

令和元年6月7日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14736

研究課題名(和文)形態形成における膜電位の機能 - 電気が作る骨のかたち

研究課題名(英文)Function of membrane potential in morphogenesis-Bioelectricity makes bone shape

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：動物の形態形成について、初期胚での研究は進んでいるが、一方で成体のプロポーションがどのように決められているかに関する知見は現在でも極めて乏しい。脊椎動物の場合、一般的には成体の形態は骨の形態に依っていると考えられてきた。本研究で、我々は独自に改良したトランスジェニック技術を用いて、ゼブラフィッシュのヒレ大きさの制御と、ヒレを構成する骨の長さの制御にはイオンチャンネルを介した共通のメカニズムが使われているにもかかわらず、それぞれの制御は別々の細胞種によって完全に独立して行われていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電気シグナルの実態を担うイオンチャンネルは遺伝子の数が非常に多く、従来のように個々の遺伝子に注目した方法では生体内での機能を解析することは難しい。本研究では発現効率を大幅に向上させたトランスジェニック技術を開発し、これを用いて標的細胞で特異的にイオンチャンネルの機能を操作することに成功した。また、同技術を用いてチャンネルロドプシンを導入し、光照射依存的に骨の形態を変化させることにも成功している。この技術を応用することで形態形成における電気シグナルの時空間的な操作が可能になるだろう。

研究成果の概要(英文)：There have been numerous researches and findings for embryogenesis. On the other hand, how to decide the body proportions in adult animals has been little understood. It have been generally considered that the shape of the adult vertebrate depends on the form of their skeleton. In this study, we improved transgenic techniques in zebrafish and found that zebrafish fin size and the fin-ray bone length are regulated independently by different types of cells, despite using similar mechanisms mediated by ion channels.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 骨形成 生体電気シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

古くから、電気シグナルは神経や筋組織において重要な機能を果たしていることが知られていた。生体における電気シグナルの実体は細胞膜電位の変化であり、膜電位は細胞膜を隔てた不均一なイオン分布によって生じる。膜電位はあらゆる細胞に存在するにも関わらず、電気シグナルは神経細胞、筋細胞のような特殊化した細胞に固有の機能であると考えられてきた。

膜電位を維持し、また変化させる際にはイオンチャネルが重要な機能を果たしている。近年、ゼブラフィッシュにおいてカリウムチャネル (*kcnk5b*) に生じた変異がヒレ、およびヒレを構成する骨 (鱗条骨) の著しい伸長を引き起こすことが報告された (*another-long-fin* 変異体、図 1 B、Perathoner, PLOS Genetics, 2014)。この変異型カリウムチャネルは発現細胞の過分極を引き起こすと考えられており、膜電位によりヒレの形態が制御されている可能性が示唆される。

また、他にヒレの形態異常を示す変異体として *short-fin* 変異体 (図 1 C、Iovine, Developmental Biology, 2003) が報告されている。この原因は、ギャップジャンクション (GJ) チャネルを形成する膜タンパク質コネキシン (*connexin43*) の機能低下であることが報告されている。GJ チャネルは別々の細胞の細胞質間を孔で直接つなぎ、イオンなど小分子を細胞間で輸送している。例えば心臓では、個々の心筋細胞の膜電位状態が GJ チャネルにより同調することで、収縮が器官全体で同期する。これらのことから、ヒレの形態形成においても複数の細胞間での膜電位の時空間的な同調が重要なのではないかと考えた。

