

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)  
渡邊正勝(大阪大学大学院生命機能研究科、准教授)  
宮澤清太(大阪大学大学院生命機能研究科、助教)  
荒巻敏寛(大阪大学大学院生命機能研究科、特任研究員)  
黒田純平((大阪大学大学院生命機能研究科、特任研究員)  
井上新哉(大阪大学大学院生命機能研究科、特任研究員)  
浜田裕貴(大阪大学大学院生命機能研究科、五年一貫制博士課程 5 年)  
渡辺大祐(大阪大学大学院生命機能研究科、五年一貫制博士課程 5 年)  
三須晃裕(大阪大学大学院生命機能研究科、五年一貫制博士課程 3 年)

### ② 研究項目

- ・皮膚模様の系での形成原理の詳細な解明
- ・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
- ・骨(臓器・器官)の形態を制御する技術の創出

### (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)  
渡邊裕介(東北大学加齢医学研究所、助教)  
宮坂恒太(東北大学加齢医学研究所、助教)  
久保 純(東北大学加齢医学研究所、助教)

### ② 研究項目

- ・骨芽／破骨細胞の解析

- ・ 変異マウスの解析
- ・ 鉄ナノ粒子による力学制御
- ・ 力学刺激への反応

## § 2. 研究実施の概要

本研究チームは、これまで近藤らが明らかにしてきたゼブラフィッシュの皮膚模様パターンの仕組みが、骨の形態形成にも働いているとの仮説を基に、動物の形態形成の原理を解明しようとするものである。近藤チームは、皮膚模様形成の分子的詳細の解明と、その知見を利用して骨パターン形成に働く中核的な因子の発見とそれを使った数理モデル作りを行う。小椋チームは、技術的な側面、特に、力のかかった場における細胞の動きの解析、さらに、任意の力を細胞に与えその挙動を見る技術の開発を行う。25年度の研究結果の概要を以下に述べる。

### 近藤グループの主な進展

#### 色素細胞の樹条突起の動態

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、黄色細胞の方向に延ばした時(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。

#### 培養皿内での相互作用の定量化と、パターン形成の再現

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)

#### 骨変異遺伝子 *stp* の変異の解析

Talen 法を用いてドミナントで骨の短縮を起こすアレルをKOすることで、正常(+/-)に戻ることを確認し、原因遺伝子が決定した。

#### 骨芽細胞破骨細胞の成長する骨上における分布

当初の予測では、脊椎骨とその付属枝の成長部分に骨芽細胞が、縮小部分に破骨細胞が存在するとしていたが、それぞれの細胞の特異的な染色画像により、それが確かめられた。

#### Talen 法による CX 遺伝子群の破壊

既にcx43を含むコネクシンクラスターの全てをKOしたラインを構築することに成功している。予想通り、ホモにすると致死であったので、今後、ヘテロの卵に対し Talen, CRISPR 等でKOを行うと両アレルがつぶれた個体を FO で観察できることになる。

### 小椋グループの主な進展

本年度は、鉄粒子による力学制御のための基礎技術の確立を中心に行った。細胞融合装置を

用いて、培養細胞とリポソームの融合実験を繰り返し、融合条件、リポソームの形成、導入鉄粒子の選択などを行った。その結果、直径2ミクロンまでの固体粒子が細胞内に導入できるようになった。1~2ミクロンの粒子では、細胞1個あたり数個の粒子が導入できる。また、100ナノメートルの粒子だと、数百個の粒子を導入できる。しかも、導入効率は40~80%で、今後の実験展開に十分な高効率であった。鉄粒子、その他の素材の粒子、ともに、細胞に対する毒性はほとんど見られず、蛍光ラベルしたビーズは最低でも1週間保持され、細胞は正常に分裂した。また、細胞内に鉄微粒子を導入した後、細胞を浮遊させ、顕微鏡で観察しながら強力なネオジム磁石を近づけると、細胞を任意の方向に動かすことができた。また、細胞を回転させることも可能であった。

鉄微粒子にヒストンを付着させ、細胞分裂を起こさせると、鉄微粒子が核内に取り込まれ、クロマチンに結合すると予想される。この実験を行うため、ヒトヒストン H2B 蛋白を精製する必要がある。今年度は、ヒトヒストン H2B の cDNA を単離し、大腸菌に発現させる系を立ち上げた。大腸菌内で大量のヒストン H2B が発現していることが確認され、精製を行った。また、ミトコンドリア、アクチン骨格に付着させるために、mitofusin1、アクチンの蛋白発現系を樹立し、ミトコンドリア外膜に結合できる mitofusin1 蛋白の発現、精製を行った。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### 論文詳細情報(国際)

1. Shinya Inoue, Shigeru Kondo, David M. Parichy, Masakatsu Watanabe, "Tetraspanin 3c requirement for pigment cell interactions and boundary formation in zebrafish adult pigment stripes", *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, pp.190-200, 2014 (DOI: 10.1111/pcmr.12192)
2. Hiroaki Yamanaka, Shigeru Kondo, "In vitro analysis suggests that difference in cell movement during direct interaction can generate various pigment patterns in vivo", *PNAS*, Feb 4;111(5), pp.867-72, 2014 (DOI: 10.1073/pnas.1315416111)
3. Hiroki Hamada, Masakatsu Watanabe, Hiu Eunice Lau, Tomoki Nishida, Toshiaki Hasegawa, David M. Parichy and Shigeru Kondo, "Involvement of Delta-Notch signaling in zebrafish adult pigment stripe patterning", *Development*, 2014 Jan;141(2), pp.318-24, 2014 (DOI: 10.1242/dev.099804)
4. Banjo T, Grajcarek J, Yoshino D, Osada H, Miyasaka KY, Kida YS, Ueki Y, Nagayama K, Kawakami K, Matsumoto T, Sato M, Ogura T, "Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of *miR-21*", *Nat Commun.*, 2013;4:1978 (DOI: 10.1038/ncom1978)

10.1038/ncomms2978)

**(3-2) 知財出願**

- ① 平成 25 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)