

# 研究報告書

## 「カイメンが工学的に優れた骨格構造を自律的に構築するメカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 船山 典子

### 1. 研究のねらい

動物の外部形態は骨格により決定される。即ち、生物の多様な形態を生み出す仕組みの理解には、骨格形成機構の解明が必須である。これまで解析の進んできた脊椎動物、昆虫、棘皮動物などの骨格形成機構は全て、共通の形態形成原理、即ち「まず骨格のパターンが決まり、そのパターンに従って骨格構成要素(軟骨など)が細胞により作られ、その場で骨格が形成される」というものであった。

私達はこれまで全く解析されていなかったカイメン骨格形成機構に着目、解析を進めている。カイメンの骨格は、「骨片」と呼ばれる微細なガラス質の骨格構成要素が非常に多数組み上げられた建築工学的にもすぐれた柱と梁構造である。しかしカイメン体内で細胞が、どの様にこの骨片を建て繋げて骨格を構築するメカニズムは長い間未解明のままであった。私達は、骨片は新規に見いだした骨片を運搬する細胞(transport cellsと命名)により、体内をダイナミックに運ばれ、その先で建て・繋げられることを明らかにし、カイメン骨格形成機構は全く新しい骨格形成機構であることを見出していた。

本研究ではこの発見の上に「何時、どこに、どの様に骨片を建て・繋げていくかに関わる運搬細胞を中心とした細胞の協調作業を制御する全く新規と期待できるロジック」を、骨片骨格により刻々と広がる体内空間との関係に着目して解明することを目的とした。解明した骨片骨格形成機構から、固着性生物であるカイメンの、個体毎にバリエーションの大きな可塑的な成長を可能にする仕組の解明につながると考えた。

本研究の展開として、水流などその場の環境からの物理力に対応して形成する骨格が微調整されている可能性とその機構について明らかにすることを目指した。カイメンは同じく固着性生物である植物やサンゴなどと同様、種特異的な形態を持ちながらも、棲息環境によって形態が違ってくるといった一般的な観察などに着想した。これらの研究成果から、風力、水流、水圧など外部からの物理力に耐久性を持ちつつ、空間を常に拡張出来る「成長する」人工建築物デザインへの応用の可能性も探れるのではないかと考えた。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、カイメン体内における骨片運搬経路の XY 面における詳細なトラッキングと解析を可能にし、その結果、骨片は上皮組織上を骨片運搬細胞によってストカスティックに運搬され、その先でたまたま骨片が上皮に刺さると建てられること、即ち、パタニングなどによって骨片が建てられる位置が決められ、その予定位置に向かって骨片が運搬されるのではないかとこの当初の仮説とは全く異なるメカニズムが存在することが明らかになった。次に、カイメン側面からの蛍光像の取得と多焦点面・長時間タイムラプスを可能にする独自の培養・顕微

鏡システムの構築に成功した。これにより、骨片が建てられる過程を捉えることに成功、そのステップを明らかにした。次に、建てられた骨片にさらに骨片が繋げられ、骨片から成る柱構造を伸長する過程も、同様の4つのステップによることを明らかにした。これらの成果から、カイメン骨格形成機構は、骨片の上皮組織上の「運搬」、上皮に骨片を「刺す」、「先端を持ち上げる」「基底側端を固定する」という、連続して起きる一連の物理的な細胞作用の繰り返しの結果、骨片が1本1本骨格に加わる、自己組織化機構であることを解明した。即ち、既知の動物の骨格形成機構に共通した形態形成メカニズムとは根本的に異なる、全く新規の動物の形態形成メカニズムの発見である。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「骨片を建てる過程およびその過程に働く細胞・組織メカニズムの解明」

本研究ではまず多焦点・XY平面での詳細なタイムラプス撮影法を確立し、骨片運搬過程の詳細なトラッキング法を検討した。ソフトウェアを用いた自動トラッキングは骨片の形状などから技術的に困難であり、最終的には全て手作業でトラッキングを行った。その結果、決まった骨片運搬経路はないこと、骨片が建てられる順に規則性はないこと、骨片が建てられる場のパタニングを示す遺伝子発現はみられないことを明らかにした。これらの結果から、骨片運搬はストカスティックであり、パタニングにより決定された建てられる位置に運搬されるのではないという予想外の結論に至った。また、骨片の先端が持ち上がった後も基底側端は移動していることが分かり、骨片を「運ぶ」、「先端を持ち上げる」、その後「基底側端が固定される」というステップを明らかにした。

