

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06655

研究課題名(和文) 魚類ヒレの形態形成において膜電位はモルフォゲンとして機能しうるか？

研究課題名(英文) Can Membrane Potential Function as a Morphogen in Fish Fin Morphogenesis?

研究代表者

荒巻 敏寛 (Aramaki, Toshihiro)

大阪大学・大学院生命機能研究科・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経科学分野で利用されている光遺伝学ツール、チャンネルロドプシンをゼブラフィッシュ表皮細胞に導入することで膜電位的人為的操作を可能にし、それによりヒレの形態を任意に変化させることに成功した。本結果より、ヒレの伸長が表皮細胞の膜電位によって制御されていることが示された。また、表皮内在の膜電位動態を観測するためのライブイメージングシステムを構築し、GCaMPイメージングにより表皮細胞間で迅速なシグナル伝達機構が存在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで変異体の解析などから細胞膜電位が形態の制御にも関与していることが示唆されていたが、本研究でそれを実験的に証明し、表皮細胞の膜電位の増減によってヒレの伸長が制御されていることを示した。本研究で確立したチャンネルロドプシンを用いた実験系は他種の細胞でも容易に利用可能であり、今度は同様の実験系を用いて神経・筋以外の細胞における膜電位の機能解析が大いに進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we introduced an optogenetics tool, channelrhodopsin which used in neuroscience research field, into zebrafish epidermal cells. Artificial membrane potential manipulation successfully altered the fin morphology, demonstrating that zebrafish fin elongation (growth) is regulated by the membrane potential of epidermal cells. Additionally, we developed a live imaging system for adult zebrafish to observe the endogenous membrane potential dynamics of epidermal cells. Calcium imaging with GCaMP reporter revealed the existence of rapid signal transmission mechanisms between epidermal cells.

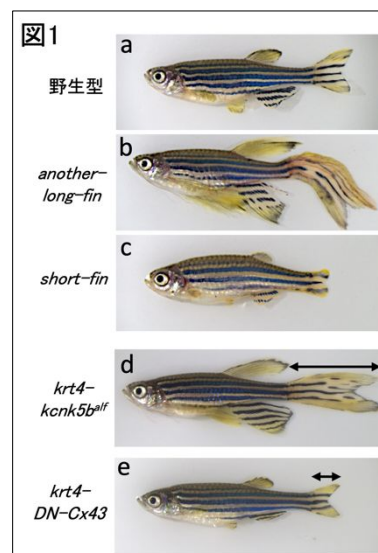
研究分野：発生生物学

キーワード：細胞膜電位 サイズスケーリング 光遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

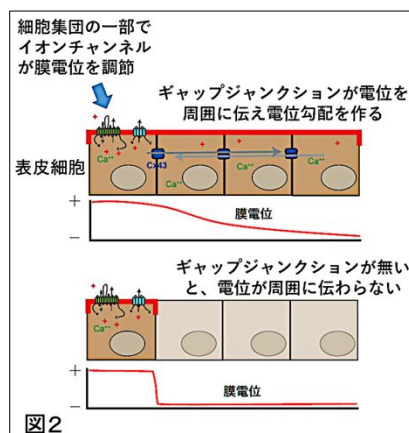
1. 研究開始当初の背景

我々は神経や筋肉以外の、いわゆる電氣的に「不活性」とされる細胞の膜電位に注目し、特に形態形成における機能について研究を行っている。膜電位の形成や動態の変化にはイオンチャンネルが重要な働きを担っているが、ゼブラフィッシュにおいて、イオンチャンネル遺伝子に生じた変異により形態に異常が生じる例がいくつか報告されている。その1つ *another-long-fin* 変異 (*alf*) は K^+ チャンネルの一種 *kcnk5b* に変異を持ち、全てのヒレが著しく伸長する(図1 a, b)。また一方で、ギャップジャンクションチャンネルの構成因子である *cx43* に変異を持つ *short-fin* 変異体 (*sof*) では、全ヒレの短縮が見られる(図1 c)。我々は以前の研究で、これら変異体の原因遺伝子を細胞種特異的プロモーター制御下で発現させることにより、変異体の形態を再現することに成功している。表皮特異的 *krt4* プロモーターを用いて各原因遺伝子を発現させたところ、ヒレの大きさがそれぞれの変異体同様に变化した(図1 d, e)。この結果から表皮細胞の膜電位がヒレの大きさの制御に関わっていることが推測されている。



