

「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」  
平成 24 年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告
----------------

近 藤 滋

大阪大学大学院生命機能研究科・教授

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

## §1. 研究実施体制

### (1) 近藤グループ

① 研究代表者: 近藤 滋 (大阪大学大学院生命機能研究科、教授)

#### ② 研究項目

##### (1) 皮膚模様の系での形成原理の詳細な解明

1-1: ギャップジャンクションを通じて伝わる低分子シグナルの解明

1-2: 黄色細胞の樹条突起に存在しているはずの、膜局在性のリガンドの解明

1-3: 培養皿内での相互作用の定量化と、パターン形成の再現

##### (2) 骨の形成に模様形成と同様の原理が働いている事の証明

2-1: 骨変異遺伝子のクローニング

2-2: 骨細胞培養と相互作用解析

### (2) 小椋グループ

① 主たる共同研究者: 小椋 利彦 (東北大学加齢医学研究所、教授)

#### ② 研究項目

##### (1) 骨芽／破骨細胞の力学制御

・ 骨芽／破骨細胞の解析

・ 変異マウスの解析

##### (2) 鉄ナノ粒子による力学制御新技術の確立

・ 鉄ナノ粒子による力学制御

・ 力学刺激への反応

## § 2. 研究実施内容

近藤グループ

### (1) 皮膚模様の系での形成原理の詳細な解明

1-1: ギャップジャンクションを通じて伝わる低分子シグナルの解明

レオパード遺伝子(cx418)を、カエルの卵に発現させ、パッチクランプ法を使って、チャンネルを通過するイオン等を検出する事を試みている。残念ながら、まだ、有効なデータを得ていない。

1-2: 黄色細胞の樹条突起に存在しているはずの、膜局在性のリガンドの解明

候補シグナルの一つは DeltaC であり、現在シグナルの受け手の細胞であるメラノフォアでの Notch シグナル応答遺伝子の発現上昇を検知しようとしている。リアルタイム PCR でなんとか差が検出できた。また、個々の樹状突起の動きをインビボでモニターするため、キクメ遺伝子(UV で単一細胞を光らせることが可能)を発現している魚を作成した。

1-3: 培養皿内での相互作用の定量化と、パターン形成の再現

今まで、色素細胞をバルクで精製して、インビトロの挙動を記録していたが、単一細胞をピックアップして記録する方法に変えることで、より正確な細胞ごとの挙動の記録に成功した。

### (2) 骨の形成に模様形成と同様の原理が働いている事の証明

2-1: 骨変異遺伝子のクローニング

懸案であった STP の原因遺伝子が最終的に特定された。予想通り CX43 であり、これは尾の短縮を引き起こす原因遺伝子と同じである。同じ遺伝子のアレルの違いが、骨の短縮を引き起こす場所の違いにつながる理由は、今のところ全く解らないが、今後面白い展開になることは確実であろう。

2-2: 骨細胞培養と相互作用解析

骨芽細胞を安定して FACS により分離精製するために、種々のイメージング用遺伝子の導入を行っている。

2-3: (追加項目)

骨の形態に関する基礎データとして、脊椎、鰭条の各成長段階における詳細な3次元データを、透明化骨染色法とレーザー顕微鏡を使って行っている。(図1)

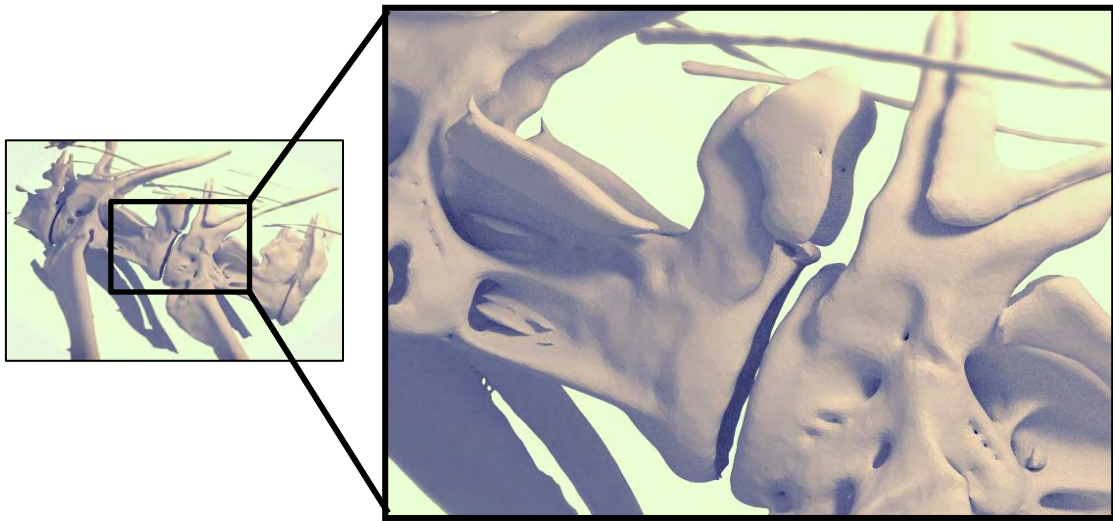


図1:蛍光データから3D 構築したゼブラフィッシュ脊椎の関節部分

#### 小椋グループ

##### (1) 骨芽／破骨細胞の力学制御

###### 1-1: 骨芽／破骨細胞の力学操作

細胞の力学操作を行う目的で、種々の骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞の導入を行い、その培養条件の設定を行った。24 年度に海外の細胞バンクや論文を検索した結果、骨細胞としては MLO-Y4 細胞株が最適と思われることから、今後、この細胞株の導入を検討したい(残念ながら、国内外の細胞バンクには登録されておらず、樹立者が米国であり、入手は容易ではないが、文献上、国内の 2 カ所が所用している可能性があるため、譲渡可能かどうか確認中である)。また、培養細胞を伸展したり、せん断応力を印加する装置の再設定を行い、これまで以上に微細な条件での印加を可能にした。特に、伸展刺激の種類(サイン波、矩形波 etc)について、多様な刺激を加えられるように改良を加えた。

###### 1- 2: ノックアウトマウス作成

変異マウスの解析について、Filamin C KO マウスの作製を行った。EUCOMM に KO ES 細胞の発注を行い、2012 年 9 月に筑波大学に輸送された。筑波大学において、10 月から KO マウスの作製を開始し、1 月 30 日にヘテロマウスが加齢医学研究所に搬入された。現在、繁殖、コロニーの拡大を行っている。

##### (2) 鉄ナノ粒子による力学制御新技術の確立

###### 2-1: liposome 融合技術

鉄ナノ粒子の細胞内導入を目的として、細胞融合装置を用いて培養細胞と liposome を融合させる実験を継続し、詳しい条件検討を行っている。予備的な実験では鉄ナノ粒子を封入した liposome を融合した所、細胞が磁石化したことを確認した。今後、Streptoavidin-coated beads

に **fluorescent avidin** を結合させ、蛍光化したものを導入する試みと電子顕微鏡による細胞内鉄粒子局在の確認を行うために準備中である。

#### 2- 2: **in vivo biotinylation** 技術の確立

**in vivo biotinylation** のための **BirA biotin ligase** の単離、**biotinylation-tag** の合成とベクターカセット化を終了し、任意の蛋白をビオチン化するための材料を整えた。これらの材料を用いて、培養細胞中で任意の蛋白質にビオチンを付加できることを確認した。