次に、共同研究による共焦点顕微鏡を用いた骨片運搬細胞の挙動の詳細な解析により、骨片運搬細胞が基底上皮組織上を移動、骨片を運搬し続ける結果、体の縁付近などで上皮組織に骨片が「刺さる」こと、その後骨片の先端が持ち上がることを明らかにした。即ちカイメンでは、骨片を建てるために体の内側から外に骨片を着き出すという予想外のメカニズムを用いていることが初めて明らかになった。

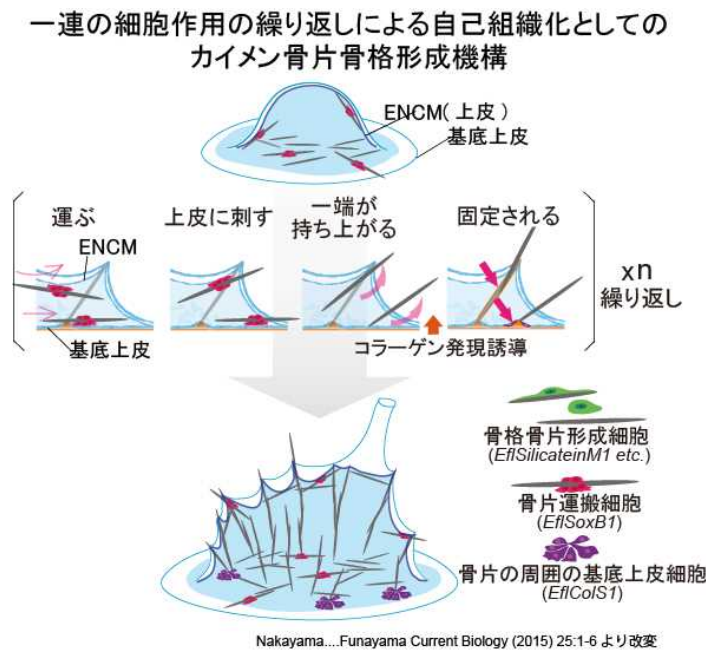
また、タイムラプス撮影と mRNA 発現解析を組み合わせる工夫を行い、建てられた骨片の周囲で特異的に発現する遺伝子として私達がすでに見出していた短鎖コラーゲン遺伝子が、骨片骨格形成過程においていつ発現しているのかを解析した。骨片の先端が持ち上げられ始めた後に、次第に基底側端付近の基底上皮細胞で短鎖コラーゲン遺伝子の発現が誘導されること、即ち「刺す」ステップの後、「先端を持ち上げる」ステップの間に短鎖コラーゲンの mRNA 発現誘導が行われていると分かった。この結果は、前もって骨片が建てられる位置が決まっているのではないという先の結論を支持する結果である。

### 研究テーマ B 「骨片を繋ぐ過程およびその過程に働く細胞・組織メカニズムの解明」

試行錯誤の結果、生きたカイメン側面からの蛍光像を取得出来る独自の顕微鏡システムを構築、生きたカイメンの側面から、蛍光可視化した骨片の画像取得に初めて成功した。また、多焦点面、5分毎、24時間以上の詳細なタイムラプス撮影を可能にする培養法を確立、骨片骨格形成過程を側面から観察・解析した。カイメンの体内空間を被う上皮組織は、基質に接着している基底上皮組織とその他の上皮組織部分(特定の名称がなく EMCM と命名)で

ある。カイメン側面からの詳細なタイムラプス撮影と解析により、骨片骨格形成の始めから、骨片はこれら基底上皮組織と ENCM 上をストカスティックに運搬されており、体の端などで建てられること、その後 EMCM 上を運搬された骨片が建てられた骨片の先付近に「運搬される」とそこで EMCM に「刺さる」、「先端が持ち上がる」、基底側端が建てられた骨片に「固定される」という建てられる際と同様の4つのステップにより「繋げられる」ことを明らかにした(下図)。即ち、当初は複雑な機構により繋げられると予想していた「骨片を繋げる」課程を明らかにすることが出来た。

