

令和元年6月10日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0079

研究課題名(和文)「拡散しない反応拡散」に基づく形態形成の分子機構

研究課題名(英文) Molecular basis of the Turing model without diffusion

研究代表者

渡邊 正勝 (WATANABE, Masakatsu)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：90323807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：生物の形は、その構成要素である細胞の配置に依存するが、時としてその配置は細胞間の相互作用依存的に決定される。この、細胞自律的な形態形成の分子メカニズムの解明を目指して、ゼブラフィッシュの体表模様形成機能の解析を行った。体表模様の構成因子には黄色素細胞と黒色素細胞があり、この細胞間には重要な細胞間相互作用が存在する。今回、この細胞間相互作用に關与する因子として、黒色素細胞が伸ばす細胞仮足、ならびにコネキシンとNotchに着目して解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は生物の形を決める分子メカニズムの解明を目指した基礎研究である。ゼブラフィッシュの体表模様を研究のモデルケースとし、黒色素細胞の集団サイズを規定するメカニズムの解明を目指している。今回の研究により、細胞集団サイズを決めるメカニズムの一つとして、ギャップ結合ネットワークの存在を示した。ギャップ結合は、細胞間の低分子化合物の通過を制御し、細胞間相互作用に直接的に作用するチャネル分子である。更には、このネットワークには細胞間の接触が必要であり、これを仲介する細胞仮足の上に成り立つこととNotchシグナルが相補的に作用していることを示した。

研究成果の概要(英文)：The body shape of organisms depends on the arrangement of its constituent cells, and the arrangement sometimes is determined depending on the interaction between cells by cell autonomous manner. In order to elucidate the molecular mechanism of the cell-autonomous morphogenesis, we have analyzed the zebrafish skin pattern formation mechanism. The stripe on fish skin mainly consists of 2 types of cells; xanthophore and melanophore, and cell-cell interactions exist between these cells. In this study, as factors involved in this intercellular interaction, we analyzed the cell projections that black pigment cells extend, as well as connexins and Notch as molecular factors.

研究分野：発生生物学

キーワード：反応拡散 色素細胞 パターン形成 ギャップ結合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生物の形態形成(パターン形成)を論じる時に、2つの重要な原理が存在する。一つはモルフォゲン濃度勾配原理で、もう一つは反応拡散原理である。前者が単純なパターン(ストライプ、あるいは同心円など)の形成を説明するのに対し、後者はストライプのみならず、スポットパターンや迷宮パターンなど、様々なパターンを構築できる原理である。本研究では、ゼブラフィッシュの体表模様(ストライプパターン)を題材に、反応拡散原理に基づくパターン形成の“分子メカニズム”の解明を目標に研究を進めてきており、これまでにいくつかの細胞間相互作用に関わる分子を単離・解析してきた。特に、ギャップ結合の構成因子であるコネキシンに関しては、その機能改変によりゼブラフィッシュの体表上に反応拡散シミュレーションと全く同様な模様を再現でき、ギャップジャンクションが反応拡散原理に関わる分子の中でも非常に重要な因子であることを示してきた。ところで、上述の2つの原理により、生命現象の多くの事象が説明できることは認識されてきているが、しかし一方で、「拡散物質が生物の体内で如何に安定な濃度勾配を形成・維持するか」という疑問に対しては、最近まで答えが見出されていなかった。この問題に関して、A:モルフォゲン濃度勾配説に関しては2011~2014年にかけて海外のグループによって、B:反応拡散原理に関しては2014年に我々の研究グループからそれぞれ論文が出され、濃度勾配の安定した形成・維持は、拡散物質の拡散によるのではなく、細胞自体が伸ばす“細胞仮足”(Cytoneemes)の伸長によるという説明がなされた。モルフォゲン濃度勾配原理の一例をあげると、ショウジョウバエのウイングディスクの形成時に仮足を介して行われるシグナル伝達の機構が分子レベルで明らかにされている。これに対し、“拡散しない反応拡散”に関しては、残念ながら細胞レベルの観察でしかなく、分子実体の直接的な検出には至っていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は「拡散しない反応拡散」原理に基づく形態形成メカニズムの分子メカニズム解明を目的とする。特に本申請課題として

