

■本資料のご利用にあたって(詳細は「利用条件」をご覧ください)

本資料には、著作権の制限に応じて次のようなマークを付しています。
本資料をご利用する際には、その定めるところに従ってください。

***** : 著作権が第三者に帰属する著作物であり、利用にあたっては、この第三者より直接承諾を得る必要があります。

CC : 著作権が第三者に帰属する第三者の著作物であるが、クリエイティブ・コモンズのライセンスのもとで利用できます。

Ⓒ : パブリックドメインであり、著作権の制限なく利用できます。

なし : 上記のマークが付されていない場合は、著作権が東京大学及び東京大学の教員等に帰属します。
無償で、非営利的かつ教育的な目的に限って、次の形で利用することを許諾します。

- I 複製及び複製物の頒布、譲渡、貸与
- II 上映
- III インターネット配信等の公衆送信
- IV 翻訳、編集、その他の変更
- V 本資料をもとに作成された二次的著作物についての I からIV

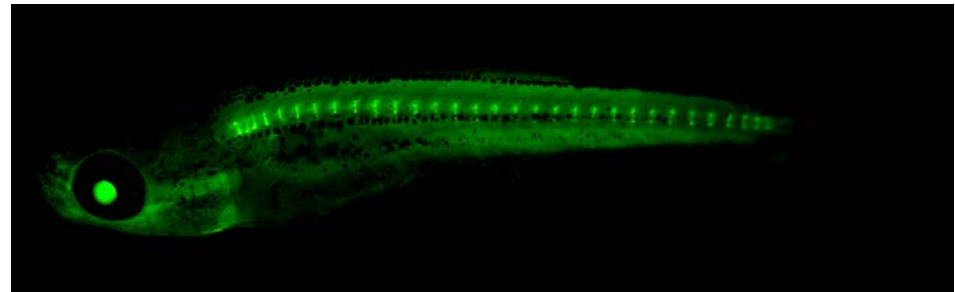
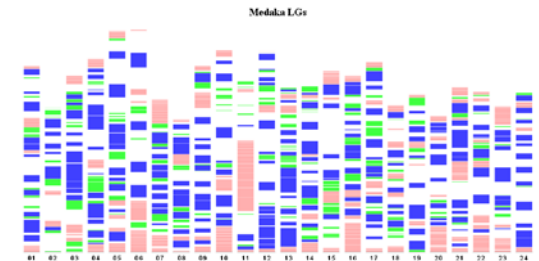
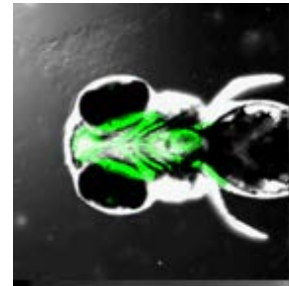
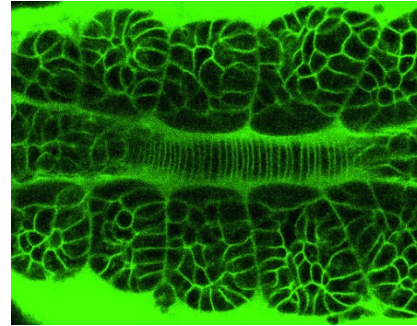
ご利用にあたっては、次のどちらかのクレジットを明記してください。

東京大学 Todai OCW 学術俯瞰講義
Copyright 2013, 武田洋幸

The University of Tokyo / Todai OCW The Global Focus on Knowledge Lecture Series
Copyright 2013, Hiroyuki Takeda

組織を正確に刻む分節時計

東京大学大学院理学系研究科・武田洋幸



1. 小型魚類と発生遺伝学

2. 組織を正確に刻む分節時計

動物の発生

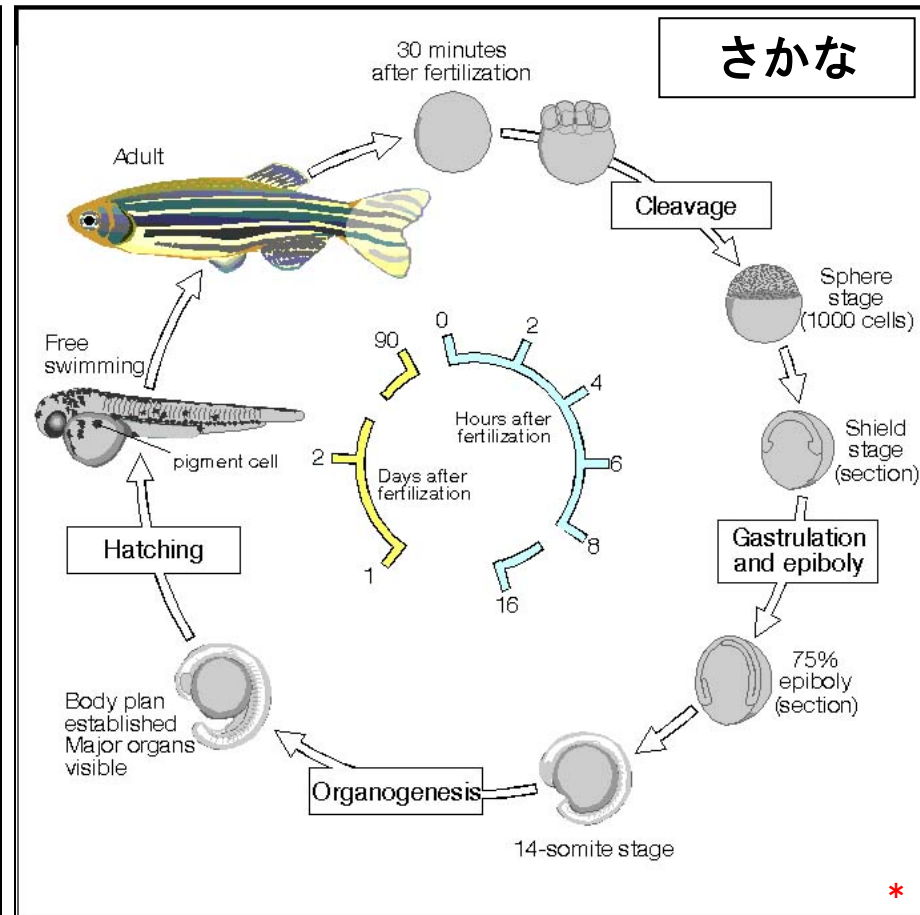
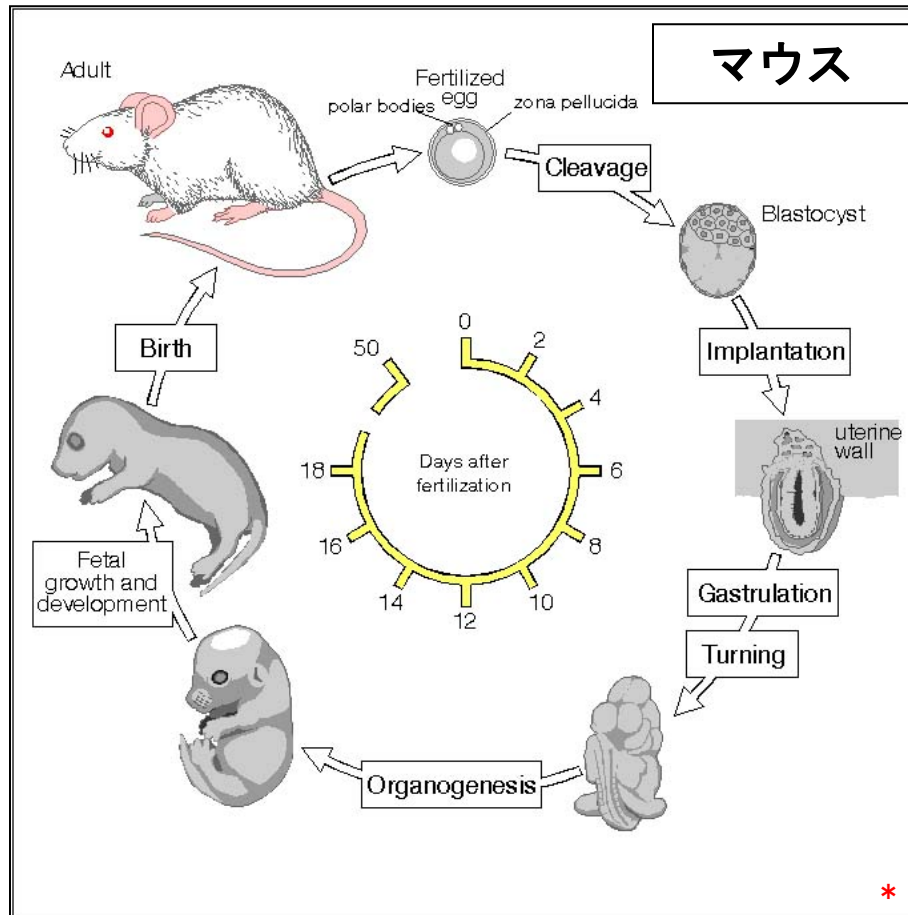
受精卵

~25,000遺伝子

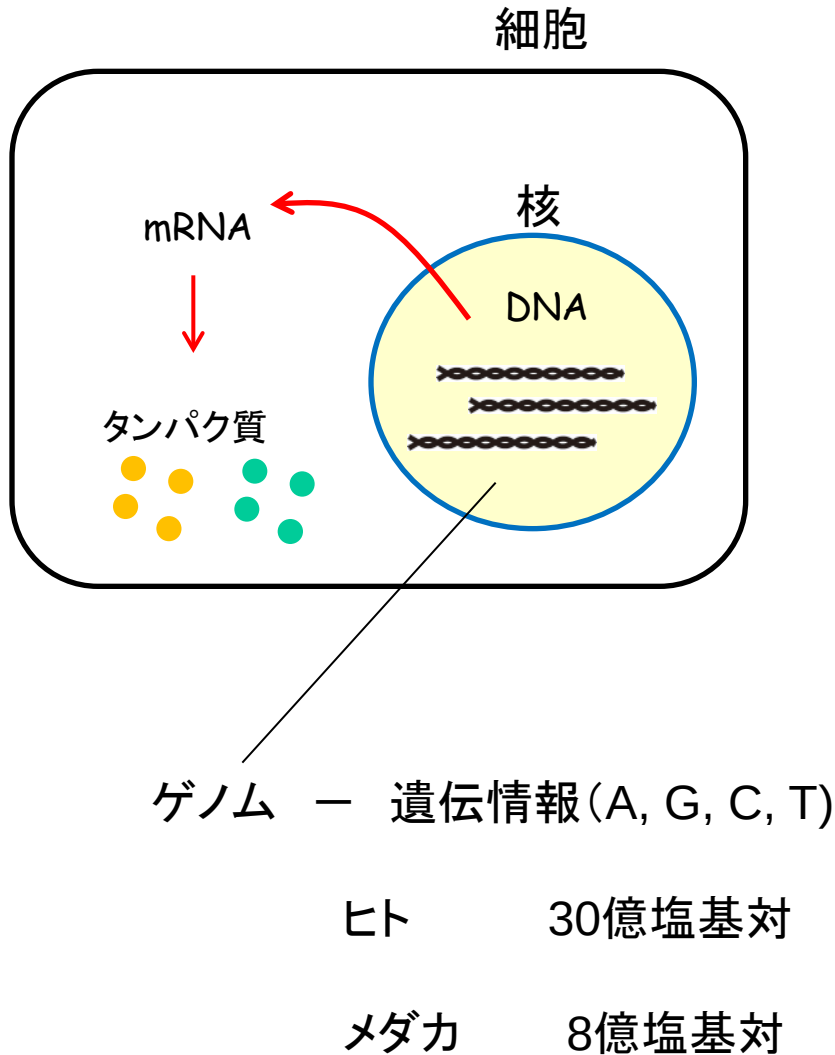
複雑な機能と
かたちを持つ個体

細胞数 1 個

60,000,000,000,000 個 (ヒト)



遺伝情報の流れ



遺伝子
20,000 - 30,000個

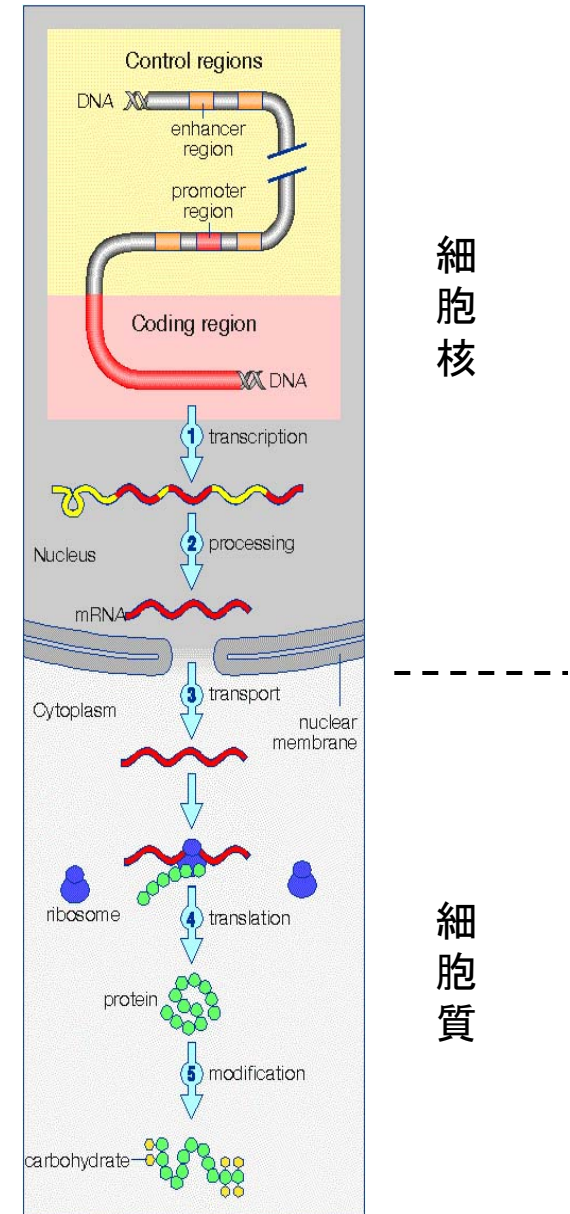
転写

mRNA

翻訳

蛋白質

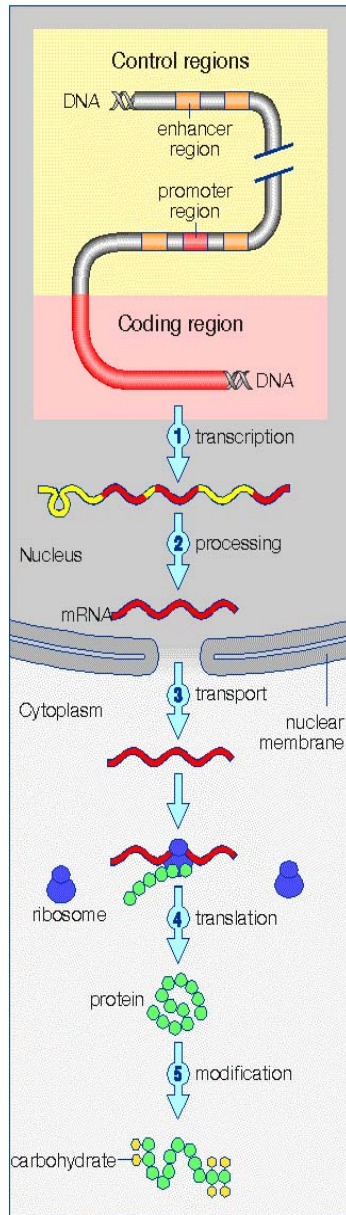
転写因子
分泌蛋白質
構造蛋白質
酵素



遺伝情報の流れ

細胞核

細胞質



遺伝子
20,000 - 30,000個



mRNA



蛋白質

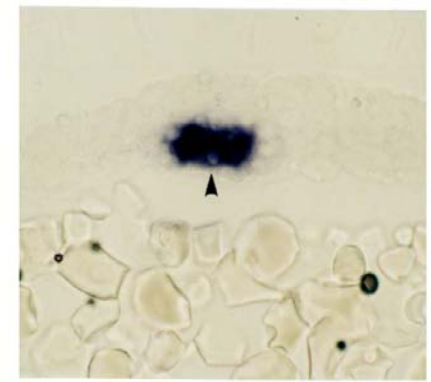
転写因子
分泌蛋白質
構造蛋白質
酵素

* Lewis Wolpert and Cheryll Tickle, *Principles of Development*, 4th ed., New York: Oxford University Press, 2010, p.18 Fig.1.19. (c) Oxford University Press 2011. By permission of Oxford University Press, USA. www.oup.com

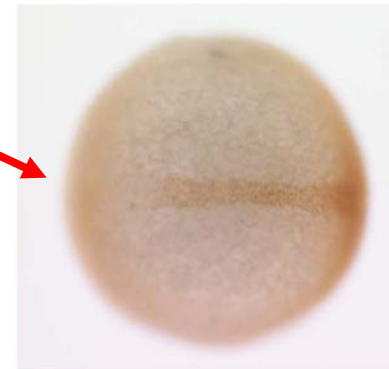
遺伝子発現の検出

ゼブラフィッシュ尾芽胚における
転写因子no tail の発現

In situ hybridization 法



抗体染色法



動物の発生

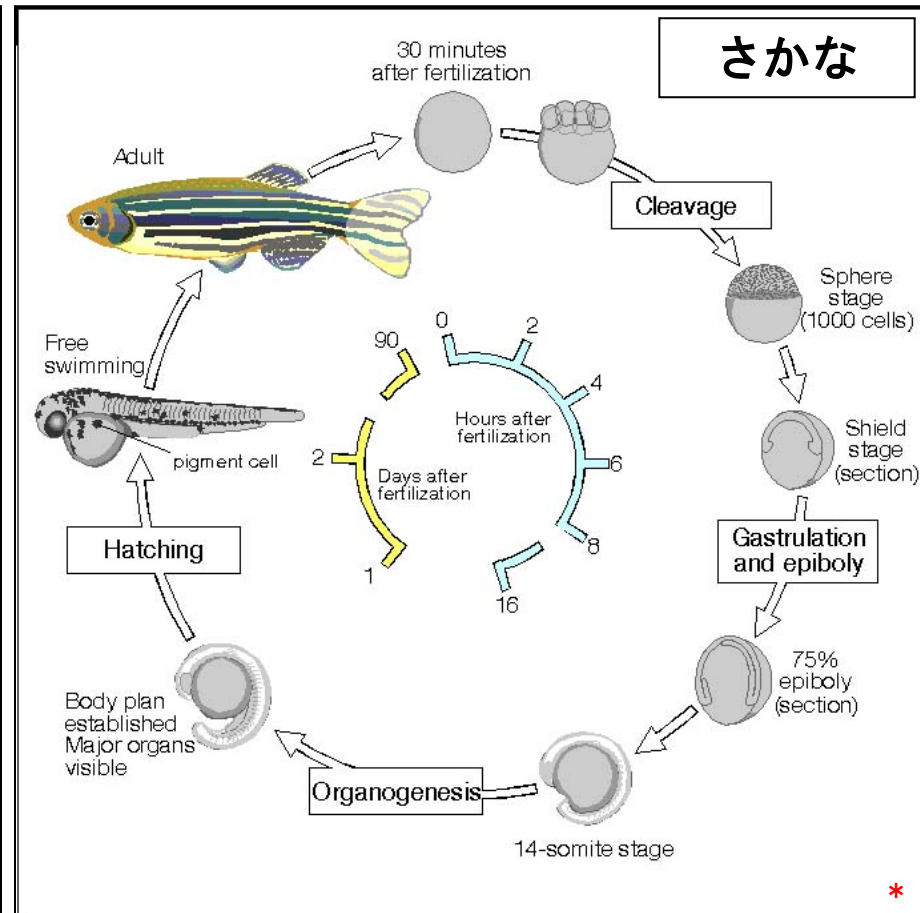
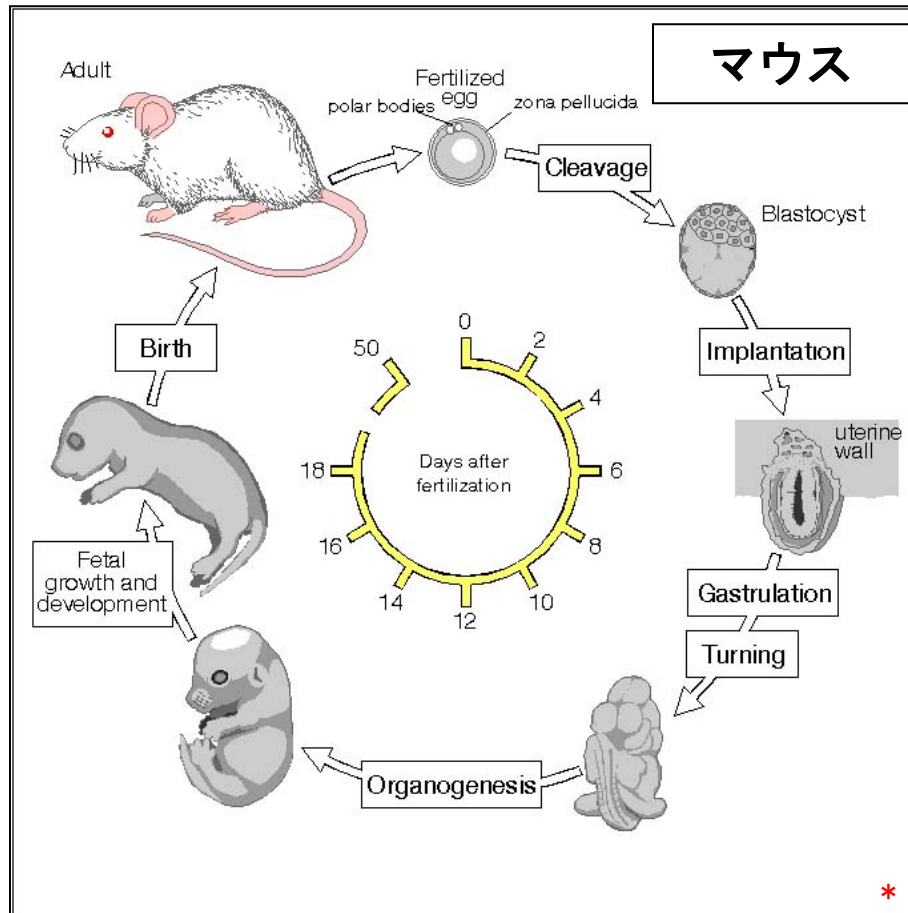
受精卵

