

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：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840080

研究課題名(和文) 光遺伝学を用いた形態形成における電気シグナルの機能解析

研究課題名(英文) Bioelectrical signal controls skin pattern formation of zebrafish

研究代表者

荒巻 敏寛 (ARAMAKI, Toshihiro)

大阪大学・生命機能研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：30525340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光遺伝学技術をゼブラフィッシュ色素細胞に導入することを試みた。黒色素細胞にチャンネルロドプシンを発現させ、青色光照射により人為的に脱分極を誘導すると細胞の運動性が亢進することが観察された。さらに本技術を応用し、光条件を調節することによってゼブラフィッシュ体表の縞模様を任意に変化させることに成功した。また、この実験の結果生じたパターンから、ゼブラフィッシュ体表縞模様の形成過程において「反応拡散モデル」の原理が働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, optogenetics techniques were introduced into zebrafish pigment cells. When illuminated by blue light, Channelrhodopsin-2 expressing melanophores were artificially depolarized and showed enhanced cellular motility in vitro. Using this technique, we then artificially altered skin pattern in vivo by switching rearing light conditions. The resulting pattern indicated that a reaction-diffusion system is viable in zebrafish skin pattern formation process.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 電気シグナル 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

生体における電気シグナルの機能は神経細胞や筋細胞で深く研究が進んでいる。電気シグナルの実体は細胞膜電位の変化であるが、細胞内外における膜電位差はあらゆる細胞において存在する。近年、神経、筋以外の細胞においても膜電位の変化が起きていることが報告されているが、その機能的意義に関しては不明な点が多い。当研究室では、ゼブラフィッシュ変異体を用いた解析から、色素細胞（黒色素胞）における膜電位の変化が体表模様の形成に参与していることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

本研究ではゼブラフィッシュの体表模様形成過程をモデルに、多細胞生物の形態形成における電気シグナルの機能解明を目的とする。また、同様のメカニズムが他の形態形成イベントにおいても関与している可能性が推測されることから、特にゼブラフィッシュの胚発生に着目し、この時期の形態形成における電気シグナルの関与を探索する。

3. 研究の方法

形態形成中の組織においては、多数の細胞がそれぞれに増殖、変形、移動することにより細胞の位置関係が著しく変化する。微小電極を用いる電気生理学的手法では、このような状況で特定の細胞集団を長期にわたって刺激、観測することは困難である。そこで、生体内において特定の細胞集団の膜電位を人為的に制御するため、近年、神経科学分野で目覚ましい発展をとげている光遺伝学的手法を利用することを計画した。青色光に反応して膜電位を脱分極させるチャンネルロドプシンをトランスジェニック技術により標的細胞に発現させる。この細胞に外部から光照射することによって非侵襲的に、かつ任意のタイミングで膜電位の変化させることができる。本研究の標的である色素細胞は体表にあり、外部からの光照射が極めて容易である。

4. 研究成果

体表模様形成における電気シグナルの機能を調べるために、本研究ではまず、色素細胞に対して光遺伝学技術の導入を試みた。mitfa 遺伝子のプロモーターを用いて黒色素胞特異的にチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作成し、この魚に ChR2 を活性化させる青色光を照射する実験を行った。その結果、光照射依存的に模様の変化を誘導することができたものの、その変化の程度は小さいものであった。そこで、より大きな効果を得るために、活性の高い ChR2 変異体を利用することを考案した。ChR2 にはチャンネル特性が異なる様々な改変体が報告されているが、本研究では活性化時の開口時間が極めて長い

(閉口時定数 = 29 min) ChR2(C128S/D156A) 改変体を用いることにした。一定強度の光条件下では、各々のチャンネルの開口時間が長いほどより多くのイオン流動が生じるため、膜電位に及ぼす影響も大きくなると考えられる。実際に、黒色素胞に ChR2(C128S/D156A) を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュでは、野生型 ChR2 を発現するものでは見られなかった顕著な模様の変化が観察された。また、このトランスジェニックゼブラフィッシュは暗条件下で飼育した場合には模様の変化をほとんど示さないことから、この効果は光照射依存的であることが示された(図1)。