### 研究成果のまとめ【カイメン骨片骨格形成機構の原理】



上記の研究結果から、既知の動物の骨格形成機構とは根本的に異なる形態形成メカニズムによる骨格形成機構の存在を見出し、その過程を明らかにした。カイメン骨片骨格形成機構は以下2つの形態形成メカニズムにより実現されていると解明した。第1に、「骨片形成細胞(資材屋)、骨片運搬細胞(大工)、コラーゲン分泌細胞(基礎屋)の分業」である。これにより、骨格形成要素の産生された場によらない自在な骨格形成を可能にしている。第2に、「連続して起きる骨片を「運ぶ」「刺す」といったシンプルで物理的な細胞作用の繰り返しによる自己組織化」である。これは、既知の動物の骨格形成機構とは根本的に異なる想像もされていなかった全く新規の機構である。固着性生物であるカイメンは、固着性生物の特徴の1つである、種特異的な形態を持ちながらも、個体ごとの形態バリエーションが大きな可塑的な成長を行う。本研究で明らかになった連続して起きる一連の「細胞が A という状況ではBを行う」という物理的な細胞作用の繰り返しの結果、骨格が形成される自己組織化機構は、「刺す」というステップに、体の成長に従って体の外側に骨片を建て・繋げることが実現でき、自然にその時その時の体に合わせた骨格が形成される、という非常に優れた機構であることも明らかに出来た。これらの成果を Current Biology 誌に発表した。

## (2) 環境からの物理力(水流)に応じた骨格形成微調整機構の可能性と解析

平行して行っていた私達の別プロジェクトが終了したため 2015 年度からこの研究課題を引き継いで行った。この別プロジェクトではすでに、一定流速下でカイメンの個体形成を行わせ、同時に倒立顕微鏡を用いてカイメン側面から撮影できる培養・撮影システムを開発・確立に成功、タイムラプス撮影を可能にしていた。本研究では、2015 年度は学部学生の実験補助のパートタイム雇用によりタイムラプス撮影を行い、水流が当たる部分において建てられた骨片に次の骨片が繋がる結合位置が、静置条件での培養時よりも低い傾向があるという、別プロジェクトの結果からの仮説を支持する結果を得た。現在、骨片の結合位置が低くなる細胞・組織機構について詳細な解析を進めており、別プロジェクトの成果と併せ、論文にまとめてゆく予定である。

## 3. 今後の展開

本研究により、全く新規の細胞作用による自己組織化という骨格形成機構を見出す事が出来た。この上に、近年着目されている研究分野である、環境からの作用を含めた動物の形態形成及び成長の理解という Ecological Developmental Biology の視点を加えた展開が期待できる。カイメンは植物・サンゴなど他の固着性生物と同様、種特異的な棲息環境により外部形態が異なることが一般的に知られている。動物の外部形態を決定するのは骨格であるため、カイメンは棲息環境により形成する骨格を微調整できる仕組みを持つのではないかと予想出来る。棲息環境からの物理的な力に応じて、自己組織化による骨格形成がどの様に微調整されるのか解明出来れば、多様な形態を生み出す形態形成メカニズムの新たな知見が得られるだけでなく、深海、地球外惑星などといった事前に詳細な測定が困難な環境に自然に合わせた建物建築法など異分野への展開が期待できる。

## 4. 評価

### (1) 自己評価

(研究者)

研究成果としては自分の予想以上に研究が進み成果を出すことが出来たと考えている。また、次の展開のためのシーズを複数得ることも出来た。これは、発生生物学・細胞生物学、生物物理学、物理学、生化学、工学など、非常に多様な分野の研究者が集まった本領域において、領域会議・自主勉強会などの度に、多くの助言や質問、コメントを貰え、そのおかげで独自の解析装置が確立出来たこと、研究内容に対して多角的な視点で考察出来たからこそ得られた成果と考えている。

