

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870413

研究課題名(和文)細胞の「つぶやき」の可視化と制御

研究課題名(英文)Visualizing and controlling cellular "tweets"

研究代表者

宮澤 清太 (MIYAZAWA, Seita)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：10377905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、細胞間コミュニケーションの可能なプロトコルの1つとして細胞の膜電位変動に着目し、その検出や制御を通じて、これら細胞の「つぶやき」とパターン形成過程との関わりを明らかにすることを目的に研究を行った。膜電位感受性蛍光プローブを色素細胞特異的に発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した他、ゼブラフィッシュ体側への任意の光刺激を可能とする個体トラッキング・光照射システムを開発し、色素細胞特異的にチャンネルロドプシン遺伝子を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて、膜電位パターンが模様パターンに与える影響を解析することを可能にした。

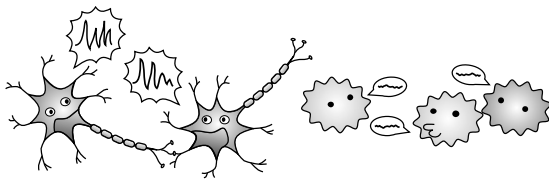
研究成果の概要(英文)：To explore the potential role in pattern formation processes as one of the possible cell-cell communication protocols, the shifts of cellular membrane potential were examined. We generated transgenic zebrafish expressing voltage-sensitive fluorescent probes in pigment cells. We also developed an individual tracking and irradiation system that can optically and separately stimulate the left and right side of the body, which enables the analysis of the effects of membrane potential on the pigment pattern formation.

研究分野：数理生物学、発生生物学、進化生物学

キーワード：パターン形成

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 興奮性細胞は膜電位の劇的な変動(活動電位)を用いて通信を行うが、非興奮性細胞においても膜電位は閾下で微妙に変化している。そうした静止膜電位変動は細胞の内部状態に依存しており、細胞が自らの「気持ち」を吐露する「つぶやき」とも言える(図)。この「つぶやき」に人為的な擾乱を加えることで、細胞の内部状態を特定の方向(増殖・分化等)へ導くことができるという興味深い事例が複数報告されており(Sundelacruz et al. Stem Cell Rev Rep 2009)、閾下膜電位情報がシグナル伝達や細胞間コミュニケーションの重要なコアの1つである可能性を示唆している。



興奮性細胞の活動電位と非興奮性細胞の「つぶやき」

(2) 一方、研究代表者らはこれまで、動物の体表模様パターンを対象として、数理モデルと実験的手法をあわせた解析により、「かたち」をつくるメカニズムの解明に取り組んできた(Miyazawa et al. Nat Commun 2010 他)。反応拡散モデルでは、空間パターンの自律的な規則性を生み出す核心は、拡散項、すなわち拡散性因子の拡散速度の違いに集約される。しかしながら、実際の生物では「拡散性因子」に相当するような分子的な実体があるとは限らず、「拡散」と数理的に同等な「情報の伝播」が存在すれば、実装方式によらず同様の空間パターンは生じ得る。実際、最近の研究では、ゼブラフィッシュ模様変異体の原因遺伝子の解析などから、色素細胞に発現する内向き整流性のカリウムチャネルや、ギャップ結合を形成するコネクシンがパターン形成に大きな影響を及ぼす(Watanabe et al. EMBO Rep 2006, Iwashita et al. PLoS Genet 2006)ということが明らかとなり、細胞の電気生理学的性質が細胞間コミュニケーションに関わり、細胞集団のパターン形成に必要な「情報の伝播」を担うという可能性が強く示唆されるに至っている。

## 2. 研究の目的

以上のような知見をふまえ、本研究では、細胞間コミュニケーションの可能なプロトコルの1つとして非興奮性細胞の閾下静止膜電位変動に着目し、その検出や人為的な操作を通じて、これら細胞の「つぶやき」とパターン形成過程との関わりを明らかにすることを目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 膜電位感受性蛍光プローブを色素細胞特異的あるいは全身性に発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、膜電位パターンと色素細胞集団の遷移動態の観察を試みた。

(2) 膜電位変化に関わる複数の因子について色素細胞特異的な発現を誘導するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、模様パターンの観察を行った。

(3) ゼブラフィッシュ体側への任意の光刺激を可能とする個体トラッキング・光照射装置の開発・試作を行った。

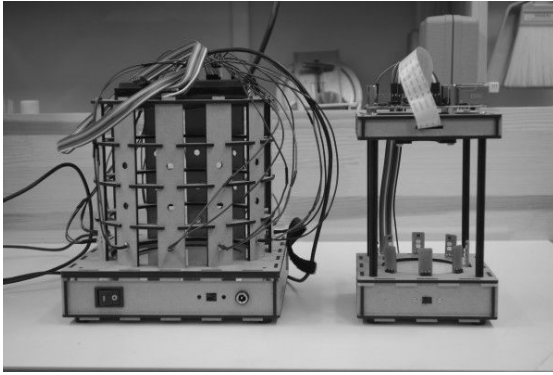
(4) 光感受性トランスジェニックゼブラフィッシュと個体トラッキング・光照射システムを用い、膜電位パターンを人為的に操作することで生じる模様パターンの変化を観察した。