~25,000遺伝子

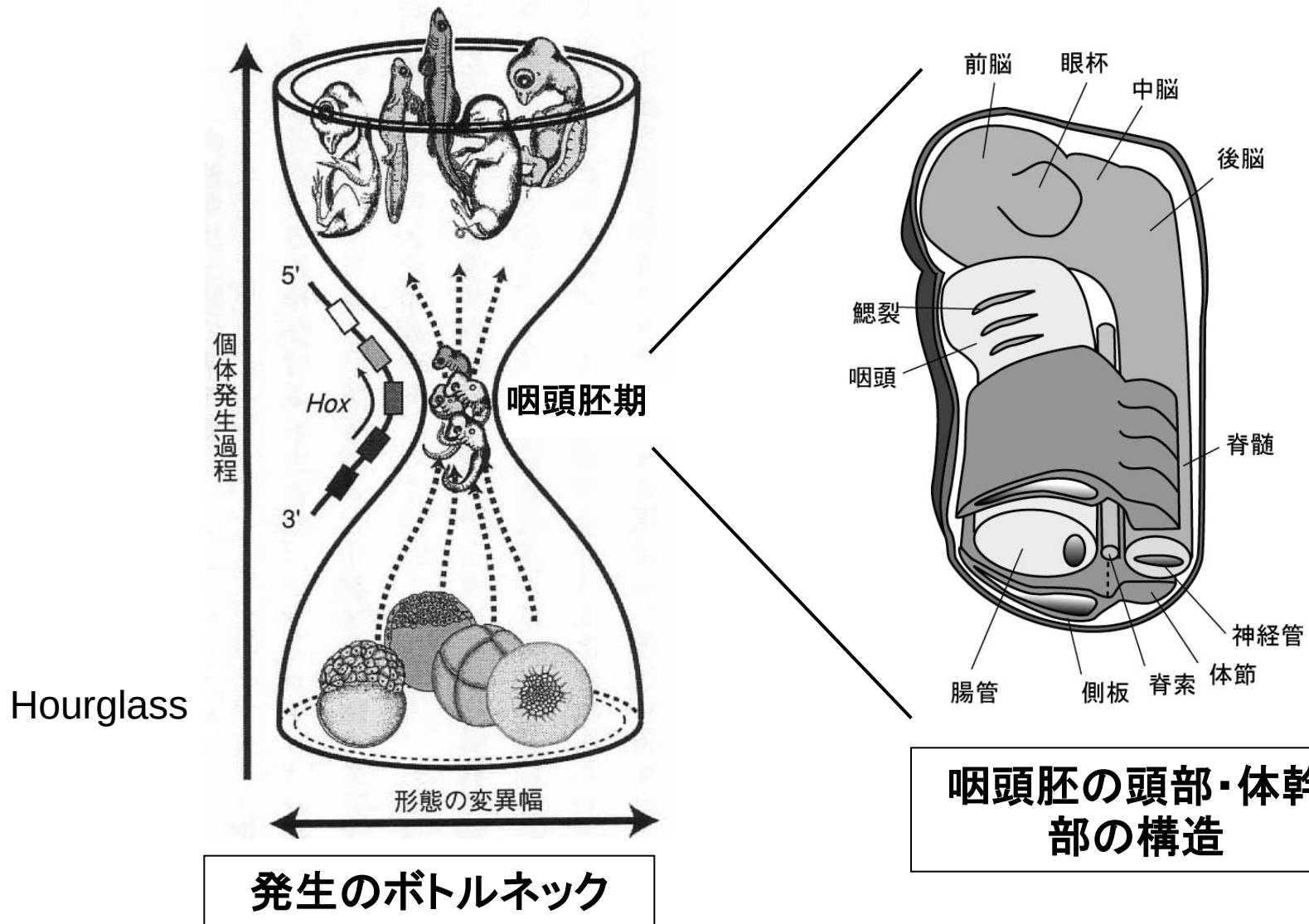
複雑な機能と
かたちを持つ個体

細胞数 1 個

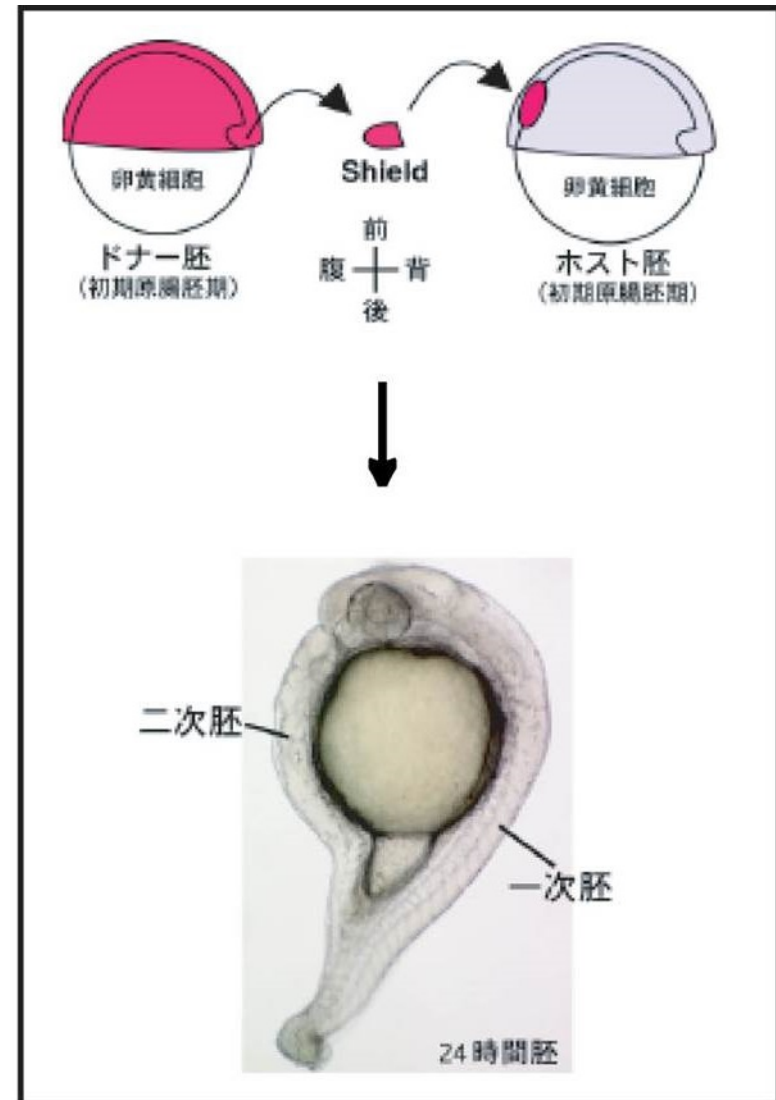
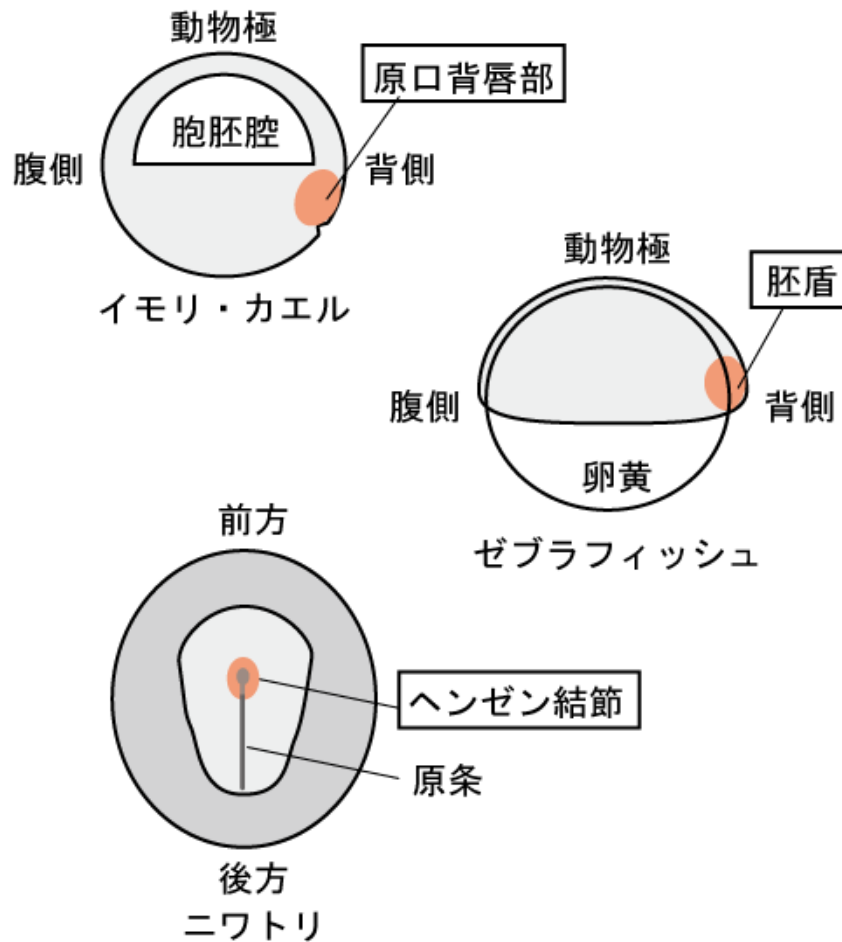
60,000,000,000,000 個 (ヒト)



脊椎動物の発生におけるボトルネック的性質



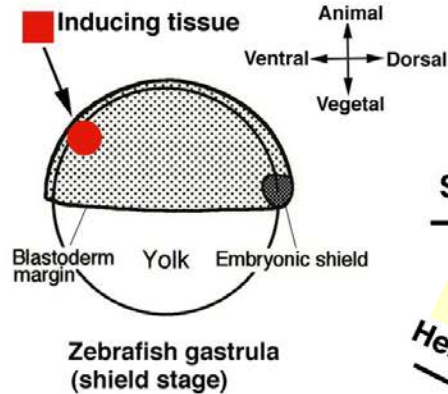
オーガナイザー活性を持つ組織の存在が脊椎動物の発生様式の特徴の一つ



オーガナイザーによる2次軸誘導は種を超えて共通の分子メカニズム

Secondary axis induction by organizer tissues

ゼブラフィッシュ胚



魚

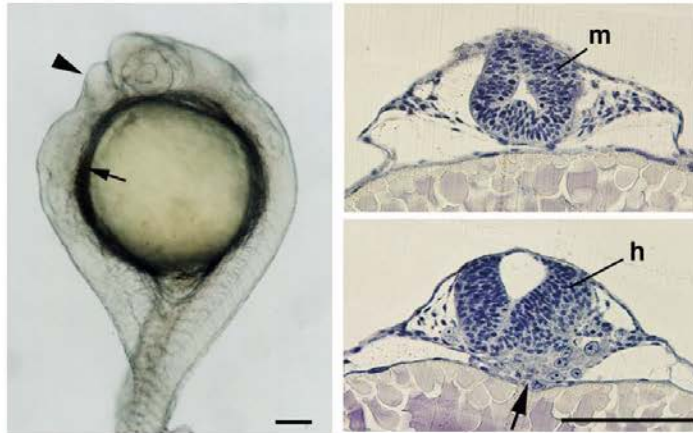
Shield

ニワトリ
Hensen's node

ほ乳類培養細胞

COS cells

All scale bars = 0.1 mm



COS7 cells transfected with
Xenopus Noggin and Chordin cDNAs

Embryonic shield (shield stage)

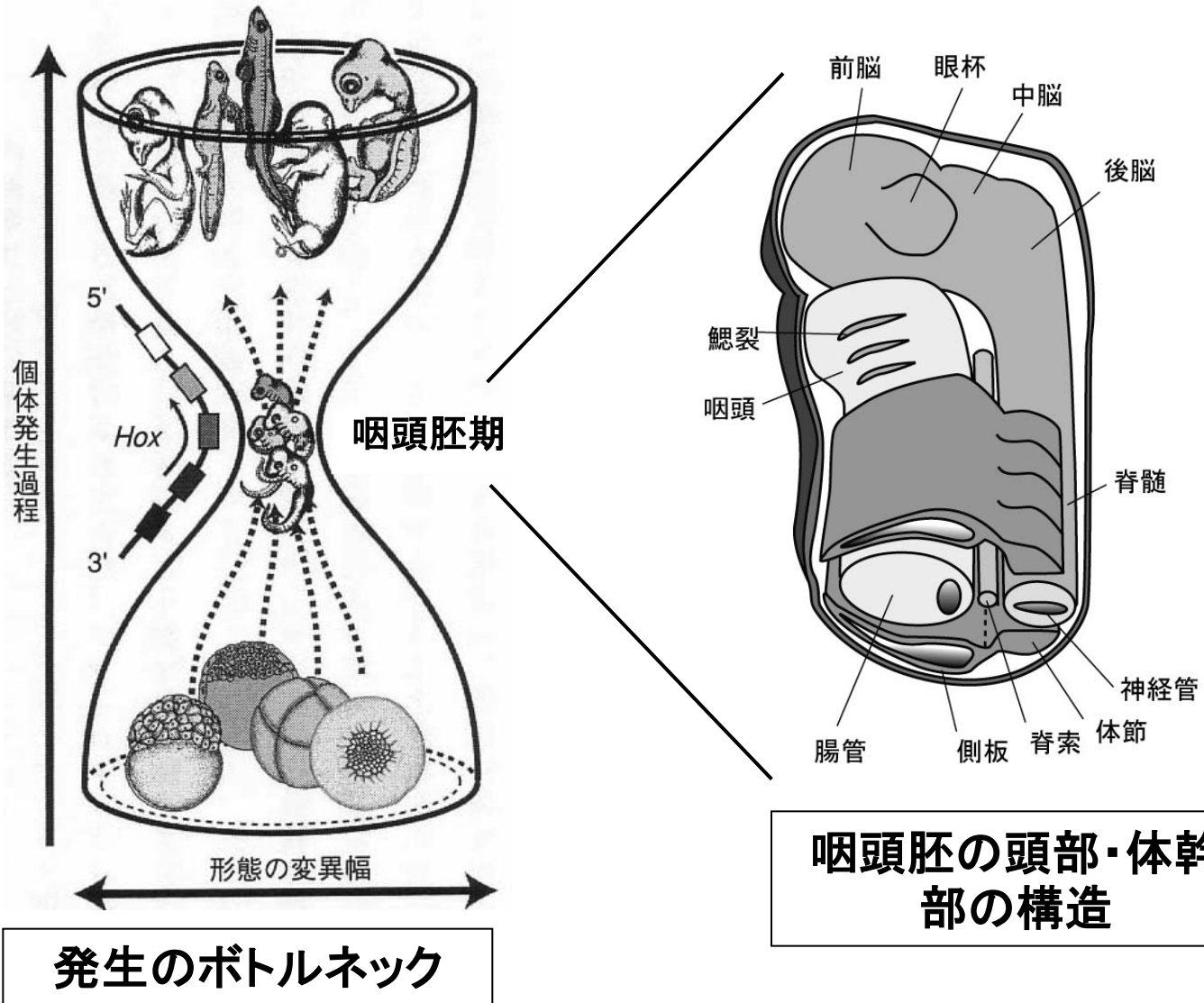


Chicken Hensen's node (St. 4)

◄ : secondary axis ◄ : transplanted tissues

d, diencephalon; h, hindbrain; l, lens; m, midbrain; n, notochord; o, otic vesicle; p, prechordal plate; r, retina

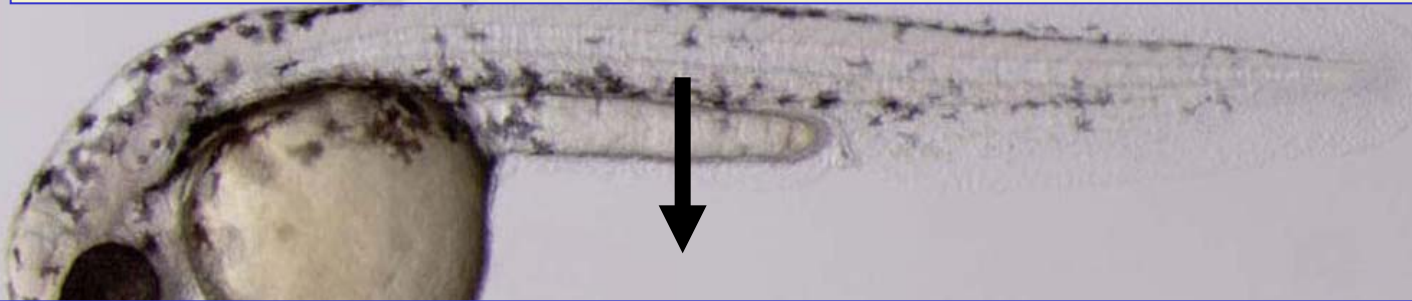
- ・魚とヒトでは遺伝子の80%以上が共通
- ・遺伝子の働きも共通





ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) の特徴

- * アジア原産のコイ科小型熱帯魚 (22 ~ 32°C)
- * 卵の直径約 0.5 mm、成魚の体長 4 – 5 cm
- * 飼育が容易で、同時に多数の個体の飼育が可能
- * 母体の外で発生して、卵・胚が完全に透明
- * 発生が早い (24時間で初期器官形成完了)
- * 多産 (週に一回200個)
- * 世代交代の期間が短い (2~3ヶ月)
- * ゲノムサイズ 1.7×10^9 、染色体数 25本



