阪大学). テトラスパニン^{3c}はゼブラフィッシュ黒色素胞の細胞移動に重要な役割を持つ. 日本動物学会 84 回岡山大会, 岡山市, 2013 年 9 月 26-28 日.
10. 宮澤清太(大阪大学). 紋様・体色形成研究の新たな展開, 日本動物学会 84 回岡山大会, 岡山市, 2013 年 9 月 26-28 日.
11. 浜田裕貴. ゼブラフィッシュの模様形成を支える突起構造. 発生生物学会夏季ワークショップ 2014, 仙台市, 2014 年 9 月 1-3 日.
12. 山中洋昭. ゼブラフィッシュの色素パターン形成と色素細胞の内在的キラリティ. 発生生物学会夏季ワークショップ 2014, 仙台市, 2014 年 9 月 1-3 日.
13. 澤田莉沙. ゼブラフィッシュの縞模様形成におけるギャップ結合の役割. 日本動物学会第 85 回仙台大会 2014, 仙台市, 2014 年 9 月 11-13 日.
14. 井上新哉. アンモナイトがフラクタルな模様の貝殻を作るメカニズムの探求. 日本動物学会第 85 回仙台大会 2014, 仙台市, 2014 年 9 月 11-13 日.

15. 浜田裕貴. ゼブラフィッシュ模様恒常性に関わる長距離での Delta/Notch シグナルの働きとその伝達経路. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2014 年 11 月 25-27 日.
16. 渡邊正勝. ゼブラフィッシュの体表模様形成における虹色素胞の役割. 日本動物学会第 86 回大会, 新潟市, 2015 年 9 月 17-19 日.
17. 渡邊正勝. ゼブラフィッシュ体表模様形成におけるギャップジャンクションの機能. 第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2015 年 12 月 1-4 日.
18. 荒巻敏寛. Bioelectrical signal controls skin pattern formation in zebrafish. 第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2015 年 12 月 1-4 日.
19. 三須晃裕. ゼブラフィッシュ骨形成におけるギャップジャンクションの機能. 第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2015 年 12 月 1-4 日.
20. 黒田純平. The analysis of the cells generating micro bone tissue of fins. 小型魚類研究会, 岡崎市, 2016 年 8 月 20~21 日.
21. 山中洋昭. The intrinsic cellular chirality of fish pigment cells. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日.
22. 黒田純平. The in vitro analysis of the cells generating micro bone tissue of fin. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日.
23. 黒田純平 (大阪大学). The mechanism about the cell autonomous generation of collagen crystal involved with fin skeletal development. 第 50 回日本発生生物学会, 東京都, 2017 年 5 月 10-13 日.
24. 澤田莉沙 (大阪大学). Exclusion mechanisms among pigment cells in zebrafish pattern formation. 第23回小型魚類研究会, 甲府市, 2017 年 8 月 29-31 日.
25. 黒田純平 (大阪大学). 魚類ヒレ骨格形成に必須なコラーゲン結晶の自律的合成メカニズム. Conbio2017(2017 年度生命科学系学会合同年次大会). 神戸市, 2017 年 12 月 9 日.

③ ポスター発表 (国内会議 27 件、国際会議 14 件)

1. Masafumi Inaba (大阪大学). Inwardly rectifying potassium channels can generate a variety of pigment pattern. Swiss Japanese Development Biology Meeting, Kyoto, 2012/11/5-7.
2. Shinya Inoue (大阪大学). Contribution of the adhesion molecules in skin pattern formation of zebrafish. 8th European Zebrafish Meeting, Barcelona, Spain, 2013/7/9-13.
3. Akira C. Saito, Toshihiko Ogura, Kei Fujiwara, Satoshi Murata, and Shin-ichiro M. Nomura (東北大学). Introducing Large DNA Nanostructures Into Living Cells Mediated by Cell-GUV Electrofusion. 11th Annual Conference Foundations of Nanoscience, P206, Utah, USA, 2014/4/14-17.
4. Akihiro Misu (大阪大学), Post embryotic malformation of vertebrae in zebrafish is

caused by mutation of cx43, 11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics, Wisconsin, USA, 2014/6/24-28.

