

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03683

研究課題名(和文)細胞集団形成と集団間相互作用による形づくり

研究課題名(英文)Pattern formation through cell cluster formation and interaction

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：生物の発生そして器官形成において、細胞が集団を形成し、その集団がある決められた大きさや形をもち、また、異なる細胞集団との間に境界を形成する。この時、同種細胞間及び異種細胞間で行われる細胞間相互作用が重要役割を果たす。本研究では、ゼブラフィッシュの体表模様注目し、黒色素細胞と黄色素細胞、それぞれが集団を形成し、一定の集団サイズを持ち、黒色素細胞-黄色素細胞間の境界(繰り返し構造、パターン)の形成メカニズムの解明を目指した。細胞間相互作用に関わる重要分子としてギャップ結合蛋白であるコネキシンに注目し、色素細胞における機能解析を行った

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の形態形成において、等間隔性や繰り返し構造といったある種のパターンが存在する。多くの場合、構成する細胞間の相互作用により細胞自律的にパターン形成が行われる。本研究では、ゼブラフィッシュの体表模様をターゲットに、細胞自律的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った。体表模様を形成する2種類の色素細胞、黒色素細胞と黄色素細胞の間には、細胞間をつなぐ2種類のチャネル分子が発現し、パターン音形成、安定化に寄与している。今回の研究により、黒色素細胞と黄色素細胞の間にはチャネル分子の機能に依存した、電気回路のようなシグナルの伝搬様式があることが分かってきた。

研究成果の概要(英文)：During development and organogenesis, cells form populations with defined size and shape and form the boundaries between different cell populations. In this process, cell-cell interactions between cells of the same and different types play an important role. In this study, I focused on the body surface pattern of zebrafish and clarified the formation mechanism of the boundary between black and yellow pigment cells, each of which forms a population and has a certain size, and the boundary between black and yellow pigment cells (repeated structure and pattern). We focused on connexins, gap junction proteins, as important molecules involved in cell-cell interactions and analyzed their functions in pigment cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：パターン形成 細胞間相互作用 ゼブラフィッシュ ギャップ結合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、生物の発生におけるパターン形成について、ゼブラフィッシュの体表模様を研究対象とし、その分子メカニズムの解明を目指した研究を進めている。本研究課題開始時点で、細胞レベル、分子レベル、数理理論それぞれで以下のことが明らかにされていた。細胞レベルでは、体表模様を構成する二種類の色素細胞、黒色素胞と黄色素胞の間には近距離の抑制相互作用と遠距離の活性化作用が存在する。特に活性化作用については黄色素胞から黒色素胞へのシグナルであり、このシグナルの欠失により黒色素胞の生存率に低下がみられる。一方分子レベルでは、それまでの色素細胞の発生・分化に関わる遺伝子群とは異なり、パターン形成因子として以下の膜蛋白質の単離、解析を行ってきた。(a) ギャップ結合蛋白の構成成分である Connexin41.8、Connexin39.4、(b) 黒色素胞の活性化因子である Notch-Delta シグナル、(c) 黒色素胞 - 黄色素胞間の細胞集団間の境界形成に関わる因子としての Kir7.1、Tespan3c、(d) 黒色素胞間の細胞間接着、安定化に関わる因子としての IgSF11。この中で、特にギャップ結合蛋白については、遺伝子操作を行うことにより、数理理論である反応拡散方程式で予測されるパターンを *in vivo* で再現できることから最重要因子として注目される。

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に関わる細胞間の相互作用とそこに関わる分子の単離を行ってきたが、そのメカニズムについては不明な点が多く残されている。特にギャップ結合に関しては、2種類のコネキシンが2種類の細胞でどのように機能しているのかについて全く明らかになっていない。本研究ではこれらを含めて細胞間相互作用の分子メカニズム解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組み換え体の作製

魚類の色素細胞は免疫染色には向かず、mRNA の検出と遺伝子組み換え体による機能評価 (体表模様変化音解析) の組み合わせによりタンパク質の発現及び機能解析を行った。色素細胞における遺伝子機能解析には、黒色素細胞の分化誘導遺伝子である *mitfa* のプロモーター、及び黄色素の代謝関連因子である *aox5* 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及び黄色素細胞に発現させ、体表模様形成への関与について検証を行った。