実験発生学、遺伝学的解析が可能なモデル脊椎動物

魚の発生

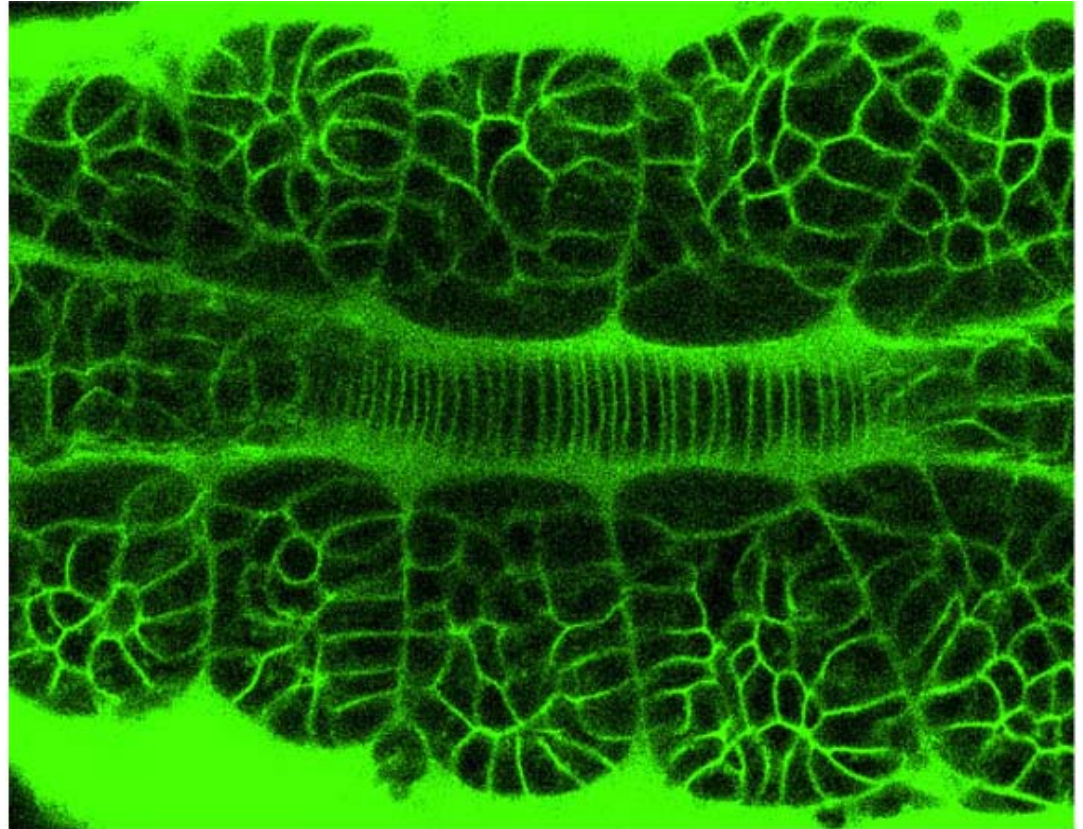
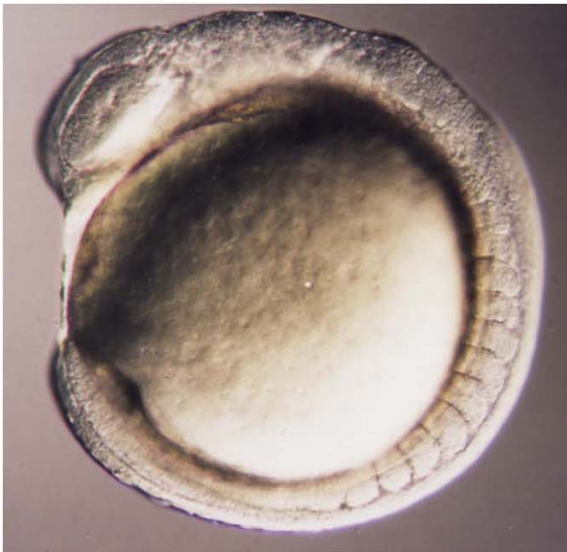
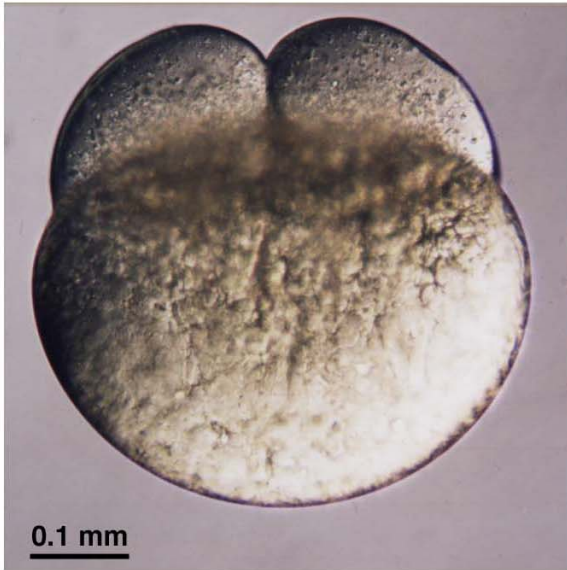


*
Credit: Rolf O. Karlstrom and Donald A.
Kane (1996) A flipbook of zebrafish
embryogenesis, *Development*,
vol.123:461

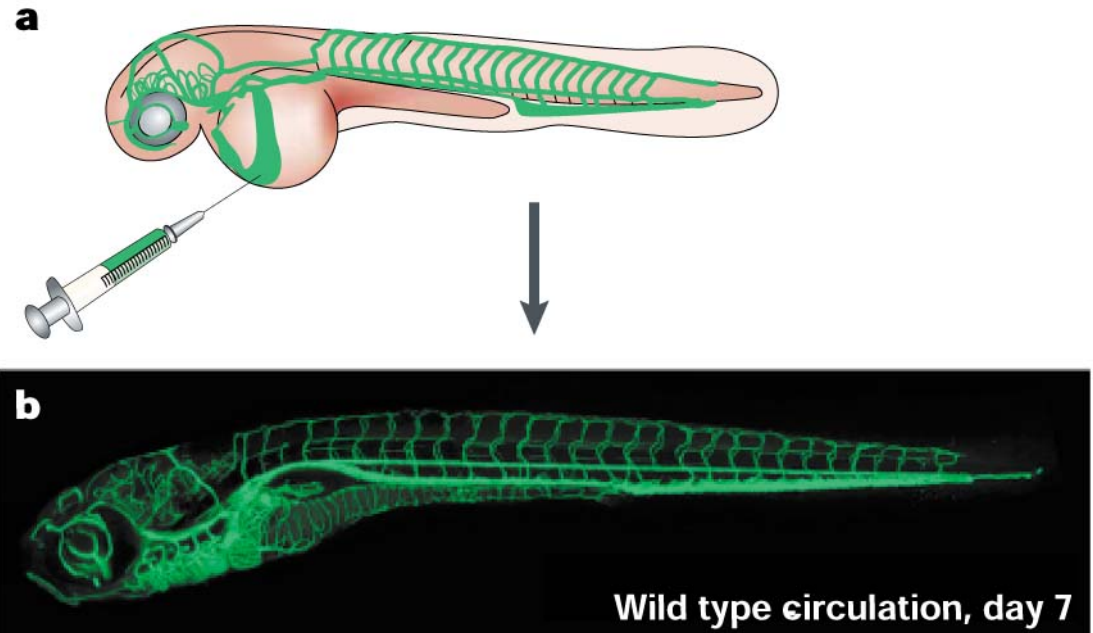
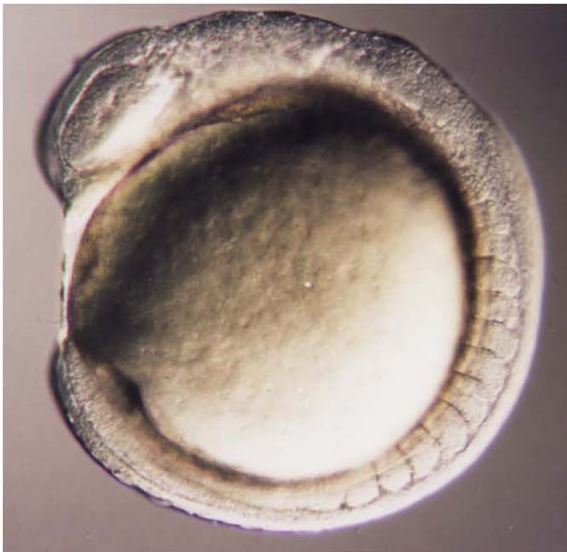
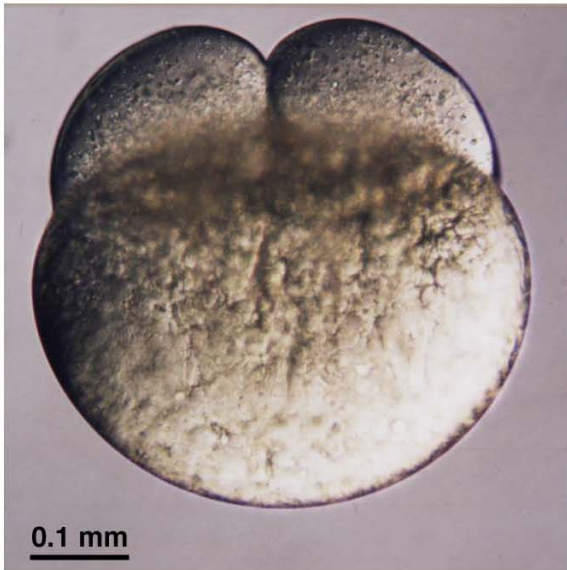
ゼブラフィッシュ

受精後1時間から20時間まで

胚が透明



胚が透明



微量蛍光ビーズ注入による循環系の ライブイメージング

Nathan D. Lawson and Brant M. Weinstein
Nature Reviews Genetics 3: 674-682, 2002

* Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Genetics*, vol.3:674-682, p.678 Box 2, copyright 2002

遺伝子機能の解析 — 遺伝学

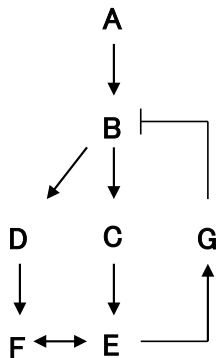
発生遺伝学の研究手法

各遺伝子座への
ランダムな変異挿入
(Forward genetics)

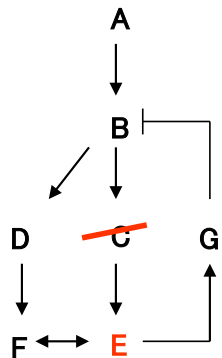
適応可能な動物の条件

- ・ 多数の成体を同時に飼育
- ・ 発生が早い
- ・ 胚が多数入手可能
- ・ 世代交代が短い

発生の遺伝子カスケード



発生の遺伝子カスケード
の異常

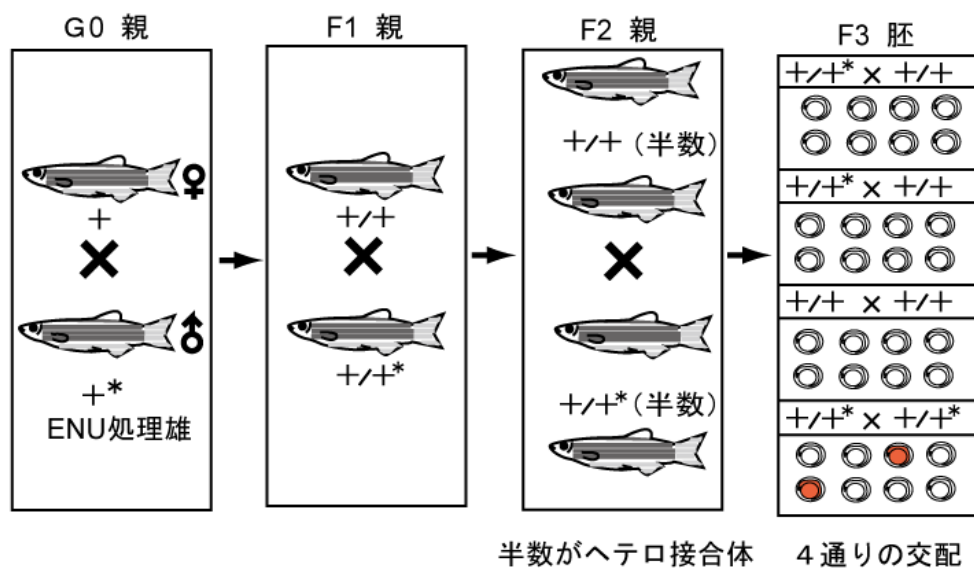


表現型の解析
交配実験

発生異常

原因遺伝子の同定
遺伝子カスケードの解明

突然変異体の単離が研究室レベルで可能

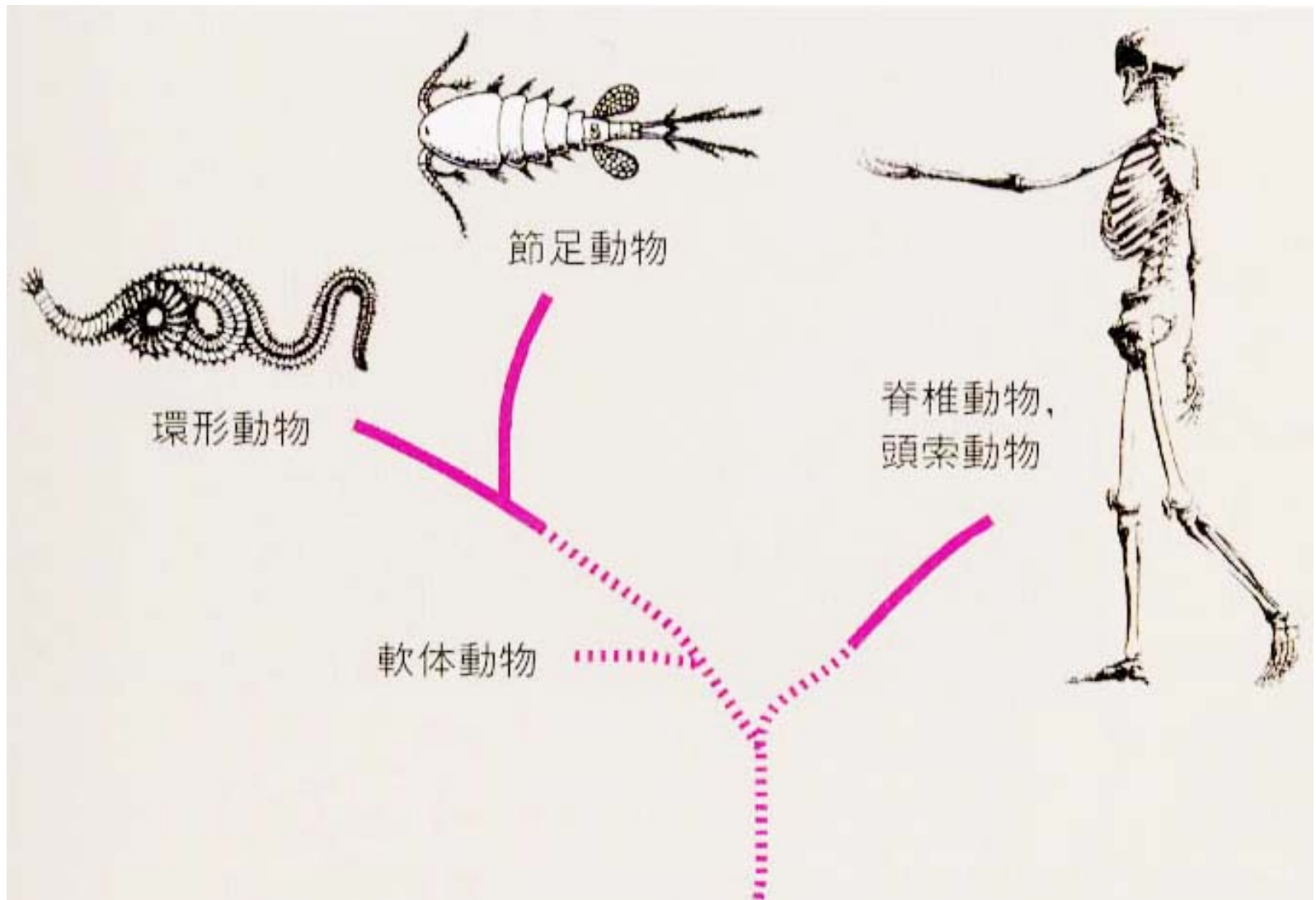


ゼブラフィッシュ飼育設備

1. 小型魚類と発生遺伝学

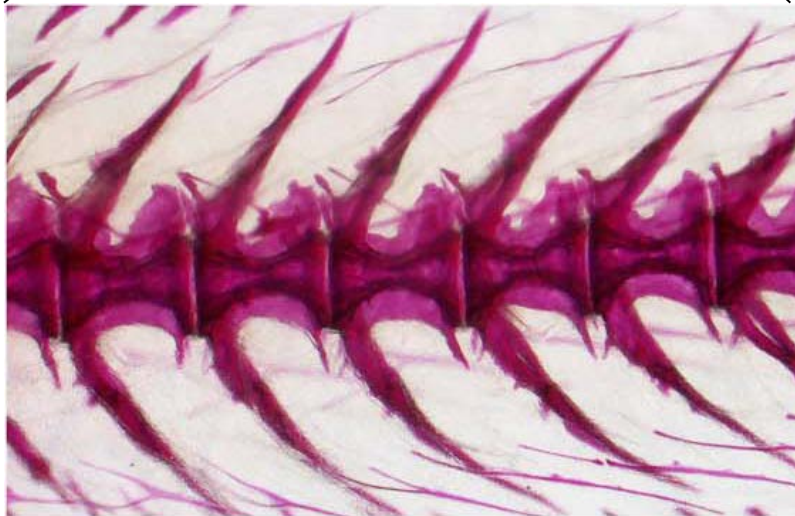
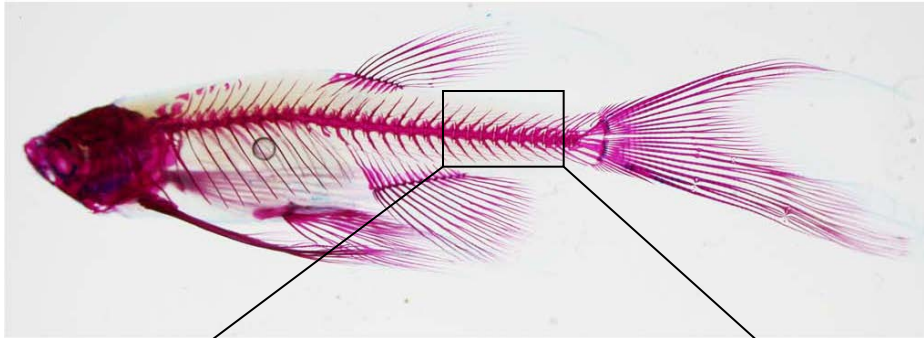
2. 組織を正確に刻む分節時計