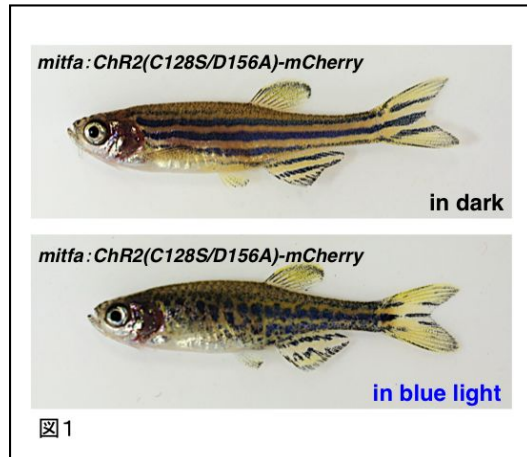


図1

次に、上記の ChR2(C128S/D156A) トランスジェニックフィッシュを用いて、模様形成時において人為的な膜電位の攪乱が及ぼす影響を詳細に観察した。このトランスジェニックフィッシュを青色光照射下で育成すると、野生型ゼブラフィッシュのような明確な縞模様は形成されず、不定形の黒色素胞の小斑が散在する状態になる(図1)。この模様の形成過程を経時的に観察すると、模様形成初期の段階(体長 12 mm)では野生型とほとんど差が見られないが、縞が形成されていく過程において、野生型では黒色素胞集団と黄色色素胞集団の間に明確な境界が存在しているのに対し、青色光照射下の ChR2(C128S/D156A) トランスジェニックフィッシュでは境界が不明瞭、かつ不安定であった(図2)。そのために直線的な縞模様が安定

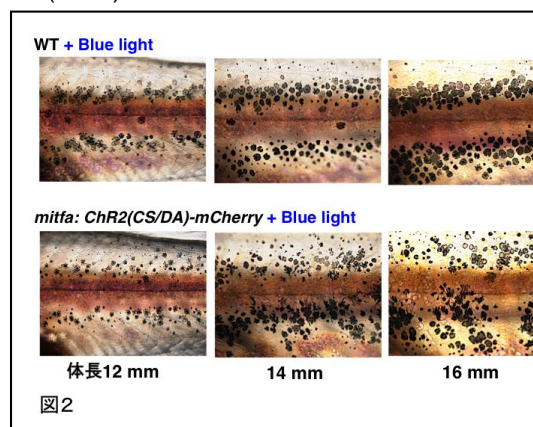


図2

して維持されず、黒色素胞の集団が分断されて小班状になったものと考えられる。

上記のように、本研究では光照射依存的にゼブラフィッシュ体表の縞模様を破壊することに成功した。この方法を利用することにより、模様の破壊と形成を *in vivo* にて任意に制御することが可能である。ChR2(C128S/D156A)トランスジェニックフィッシュの模様を光照射により破壊したのちに、暗条件下で飼育すると縞模様が再形成される。しかしながら、再形成された縞模様は野生型のような縦方向に直線的な縞模様ではなく、迷路状の縞模様であった(図3)。この結果から、ゼブラフィッシュの縦縞の方向性は模様形成最初期のパターン(初期条件)に依存しており、黒色素胞における電気シグナルは初期条件に倣った縞の方向性の維持に必要であると考えられる。また、この結果は「反応拡散モデル」を用いたシミュレーションにおいても再現することができる(図3)。このことから、ゼブラフィッシュの縞模様形成過程では同モデルの原理が働いていることが示唆される。

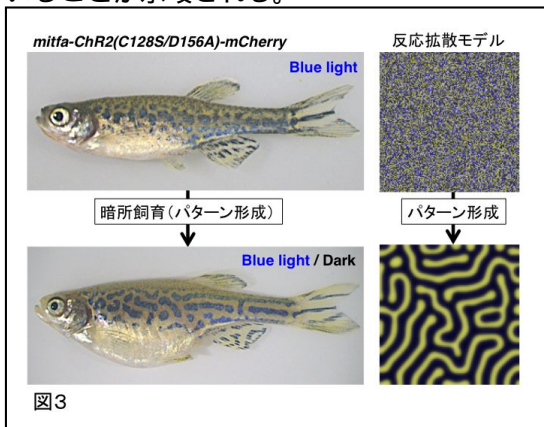


図3

黒色素胞における電気シグナルの機能をより詳細に解析するために、*in vitro* 培養系を用いて、人為的膜電位操作が細胞の挙動に及ぼす影響を観察した。トランスジェニックフィッシュから採取した黒色素胞を分散培養し、青色光照射により人為的に脱分極を誘導したところ、光照射時に黒色素胞の運動性が顕著に増大することが観察された。また、光照射後の黒色素胞ではアクチンフィラメ