(1)「細胞仮足の動態と機能」に着目して、その機能解明を目指した。

(2)色素細胞間相互作用に関与する分子として Notch-Delta と Gap Junction に注目し、パターン形成における機能解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)ゼブラフィッシュの体表模様を形成する2種類の色素細胞には2種類のギャップ結合タンパク質であるコネキシン41.8とコネキシン39.4が発現している。ギャップ結合はコネキシンタンパク質の12量体であるが、異なる種類のコネキシンの複合体として存在する可能性がある。このため、別々に発現させたコネキシンに由来するギャップ結合を再構成させて、それぞれの機能解析を行った。

(2)色素細胞は免疫染色等の手法がうまく機能せず、タンパク質の検出が困難な細胞である。このため、蛍光タンパク質の利用が有効な手段となっている。しかしながらこれまでの研究により、単にEGFPを融合させたコネキシンタンパク質では、in vivoでの再構成ができないことが分かっていた。本研究では、コネキシンタンパク質の分子解剖を行い、蛍光タンパク質融合型のコネキシンを作製し、発現解析を行った。

(3) 体表模様形成における細胞仮足の機能解析の一環として、体表模様変異体の持つ黑色素細胞の細胞仮足の観察を行う。これまでの知見として、黄色素細胞と黑色素細胞の間の Notch-Delta シグナルの重要性が分かっている。このためこれら細胞の直接的な接触が必要であり、このためには黑色素細胞の細胞仮足の伸長が必要である。本研究では、細胞仮足の伸長と体表模様の関係を調べるため、体表模様変異体由来の黑色素細胞の細胞仮足の観察を行った。

(4) ギャップ結合と Notch シグナルの関係解明を目指して、様々な変異体に Notch 細胞内ドメイン (NICD) を導入し、その効果を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞間相互作用に関わるギャップ結合を形成するコネクシンの役割を明らかにするために、細胞間相互作用によるパターン形成に必要なコネクシンの最小条件を検討した。その結果、色素細胞特異的なプロモータを用いた遺伝子発現を行う遺伝子組換え体の作成により、黑色素細胞ではコネクシン 39.4、黄色素細胞ではコネクシン 41.8 の発現が最小条件となりうることを見出した。また、コネクシン 39.4 がポリアミン結合モチーフを有し、*in vitro* の実験系ではスペルミジン感受性を持ち、ギャップ結合の整流性に関与していることを示した。更に、これまでの知見である、(a)黑色素細胞にスペルミンが蓄積しており、パターン形成に関与していること、(b)黑色素細胞に内向き整流性カリウムチャネルが発現し、この整流性にはポリアミンが関与していること、(c)ポリアミン代謝酵素の異所的発現により、ゼブラフィッシュの表現型が、コネクシン変異体とカリウムチャネル変異体の中間型からダブル変異体の表現型を示すこと、などから、黄色素細胞から黑色素細胞への活性化シグナルが、コネクシン 41.8 - コネクシン 39.4 それぞれが作るヘミチャネルの結合によるギャップ結合を介していることを明らかとした。

(2) ゼブラフィッシュ色素細胞に発現するコネクシンタンパク質の検出を目指して、コネクシンの分子解剖を行い、蛍光タンパクを用いた分子標識の条件検討を行った。野生型のコネクシン 41.8、コネクシン 39.4 共に、C 末ドメインへの EGFP タンパクの融合では、*in vivo* での機能相補、蛍光検出とも出来ていなかったが、C 末ドメインの部分的置換により、機能する融合タンパクの作出に成功した。この融合タンパク質を用いて *in vivo* における蛋白局在を行うとともに、培養細胞を用いた電気生理解析の指標とし、上記の電気生理解析によりポリアミン感受性を解析した。