5. Hiroaki Yamanaka (大阪大学), Rotating melanophores exhibit an intrinsic chirality, MBI-Japan Joint Symposium, Singapore, Singapore, 2014/12/2-4

6. Seita Miyazawa (大阪大学), Peculiar pigment patterns and possible progenitors of a poisonous pufferfish, Gordon Research Conferences, Ventura, USA, 2015/3/16-19

7. Akihiro Misu (大阪大学), Post embryotic malformation of vertebrae in zebrafish caused by the mutation in cx43, International Gap Junction Conference, Santiago, Chile, 2015/3/28-4/2

8. Masakatsu Watanabe (大阪大学), Characterization of gap junctions working on skin pattern formation of zebrafish, International Gap Junction Conference, Santiago, Chile, 2015/3/28-4/2

9. Akira C. Saito, Toshihiko Ogura, Kei Fujiwara, Satoshi Murata, and Shin-ichiro M. Nomura (東北大学). Simultaneous and efficient introduction of multiple μm -sized objects into live cells by a novel cell-GUV electrofusion technique. IUPAB, #390, Brisbane, Australia, 2014/8/3-7.

10. Hiroaki Yamanaka (大阪大学). Cell Motility and Guidance. Society for Developmental Biology 74th Annual Meeting, Utah, USA, 2015/7/9-13.

11. Toshihiro Aramaki (大阪大学). Bioelectrical signal controls skin pattern formation of zebrafish. Society for Developmental Biology 74th Annual Meeting, Utah, USA, 2015/7/9-13.

12. Seita Miyazawa (大阪大学). Peculiar pigment patterns and possible progenitors of a poisonous pufferfish. SMBE 2015, Vienna, Austria, 2015/7/12-17.

13. Akira C. Saito, Toshihiko Ogura, Satoshi Murata, and Shin-ichiro M (東北大学). Electrofusion of Cell-GUV enables micrometer-sized artificial objects transfer into live cells. 10th European Biophysics Congress, Dresden, Germany, 2015/7/18-22.

14. Misaki Sakashita (大阪大学). Biologically Inspired Topology Optimization Model with a Local Density Penalization. 9th Vienna International Conference on Mathematical Modelling, Vienna, Austria, 2018/2/21-23.

15. 渡邊 正勝 (大阪大学). ギャップジャンクションのポリアミン感受性がゼブラフィッシュの体表模様形成に重要である. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2012 年 12 月 10-14 日.

16. 三須晃裕 (大阪大学). Analysis of mutant *stöpseldtl28d* (*stp*) indicating the vertebral form abnormality. 第 46 回発生生物学会年会, 松江市, 2013 年 5 月 29 日

17. 宮澤清太 (大阪大学). ヘンな模様のどうぶつをしらべたい. NGS 現場の会 第三回研究会, 神戸市, 2013 年 9 月 4 日.

18. 荒巻敏寛 (大阪大学). Bioelectrical signal controls pattern formation of zebrafish skin. 第 20 回小型魚類研究会, 東京都, 2014 年 9 月 20 日.

19. 山中洋昭 (大阪大学). ゼブラフィッシュ黒色素細胞にみられる内在的なキラリティ. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2014 年 11 月 25 日.
20. 渡邊正勝 (大阪大学). コネキシン 41.8 変異体の機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2014 年 11 月 26 日.
21. 澤田莉沙 (大阪大学). ゼブラフィッシュ体表模様形成において色素細胞の初期配置に対するギャップ結合の役割. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2014 年 11 月 27 日.
22. 荒巻敏寛 (大阪大学). Bioelectrical signal controls pattern formation of zebrafish skin. 第 48 回日本発生生物学会大会, 茨城県つくば市, 2015 年 6 月 2-5 日.
23. 齋藤 明, 小椋 利彦, 藤原 慶, 村田 智, 野村 M.慎一郎 (東北大学). 細胞-GUV 電気融合法による巨大人工物の導入について. 第 55 回生物物理若手の会, 高島市, 滋賀県, 2015 年 8 月 21-24 日.
24. 齋藤 明, 小椋 利彦, 村田 智, 野村 M.慎一郎 (東北大学). 細胞-GUV 電気融合法による μm スケール人工物導入について. 第 53 回生物物理学会年会, 金沢市, 2015 年 9 月 13-15 日.
25. 東純平 (大阪大学). Formation of the 3D structure of vertebrate bones by topology optimization. CREST-PRESTO国際シンポジウム, 東京都, 2015 年 11 月 5-6 日.
26. 黒田純平 (大阪大学). The in vitro analysis of the cells generating micro bone tissue of fins. BMB2015, 神戸市, 2015 年 12 月 1-4 日.
27. 荒巻敏寛 (大阪大学). Bioelectrical signal controls skin pattern formation of zebrafish. 第 8 回光操作研究会, 東京都, 2016 年 9 月 29 日.
28. 船附壮一 (大阪大学). Screening of the gene for skin pattern formation in zebrafish. 第 87 回日本動物学会年会, 宜野湾市, 2016 年 11 月 14-19 日.
29. 長谷川彰人 (大阪大学). The analysis of the cells generating micro bone tissue of fins. 第 87 回日本動物学会年会, 宜野湾市, 2016 年 11 月 14-19 日.
30. 黒田純平 (大阪大学). The in vitro analysis of the cells generating micro bone tissue of fins. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日.
31. 黒田純平 (大阪大学). The mechanism about the cell autonomous generation of collagen crystal involved with fin skeletal development. 第 50 回日本発生生物学会, 東京都, 2017 年 5 月 10-13 日.
32. 山中洋昭 (大阪大学). The intrinsic cell chirality of zebrafish pigment cell. 第 69 回日本細胞生物学会大会, 仙台市, 2017 年 6 月 13-15 日.
33. 坂下美咲 (大阪大学). 魚類の椎骨側部にある梁状構造ができる原理. 第 37 回日本骨形態計測学会, 大阪市, 2017 年 6 月 23-24 日.
34. 澤田莉沙 (大阪大学). Exclusion mechanisms among pigment cells in zebrafish pattern formation. 第 23 回小型魚類研究会, 甲府市, 2017 年 8 月 29-31 日.

