

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770247

研究課題名(和文)細胞種間の境界を決める分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism for pattern formation

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) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュの体表模様を題材に、異種細胞集団間で境界を作るメカニズムの解析を行った。ゼブラフィッシュの体表模様は黒色素胞と黄色素胞から構成される。黒色素胞と黄色素胞が混ざり合う体表模様変異体daliの解析を行ったところ、Tetraspanin 3C(Tspan3C)と名付けた新規膜蛋白質に変異が入っていることを見出した。今回検出したアミノ酸置換によりTspan3Cの糖鎖修飾に異常が起こり、膜局在が不十分になる。その結果、黒色素胞の移動能の低下、黒色素胞-黄色素胞間の反発相互作用が低下し、色素細胞間の境界形成ができなくなっていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to analyze molecular mechanism of boundary formation between cells. Zebrafish stripe consists of two types of pigment cells, melanophores and xanthophores. We analyzed pigment pattern mutant, dali, which shows intermingled pigment pattern of melanophores and xanthophores. We identified an amino acid substitution in Tetraspanin 3C (Tspan3C) protein which has a function to anchor membrane proteins at cell surface. The mutation caused defects in protein modification of Tspan3C and in cell migration activity of melanophore. Furthermore we detected the loss of repulsive interaction between melanophore and xanthophore, which caused intermingled pigment pattern of the mutant fish.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：パターン形成 ゼブラフィッシュ 体表模様 細胞間相互作用 細胞境界

1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュの体表模様は黒色素胞と黄色素胞から構成されるストライプ模様である。ストライプ形成において、それぞれの色素細胞の集団間にきれいな境界を形成するためには、集団間の反発作用と活性化作用の両方が存在することが予想されていた。それらの作用に関わる因子として、これまでに、コネキシン、カリウムチャネル、Notch-Deltaなどが単離されてきた。しかしながら一方で、その作用機序については不明であった。また、様々な変異体から、これ以外の因子の関与も十分に考えられた。

2. 研究の目的

本研究は「異なる細胞種間の境界」を決めるメカニズムの解明を目的とする。「境界」の形成には異種細胞集団間に存在する「反発作用」や、「協調作用」等の相互作用が必要である。この相互作用の実体の解明を目指して、ゼブラフィッシュの体表模様を研究対象として研究を進める。

3. 研究の方法

細胞集団間で境界を作るメカニズムの解明に向けて、ゼブラフィッシュの縞模様を研究対象とした。ゼブラフィッシュの縞模様は黒色素胞と黄色素胞の各集団よりなり、はっきりとした境界が形成されている。模様変異体のひとつ dali 変異体は、この境界が曖昧で、一部で黒色素胞、黄色素胞の集団が混ざり合っている。また、seurat 変異体は黒色素胞がゆがんだスポット模様を形成している。本研究ではこれらの遺伝解析を行い、色素細胞の振る舞いに関する解析を行った。

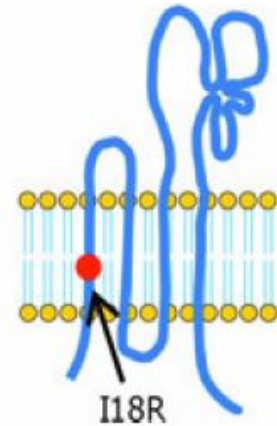
また、黒色素胞-黄色素胞間の相互作用に関して、これまでの解析により Notch-Delta あるいはギャップ結合が重要な役割を担っていることがわかってきた。一方で、過去の解析では、これら色素細胞間に直接的な接触を検出した例はなく、細胞間相互作用がパターンを作るという仮説の矛盾点となっていた。これを解決するため、体表における色素細胞の配置に関して電子顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

テトラスパニンが黒色素胞-黄色素胞間の境界形成に関与している。

通常はきれいなストライプとなる黒色素胞-黄色素胞の境界が曖昧になり、一部で混在がみられる模様変異体 dali に関して、Parichy 研究室との共同研究として解析を行った。dali 変異体は、Parichy 研究室で単離された変異体であるが、今回、その遺伝子解析を行ったところ、4回膜貫通型膜タンパク質、テトラスパニン 3c にアミノ酸変異を検出した。このアミノ酸置換により、ER から Golgi への移行に異常が生じていること、また、糖鎖修飾に異常が生じていることが明らか

かとなった。更に dali 変異体から単離した色素細胞の動態を解析したところ、黒色素胞の移動能の低下及び、黒色素胞の黄色素胞からの逃避行動に異常が検出された。このことから、テトラスパニンに生じたアミノ酸置換が、自身の修飾に異常を生じさせ、細胞移動能、細胞間相互作用能の低下を引き起こしていることが明らかとなった。