2. 研究の目的

表皮細胞の電氣的活性によってヒレの形態が制御される作用メカニズムに関してはほとんどわかっていない。表皮組織において、膜電位の形成に関わる K^+ チャンネル (*kcnk5b*) や膜電位の伝達を担うギャップジャンクションチャンネル (*cx43*) の機能異常によってヒレの形態変化が起こる。このことから表皮組織内で膜電位が勾配を形成し、モルフォゲン様に位置情報として機能するのではないかと推測した(図2)。このモデルでは膜電位の変化 (= シグナル) は遠くまで瞬時に到達でき、またギャップジャンクションの量で伝達効率 (= 拡散効率) を制御できるため、成体のヒレのような比較的大きな器官において位置情報を形成するのに有利であると考えられる。この仮説を確かめるため、本研究では以下に示す3つの項目に関して検証を行う。



- (1) 膜電位は形態制御因子として機能するのか？
- (2) 膜電位は拡散するのか？
- (3) 膜電位はどのようにして細胞の振る舞いを変えるのか？

3. 研究の方法

- (1) 膜電位は形態制御因子として機能するのか？

膜電位がヒレの大きさの制御において決定的な役割を担っていることを機能的に証明する。膜電位の機能解析を行うために、神経科学分野で用いられている光遺伝学の技術に応用することを計画した。青色光依存的に開口する陽イオンチャンネル、チャンネルロドプシン (ChR) を表皮細胞に発現させることで光条件による膜電位の人為的操作を可能にする。この実験系を用いて *in vivo* で表皮細胞の膜電位操作を行い、それに伴いヒレの形態が変化することを検証する。

- (2) 膜電位は拡散するのか？

膜電位がモルフォゲンのように周囲の細胞に伝播し、位置情報を形成しうることを検証する。膜電位は生きた細胞にしか存在せず、また本研究目的の達成には複数の細胞を同時に計測する必要があるのでからライブイメージングによる観測を計画した。表皮細胞にカルシウムレポーター-GCaMP や、膜電位レポーター-ASAPなどを導入することにより *in vivo*、または *in vitro* 培養でのライブイメージングにより膜電位動態の検出を試みる。

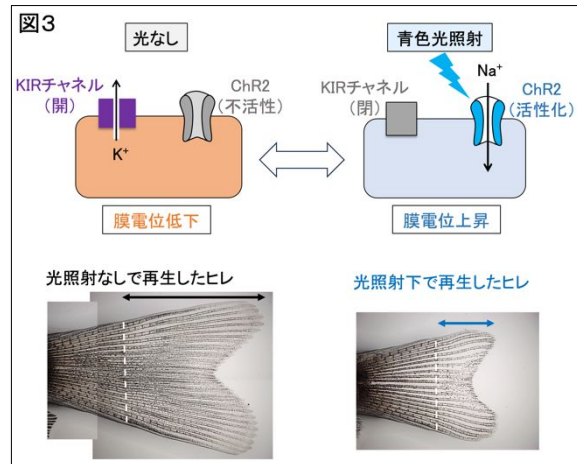
- (3) 膜電位はどのようにして細胞の振る舞いを変えるのか？

表皮細胞の膜電位が変動した際、ヒレを構成する様々な細胞の増殖・分化に影響を及ぼすことでヒレ全体の形態変化が生じると考えられるが、詳細は不明である。(1)で膜電位を操作する実験系が確立されたならば、これを用いて膜電位変動時の細胞応答の検出を試みる。トランスクリプトーム解析などによる比較解析の結果をもとに標的遺伝子を同定し、さらにはそこから細胞内シグナル伝達経路の推測・特定を目指す。