(3) 細胞仮足の伸長分布に関しては、ゼブラフィッシュ体表模様変異体に対して仮足長の測定を試みたが、現在のところ、黑色素細胞 黄色素細胞間の接触に大きな影響を与えているとは言えず、今後の検討課題となっている。

(4) ギャップ結合変異体並びに体表模様変異体において Notch シグナルの効果について検討を行った。Notch 下流因子を NGS と CRISPR を用いてスクリーニングを試みたが、現在のところ、Hes や Her などのような候補となる因子は得られておらず、さらなるスクリーニングが必要となっている。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 8 件)

Denis, J. F., Diabougou, M. R., Molica, F., Hautefort, A., Linnerz, T., Watanabe, M., Lemeille, S., Bertrand, J. Y., and Kwak, B. R\*. (2019) KLF4-Induced Connexin40 Expression Contributes to Arterial Endothelial Quiescence. *Front Physiol* 査読あり 10:80 doi:10.3389/fphys.2019.00080

Usui, Y., Kondo, S., and Watanabe, M. (2018) Melanophore multinucleation pathways in zebrafish. *Dev Growth Differ* 査読あり **60**, 454-459 doi: 10.1111/dgd.12564

Chanson, M<sup>#</sup>., Watanabe, M<sup>#</sup>., O'Shaughnessy, E. M., Zoso, A., and Martin, P. E<sup>#</sup>.\*. (2018) Connexin Communication Compartments and Wound Repair in Epithelial Tissue. *Int J Mol Sci* 査読あり 19(5), 1354; <https://doi.org/10.3390/ijms19051354>

Watanabe, M. (2017) Gap Junction in the Teleost Fish Lineage: Duplicated Connexins May Contribute to Skin Pattern Formation and Body Shape Determination. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 査読あり 5:13 review doi.org/10.3389/fcell.2017.00013

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. 実験医学増刊号、査読なし 2017年3月号 192-194 (総説)

Misu, A., Yamanaka, H., Aramaki, T., Kondo, S., Skerrett, I. M., Iovine, M. K., and Watanabe, M. (2016) Two Different Functions of Connexin43 Confer Two Different Bone Phenotypes in Zebrafish. *J Biol Chem* 査読あり **291**, 12601-12611 doi: 10.1074/jbc.M116.720110

Watanabe, M., Sawada, R., Aramaki, T., Skerrett, I. M., and Kondo, S. (2016) The Physiological Characterization of Connexin41.8 and Connexin39.4, Which Are Involved in the Striped Pattern Formation of Zebrafish. *J Biol Chem* 査読あり **291**, 1053-1063 doi: 10.1074/jbc.M115.673129

Watanabe, M. (2016) Genetics of body shape: Connexin43 is the key to two zebrafish mutants with shorter backbones and fins. *ATLAS of Science* 査読なし **September 26**, review <https://atlasofscience.org/genetics-of-body-shape-connexin43-is-the-key-to-two-zebrafish-mutants-with-shorter-backbones-and-fins/>

### 〔学会発表〕(計 3 件)

Usui, Y., Kondo, S., and Watanabe, M. Melanophore multinucleation pathways in zebrafish 日本分子生物学会 (2018年12月・パシフィコ横浜)

臼居優、近藤滋、渡邊正勝、黒色素細胞の多核化について 日本動物学会 (2018年9月、札幌)

Watanabe, M. Do gap junctions contribute to the diversification of teleost? 2016 Asia Oceania Zebrafish Meeting (2016年9月、シンガポール)

### 〔その他〕

ホームページ等

<https://www.fbs-osaka-kondolabo.net/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：臼居 優

ローマ字氏名：(USUI, yuu)

研究協力者氏名：近藤 滋

ローマ字氏名：(KONDO, shigeru)