(2) 電気生理解析

ゼブラフィッシュの Connexin41.8、Connexin39.4 および変異体についてアフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理解析を行い、変異導入の影響の解析を行った。また、Connexin39.4 に関しては N2A 細胞を用いたパッチクランプ法により、パターン形成への関与が示唆されているポリアミンの一種、スベルミジンとの関連を解析した。

4. 研究成果

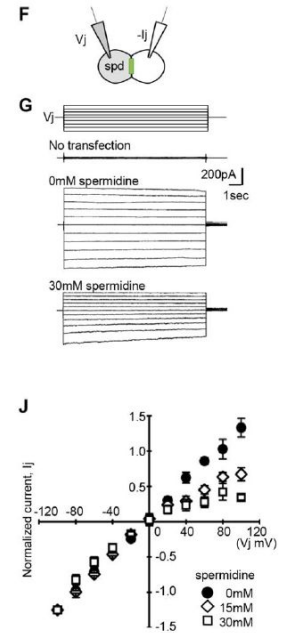
(1) 最小回路の特定

二種類の色素細胞に、性質の異なる2種類のコネキシン (Cx41.8 および Cx39.4) が発現し、ゼブラフィッシュの体表模様の形成・安定化に寄与している。両者の二重変異体 (ダブルノックアウト) ラインを作成したところ、この個体は体表に模様を持たないパターンレスの表現型を示した。このラインに *mitfa* あるいは *aox5* のプロモーターを用いて様々な組み合わせで Cx41.8 あるいは Cx39.4 を発現させたところ、

るいはCx39.4を発現する遺伝子組み換えシステムの作製を行った。二重変異体に対し mitfa-Cx39.4 を導入した場合 Cx41.8 変異体の表現を示したことから、Cx39.4 のタンパク質レベルでの発現は黒色素細胞での発現が必須であり、黄色素細胞での発現は不要であることが明らかになった。一方、Cx41.8 は黄色素細胞あるいは黒色素細胞の単独発現ではCx39.4 変異体の表現を再現できず、黒・黄両方で発現することにより再現可能であることが分かった。このことから、Cx41.8 の発現は黒・黄の両細胞で必須であることが示唆された。しかしながら Cx39.4 が黒色素細胞で発現している条件下においては Cx41.8 の発現は黄色素細胞のみで十分であり、黒色素細胞では発現は不要であった。これらの情報をまとめると、黄色素細胞で Cx41.8、黒色素細胞で Cx39.4 が同時に発現していることがストライプ形成に必要な条件であることが明らかとなった。

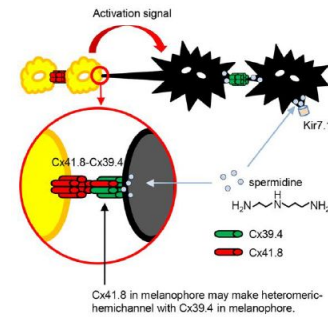
(2) スペルミジン感受性

Cx41.8 のN末ドメインにポリアミン感受性モチーフが存在することが予想されていたが、このモチーフは Cx39.4 にも存在している。また、黒色素細胞においてポリアミン代謝酵素の過剰発現及びポリアミンの一種スペルミジンの合成酵素の欠損は体表模様形成に影響を及ぼす。黒色素細胞のスペルミジンのターゲットとして境界形成に關する Kir7.1 が予想されていたが、スペルミジン関連の変異体は Cx41.8/Kir7.1 二重変異体の表現型に似た体表模様を示した。これらのことから、黒色素細胞に発現するコネキシンもスペルミジンのターゲットとなりうるということが考えられた。本研究においてはパッチクランプ法により Cx39.4 のポリアミン感受性に関する解析を行い、Cx39.4-ギャップ結合がスペルミジン濃度依存的に整流性を示すことを明らかにした。



(3) ギャップ結合回路

上記の結果から、ゼブラフィッシュの体表模様を構成する黄色素細胞と黒色素細胞の間には、Cx41.8(黄) - Cx41.8(黄) - Cx39.4(黒) - Cx39.4(黒)という回路が形成されていることが明らかになった。また、Cx41.8(黄) - Cx39.4(黒)により形成されるギャップ結合にはスペルミジンに依存した方向性が存在し、黄色素細胞から黒色素細胞への活性化シグナル(正のシグナル)の伝達に關与していることが明らかになった。」