動物の分節性



我々のからだは節(ふし)でできている

ゼブラフィッシュ



マウス

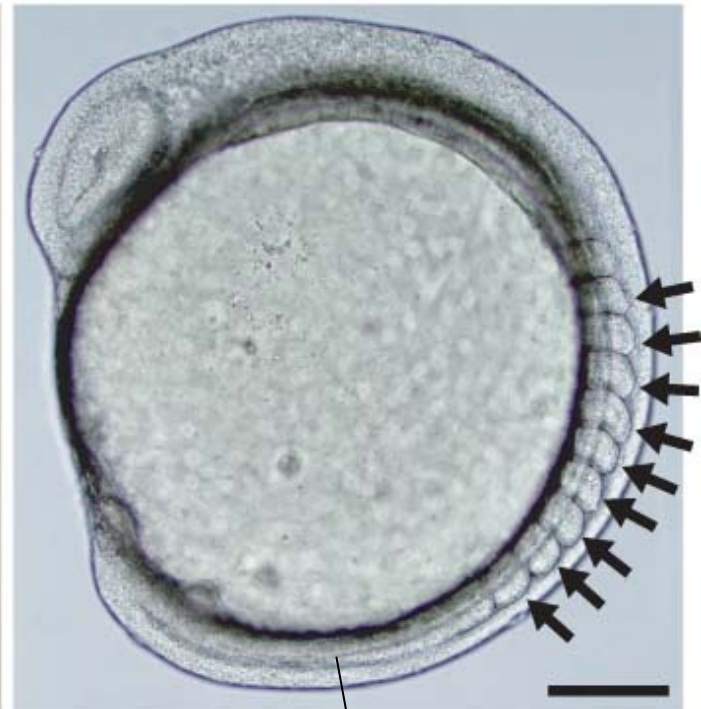


節構造は発生過程で現れる体節（たいせつ）とよばれる組織に由来する

マウス9日胚



ゼブラフィッシュ14時間胚



* 相賀裕美子氏提供

← : 体節

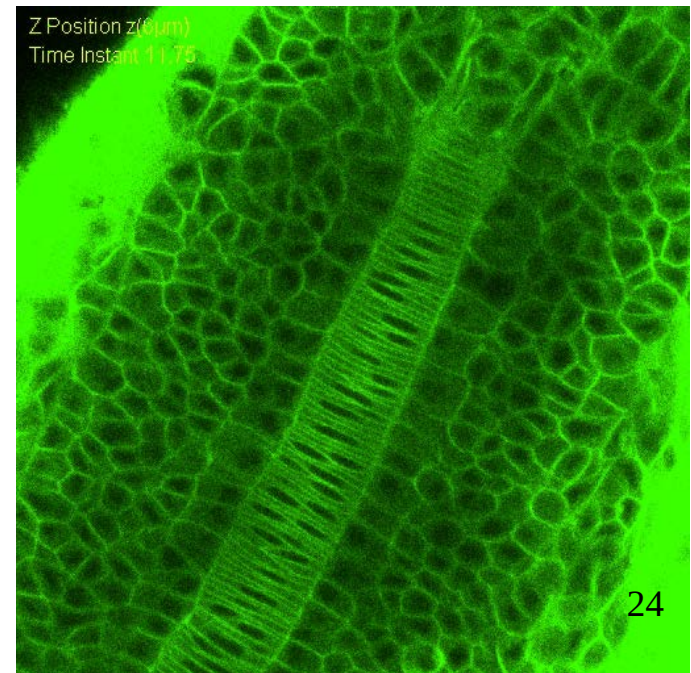
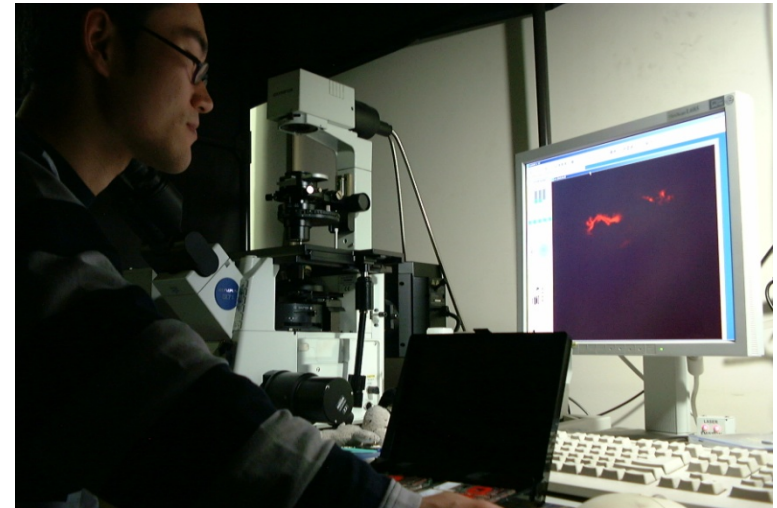
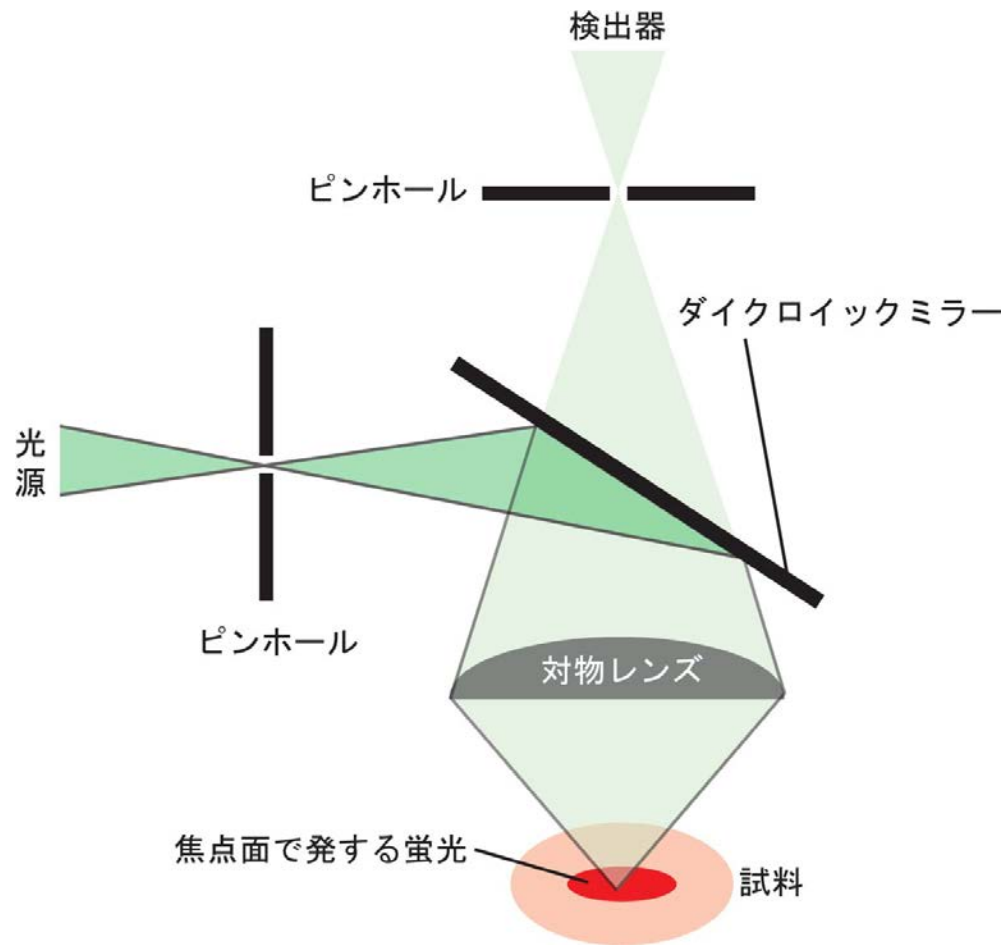
スケールバー= 100 μ m

未分節中胚葉
(presomitic mesoderm, PSM)

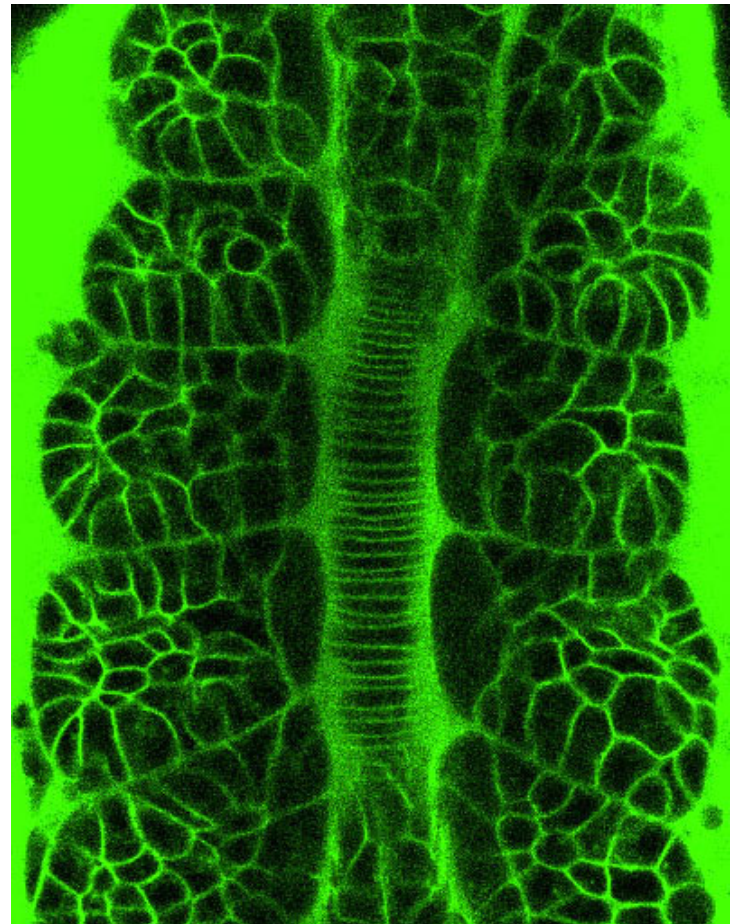


*
Credit:
Rolf O. Karlstrom
and Donald A. Kane
(1996) A flipbook of
zebrafish
embryogenesis,
Development,
vol.123:461

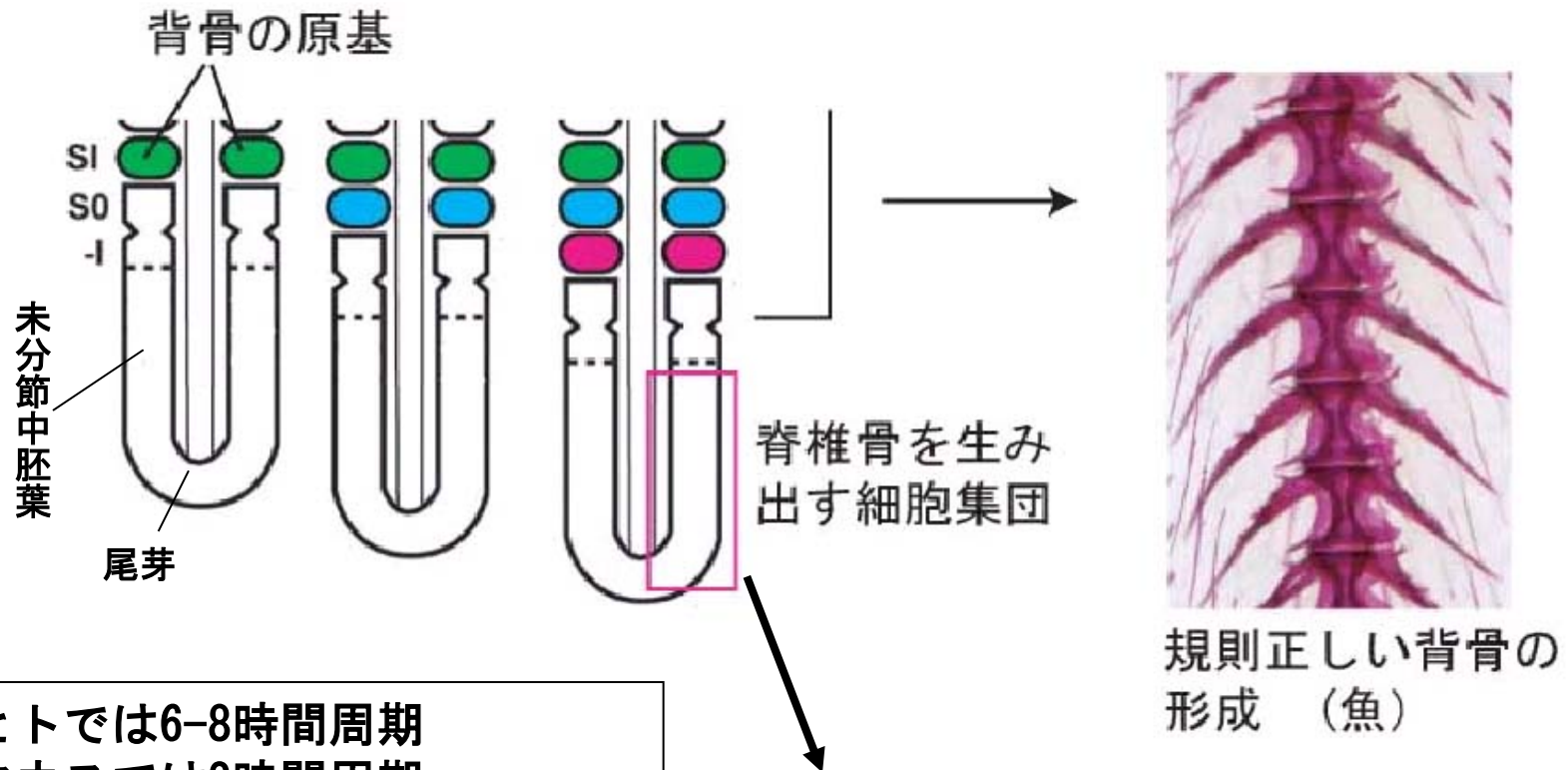
共焦点レーザー顕微鏡によるライブイメージング



分節時計どこに？



体節は前から順番に一定の時間周期で作られる

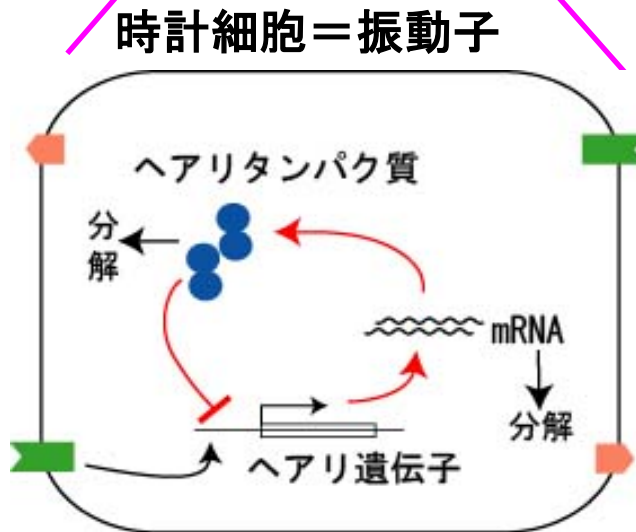
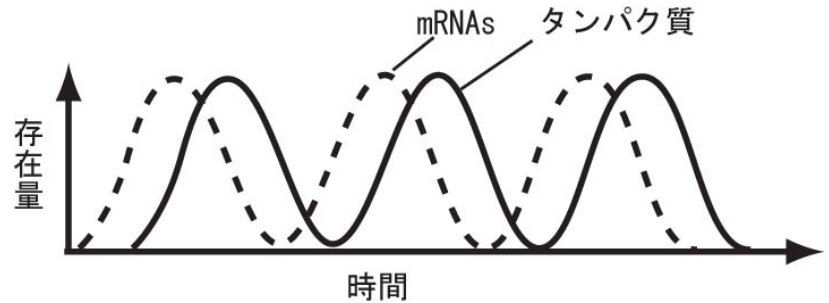
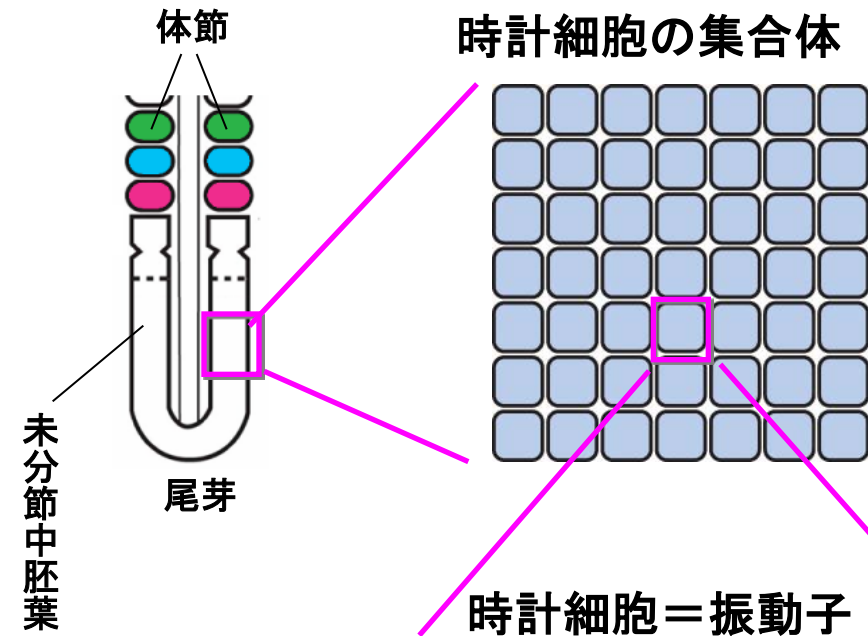


ヒトでは6-8時間周期
マウスでは2時間周期

ニワトリでは90分周期
ゼブラフィッシュでは30分周期

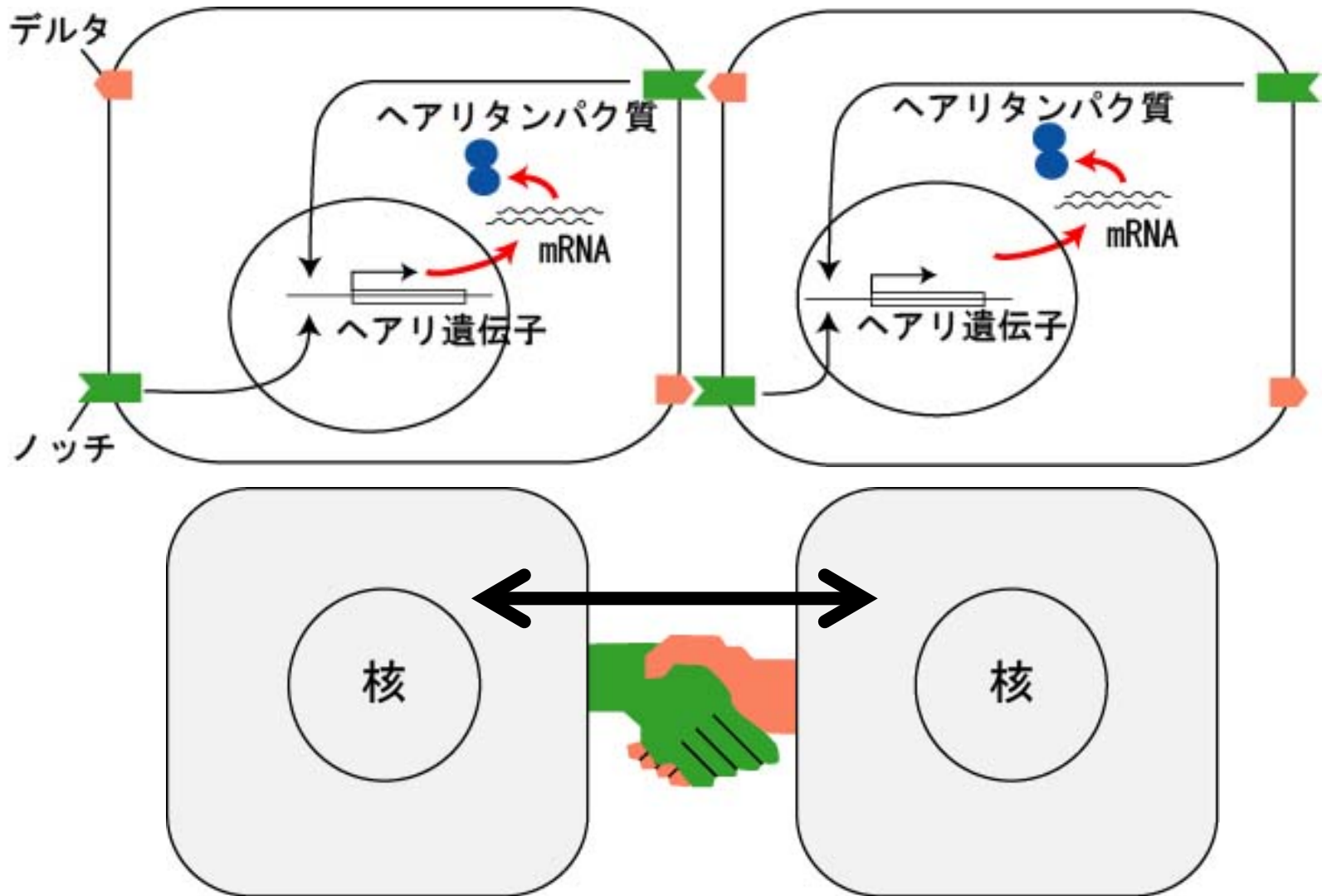
時計機構の存在

分節時計は時計細胞を最小単位とする細胞の集合体



時計細胞の中ではヘアリとよばれる(抑制性)転写制御因子が周期的な発現変動を示している。①転写がONになる。②転写因子が一定の量に達すると自身の遺伝子の転写をOFFにする。③転写が止まり、自己分解により転写因子の濃度が低下する。①→②→③→①・・・を一定周期で繰り返す。

Notch/Delta シグナルは細胞間のコミュニケーションに活躍



ゼブラフィッシュ分節異常変異体の原因遺伝子

fss-type (segmentation defects)

fused somites (fss) = *tbx24*

beamter (bea) = *deltaC* (デルタ)

deadly seven (des) = *notch1* (ノッチ)

after eight (aei) = *deltaD* (デルタ)

white tail (wit, mib) = a ubiquitin ligase

After van Eden et al. Development 123: 153 (1996)

Holley et al., Genes Dev 14: 1678 (2000)

Development 129: 1175 (2002)

Ito et al., Dev. Cell 4: 67 (2003)

Nikaido et al., Nature genetics 31: 195 (2002)

wild



fss



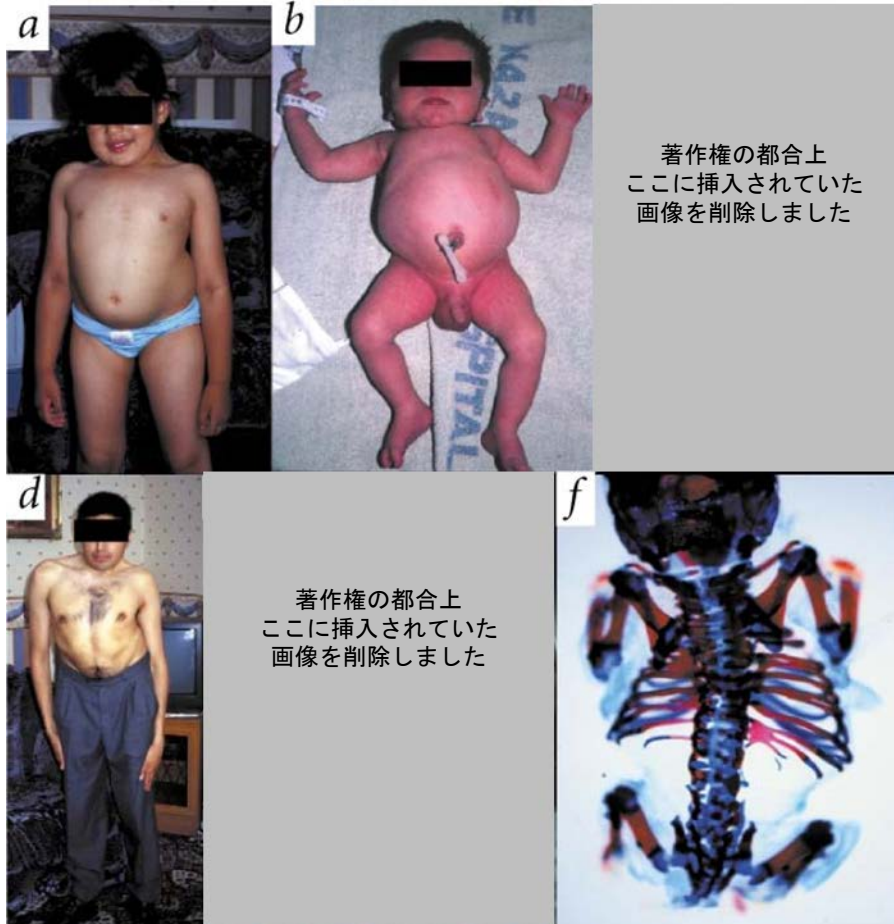
aei



脊椎骨形成異常

脊椎骨癒合症

Spondylocostal dysostosis



Bulman et.al. (2000)

* Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Genetics, vol.24(no.4): 438-441, p.438 Fig.1, copyright 2000.

pudgy



K. Kusumi et al. (1998)

* Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Genetics, vol.19 (no.3):274-278, p.274 Fig.1, copyright 1998.