35. 坂下美咲 (大阪大学). 魚類脊椎骨の 3 次元形態形成の研究. 日本動物学会第 88 大会, 富山市, 2017 年 9 月 21 日.
36. 白居優 (大阪大学). ゼブラフィッシュの色素細胞において細胞集団サイズを制御するギャップジャンクションサーキットの探索. 日本動物学会第 88 大会, 富山市, 2017 年 9 月 23 日.
37. 白居優. (大阪大学). ゼブラフィッシュの模様形成において、黒色素胞の集団サイズを制御するギャップジャンクションサーキットの探索. Conbio2017(2017年度生命科学系学会合同年次大会), 神戸市, 2017 年 12 月 6 日.
38. 中川日々紀 (大阪大学). コラーゲン結晶の配向が誘導するひれ骨のかたち. Conbio2017(2017 年度生命科学系学会合同年次大会), 神戸市, 2017 年 12 月 7 日.
39. 澤田莉沙 (大阪大学). ゼブラフィッシュ模様形成における色素細胞の 2 種類の排除メカニズム. Conbio2017(2017 年度生命科学系学会合同年次大会), 神戸市, 2017 年 12 月 8 日.
41. 丸田尚道 (大阪大学). 魚類の鰭骨を直線的に形成するコラーゲン結晶の機能. Conbio2017(2017 年度生命科学系学会合同年次大会), 神戸市, 2017 年 12 月 8 日.
40. 黒田純平 (大阪大学). 魚類ヒレ骨格形成に必須なコラーゲン結晶の自律的合成メカニズム. Conbio2017(2017 年度生命科学系学会合同年次大会), 神戸市, 2017 年 12 月 9 日.

(4)知財出願

①国内出願 (2 件)

1.発明の名称：細胞内へ物体を導入する方法

発明者：野村慎一郎、小椋利彦、齋藤明

出願人：国立研究開発法人科学技術振興機構

出願日：【国際出願日】2017 年 3 月 24 日

出願番号：特願 2014-059898

2.発明の名称：細胞内へのミトコンドリア導入方法、外因性ミトコンドリアが導入された細胞及び動物の製造方法

発明者：野村慎一郎、小椋利彦、齋藤明

出願人：国立研究開発法人科学技術振興機構

出願日：2015 年 9 月 18 日

出願番号：特願 2015-185058

(公開番号 2017-055729、2017 年 3 月 23 日公開)

②海外出願 (0 件)

③その他の知的財産権 なし

(5)受賞・報道等

① 受賞

科学技術への顕著な貢献 2012(ナイスステップな研究者) 科学技術政策研究所

② マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)
なし

③ その他

NHKワールド「Science View」において、研究成果の内容を海外向けにTV放送された。
(2012年)

日本テレビ「目がテン」において、「生き物(模様)の科学」というタイトルで模様のできる仕組みについて解説した。(2015年)

(6)成果展開事例

① 実用化に向けての展開

小椋グループで開発した技術は、どれも、細胞工学的な真偽術として有用なものであると考えられますが、実用に向けての展開は未だ行っておりません。

② 社会還元的な展開活動

・万博公園内にある水族館「ニフレル」において、2016年10月より、パターン形成原理を説明する展示を行っている。現在でも継続中。

・成果をHPに掲載し一般公開している。

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/skondo/saibokogaku/index.html>