4. 研究成果

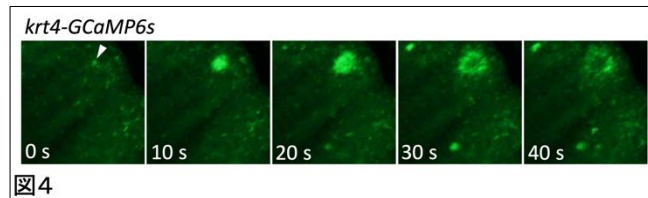
(1) 膜電位は形態制御因子として機能するのか？

To12 トランスジェニック技術を用い、表皮細胞にチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を発現するゼブラフィッシュを作成した。ChR2 は青色光照射に反応して開口し、発現細胞の膜電位を上昇させる。ChR2 トランスジェニックフィッシュを青色光照射下で飼育すると、照射しないものと比較して優位にヒレが縮小していた。表皮細胞における膜電位の上昇はヒレの伸長を抑制すると考えられる。この結果をもとに、さらに効率的に膜電位操作を行うため ChR2 と K⁺チャンネルを組み合わせることを考案した。膜電位を低下させる機能のある K⁺チャンネルを発現させておくことで、ChR2 活性化による膜電位上昇の影響をより大きくできる。また、K⁺チャンネルとして電位依存性を有する KIR2.1 を用いると、ChR2 活性化による膜電位上昇時には閉鎖し干渉を小さくできる。神経細胞で見られる脱分極応答を模したこの機構により光刺激への応答性を高めた。本手法を用いて、光操作によりヒレの大きさを劇的に変化させることに成功している(図3)。ヒレの大きさは光条件の違いによって顕著に差があり、表皮細胞の膜電位がヒレの伸長を制御していることを明確に示している。



(2) 膜電位は拡散するのか？

表皮細胞における膜電位動体を観測するにあたり、まずは検出することを最優先に考え、(研究開始時点では)最も感度の高い細胞内カルシウムレポーターGCaMP6s を表皮に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た。また、ゼブラフィッシュ成体を観察するための麻酔や保定条件について詳細に検討を行い、長時間の観察が可能なライブイメージングシステムを構築した。本システムを用いて再生中(伸長中)のヒレの表皮を GCaMP イメージングにより観察したところ、多数の散発的なシグナルが観察された。特に、大きなシグナルは波紋状に表皮細胞間を伝播して広がってゆく様子が観察されており、細胞間で迅速な伝達機構が存在することが確かめられた(図4)。今回観察された現象は膜電位そのものの伝達ではないが、形態制御との関連が強く示唆されるものである。



(3) 膜電位はどのようにして細胞の振る舞いを変えるのか？

膜電位を操作する実験系を確立させるまでに想定していた以上に時間がかかったため、研究期間内にスクリーニングの実施にまでは至らなかった。しかしながら、予備的実験として TOPFLASH レポーターを用いた解析から、少なくとも wnt/ -catenin シグナルの活性が膜電位操作時に大きく変動していることが観察されており、下流因子の有力な候補であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuroda Junpei, Itabashi Takeshi, Iwane Atsuko H., Aramaki Toshihiro, Kondo Shigeru	4. 巻 8
2. 論文標題 The Physical Role of Mesenchymal Cells Driven by the Actin Cytoskeleton Is Essential for the Orientation of Collagen Fibrils in Zebrafish Fins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.580520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ramli, Aramaki Toshihiro, Watanabe Masakatsu, Kondo Shigeru	4. 巻 14
2. 論文標題 Piezo1 mutant zebrafish as a model of idiopathic scoliosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2023.1321379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aramaki Toshihiro, Kondo Shigeru	4. 巻 -
2. 論文標題 Independent size regulation of bones and appendages in zebrafish	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.03.27.587111	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Toshihiro Aramaki
2. 発表標題 Bioelectrical size regulation of bones and appendages in zebrafish
3. 学会等名 55th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒巻 敏寛
2. 発表標題 魚類ヒレ骨の分節パターンを制御する生体電気シグナル
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshihiro Aramaki
2. 発表標題 Bioelectrical size regulation of bones and appendages in zebrafish
3. 学会等名 54th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshihiro Aramaki
2. 発表標題 Bioelectrical signal regulates the segmentation pattern of zebrafish fin bones
3. 学会等名 The 29th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toshihiro Aramaki
2. 発表標題 Bioelectrical signal regulates the segmentation pattern of zebrafish fin bones
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------