Delta (デルタ) 遺伝子の変異による体節・脊椎骨の異常

ヒト

Spondylocostal dysostosis

Delta

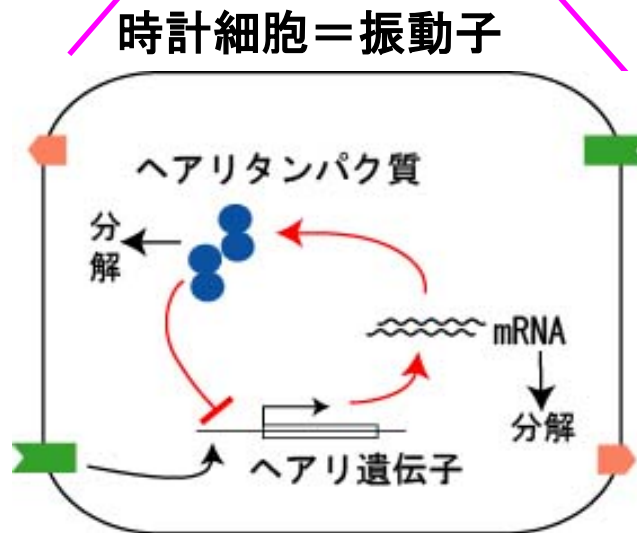
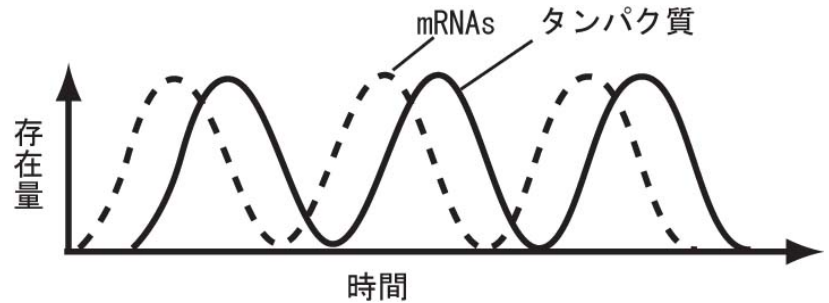
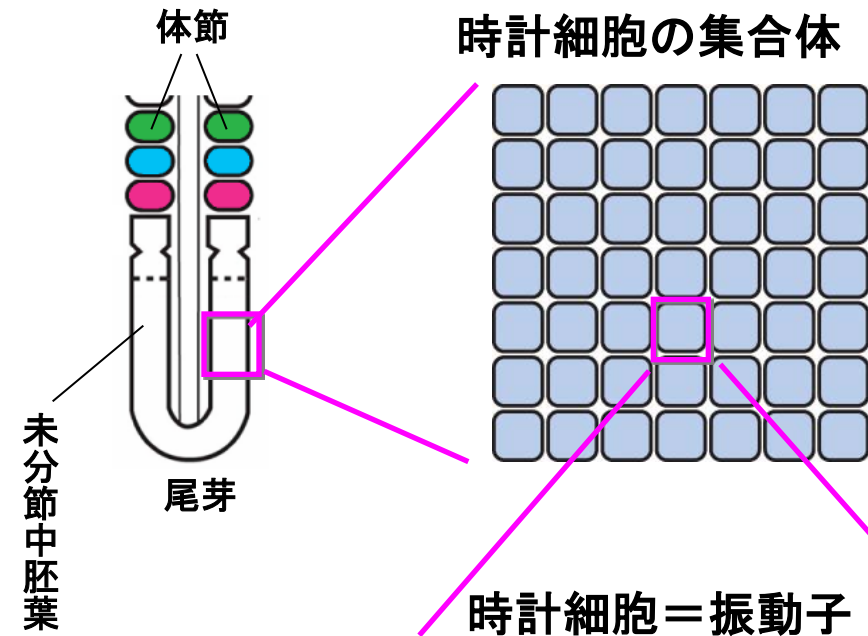
ゼブラフィッシュ

after-eight mutation

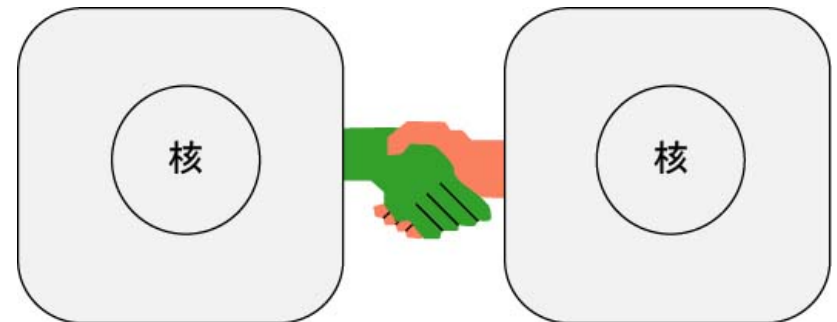
マウス

pudgy mutation

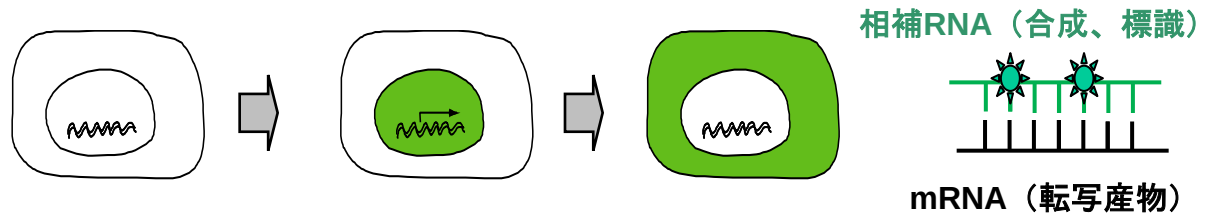
分節時計は時計細胞を最小単位とする細胞の集合体



隣接の細胞は位相情報を共有している

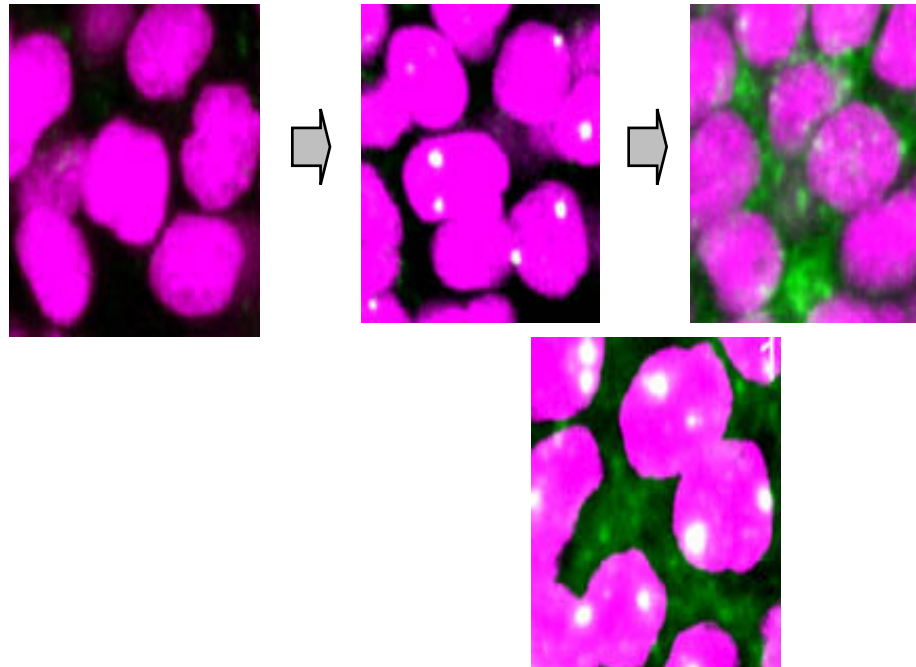


High resolution in situ hybridization を用いて時計細胞の位相を決定する

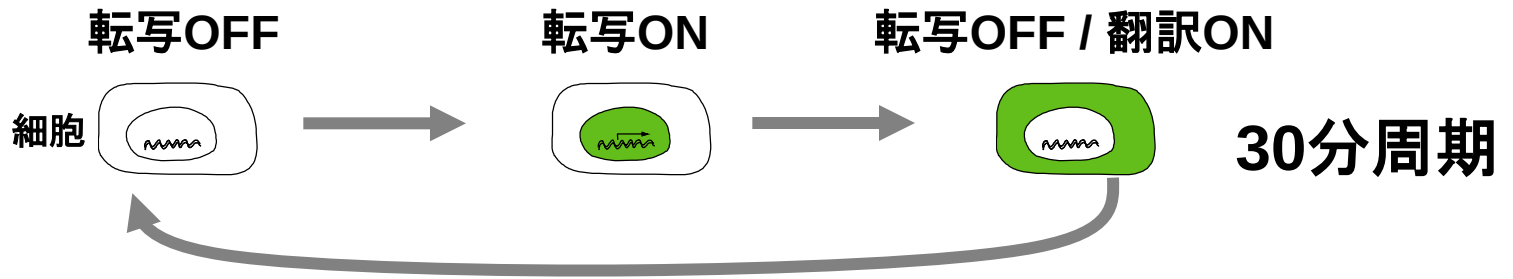


Negative → Nuclear → Cytoplasmic

her1

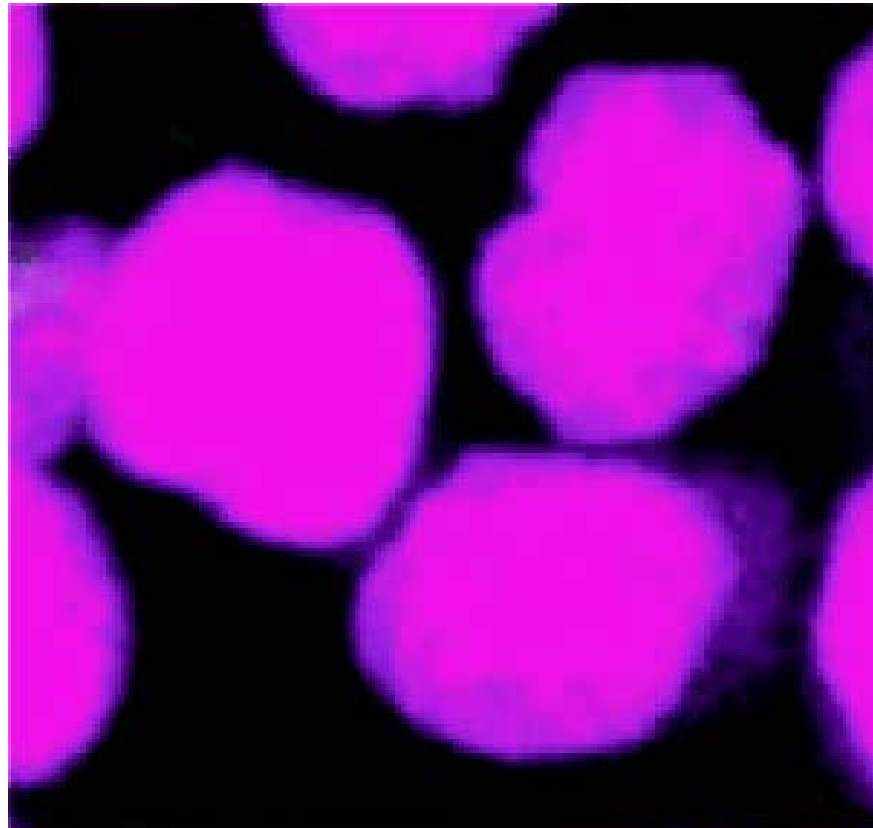
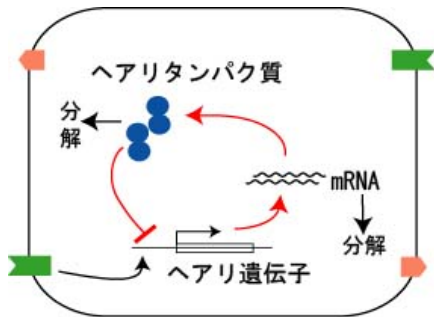


時計細胞の振動を可視化する



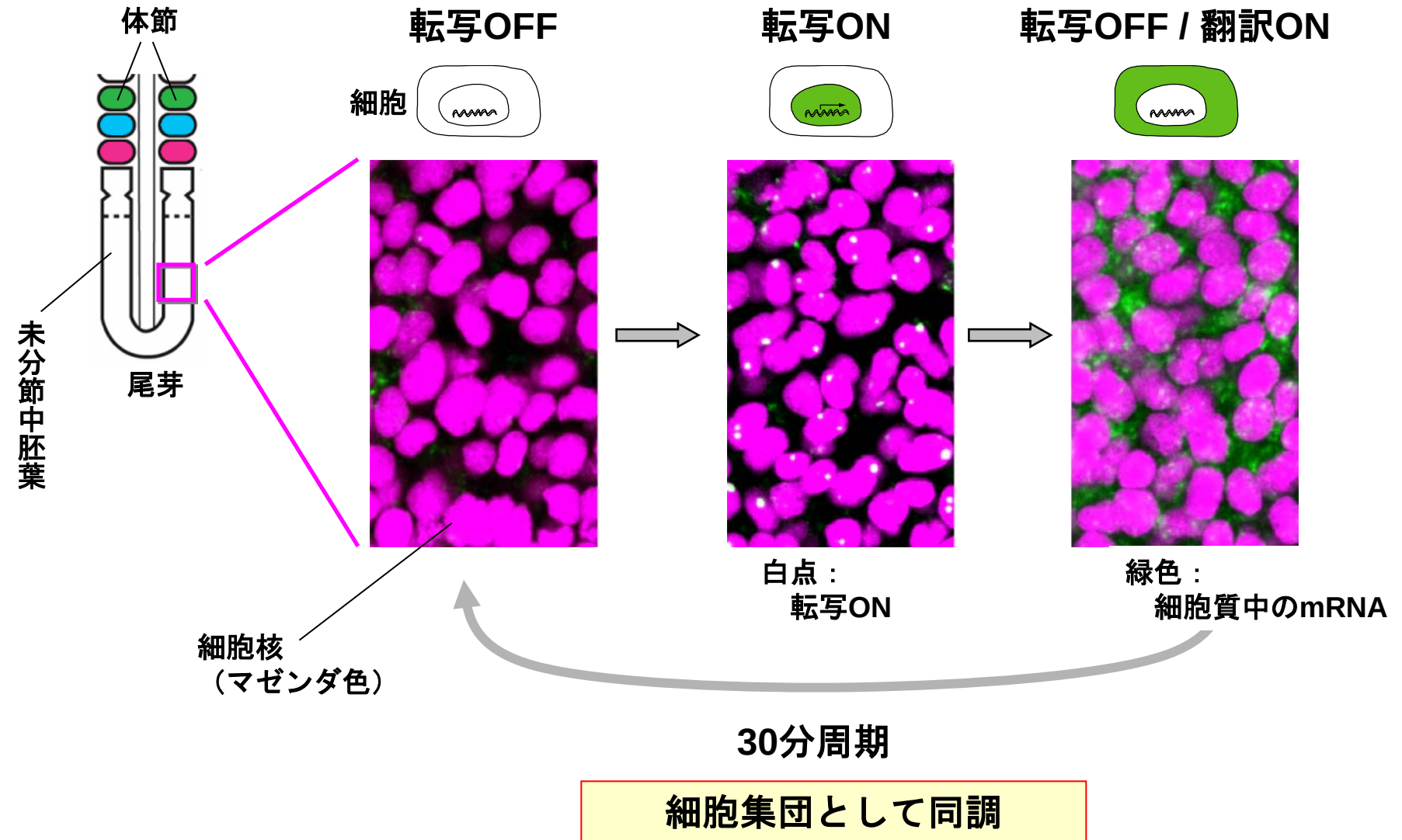
白点:
転写ON

緑色:
細胞質中のmRNA

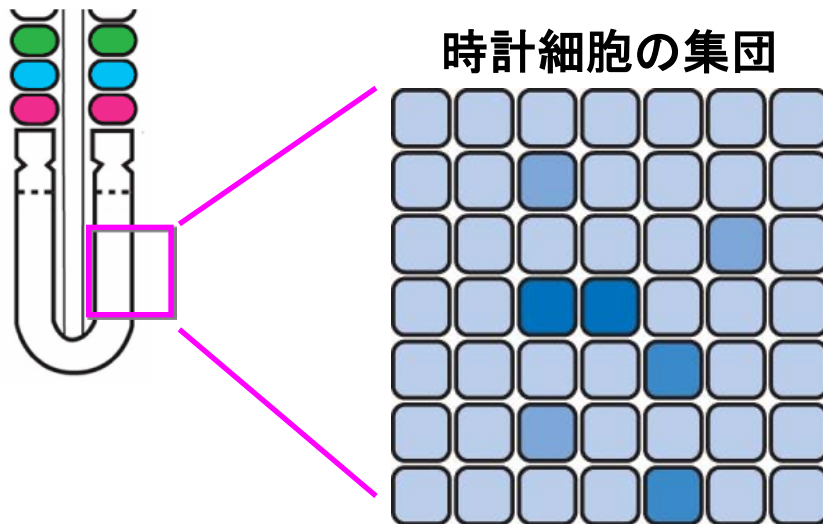


ヘアリ遺伝子の発現変動

分節時計におけるヘアリ遺伝子の同調的発現振動



時計は集団としてほぼ同調しているが、個々の細胞での遺伝子発現の ON・OFFのタイミングにはばらつき（ノイズ）が存在している

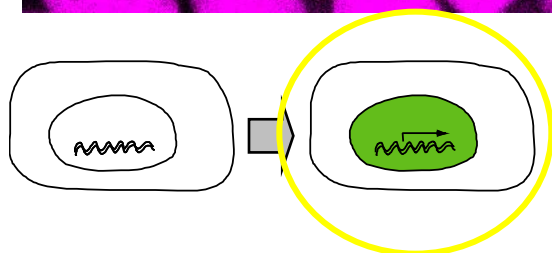
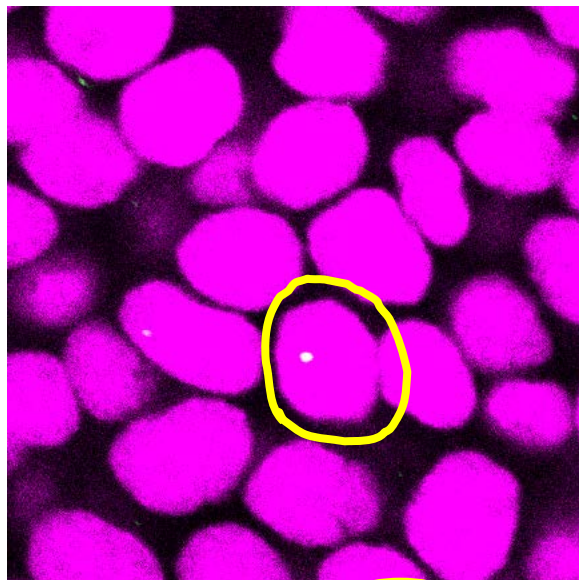