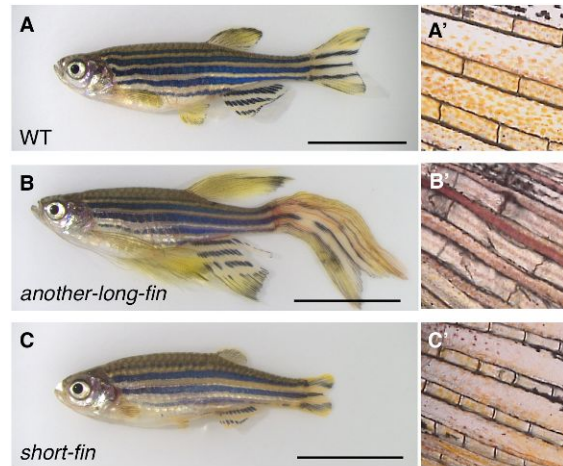


図 1

2. 研究の目的

本研究ではゼブラフィッシュヒレの形態をモデルに、電気シグナルの形態形成への関与、ならびにその機能メカニズムの解明を目的とする。細胞の膜電位を人為的に制御するために、神経科学分野で飛躍的に発展している光遺伝学 (オプトジェネティクス) の技法を導入することを計画した。光依存的に開口するイオンチャネルを標的細胞に発現させることで、光照射によって膜電位を人為的に制御することができる。我々はこれまでにゼブラフィッシュ色素細胞にこの技法を導入し、光照射によって体表模様を変化させることに成功している (Aramaki, Developmental Biology, 2019)。本研究ではヒレの形態を制御する細胞に導入し、人為的な膜電位操作により生じるヒレの形態変化や、細胞レベルでの応答を解析したい。

3. 研究の方法

本研究では、ゼブラフィッシュのヒレを構成する細胞に光遺伝学を導入する予定であるが、そのためにはまず、チャネルロドプシンを発現させる標的細胞を特定する必要がある。前述の通り *another-long-fin* 変異体の原因遺伝子はカリウムチャネル (*kcnk5b*) であるが、このチャネルがいずれの細胞において機能しているのか、本計画を立案した時点では全くわかっていなかった。そこで本研究ではまず、トランスジェニック技術を用いた機能的スクリーニングを行い、ヒレの形態を制御する細胞種の特定を試みる。

another-long-fin 変異体の原因となる変異は当該チャネルの機能亢進を引き起こし、その表現型は優勢であることが報告されている。このことを利用し、トランスジェニック技術を用いてヒレを構成する各細胞種に特異的に変異型チャネルを発現させ、*another-long-fin* 表現型の再現を試みる。表現型の再現に成功した場合、変異型チャネルを発現している細胞がヒレの形態制御を担う膜電位感受性の細胞であると考えられる。標的細胞が特定されたならば、次にその細胞にチャネルロドプシンを発現させる。標的細胞特異的に任意のタイミング、任意の強度での膜電位操作が可能になるだろう。この技術を用いて形態形成における電気的シグナルの機能の解明に迫りたい。

4. 研究成果

標的細胞をスクリーニングするため、ゼブラフィッシュにおいて機能することが報告されている様々な細胞種特異的プロモーターの制御下で変異型 *kcnk5b* チャネルを発現させた。その結果、ヒト *RUNX2* 遺伝子プロモーターを用いて骨芽細胞に *another-long-fin* 変異型カリウムチャネル (*kcnk5b^{al/f}*) を発現させた際に、*another-long-fin* 変異体に似た表現型を再現できることを見出した (*RUNX2:kcnk5b^{al/f}*、図 2 B)。このトランスジェニックフィッシュでは *another-long-fin* 変異体と同様に鱗条骨の伸長が観察されたが、意外なことにヒレ全体の長さ

は野生型とほとんど同じであった。このことは、鰭条骨の長さに関しては少なくとも *RUNX2* 陽性の骨芽細胞が制御しているが、ヒレ全体の長さに関しては別の細胞種によって制御されていることを示唆している。

次に、上記 *RUNX2* プロモーター制御下にチャンネルロドプシンを発現するトランスジェニックフィッシュを作成した。導入するチャンネルロドプシンには、通常のものよりも開口時間が長く、コンダクタンスの大きい D156C 変異体 (Dawydow, PNAS, 2014) を用いた。しかしながら、このトランスジェニックフィッシュ (*RUNX2:ChR2DC*) は青色光存在下で飼育しても明確な鰭条骨の形態変化を示さなかった。これは、鰭条骨の形態に影響を及ぼすためにはチャンネルロドプシンの発現量が不足していることが原因ではないかと考えられる。この問題を解決するため、導入遺伝子の発現量を高めるためにトランスジェニックコンストラクトの改良を検討した。

