

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291049

研究課題名(和文)ギャップ結合が細胞集団の大きさと細胞集団間の距離を決める機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism that gap junctions determines size and distance of cell populations

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ギャップジャンクションは細胞間で低分子化合物の輸送にかかわるチャネル分子である。本研究では2種類のゼブラフィッシュ変異体、leopardとstoepselの解析を行った。原因遺伝子はそれぞれCx41.8とCx43である。また今回Cx39.4についても解析を行ったが、Cx39.4も別の模様変異体より単離された遺伝子である。電気生理解析により、Cx41.8とCx39.4が異なる機能を持ち、協奏的に機能していることを示した。また、Cx43のギャップジャンクション機能とヘミチャネル機能のうち、後者の活性増大によりゼブラフィッシュ脊椎骨に異常が生じることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：Gap junctions are intercellular channels that allow passage of ions and small molecules between adjacent cells. The zebrafish has been predicted to contain 39 connexin-encoding genes; the high number can be attributed to gene duplication during fish evolution, which resulted in diversified functions of gap junctions in teleosts. In this project we analyzed two connexin mutants, leopard and stoepsel, which are caused by the mutations in cx41.8 and cx43, respectively. In addition, we also analyzed cx39.4 which is involved in the skin pattern formation of zebrafish as cx41.8 is. Electrophysiological analysis revealed that Cx41.8 and Cx39.4 have different properties and function in a coordinated manner in skin pattern formation. Also electrophysiological analysis revealed that the growth-dependent malformation of the vertebrae in stp fish is likely caused by aberrant hemichannel activity of Connexin43 rather than by its reduced gap junction function due to the stp mutation

研究分野：発生生物学

キーワード：ギャップジャンクション ゼブラフィッシュ パターン形成 色素細胞 体表模様 骨形成

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が集まり、あるいは分裂を繰り返し「器官」という「形」を作る場合、同一の細胞はある種の「細胞集団」を形成する。そしてこの集団は無限に増殖するのではなくある一定の「大きさ」を持っている。更に、細胞集団間には排他的、あるいは協調的な相互作用が生じ、「境界」を形作る。この時、「細胞集団間の距離」のとりかたが形作りに重要になってくる。形ができるとは即ち「細胞集団」が形成され、「集団間の相互作用」が生じ、「境界」ができることによる。もちろんこの問いに対しては、直接的ではないにしろこれまでに多くの研究者によって研究がなされている。卵割から初期発生において細胞の個性ができる過程は様々な遺伝子・分子が関与していることが知られている。

申請者は、これまで多くの研究者が着目してきた初期発生ではなく、後期発生に着目している。なぜなら後期発生においても、常に「細胞集団」は維持され続け、あるいは新しく作り出され続けているからである。どのように、細胞や組織の境界が形成され、維持されていくか理解することは生体組織における恒常性の維持や成長制御等を理解する上で重要な問題であると言える。また、境界の消失、再構成等の現象が得られれば、組織再生の理解へも発展するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

ゼブラフィッシュの体表模様に関する研究は、20年来、海外のグループを中心に行われてきているが、それらの多くは色素細胞の分化・発生に関するものがほとんどであり、形づくり・パターン形成に関する研究は我々のグループが世界の中心にある。

パターン（体表模様）の形成には黑色素細胞と黄色素細胞間の相互作用が重要であるが、その相互作用に関係する因子として申請者は、ギャップ結合の構成因子：コネキシン 41.8、カリウムチャネル Kir7.1、IgSF11、Tspan3c、Notch-Delta を単離してきた。これらは、これまでの色素細胞の分化・発生に関わる既知遺伝子群とは一線を画し、まさに細胞間相互作用に関わる膜タンパク質であった。特にコネキシン、カリウムチャネルといったチャネル分子が入っていることは驚きであった。これまでの研究の過程では、本申請課題に関係して特に以下の点が明らかとなってきた。

(1)コネキシン 41.8 を用いてゼブラフィッシュの体表上に人工的に自由に模様を描ける。

(2)模様の変化に伴い、黑色素細胞の集団サイズが変化している。

(3)黑色素細胞の集団サイズの変化はコネキ

シンが形成するギャップ結合の生化学的な機能に依存する可能性がある。

(4)黑色素細胞の集団サイズは、黑色素細胞の持つ細胞の仮足の性質と黄色素細胞からの距離にも依存する可能性がある。

これらの知見を踏まえて、生物の形態形成におけるギャップジャンクションの機能解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究期間では、これまで進めてきた以下の3つのサブテーマをそれぞれ発展させる計画を進めた。

(1)ギャップ結合の生理学的機能と体表模様はどのように関わるか？

コネキシン遺伝子に導入した変異により様々な体表模様が作られる。ここから、模様の変化だけでなく、黑色素細胞集団の大きさも変化していることもわかる。現在のところ導入した変異の影響については不明であるため、これを明らかにする。また、ギャップ結合の下流因子についても明らかにする。

(2)黄色素細胞からのシグナルと黑色素細胞の集団サイズ

黑色素細胞の生存には黄色素細胞の存在が重要であり、黑色素細胞が単独では生存することができない。このため、何らかの方法で黄細胞からのシグナルが黒細胞まで届いているはずである。仮説としては(1)ギャップ結合による仲介、(2)細胞の仮足による直接的なシグナル(後述)、(3)両者の融合、が考えられる。本研究期間にこの問題を明らかにする。

(3)他の因子との関係

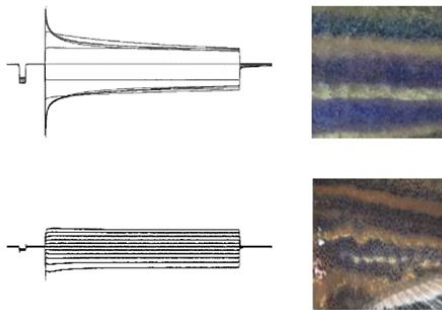
これまで単離してきた変異体原因遺伝子と、ギャップ結合・細胞集団サイズとの関係を、交配実験・遺伝子組み換え実験により調べ、明らかにする。

また、本研究を進めるにあたり、生物の形態(骨格)に注目した研究も行った。原因遺伝子として、ギャップジャンクション蛋白質の一つコネキシン 43 の関与が明らかになり、そのメカニズムについての解析も進めた。

## 4. 研究成果

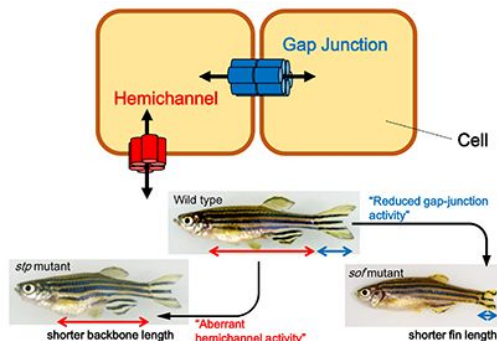
黑色素細胞の集団サイズを規定し、パターン形成に重要な因子として Connexin41.8 を単離していた (Watanabe et al 2006 EMBO Rep)。また、Cx41.8 が、反応拡散に基づくパターン形成のためのパラメータになりうること (Watanabe & Kondo 2012 PCMR) この作用にポリアミンが関与していること (Watanabe et al 2012 Sci Rep) が分かっていた。今回は、最近単離されてゼブラフィッシュのパターン形成に関与していることが明らかにされている魚類特異的コネキシン蛋白 Cx39.4 とともに

Cx41.8 およびその変異体の電気生理解析と遺伝子組み換え体の作製から機能比較解析等を行った。



その結果、ストライプを迷宮模様に変化させるコネクシン変異体は全く機能を持たず、ドミナントネガティブに作用していることが分かった。一方ストライプが割れるパターンを作る N 末変異コネクシンはゲーティング機能の低下がみられたが、現在のところこの作用については明らかにはなっていない。また、ゼブラフィッシュの色素細胞には Cx39.4 と Cx41.8 が発現し、他のコネクシンは発現していない (RT-PCR では検出できない) ことが明らかになった。Cx41.8 の N 末ドメイン変異体を使った遺伝子組み換え実験及び電気生理解析から、Cx41.8 と Cx39.4 が色素細胞内で協奏的に機能していることを示した。また、黄色素細胞-黒色素細胞の集団間で回路のような構造をとって配置の安定化に参与しているモデルを提唱した。

一方で、ゼブラフィッシュの骨格変異体の解析から、骨格 (プロポーション) を決める因子として Cx43 を単離した (Misu et al 2016)。ゼブラフィッシュ Cx43 はすでに鰭の短い変異体の原因遺伝子として単離されていたが、今回脊椎骨の短い変異体として単離した。電気生理解析を行ったところ、ギャップジャンクション機能は鰭変異体、脊椎骨変異体ともに低下していることが明らかになった。一方、コネクシン 6 量体により形成されるヘミチャネルは、ヒレ変異体では野生型と同じ機能を示したのに対し、脊椎骨変異体では異常な透過能の増大が見られた。このことより、ヘミチャネルの機



能の違いが脊椎骨の異常、ヒレの異常という 2 つの形態変化を生じさせていることを明らかにした。

## 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 9 件)

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* 21 February (査読あり)  
doi: 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*、2017 年 3 月号(査読なし)

Misu, A., Yamanaka, H., Aramaki, T., Kondo, S., Skerrett, I. M., Iovine, M. K. & Watanabe, M.\* (2016). Two Different Functions of Connexin43 Confer Two Different Bone Phenotypes in Zebrafish. *J Biol Chem* 291, 12601-11. (査読あり).  
doi: 10.1074/jbc.M116.720110

Watanabe, M.\*, Sawada, R., Aramaki, T., Skerrett, I. M. & 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* 291, 1053-63 (査読あり).  
doi: 10.1074/jbc.M115.673129.

Watanabe, M.\* & Kondo, S. (2016). Genetics of body shape: Connexin43 is the key to two zebrafish mutants with shorter backbones and fins. *Atlas of Science* Sep. 26, 2016 (査読なし).  
<http://atlasofscience.org/genetics-of-body-shape-connexin43-is-the-key-to-two-zebrafish-mutants-with-shorter-backbones-and-fins/>

Watanabe, M. & Kondo, S. (2015). Fish pigmentation. Comment on "Local reorganization of xanthophores fine-tunes and colors the striped pattern of zebrafish". *Science* 348, 297. (査読あり).  
doi: 10.1126/science.aaa2804.

Watanabe, M. & Kondo, S. (2015). Is pigment patterning in fish skin determined by the Turing mechanism?

Trends Genet 31, 88-96. (査読あり)  
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2014.11.005

Kondo, S. & Watanabe, M. (2015). Black, yellow, or silver: Which one leads skin pattern formation? *Pigment Cell Melanoma Res* 28, 2-4. (査読あり)  
DOI: 10.1111/pcmr.12328

渡邊正勝・近藤滋 (2014) 「細胞間相互作用とパターン形成」、*生体の科学* [増大特集]生命動態システム科学 Vol.65, No.5, 422-423 金原一郎記念医学医療振興財団 / 医学書院 (査読なし)

[学会発表](計6件)

Masakatsu Watanabe, 7<sup>th</sup> Asia Oceania Zebrafish Meeting, Do gap junctions contribute to the diversification of teleost? 2016年10月2日、Biopolis, Singapore

Masakatsu Watanabe, Gap junctions in skin pattern formation of zebrafish, BMB2015, 2015年12月2日、神戸ポートピアホテル・兵庫

渡邊正勝、ゼブラフィッシュの体表模様形成における虹色素胞の役割、日本動物学会、2015年9月18日、朱鷺メッセ、新潟

Masakatsu Watanabe & Shigeru Kondo, Zebrafish skin pattern variation depends on current value through gap junction 9th European Zebrafish Meeting, 2015年6月29日、オスロ、ノルウェー

Masakatsu Watanabe, Risa Sawada, Toshihiro Aramaki, I.M. Skerrett & Shigeru Kondo, Characterization of gap junctions working on skin pattern formation of zebrafish, 2015 IGJC, 2015年3月30日、サンチャゴ、チリ

Masakatsu Watanabe, I. M. Skerrett & Shigeru Kondo, Functional analysis of Cx41.8 mutants, 日本分子生物学会, 2014年12月26日、パシフィコ横浜、神奈川

## 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