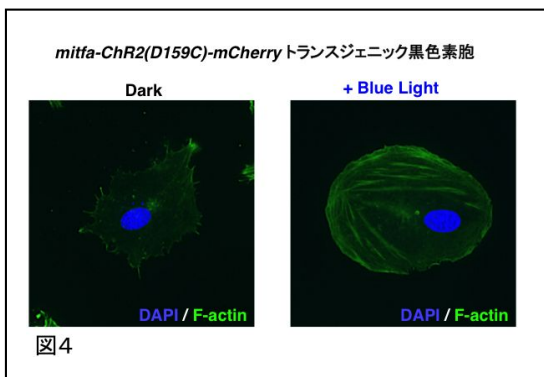


図4

ントの形成が著しく促進されており(図4)、細胞膜の脱分極によって直接的に細胞運動が制御されていることが示唆される。

発生期における電気シグナルの関与を探索するために、*in vitro* 合成したChR2(C128S/D156A) mRNAをマイクロインジェクション法により胚に導入した。導入胚、非導入胚をそれぞれ青色光照射下で発生させたところ、導入胚、非導入胚共に孵化前に死亡した。高強度の青色光は、胚発生において致命的な毒性があるようである。この毒性を回避するため、光制御可能なChR2の使用を断念し、恒常的に開口しているチャネルを用いる計画へと変更した。本研究で使用したカリウム漏洩チャネル *kcnk5b*(W169L)変異体は、野生型のものよりも大きなコンダクタンスを持ち、発現細胞の膜電位を過分極側へと傾ける。このチャネルを導入した胚では、著しい形態異常が観察された(図5)。この結果から胚発生期における形態形成においても、電気シグナルが重要な機能を果たしていることが示唆される。

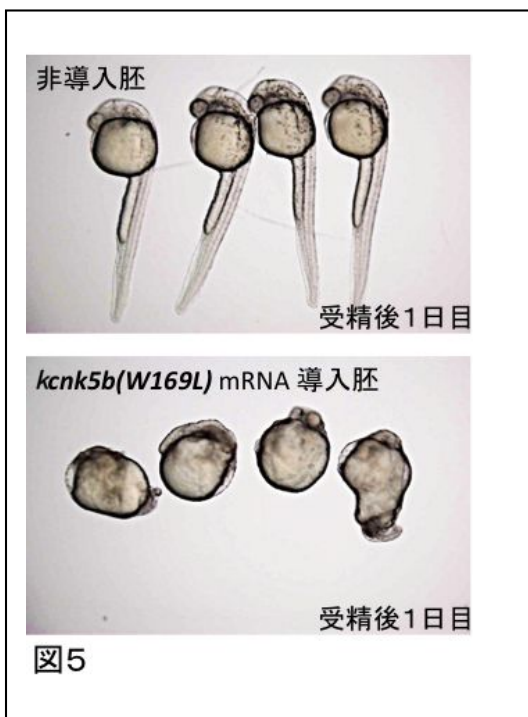


図5

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4件)

Toshihiro Aramaki, Bioelectrical signal controls zebrafish skin pattern formation, 第8回光操作研究会、2016年09月29日～2016年09月30日、慶應義塾大学 三田キャンパス(東京都港区)

Toshihiro Aramaki, Bioelectrical signal controls skin pattern formation of zebrafish, Society for Developmental Biology 74th Annual Meeting, 2015年07月09日～2015年07月13日、Snowbird (Utha, USA)

Toshihiro Aramaki, Bioelectrical signal controls pattern formation of zebrafish skin, 48th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2015年06月02日～2015年06月05日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

Toshihiro Aramaki, Bioelectrical signal controls pattern formation of zebrafish skin, 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2014年09月20日～2014年09月21日、慶應義塾大学 芝共立キャンパス(東京都港区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒巻 敏寛 (ARAMAKI, Toshihiro)

大阪大学・生命機能研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：30525340