体節時計では、一つ一つの細胞をみると、細胞分裂などによって生じた“遺伝子発現のばらつき”（ノイズ）が存在する

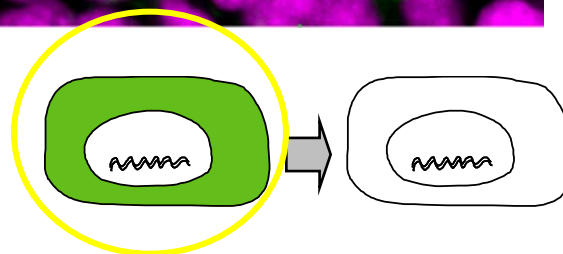
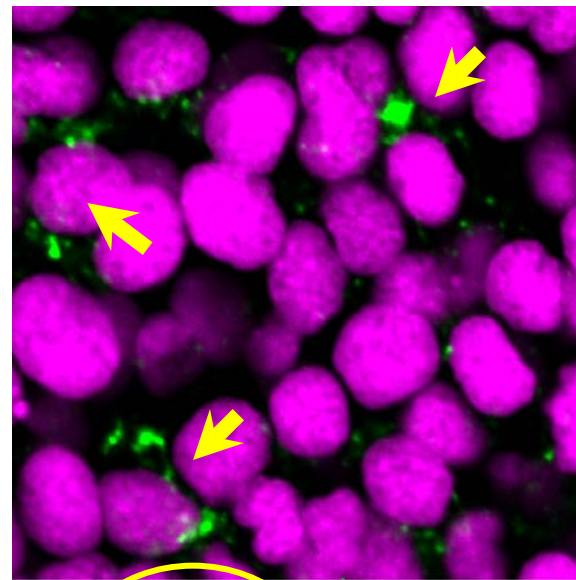
- ・ 遺伝子発現は化学的反応でありそれ自体に“ゆらぎ”がある
- ・ 分裂中の細胞は遺伝子の転写はOFF
発生中の胚では細胞分裂がさかん

すべての細胞が必ずしも同調していない！

遺伝子発現には‘ゆらぎがある’



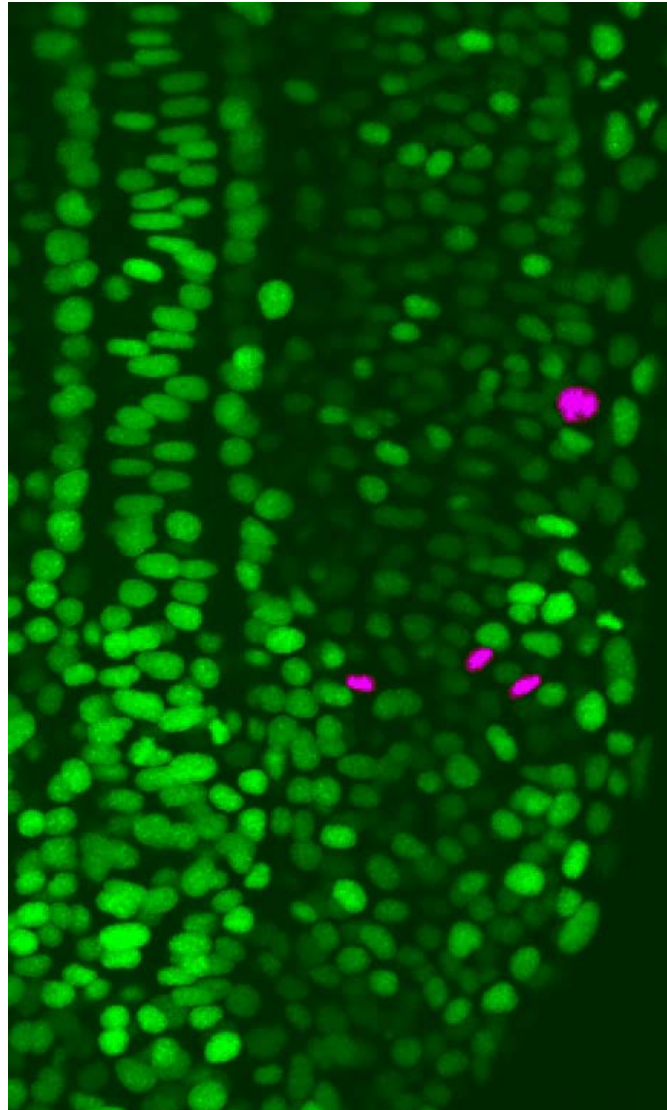
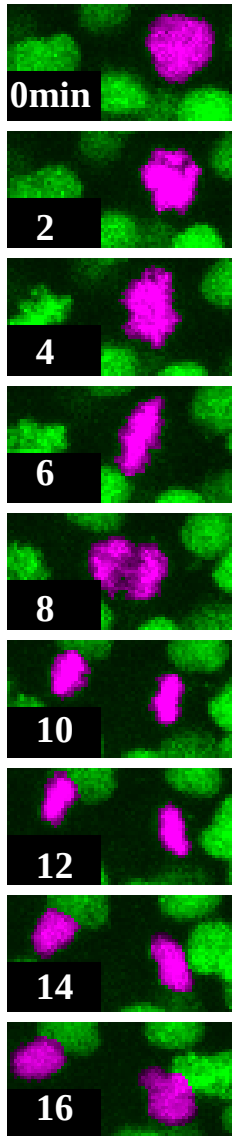
少し進んでいる



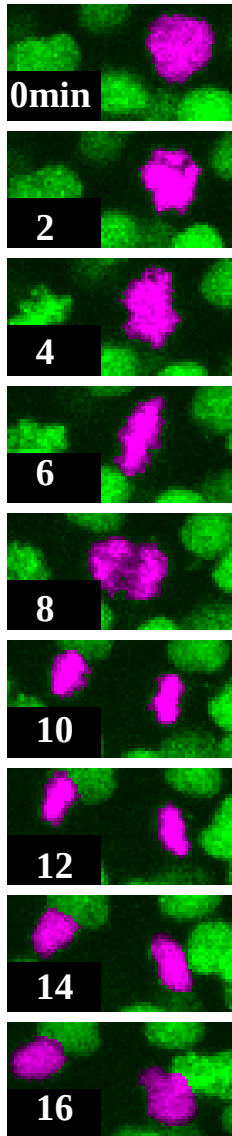
少し遅れている

発生中の組織では細胞分裂がさかん！

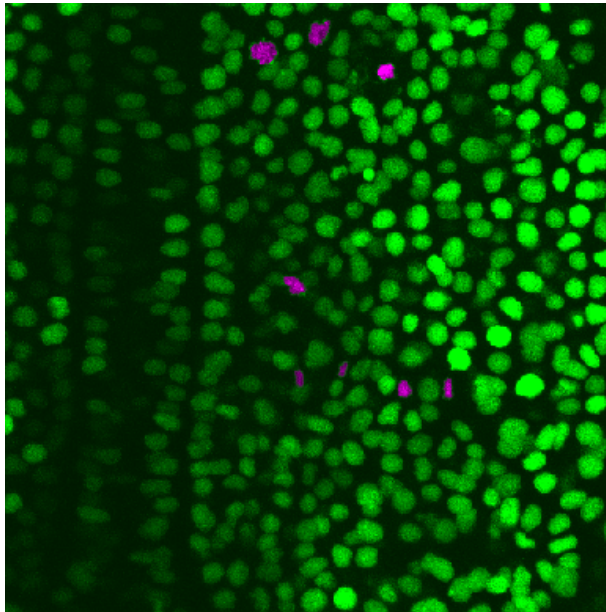
Histon 2B mRNA-injected live embryos



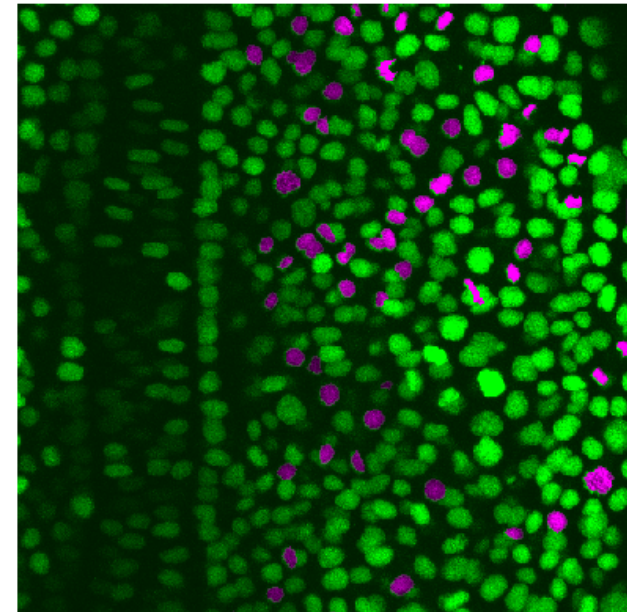
発生中の組織では細胞分裂がさかん！



Histon 2B mRNA-injected live embryos



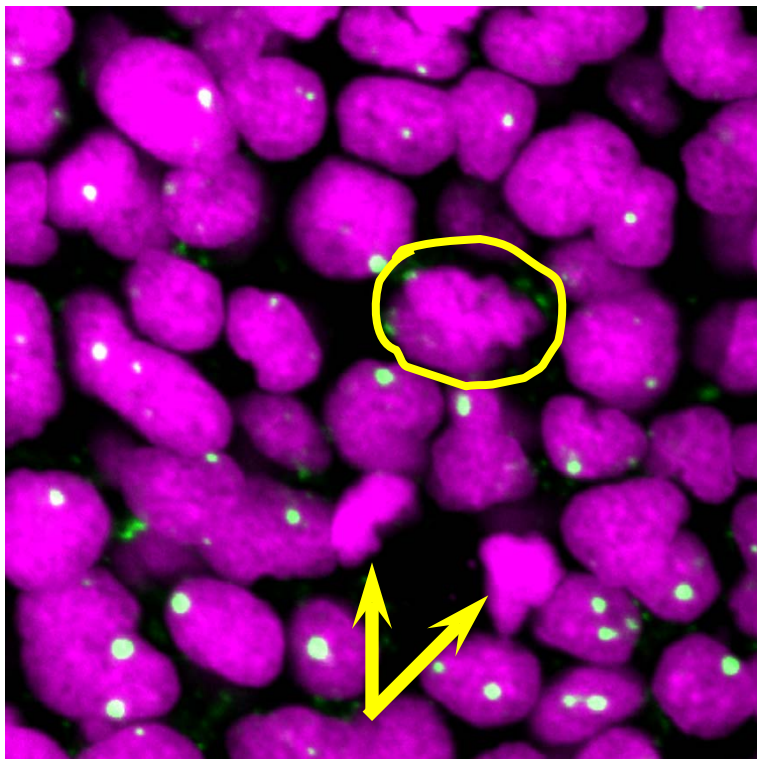
30min



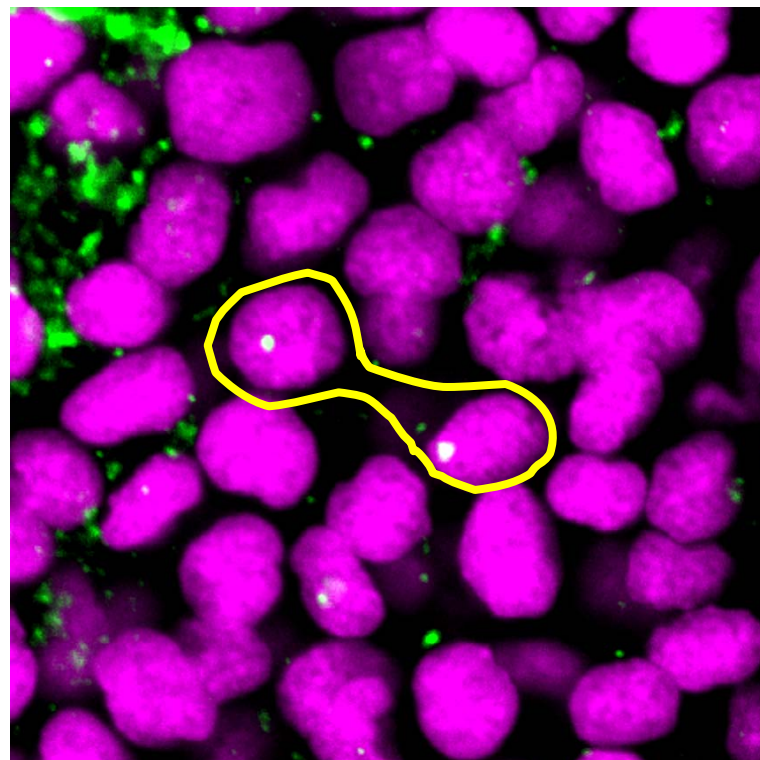
- ・ 分裂中期は15分程度継続する
- ・ 30分の周期の中で10-15%の細胞が分裂を経験する

分裂中の細胞は振動を停止している！

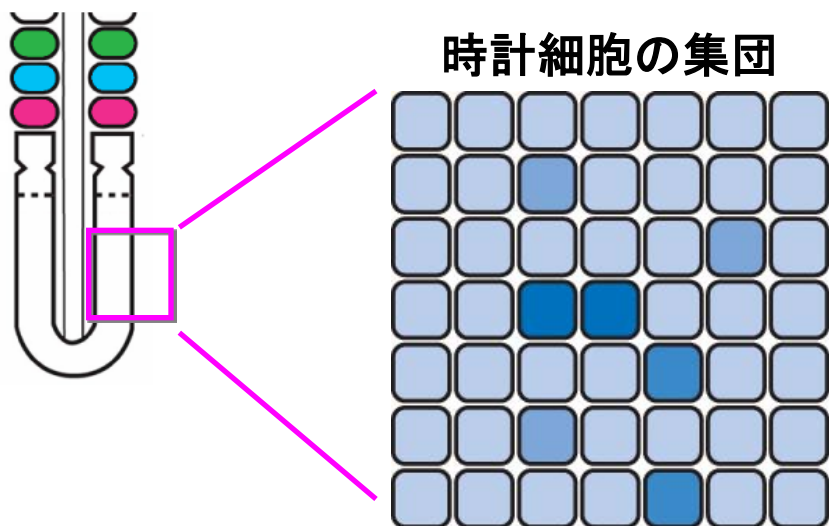
時計が停止している細胞



位相が大きくずれている細胞



時計は集団としてほぼ同調しているが、個々の細胞での遺伝子発現の ON・OFFのタイミングにはばらつき（ノイズ）が存在している



体節時計では、一つ一つの細胞をみると、細胞分裂などによって生じた“遺伝子発現のばらつき”（ノイズ）が存在する

- ・ 遺伝子発現は化学的反応でありそれ自体に“ゆらぎ”がある
- ・ 分裂中の細胞は遺伝子の転写はOFF
発生中の胚では細胞分裂がさかん

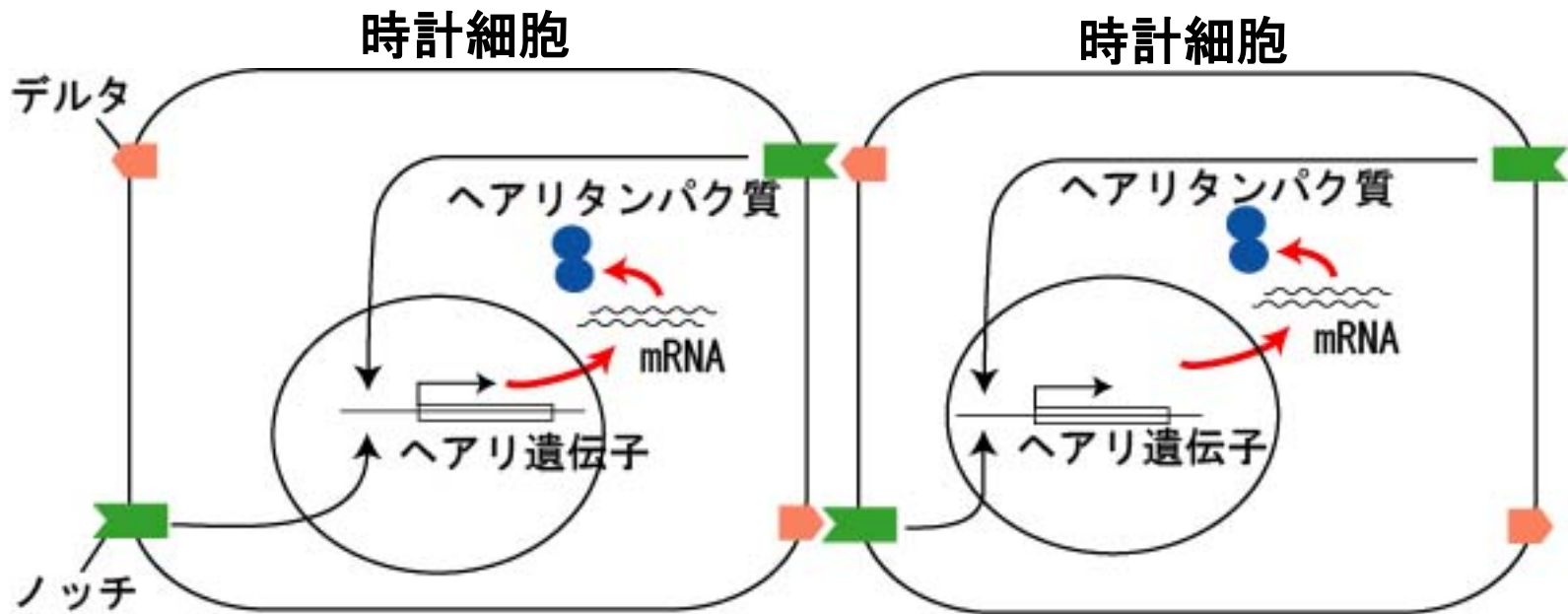


ノイズを軽減する仕組みがなければ、細胞集団としての同調性はたちどころに失われる

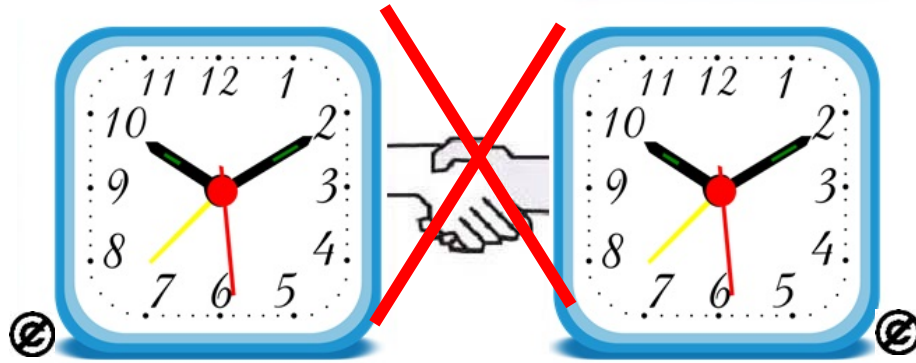


ノイズを軽減する仕組みは？

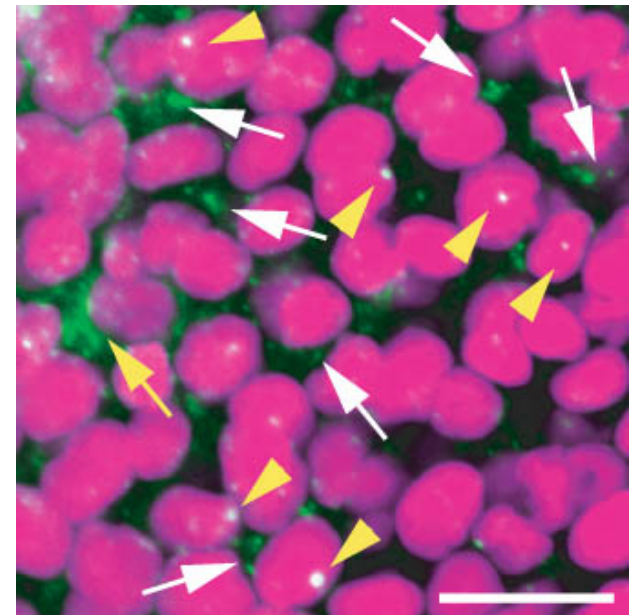
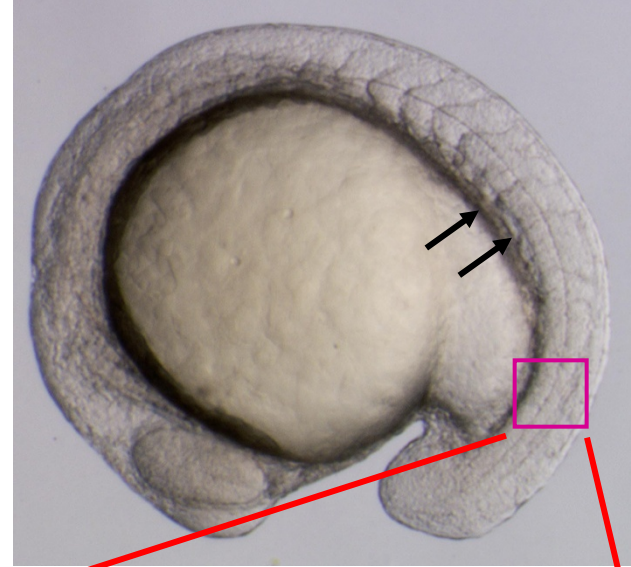
細胞はノッチ・デルタタンパク質を介して同調する