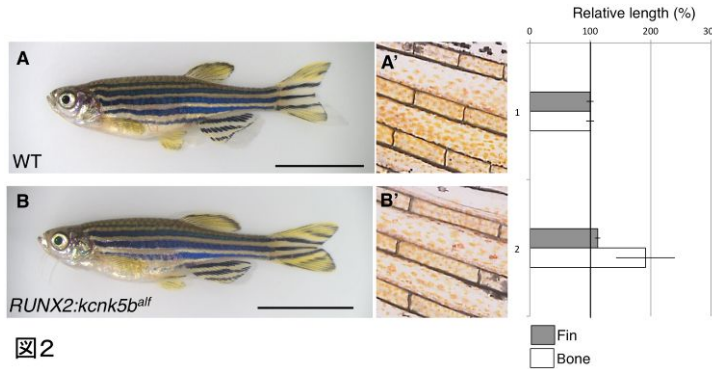


図2

本研究で使用した *RUNX2* プロモーターは、ヒト由来の *RUNX2* 遺伝子エンハンサーに人工のミニマルプロモーターを組み合わせたものである (図3)。このエンハンサー部分を複数個タンデムに連結させることで、骨芽細胞での特異性を維持しつつ発現量を高めることができるのではないかと考えた。*RUNX2* エンハンサーを5つタンデムに連結させたコンストラクトでは、エンハンサーが1つのものと比較して発現量が飛躍的に向上しており、また鰭条骨や鱗など骨組織における特異性も維持している。しかしながら、この強化型プロモーターを組み込んだトランスジェニックフィッシュ (*5xRUNX2:ChR2DC*) は、青色光非存在下では正常に生育できるが、青色光の存在下では、通常の飼育環境 (室内蛍光灯による照明) であっても死亡してしまうという問題が生じた。この原因は、*RUNX2* エンハンサーの数を増やしたことで骨組織以外、おそらくは筋組織でのチャンネルロドプシンの漏洩的な発現も高まってしまったためだと推測している。この問題を解決するためには、*RUNX2* プロモーターよりもさらに骨組織特異性の高いプロモーターを用いる必要があると考えた。

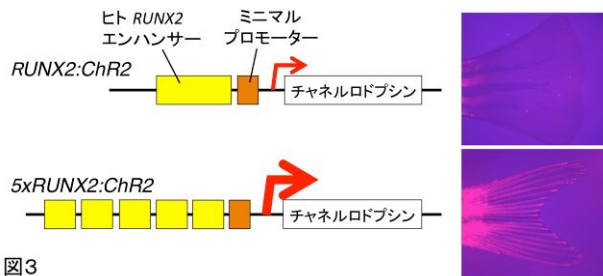


図3

RUNX2 プロモーターよりもさらに骨組織特異性の高いプロモーターの候補として、メダカ由来の *osterix/sp7* プロモーターを検討した。このプロモーター制御下に *another-long-fin* 変異型 *kcnk5b* (*kcnk5b^{alt}*) を発現させたトランスジェニックフィッシュ (*osterix:kcnk5b^{alt}*) では、*RUNX2* プロモーターの場合と同様に鰭条骨の伸長が観察された。すなわち、*osterix* を発現する骨芽細胞も鰭条骨の形態を制御するということである。次に、魚類間での保存性をもとにエンハンサー領域を特定し、*RUNX2* プロモーターの場合と同様にして強化型 *osterix* プロモーターコンストラクトを作成した (*5xosterix:ChR2DC*)。このトランスジェニックフィッシュは、青色光照射下で飼育しても問題なく生育できる。この魚を青色光照射下で飼育すると、鰭条骨が野生型に比べて著しく短縮することが観察された (図4B)。一方で、青色光非存在下で飼育した場合には骨の短縮は起こらない (図4C)。このことは、鰭条骨の短縮がチャンネルロドプシンの活性化依存的に起こっていることを示している。また、この表現型を検証するために、強化型 *osterix* プロモーター下で非選択的陽イオンチャンネル *Girk2^{uv}* を発現させたところ、チャンネルロドプシン活性化時と同様に鰭条骨の短縮が観察された (*5xosterix:Girk2^{uv}*, 図4D)。すなわち、活性化したチャンネルロドプシンが陽イオンチャンネルとして機能することで骨芽細胞の脱分極を引き起こし、その結果鰭条骨が短縮したものと推測される。逆に、*another-long-fin* 変異型 *kcnk5b* は過分極を誘導し、その結果鰭条骨の伸長を引き起こすと考えられている。これらの結果から、骨芽細胞の膜電位状態が鰭条骨の長さの制御に直接的に関与していることが強く示唆される。