この研究成果は、カイメン骨片骨格形成機構の過程とロジックに関する論文を発表することが出来た。EurekAlert で Cell press の記者による紹介文と共に主な 3 本の動画を一般に配信することも出来、それにより Nature 誌の Research highlight や、Phys.org, ナショナルジオグラフィック web 版、複数の新聞などで取り上げられ、生物学以外の研究者だけでなく一般の方々にも、動的で建築工法的なカイメン骨片骨格形成という生物の持つ巧妙で魅力的な形態形成メカニズムを伝える事が出来た。私達は、本研究が取り組むカイメン骨片骨格形成という現象は、科学・生物への興味を刺激する魅力的な現象であると考え、様々な方々に伝えたいと長く希望してきていたため、この様な形で社会へ発信できたことも本研究の大きな成果と考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

最も外側の上皮を蛍光可視化し、ezDSLIMで長時間撮影に成功し、骨片運搬細胞が刺さった骨片を運搬している可能性を示した。また、側面からのカイメン蛍光像を撮影する倒立顕微鏡システムの構築に成功して、長時間タイムラプス解析により、additional spiculesはENCM上を運搬され、1段目の骨片と同様の5つの連続したステップにより、骨片に結合し組み上がることを解明した。このように、長い努力が実って、運搬細胞の可視化と横方向からの撮影技術の開発に成功したことによって、全く研究されてこなかった現象の理解が大きく進展したことを、高く評価したい。

ストカスティックな骨片運搬と置き位置決定の仕組みは、結果的に、カイメンの体内空間を最大化することになるのか、構造体の強化と空間最大化の両者を追求することになるのか、などのカイメンの形態形成戦略解明が課題である。この点に関して、緩急水流中での培養や、斜めまたは凹凸のある底面上で育てるなどの工夫によって、興味深い結果が得られる可能性も有り、今後の研究の進展が期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Nakayama S, Arima K, Kawai K, Mohri K, Inui C, Sugano W, Koba H, Tamada K, Nakata YJ, Kishimoto K, Arai-Shindo M, Kojima C, Matsumoto T, Fujimori T, Agata K, Funayama N. “Dynamic transport and cementation of skeletal elements building up pole-and-beam structured skeleton of sponges “ Current Biology (2015) 25:1-6
2. Alié A, Hayashi T, Sugimura I, Manuel M, Sugano W, Mano A, Satoh N, Agata K, Funayama N.” The ancestral gene repertoire of animal stem cells” Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Dec 22;112(51):E7093-100

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### ① プレスリリースなど

紹介記事

1. Research highlights How the sponge got its skeleton (Research highlight)  
*Nature* 525, 428
2. Sponge cells build skeletons with pole-and-beam structure  
[http://www.eurekalert.org/pub\\_releases/2015-09/cp-scb091015.php](http://www.eurekalert.org/pub_releases/2015-09/cp-scb091015.php)
3. The Surprisingly Complicated Construction Work of Simple Sponge

<http://phenomena.nationalgeographic.com/2015/09/17/the-surprisingly-complicated-construction-work-of-simple-sponges/>

4. カイメン体内で微細な建築資材(ガラス質の骨片)を細胞が運び、立て、組み上げる全く新しい骨格形成機構を発見

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150918/>

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2015/150918\\_2.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/150918_2.html)

5. 朝日新聞 (2015/9/24)

6. カイメンが明らかにした幹細胞の起源的な分子基盤

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2015/151207\\_1.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/151207_1.html)

## ② 総説

1. 近藤滋・船山典子 工務店細胞が「建設」する深海のスカイツリー  
細胞工学 34(11) 1096-1103 (2015)

## ③ 主要な学会発表

1. FUNAYAMA N. How do sponge cells build up the hierarchical spiculous skeleton?

日本生物物理学会第 51 回年会(招聘) (2013)

2. Funayama, N. What we can learn from sponges? – Origin of stem cells and a novel mechanism to construct 3-dimensional body International Workshop ” The origin of metazoans” (招聘) (2015)

3. 船山典子 5つの力学的細胞作用の繰り返しが自律的に海綿骨片骨格を形成する  
第 55 回 生物物理若手の会夏の学校(招聘 講演) (2015)

4. Funayama, N. Transport and cementation of skeletal elements into pole-and-beam structure in sponges JST-HMS joint symposium on Systems Biology (2015)

5. Funayama, N. Skeleton construction of sponges: the simple and accordingly robust mechanisms underlying both their plastic growth and phenotypic plasticity 熊本大学リエゾンラボ研究会／リーディングプログラム:HIGO 最先端研究セミナー (招聘)(2016)