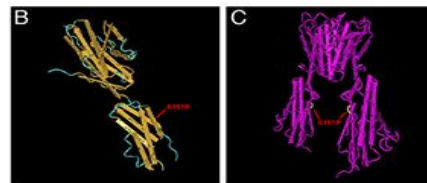


Notch-Delta がゼブラフィッシュのストライプパターン形成に関与している

研究開始以前より、Notch-Delta がストライプパターン形成に関与している可能性が示唆されていたが、両者を発現する色素細胞間に直接的な接触があるかどうかの問題であった。本研究期間に電子顕微鏡観察を行い、黒色素胞と黄色素胞が、黒色素胞の持つ長い仮足により、直接接触していることが明らかとなった。

Igsf11 がゼブラフィッシュのパターン形成に関与している。

通常はストライプとなる体表模様が、黒色素胞がゆがんだ円形になる変異体 seurat の解析を行った。遺伝解析の結果、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する Igsf11 にアミノ酸置換が検出された。Igsf11 は細胞接着に関する因子であり、検出されたアミノ酸変異により Igsf11 間の接着能の低下がみられた。細胞レベルでは黒色素胞の移動能とともに生存能の低下がみられた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Inoue, S., Kondo, S., Parichy, D. M. & Watanabe, M. (2014). Tetraspanin 3c requirement for pigment cell

interactions and boundary formation in zebrafish adult pigment stripes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 査読有, 27,190-200. DOI: 10.1111/pcmr.12192

Hamada, H., Watanabe, M., Lau H. E., Nishida, T., Hasegawa, T., Parichy D. M. & Kondo, S.(2014). Involvement of Delta/Notch signaling in zebrafish adult pigment stripe patterning. *Development* 査読有, 141, 318-324. doi:10.1242/dev.099804

渡邊正勝 (2013). ゼブラフィッシュの色素細胞間相互作用とパターン形成. 関西実験動物研究会会報. 35号 52-59(査読なし)

http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/kansai/kansai_web_new/reports/reports.html

Eom, D.-S., Inoue, S., Patterson, L. B., Gordon, T. N., Slingwine, R., Kondo, S., Watanabe, M. & Parichy, D. M. (2012). Melanophore migration and survival during zebrafish adult pigment stripe development require the immunoglobulin superfamily adhesion molecule, igsf11. *PLoS Genet.* 査読有, 8(8): e1002899.

doi:10.1371/journal.pgen.1002899

Watanabe, M., Watanabe, D. & Kondo, S. (2012). Polyamine sensitivity of gap junctions is required for skin pattern formation in zebrafish. *Sci Rep* 2, 473. DOI: 10.1038/srep00473

#Watanabe, M. & Kondo, S. 査読有, (2012). Changing clothes easily: connexin41.8 regulates skin pattern variation. *Pigment Cell Melanoma Res* 査読有, 25, 326-30. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2011.00984.x

[学会発表](計 10 件)

Masakatsu Watanabe & Shigeru Kondo, Molecular bases of Zebrafish skin pattern formation, 日本発生生物学会 (沖縄コンベンションセンター・2011年5月)

Masakatsu Watanabe & Shigeru Kondo, Skin pattern variation brought by the mutation in connexin41.8 of zebrafish, 2011 International Gap Junction conference (Gent・ベルギー・2011年7月)

渡邊正勝・近藤滋、反応拡散モデルに基づくゼブラフィッシュの体表模様形成機構、日本数理生物学会 (明治大学・東京・2011年9月)

渡邊正勝・近藤滋、パターン形成におけるギャップジャンクションの働き、日本動物学会 (大阪大学・2012年9月)

Masakatsu Watanabe & Shigeru Kondo, Polyamine sensitive residues in gap junction is crucial for skin pattern formation of zebrafish, 日本分子生物学会 (マリンメッセ福岡・2012年12月)

渡邊正勝、ゼブラフィッシュの色素細胞間相互作用とパターン形成、関西実験動物研究会 (京都大学・2013年3月)

Masakatsu Watanabe, Daisuke Watanabe, Tomoki Nishida & Shigeru Kondo, Molecular basis of stripe pattern formation in zebrafish, 日本発生生物学会 (くにびきメッセ・島根・2013年5月)

Masakatsu Watanabe & Shigeru Kondo, Gap junction mediates signal flow to make skin patterns on zebrafish. EMBO Conference 2013 Morphogen Gradients (オックスフォード大学・イギリス・2013年6月)

Masakatsu Watanabe & Shigeru Kondo, Connexin41.8 is required for the melanophore-xanthophore interaction in zebrafish, 2013 International Gap Junction conference (チャールストン・アメリカ・2013年7月)

渡邊正勝・近藤滋、ゼブラフィッシュのパターン形成、日本動物学会 (岡山大学・2013年9月)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
大阪大学大学院生命機能研究科近藤滋研究室

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/skondo/>

6．研究組織

(1)研究代表者

渡邊 正勝（WATANABE, Masakatsu）
大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授
研究者番号：90323807