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2012年10月21日	第7回女子中高生のための関西科学塾	大阪大学	10人	テーマ「生き物の形づくりをコンピュータで再現する」
2013年2月15日	大阪大学21世紀懐徳堂 i-spot 講座	淀屋橋 odona2 階	60人	テーマ「動物の体のデザイン」
2013年12月4日	新しいメカノバイオロジーを目指す工学と生物学の融合	神戸国際会議場5階501	200人	分子生物学会のワークショップとして細胞の力と動きに関する講演会
2014年4月1日	大阪大学大学院生命機能研究科セミナー	大阪大学	35人	テーマ「古生物の形を復元する」
2014年7月7～8日	ミーティング	東北大学加齢医学研究所	4人	研究の打合せ
2014年8月6日	大阪大学大学院生命機能研究科セミナー	大阪大学	40人	フグが作るミステリーサークルの謎を解く
2014年11月9日	第9回女子中高生のための関西科学塾	大阪大学	10人	テーマ「生き物の形づくりをコンピュータで再現する」
2015年10月8日	SSH 講演会	宮崎日本大学高等学校	500～1000人	テーマ「生物学の宝を探す」
2015年10月9日	SSH 講演会	宮崎学園高等学校・宮崎第一高等学校	500～1000人	テーマ「生物学の宝を探す」
2016年5月27日	SSH 講演会	愛知県立刈谷高等学校	500～1000人	テーマ「模様の研究から考える<科学の楽しみ方>」
2017年1月11～12日	ミーティング	東北大学加齢医学研究所	4人	研究の打合せ
2017年3月25～26日	第11回女子中高生のための関西科学塾	大阪大学	10人	テーマ「生き物の形づくりをコンピュータで再現する」
2017年11月4日	日本物理学会 2017年度公開講座「物理で探る生物の謎」	東京大学伊藤謝恩ホール	200人	テーマ「生物の模様ができるしくみ」
2018年1月10日	シニア自然大学校	大阪産業創造館	50人	テーマ「動物の形と模様」
2018年3月17日	ナショジオオープンキャンパス動物編	YMCA 国際文化センター	300人	小学生対象

§ 6 最後に

まず、5年間にわたり私どもの研究を支援していただいたことに、心よりお礼申し上げます。

研究の経過としては、最初のところで、作業仮説の見直しを迫られるという状況に陥入り、いきなり苦境に立たされました。しかし、「細胞の動態を見てモデルを修正していく」という、皮膚模様研究の時から基本姿勢に戻り、それを堅持することによって、(今となってみればですが)、以前のモデルよりも、ずっと実験事実との整合性もあり、しかも、斬新なモデルに辿りつけたと、胸をなでおろしています。もちろん、方針変更のマイナス面はあり、実際に、骨関係の論文発表はかなり遅れています。しかし、データは、特にこの2年ほどは順調に出ており、あと1年ほどあれば、以前、チューリングを復活させた時のように、学会に新たな話題を提供できると考えています。

骨の形成原理は結果的に3つのカテゴリーに分かれました。

なぜ、鰭の骨は直線的な構造なのだろう？という素朴な疑問から出てきた「直線的構造物(アクチノトリキア)の形成・配列による形態形成」というかなり突飛なアイデアは、実は、既に、海綿動物において例があります。京都大学准教授の船山さんの研究で、カワカイメンの細胞が、シリコンのファイバーを作り、運び、立てる、という作業を、しかも、分業体制で行うという観察をしています。まるで建築作業員のようなのです。

ファイバーを連結させる作用は、同時に、ひれ骨パターンの分岐のための原理としても使えるため、数理モデルの対象としても優れています。また、軟骨性のファイバーが骨の前駆体になるという点で、軟骨性骨化のモデルとしても有効でしょう。

形状最適化を使った骨形態モデルに関しては、その根拠として遺伝子(STP)の研究があることと、操作できる実験系(ゼブラフィッシュの脊椎)があること、皮骨の外形と海綿状骨を同列に扱えるということ、という3つの強いメリットがあり、今後、大々的に発展させていけると期待しています。

ひれ骨の分節の間隔に関する研究ですが、研究機関の後半になって、光制御がうまくできるようになったため、かなり遅れました。この部分だけは、骨芽細胞のシグナル伝達制御で調節されているため、当初の作業仮説とかなり近い考えで進めることができます。最初にこちらがうまく動いていれば、計画全体の遂行も、かなり違ったものになった可能性もあるのですが、これだと、しょせんチューリングの手のひらからは脱出できないことになりますので、自分としては、(今となってみればですが)方針変更をしてよかったと感じています。