細胞間コミュニケーションができない変異体では 体節形成はうまく起こらない

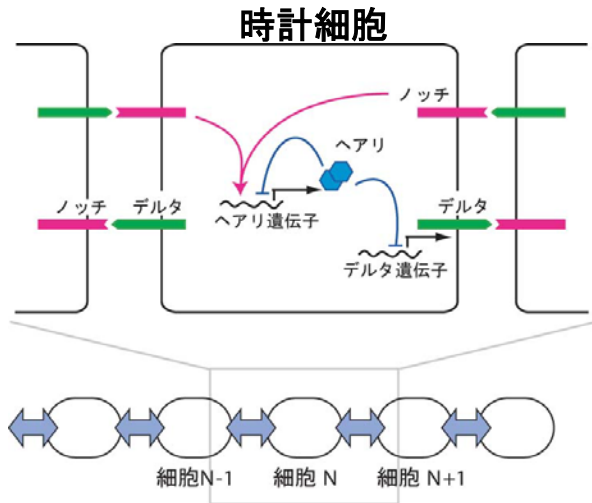


デルタタンパク質の変異体



時計細胞は同期が起こらず
ランダムに振動

シミュレーションによる計算予測と実験結果は一致した



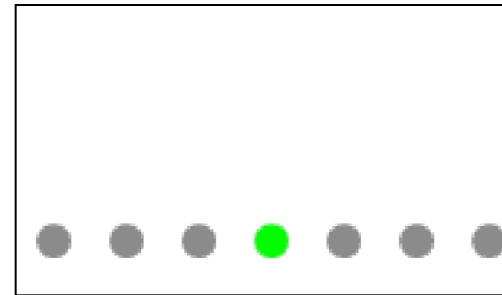
$$\frac{d(\text{protein})}{dt} = \text{synthesis of protein} - \text{degradation}$$

$$\frac{d(\text{mRNA})}{dt} = \text{synthesis of mRNA} - \text{degradation}$$

- Cyclic transcription of her1/7 and deltaC is assumed to a consequence of HER-dependent repression and Delta-Notch dependent activation

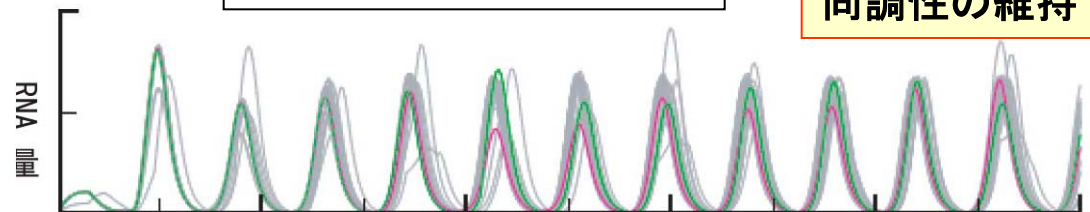
Lewis (2003)

・ノイズを導入したシミュレーション



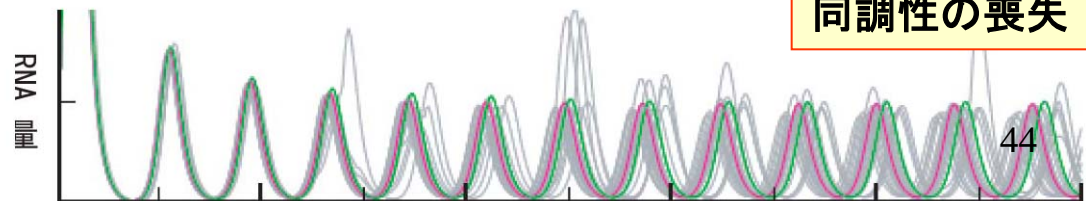
同調性の維持

ノッチ・デルタによる
細胞間連絡 **ON**



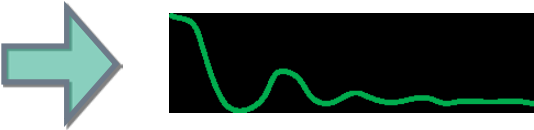
ノッチ・デルタによる
細胞間連絡 **OFF**

同調性の喪失

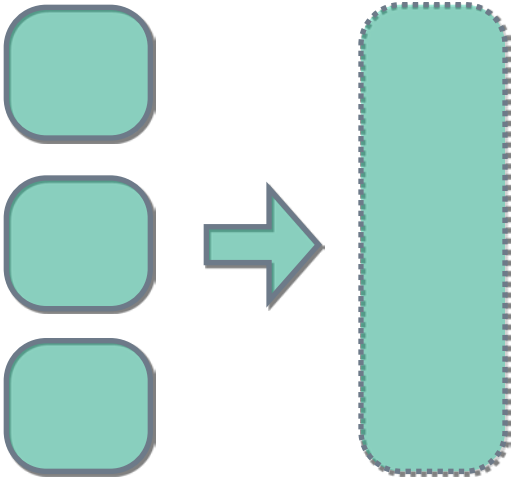


振動と体節形成の関係

振動の喪失



節ができない

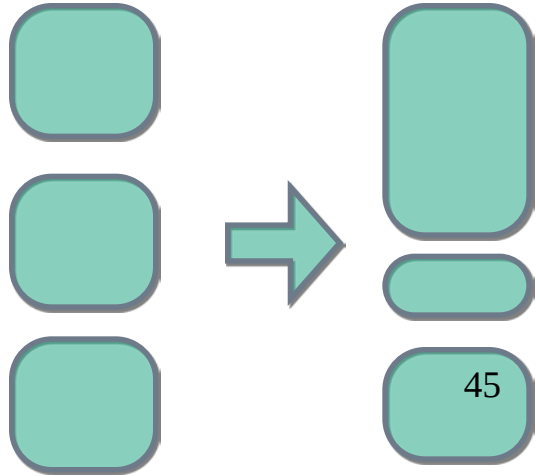


振動の喪失

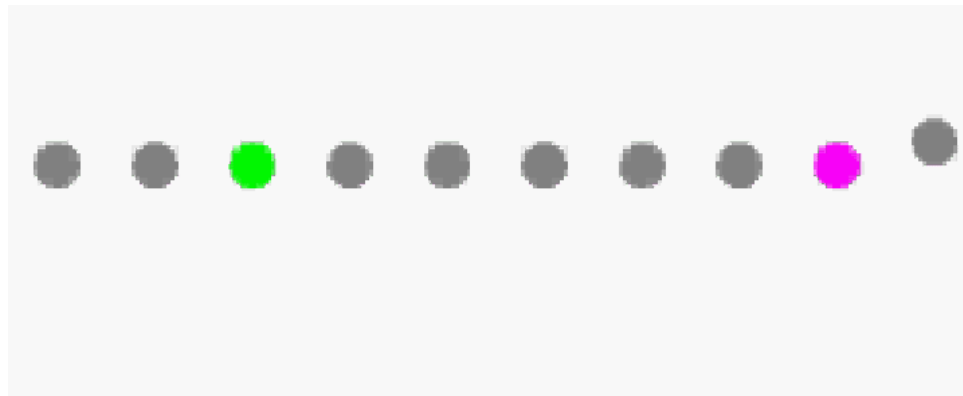


サイズを変えることが変化するのでは？

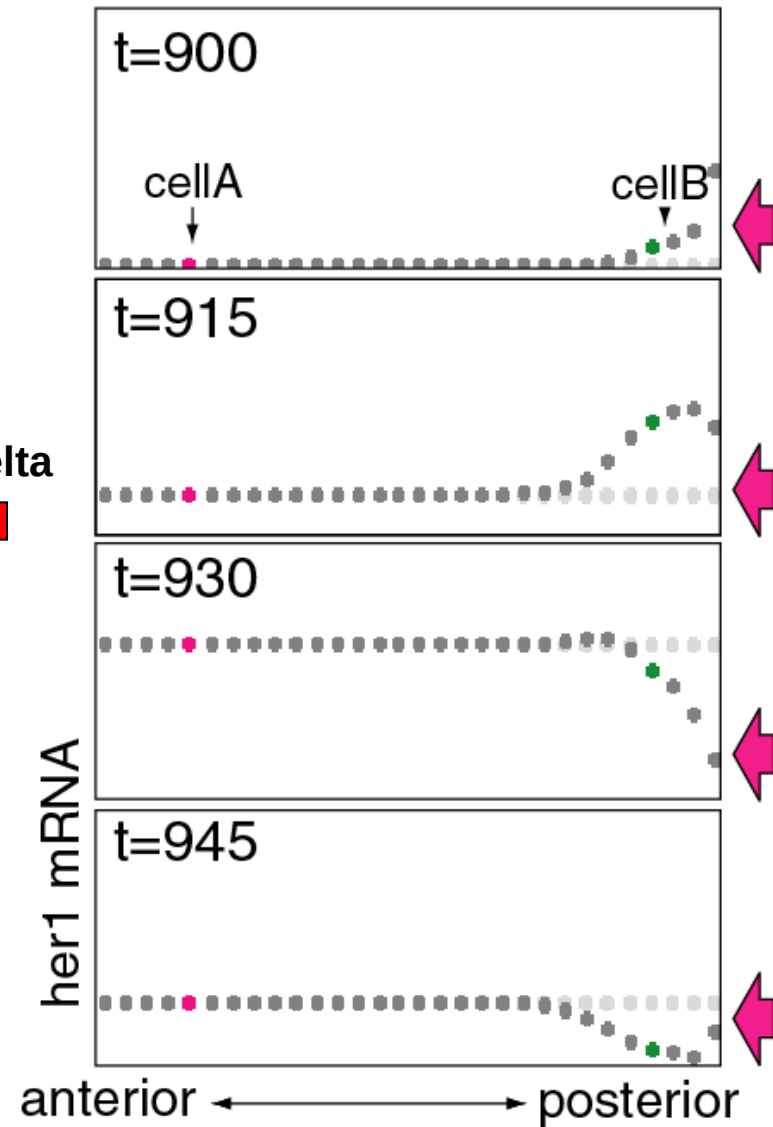
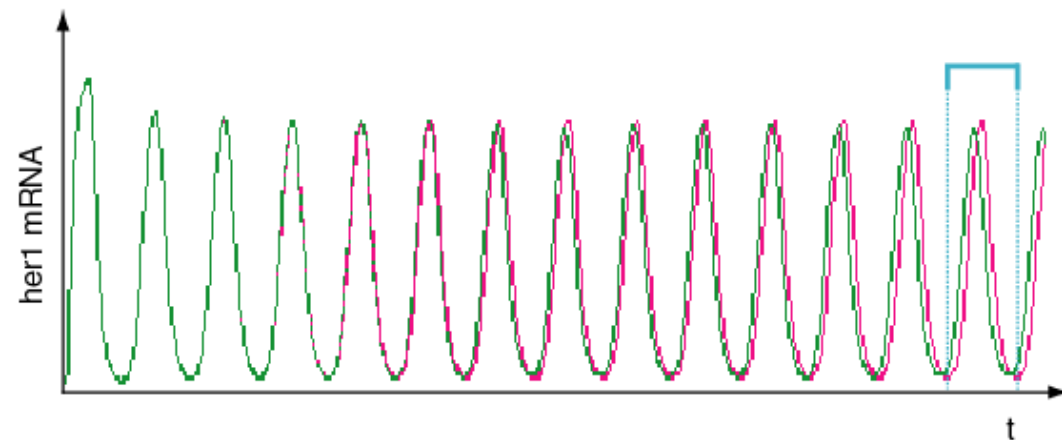
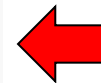
周波数の改変



シミュレータによるin silicoでの予測（近藤研・名大）

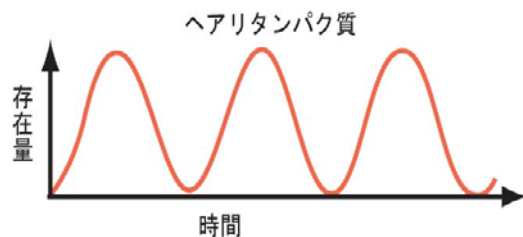
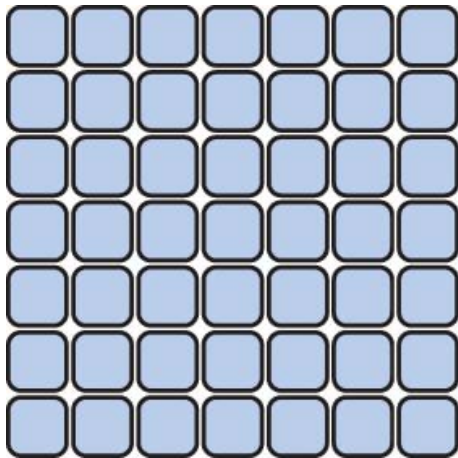


Delta



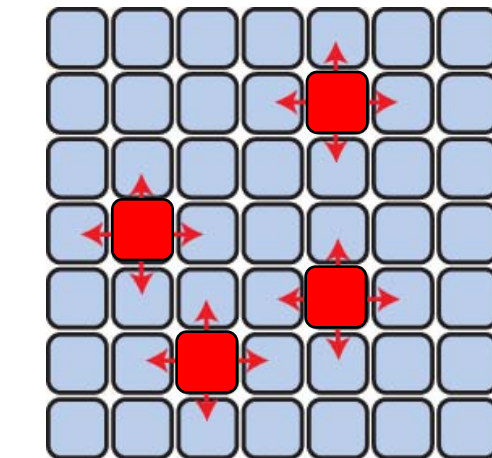
分節時計を加速させる実験

■ 正常な時計細胞

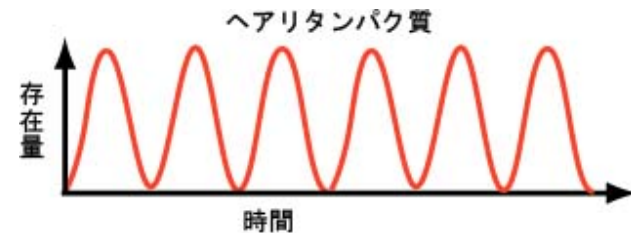


集団として、ヘアリタンパク質の同調した周期的発現変動

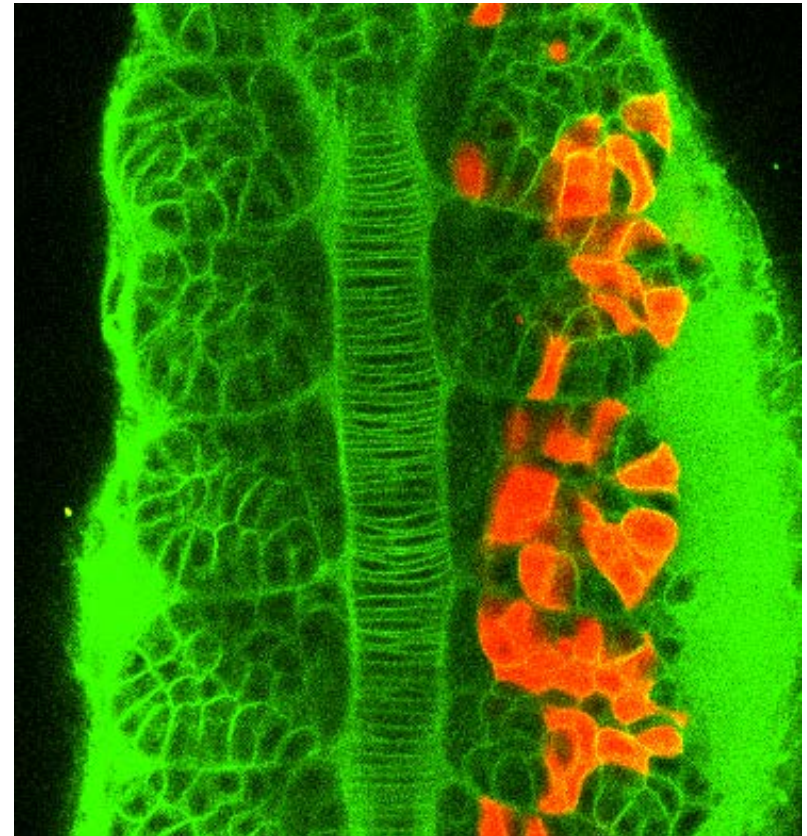
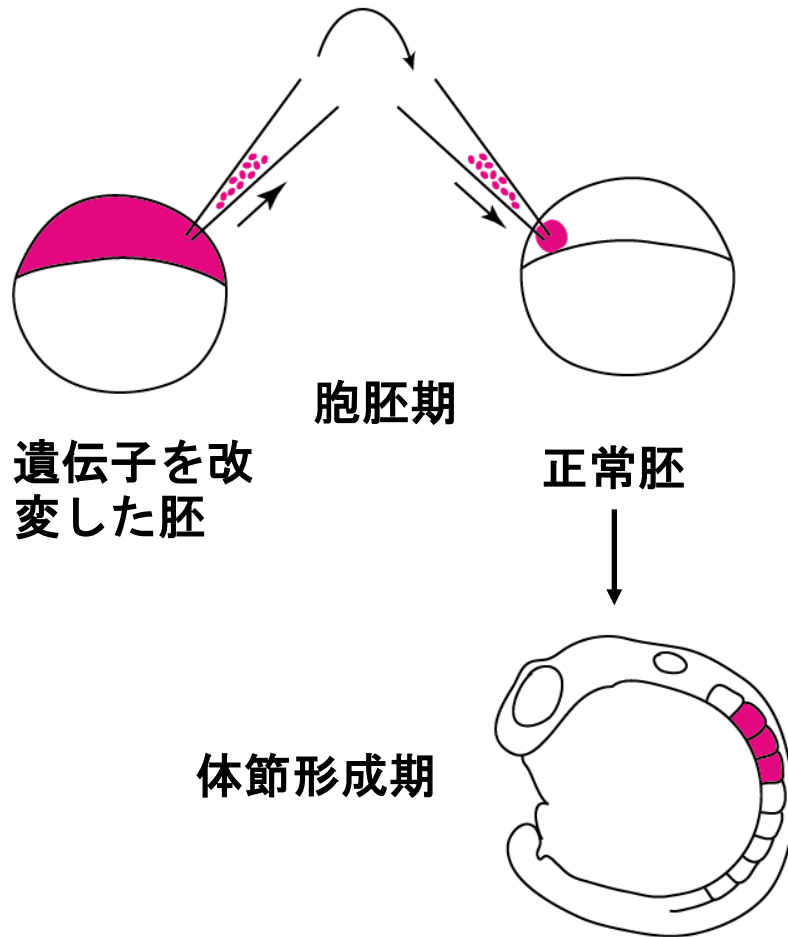
デルタを発現し続けて、隣の細胞へ常にシグナルを送っている異常な細胞