## 4. 研究成果

(1) 体表組織模様パターン形成過程における細胞膜電位パターンの可視化を目的として、筒井ら(Tsutsui et al. Nat Methods 2008)が開発した膜電位感受性蛍光プローブを色素細胞特異的もしくは全身性に発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、模様パターン形成過程における膜電位パターンの *in vitro*, *in vivo* での経時的変化を観察することを試みた。プローブの発現自体は確認できたものの、色素細胞における発現量および局在の問題から望ましいシグナル強度を達成することが難しく、これまでのところ明瞭なパターンの観察結果を得るまでには至らなかった。

(2) 細胞膜電位を脱分極方向/過分極方向へシフトさせる効果をもつことが報告されている複数の因子について、色素細胞特異的な発現を誘導するトランスジェニックゼブラフィッシュの作製と模様パターンの観察を行った。過分極方向への膜電位シフトをもたらす因子については、模様パターンにわずかに変化が生じた遺伝子導入個体が少数認められたものの、パターン形成に劇的な変化をもたらすようなものはこれまでのところ確認できておらず、今後の検討を要する状況である。

(3) 光感受性イオンチャネルを遺伝子導入したゼブラフィッシュに対し、左右体側への任意の光刺激を与えることで人為的な膜電位操作を可能とする個体トラッキング・光照射装置の開発・試作を行った(図)。



ゼブラフィッシュ個体トラッキング・光照射装置

装置はゼブラフィッシュ成魚もしくは稚魚を単独飼育するための円筒形の小型アクリル水槽を設置可能な基部を持つ。基部内に配置した赤外線 LED マトリクスから基部上面のディフューザーフィルムを介して水槽底面側より赤外線を照射し、装置上部に設置した制御用コンピュータ (Raspberry Pi) および赤外線カメラ (Raspberry Pi 接続 PiNoir カメラと赤外線透過フィルターを使用) によって水槽内ゼブラフィッシュ個体のリアルタイムトラッキングを行う。トラッキング結果から得たゼブラフィッシュ個体の姿勢データをもとに、水槽外部に円周状に配置した青色 LED モジュールアレイを制御することで、ゼブラフィッシュ体側に対し任意の角度および頻度・間隔をもって青色光を照射可能なシステムを構成した。トラッキングおよび LED モジュールの照射制御プログラムは OpenCV ライブラリと Python を用いて作成し、装置外部よりネットワークを介したりリモート接続にてコントロール可能とした。孵化後 2~4 週程度の稚魚および孵化後 12 週以降の成魚を用いてテストを行ったところ、どちらに対しても正確なトラッキングおよび体側一定方向からの光照射を継続して行えることを確認した。

(4) 色素細胞特異的に改変型チャンネルロドプシン遺伝子を発現する光感受性トランスジェニックゼブラフィッシュを対象に、前項で試作開発した個体トラッキング・光照射装置を用いて、体側部のストライプ状模様パターンを構成する皮膚組織色素細胞の細胞膜電位を人為的に操作することを試みた。トランスジェニック個体および野生型個体のそれぞれについて体側の一方方向のみ連続して青色光が照射される条件を設定し、装置内部でおよそ 4 週間にわたり継続飼育を行ったところ、野生型コントロール個体では模様パターンにほとんど変化が見られなかったのに対し、トランスジェニック個体ではストライプ状の模様パターンに乱れが生じることを確認できた。今回試行した体側一方方向から青色光を連続照射する実験条件では、トラン

スジェニック、野生型ともに背光反射の影響が見られ、頭尾軸に関し光照射側へ傾斜した体勢を保つ傾向が見られたが、遺伝子導入する改変型チャンネルロドプシンや光照射条件 (頻度・間隔) の検討により、背光反射の影響を極力抑えながら実験を行うことは可能であると考えられる。本研究課題で開発したシステムを用いることで、人為的に操作した膜電位パターンが模様パターン形成におよぼす影響を解析することが可能となり、細胞間コミュニケーションのプロトコルの 1 つとしての膜電位パターンの役割について明らかにできるものとする。

## 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)

[学会発表](計 7 件)

Seita Miyazawa, Shigeru Kondo, Sho Hosoya, Kiyoshi Kikuchi, Peculiar pigment patterns and possible progenitors of a poisonous pufferfish, The annual meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, 2015.7.12-16, Vienna (Austria)

Seita Miyazawa, Peculiar pigment patterns and possible progenitors of a poisonous pufferfish, Gordon Research Conference on Speciation, 2015.3.15-20, Ventura (USA)

宮澤 清太、どうぶつのもようを考える、東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻野中勝教授退職記念シンポジウム、東京大学 (東京都・文京区) 2015 年 2 月 28 日

宮澤 清太、へんなもようのどうぶつをしらべたい、定量生物学の会 第六回年会、大阪大学 (大阪府・吹田市) 2013 年 11 月 23 日 24 日

宮澤 清太、カタい模様、コルい模様、日本動物学会第 84 回岡山大会 シンポジウム「紋様・体色形成研究の新たな展開」、岡山大学 (岡山県・岡山市) 2013 年 9 月 26 日

宮澤 清太、へんなもようのどうぶつをしらべたい、NGS 現場の会 第三回研究会、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市) 2013 年 9 月 4 日 5 日

宮澤 清太、「やわらか模様」のつくりかた、新学術領域「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」第 6 回インフォマティクスオープンセミナー、富山大学 (富山県・富山市) 2013 年 6 月 1 日

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

宮澤 清太 (MIYAZAWA, Seita)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教  
研究者番号： 10377905

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし