

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650078

研究課題名(和文)ギャップ結合によるTuring波形成の普遍性の検討

研究課題名(英文) Investigation whether gap junction works widely for skin 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物の形態形成では多くの場面で反応拡散原理(Turing)に基づく現象がみられる。我々はこれまで、ゼブラフィッシュの縞模様を対象として、この模様が反応拡散原理に基づくものであることを示してきた。この中で、色素細胞間の相互作用が重要であること、この相互作用にはギャップジャンクションが重要な役割を担っていることが分かっている。今回、他の生物でもこのシステムが関与しているかどうかに関して、魚類ゲノムに存在するコネクシン遺伝子の解析を行った。その結果、ゼブラフィッシュの体表模様形成に関するギャップジャンクション蛋白は他の魚類でも高度に保存されており、Turing波形成に関与していることが示唆された。

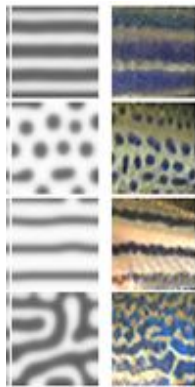
研究成果の概要(英文)：In the morphogenesis of organisms, we observe autonomous pattern formation based on the Reaction-Diffusion (R-D) model (Turing). We have reported that zebrafish skin pattern formation is based on the R-D model and aim to disclose the molecular mechanism in this pattern formation. We also have reported that gap junction is one of the most important factor for cell-cell interaction among pigment cells. In this study we analyzed gap junction genes of teleosts species including zebrafish. We found that connexin genes that are involved in skin pattern formation are highly conserved among teleosts and that they may function for Turing pattern formation.

研究分野：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 ギャップジャンクション

1. 研究開始当初の背景

我々は、ゼブラフィッシュの体表模様（縞模様）を指標に、Turing 波（反応拡散波）に基づくパターン形成の分子メカニズムの解明を目指した研究を行い、生物の形作りの基本原理として Turing 波が非常に重要な役割を担っていることを示してきた。この過程で、ギャップジャンクションを介した細胞間相互作用が反応拡散方程式のパラメータの役割を担っていることが分かってきた。実際、ギャップジャンクションの構成因子であるコネキシンの機能変換により、反応拡散方程式を用いたシミュレーションにより予想されるパターンの多くをゼブラフィッシュ体表上に作り出すことができている（右図）。



2. 研究の目的

上述のように、ゼブラフィッシュの体表模様形成が Turing 波によること、この中でギャップジャンクションが重要な役割を担っていることなどが明らかになってきた。詳細なメカニズムに関しては現在解析を進めている段階である。Turing パターンは多くの生物で見られる現象であり、我々が明らかにしてきたギャップジャンクションに基づくパターン形成が他の生物にも当てはまるかどうかについては興味深い問題である。本研究では、ゼブラフィッシュ以外の魚類のパターン形成においてもギャップジャンクションが関与しているのかどうか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ゲノム解析

データベース上に蓄積されたゲノム情報の解析を行い、魚類ゲノムに存在するコネキシ

ン遺伝子の解析を行う。遺伝子重複や機能変換の可能性について特に詳細に調べる。

(2) 遺伝子組み換え体の作製

ゼブラフィッシュの解析においては黒色素細胞の分化誘導遺伝子である *mitfa* のプロモーターを用いて、野生型コネキシン及びその変異体を黒色素細胞に発現させて体表模様形成への関与について検証を行った。本研究においてはグッピー、シクリッドなどの飼育を行い、受精卵に遺伝子導入を行い模様形成への関与について検証を行う。

(3) 細胞の観察

ゼブラフィッシュのパターン形成においては黒色素細胞、黄色素細胞のもつ細胞仮足が細胞間の相互作用に重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。本研究では主にグッピーを用いてこの可能性について検証を行う。

(4) 電気生理解析

ゼブラフィッシュのコネキシン 41.8 及びコネキシン 39.4 に関しては電気生理解析を進めており、*in vivo* で両コネキシンが協調的に機能していることが明らかになりつつある。この点について、他の魚類のコネキシン（ギャップジャンクション）の機能解析を行い、体表模様形成への関与を考察する。

4. 研究成果

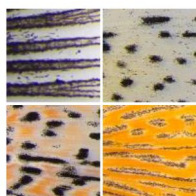
(1) 遺伝子重複

これまでの研究によりゼブラフィッシュの体表模様形成には2種類のコネキシン、コネキシン 41.8 とコネキシン 39.4 が関与していることが明らかになっている。コネキシン 41.8 は哺乳類コネキシン 40 のホモログであり、魚類においてはパラログ遺伝子であるコネキシン 45.6 が存在する。また、コネキシン 39.4 は魚類特異的なコネキシンであり、

哺乳類ゲノムには存在しない。ゲノム解析により、哺乳類のコネキシン 40 のホモログは多くの種で 2 遺伝子存在しているが、カダヤシ科の一部とメダカ科の一部では欠失がみられた。

(2) 遺伝子配列比較

近縁種間でコネキシン 41.8 及びコネキシン 39.4 のアミノ酸配列の比較を行った。体表模様の異なる



グッピー 4 種(系統)のゲ

ノムよりコネキシン 41.8 及びコネキシン 39.4 の配列をそれぞれ単離し比較したところ、優位な変異は検出されなかった。ゼブラフィッシュを用いたこれまでの研究により、コネキシンは黑色素細胞の細胞集団サイズの規定に関与していることが示唆されている。今後、近縁種を含めた多くの魚類種に関して解析を行う必要がある。また、次項に述べる原因により細胞ごとの発現解析に至らなかったため、より適切な条件検討を行ったうえで色素細胞における発現解析を行う予定である。

(3) 遺伝子発現解析

色素細胞で発現するコネキシンを網羅的に検出する目的で次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行った。酵素処理により単一化した色素細胞を、キャピラリーを用いてピックアップして、RNA 回収、cDNA 合成を行った後、塩基配列の決定を行った。ゼブラフィッシュ色素細胞においては野生型、模様変異体、遺伝子組み換え体など由来の色素細胞に対して解析を行うことに成功し、黑色素細胞、黄色素細胞それぞれで高発現する遺伝子リストの取得ができた。現在、各遺伝子に関して個別の解析を進めている。一方、グッピー由来の黑色素細胞から RNA 回収、cDNA 合成を行って遺伝子発現解析を試みたが、ゼブラフィッシュと同じ条件ではデー

タの取得には至らなかった。現在、解析の条件検討を再度行っている。

次世代シーケンサーの解析と並行して個別のコネキシン遺伝子の発現解析を行った。コネキシン 41.8 のパラログ遺伝子であるコネキシン 45.6 はゼブラフィッシュの色素細胞での発現は検出されなかった。約 10 種類存在するタイプのコネキシンに関して発現解析を行ったところ、コネキシン 41.8 とコネキシン 39.4 のみで発現が検出された。更に、コネキシン 41.8 とコネキシン 39.4 のダブルノックアウトにより体表模様がほぼ消失してしまうことから、色素細胞の生存・分化・パターン形成においてこれら 2 つのコネキシンが非常に重要な機能を担っていることが明らかになった

(4) 遺伝子組み換え体の作製・解析

当初の計画として、Turing 波を示しているグッピーに、ドミナントネガティブ型のコネキシン遺伝子を導入して体表模様変化を検出することにより、グッピーの Turing 波形成におけるギャップジャンクションの関与を示す計画であった。日本国内でラインが確立し、模様が安定している系統を選択して飼育し、受精とともに体内から受精卵を回収して遺伝子導入を行う計画であった。残念ながら本研究期間内に安定して受精卵をとるに至らず、本研究では結論は得られなかった。代替の実験として(3)に述べた遺伝子発現解析と(5)に示す電気生理解析を行った。

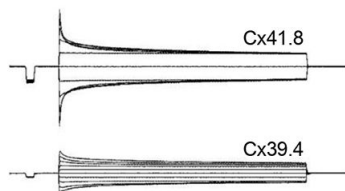
(5) 電気生理解析

本研究期間に、ゼブラフィッシュのコネキシン 41.8 とコネキシン 39.4 に関しての電気生理解析を行い、ゼブラフィッシュの体表模様形成において両者が協調的に機能し、パターンを作り上げていることを示した。また、コネキシン上のアミノ酸変異(N 末ドメインの付加・欠失、アミノ酸置換)、第一膜貫通領

域のアミノ酸置換がそれぞれ、ゲーティングの低下、清流性の欠失、ギャップ機能の低下とヘミチャンネル活性の増大、を引き起こすことを示した。これらの知見をもとに、ゼブラフィッシュと他の生物種とのコネキシン 41.8 及びコネキシン 39.4 のアミノ酸配列の比較を行った。ゼブラフィッシュの近縁種間の比較ではコネキシン 39.4 において、生物種間で保存性の高い膜貫通領域にアミノ酸置換を検出した。この置換をゼブラフィッシュの野生型コネキシンに導入して電気生理解析を行った。結果としては、ギャップジャンクション、ヘミチャンネルの機能変換を及ぼす変異は検出されなかった。

また、グッピー由来のコネキシン 41.8 とコネキシン

39.4 に関しても電気生理解析を行った(右図)。チャンネルの



開閉に関してはゼブラフィッシュのそれぞれのオロソログと同様の性質を示したが、コンダクタンスに関してはコネキシン 41.8 に関しては約 10 倍、コネキシン 39.4 に関しては約 10 分の 1 の値が得られた。今後この性質の違いと体表模様形成機構との関係を解析する予定である。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

渡邊正勝、ゼブラフィッシュ体表模様形成におけるギャップジャンクションの機能、日本生化学会・日本分子生物学会合同年会ワークショップ(神戸国際会議場・兵庫・2015年12月2日)

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、第11回色素細胞シンポジウム(朱鷺メッセ・新潟・第86回日本動物学会内・2015年9

月18日)

Watanabe & Kondo, Zebrafish skin pattern variation depends on current value through gap junction, European zebrafish meeting (Oslo, Norway, 2015年7月1日)

Watanabe, Skerrett & Kondo, Functional analysis of Cx41.8 mutants, 日本分子生物学会(パシフィコ横浜・神奈川、2014年11月26日)

[その他]

ホームページ等

<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: 26291049