モザイク状態を実験的に作る



改変細胞の移植により分節時計を乱す



改変した
シグナル

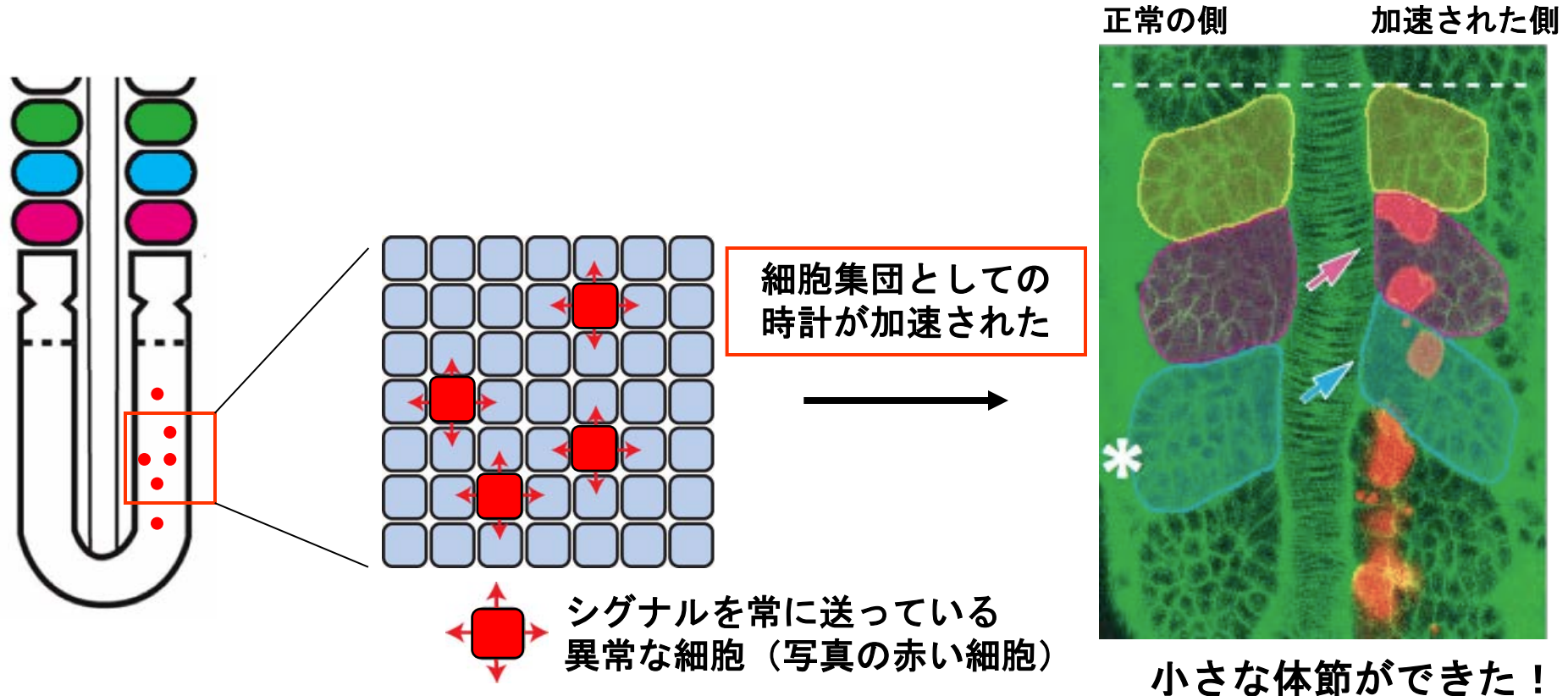


正常なシステム



システムの乱れ

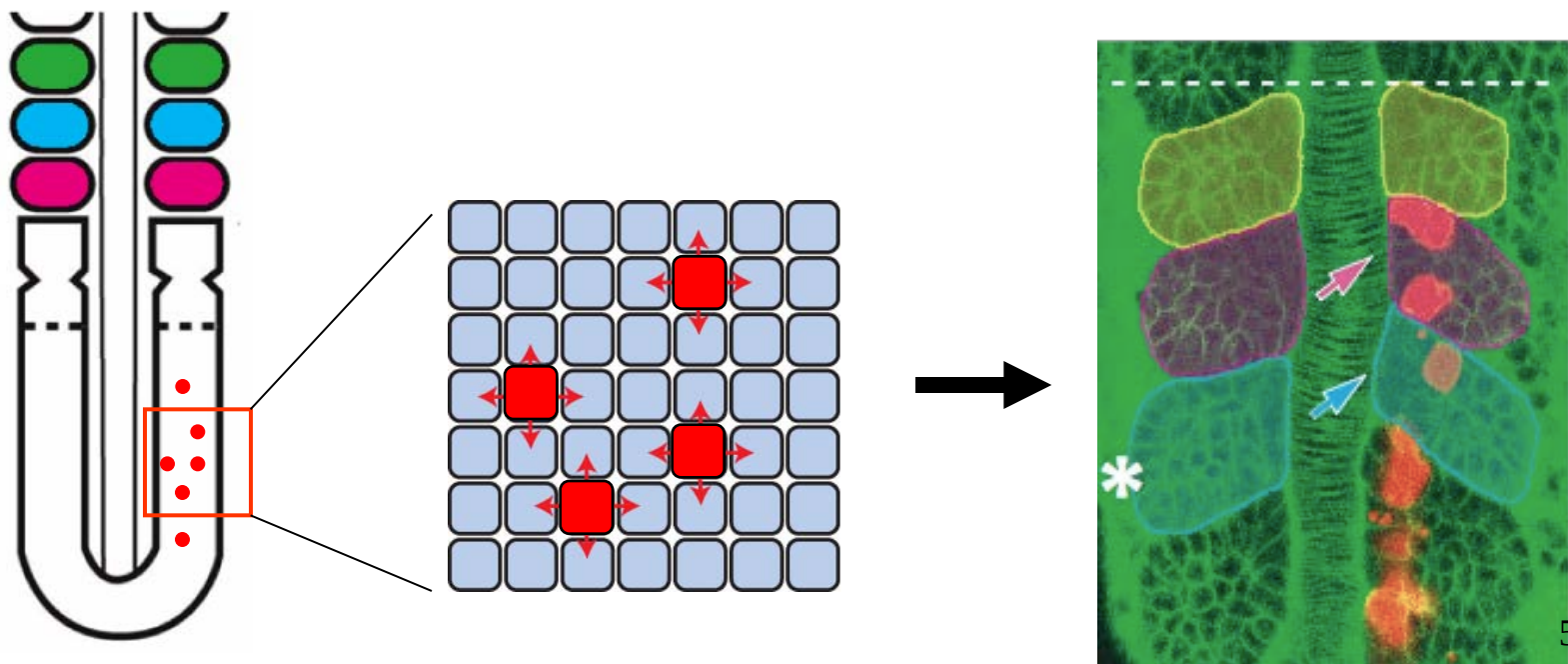
シグナルを送り続ける細胞は集団全体の時計を加速した！



外部から刺激を与えることで分節時計を変調させ、節の大きさを人為的に変えることにも成功した

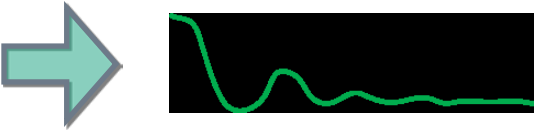


in vitro と in silico の実験結果が一致



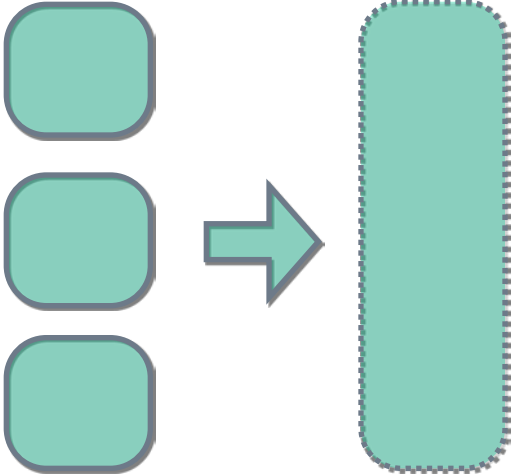
振動と体節形成の関係

振動の喪失



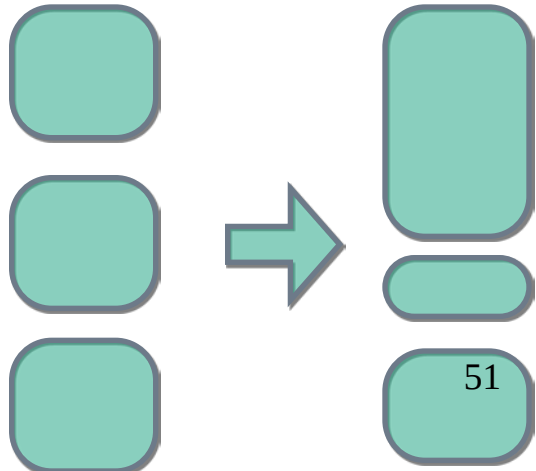
振動の喪失

節ができない



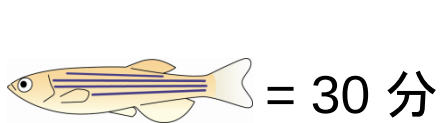
サイズを変えることが変化する

周波数の改変

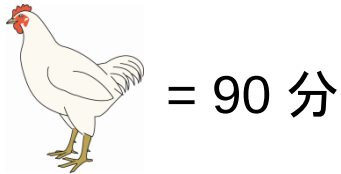


まとめ

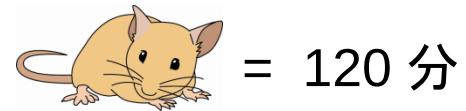
- 脊椎骨の規則正しいパターンは分節時計が創り出す



* © 2007 Emi Kosano

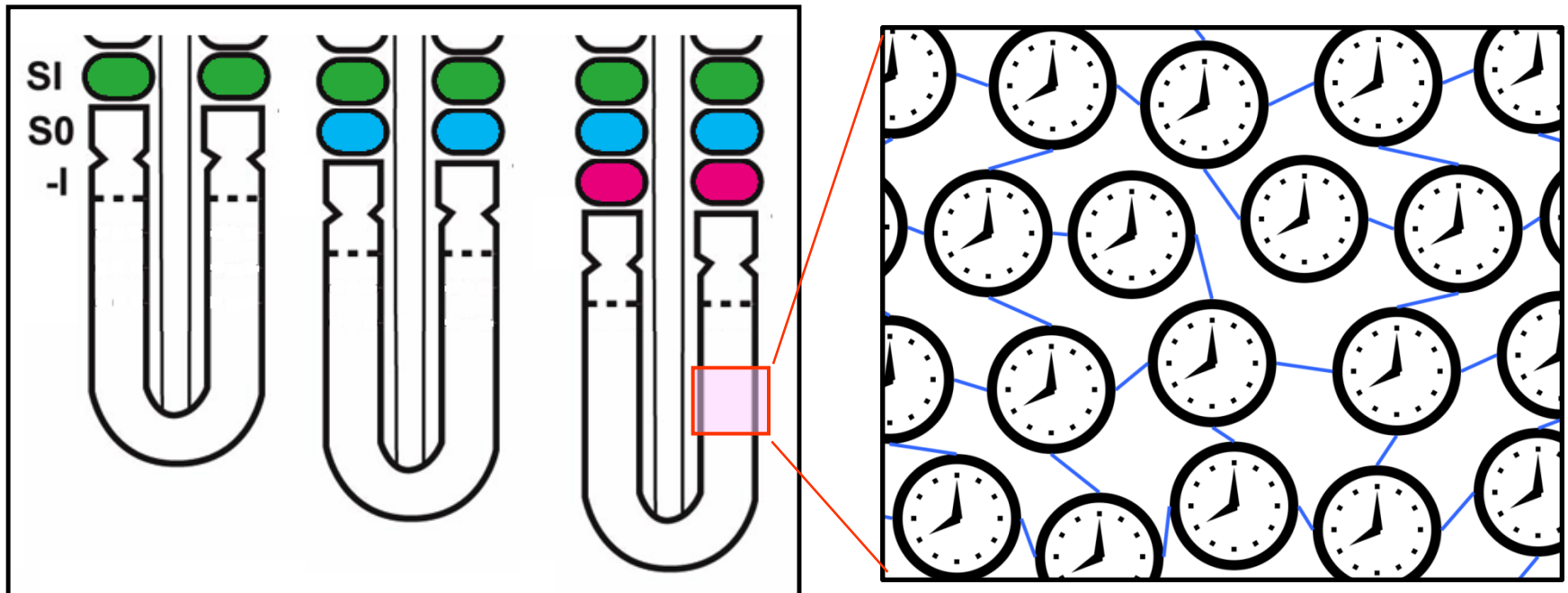


* © 2007 Emi Kosano



* © 2007 Emi Kosano

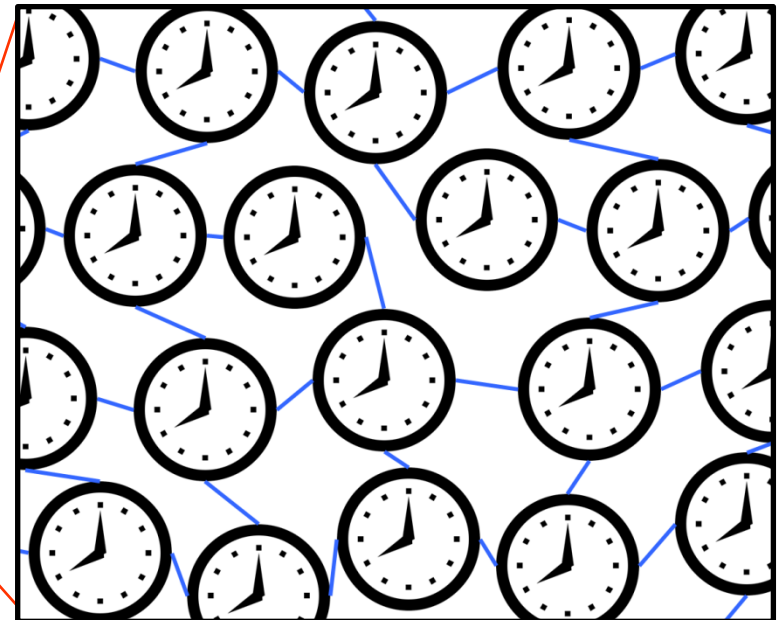
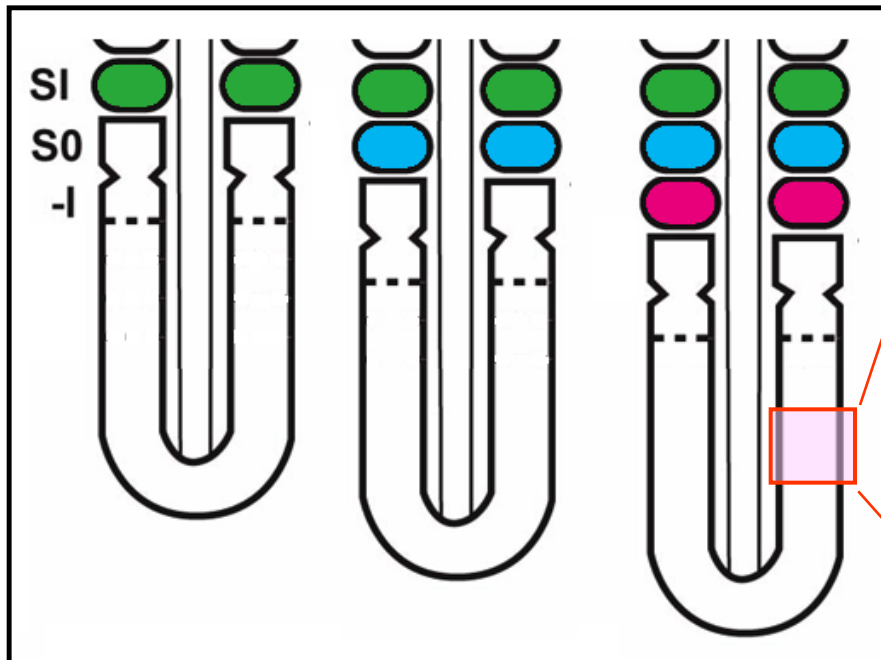
- 分節時計は時計細胞の集団が連結した集合体である



まとめ

生命の堅牢性と可塑性

分節時計 = Coupled oscillators



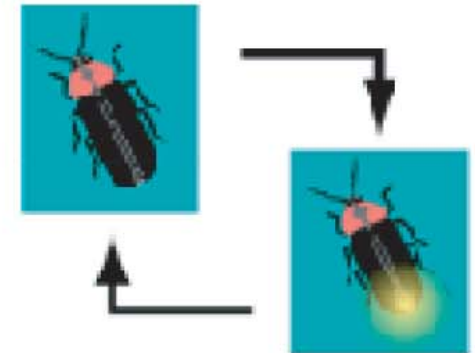
ノイズ耐性の時計
(民主的なメカニズム)

自然界にみられる類似の現象

集団内の同調した点滅



個体としての点滅



視覚を介した
同調

* イラスト出典：いきもの道具箱
<http://www.odd.jp/dougu/dougu.htm>

著作権の都合により
ここに挿入されていた動画を削除しました

山江村ケーブルテレビ
110608ほたる.mp4
<https://www.youtube.com/watch?v=hQIt7Q8ntZo>

器官構築の基本原理としての繰り返し構造

器官サイズ=コンパートメント(繰り返しの基本単位)×数



背根神経節



* 相賀裕美子氏提供
椎骨



魚の紋様(近藤,
Nature, 1995 & 1996)

*
Reprinted by
permission from
Macmillan
Publishers Ltd:
Nature, vol.376,
no.6543, 31 August
1995
[www.nature.com
/nature/journal
/v376/n6543
/index.html](http://www.nature.com/nature/journal/v376/n6543/index.html)

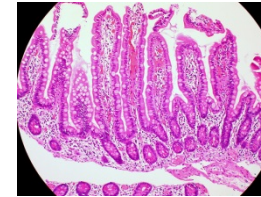


Photo by Ed Uthman, from
flickr (2013/12/19) CC BY 2.0
[http://www.flickr.com/photos/
euthman/5916217283/](http://www.flickr.com/photos/euthman/5916217283/)

腸の絨毛

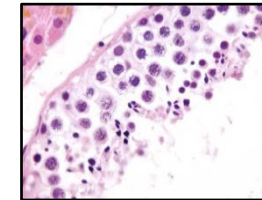


Photo by Nephron, from Wikimedia
Commons (2013/12/19) CC BY-SA 3.0
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:
Seminiferous_tubule_and_sperm.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Seminiferous_tubule_and_sperm.jpg)

精子形成の波

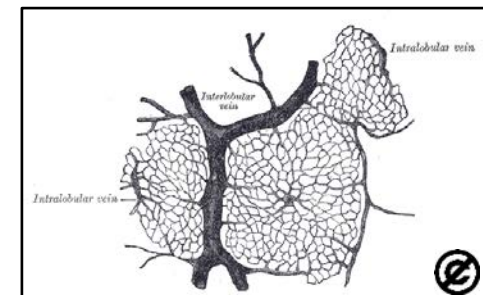


Photo by nojhan, from flickr
(2013/12/19) CC BY-SA 2.0
[http://www.flickr.com/photos/25891376
@N00/421254473](http://www.flickr.com/photos/25891376@N00/421254473)

毛髪

体節の分節性

器官の周期性を支配する
クロック機構
= 器官形成クロック



肝小葉

生物界にみられる振動現象

Rhythmic activity of the neural network

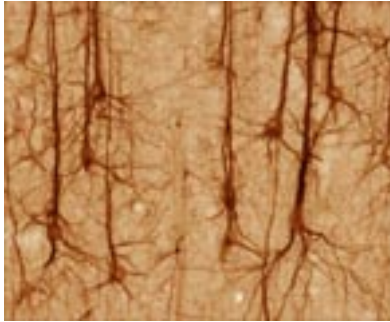
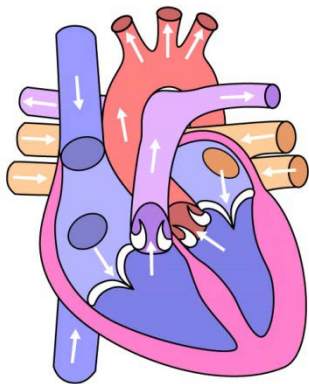
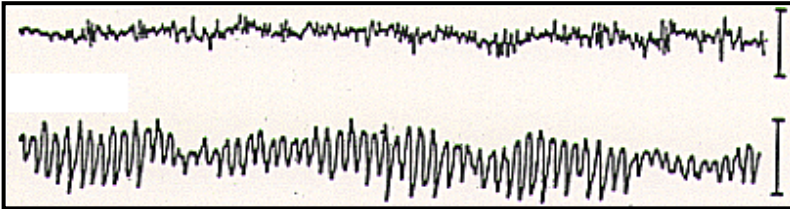


Image by Brainmap.org
CC BY-SA 3.0
<http://brainmaps.org/index.php?p=screenshots>



Heart beating



Image by Wapcaplet/Yaddah, from Wikimedia Commons (2013/12/19) CC BY-SA 3.0
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagram_of_the_human_heart.svg

Synchronized life cycle



Photo by Dave Govoni, from flickr (2013/12/19)

CC BY-NC-SA 2.0

<http://www.flickr.com/photos/dgovoni/8751192202/>

Cicadas hatching every 7,
13 or 17 years 57

共同研究者

名古屋大学・近藤研究室

近藤 滋 教授
吉元 英一

Contributor

堀川 一樹(徳島大学)
石松 愛(さがけ研究員)