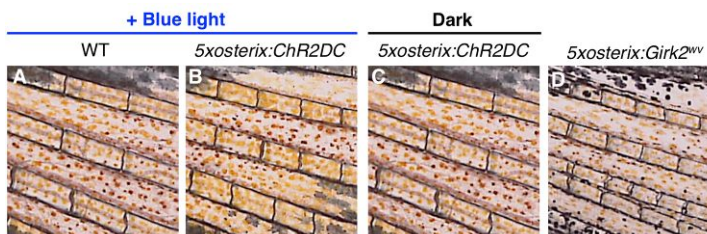


図4

近年のゲノム編集技術の進歩により、遺伝子ノックアウトは非常に容易なものとなった。し

かしながら、イオンチャンネルをコードする遺伝子は非常に数が多く、また多種のイオンチャンネルが協働して膜電位の形成に関わるため、一つのチャンネルの変異が膜電位の大きな異常として顕れにくいことが推測される。逆に、個体の生命維持に必要な神経系や心臓などに重篤な表現型が現れた場合には致死となり、この場合も形態の解析は難しいだろう。同様に、薬理的アプローチでは全身の細胞に作用してしまうため、神経系や心臓に影響を及ぼす可能性が高い。これに対して、今回我々が開発した強化型プロモーターを組み込んだトランスジェニック技術を用いることで、上記の問題を回避しつつ効果的にイオンチャンネルの機能解析を行うことができる。前述の通り *short-fin* 変異体の原因はギャップジャンクションチャンネル connexin43 の機能低下である。しかしながら connexin43 の完全な機能喪失(ノックアウト)は致死となり、このような場合には骨形成における機能だけに注目して解析することは難しい。そこで、本研究で用いた強化型 *RUNX2* プロモーターの制御下でドミナントネガティブ型 connexin43 を発現させることにより、骨組織特異的な機能阻害を試みた。このトランスジェニックフィッシュ (*5xRUNX2:DN-cx43*) では *short-fin* 変異体と同様に鰭条骨が著しく短縮していたが、ヒレ全体の長さに関しては野生型と変わらなかった(図5B)。この結果は、*another-long-fin* 表現型の

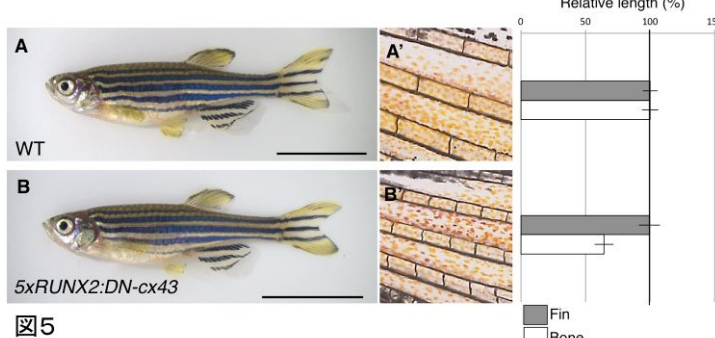


図5

場合と同じく、鰭条骨の長さは骨芽細胞が制御しているが、ヒレ全体の長さに関しては別の細胞種が制御していることを示唆している。また、本手法における別の利点として、ドミナントネガティブ型チャンネルを発現させた場合、似た構造を持つファミリー分子も同時に抑制することができるという点が挙げられる。上述の通りイオンチャンネル遺伝子は非常に数が多いが、似た構造、機能を持つファミリー分子をまとめて阻害することで、個々の遺伝子ではなくタンパク質分子としての機能に注目した解析ができるだろう。

これまでの解析では、骨芽細胞でイオンチャンネル機能を操作した場合には鰭条骨の長さが変化したが、ヒレ全体の大きさは変化しなかった。このことから、ヒレの大きさは鰭条骨の長さによって決まっているわけではなく、同じイオンチャンネル分子を使っている、ヒレの大きさ自体を制御する機構が別に存在することが推測される。ヒレの大きさの制御を担う細胞種を特定するために、さらなるスクリーニングを実施した。その結果、表皮細胞(ケラチノサイト)に特異的に発現する *keratin4* 遺伝子のプロモーターを用いることで、*another-long-fin*、*short-fin* 各変異体の表現型を再現できることを発見した(図6)。

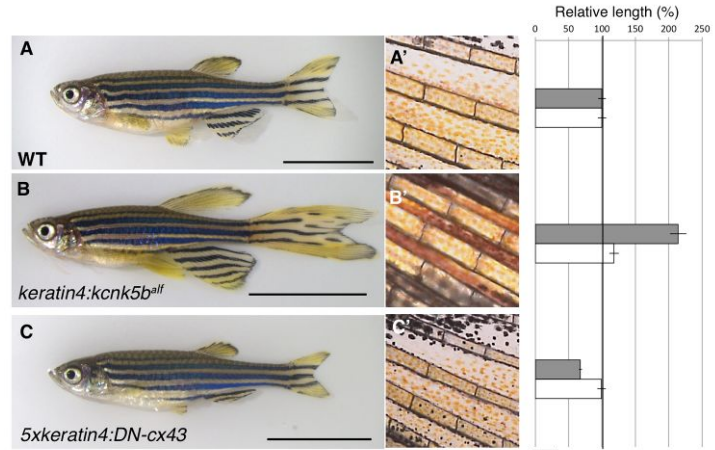


図6

鰭条骨の長さの制御とヒレ全体の大きさの制御が完全に独立していることを証明するために、それぞれが逆の表現型を示す2重トランスジェニックフィッシュの作成を試みた。ヒレ全体の伸長を引き起こす *keratin4:kcnk5b^{Δf}* トランスジェンと、鰭条骨の短縮を引き起こす *5xRUNX2:DN-cx43* トランスジェンの両方を有する個体では、*another-long-fin* 様の大きなヒ

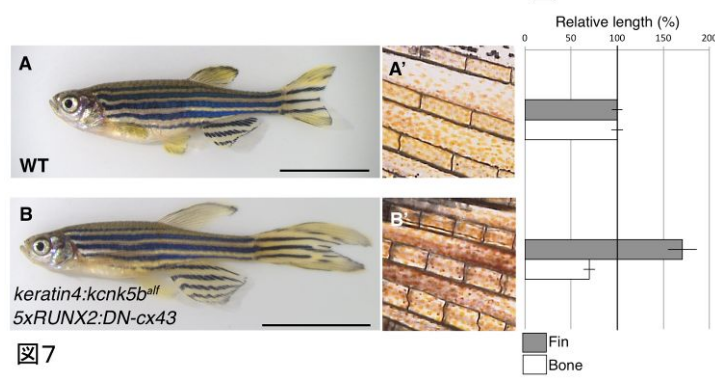


図7

レと *short-fin* 様の短い鰭条骨が同時に観察された (図 7B)。この結果より、ゼブラフィッシュの鰭条骨の長さとしれ全体の大きさは、同じチャンネル分子を使用した、おそらくは同様の機構により制御されているが、それぞれの制御は異なる細胞種において独立に行われていることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

Toshihiro Aramaki, Bioelectrical signal regulates organ size, 52th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2019 年 5 月 14 日~2019 年 5 月 17 日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。