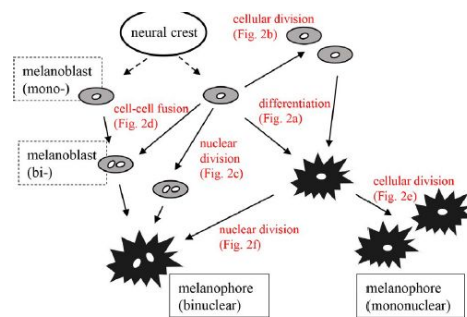


(4) Cx41.8、Cx39.4 の in vivo での可視化とドメイン解析

上述のように色素細胞に対して免疫染色が機能しないため、GFPシグナルによる検出を試みた。しかし、これまでの研究においては GFP 融合コネキシン蛋白が生体内で機能しないことから、GFP 融合条件の検討を行った。機能的保証はゼブラフィッシュ変異体の表現型相補により検証し、哺乳類培養細胞を用いてその普遍性の確認をおこなった。その結果、Cx39.4 に関しては C 末の 4 アミノ酸の付加により機能的 GFP 融合 Cx39.4 を作成した。この蛋白は哺乳類培養細胞でも機能し、(3)に記したパッチクランプ解析が可能となった。一方、Cx41.8 に関しては、Cx39.4 共存化においては C 末ドメインが不要であるが、単独では必要となることが明らかとなった。

(5) 色素細胞多核化

ゼブラフィッシュの黒色素細胞は約 50% が多核化しており、ごくまれに 3 核の細胞も見られる。これは紫外線から皮膚を守るため、細胞自体が大きくなる必要性から起きたものと考えられるが、そのメカニズム、形成過程は不明であった。上述の色素細胞に関する研究で行った in vitro での動態観察の過程で、黒色素細胞が多核化する過程が少なくとも 3 つ存在することを発見した(図)。黒色素細胞前駆細胞同士の融合、黒色素細胞前駆細胞内での細胞分裂を伴わない核分裂、黒色素細胞における核分裂である。この多核化は黄色素細胞でも観察されている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kondo Shigeru, Watanabe Masakatsu, Miyazawa Seita	4. 巻 379
2. 論文標題 Studies of Turing pattern formation in zebrafish skin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences	6. 最初と最後の頁 20200274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsta.2020.0274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuzuya Maki, Hirano Hidemi, Hayashida Kenichi, Watanabe Masakatsu, Kobayashi Kazumi, Terada Tohru, Mahmood Md. Iqbal, Tama Florence, Tani Kazutoshi, Fujiyoshi Yoshinori, Oshima Atsunori	4. 巻 15
2. 論文標題 Structures of human pannexin-1 in nanodiscs reveal gating mediated by dynamic movement of the N terminus and phospholipids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eabg6941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.abg6941	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 Kon Tetsuo, Omori Yoshihiro, Fukuta Kentaro, Wada Hironori, Watanabe Masakatsu, Chen Zelin, Iwasaki Miki, Mishina Tappei, Matsuzaki Shin-ichiro S., Yoshihara Daiki, Arakawa Jumpei, Kawakami Koichi, Toyoda Atsushi, Burgess Shawn M., Noguchi Hideki, Furukawa Takahisa	4. 巻 30
2. 論文標題 The Genetic Basis of Morphological Diversity in Domesticated Goldfish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2260 ~ 2274.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.04.034	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 該当する
1. 著者名 Hoshino Soichiro, Kanemura Ryohei, Kurita Daisuke, Soutome Yukihiro, Himeno Hyouta, Takaine Masak, Watanabe Masakatsu, Nameki Nobukazu	4. 巻 4
2. 論文標題 A stalled-ribosome rescue factor Pth3 is required for mitochondrial translation against antibiotics in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01835-6	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 Usui Yuu, Watanabe Masakatsu	4. 巻 1
2. 論文標題 Role of the Connexin C-terminus in skin pattern formation of Zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BBA Advances	6. 最初と最後の頁 100006 ~ 100006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadv.2021.100006	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 Usui, Y., Aramaki, T., Kondo, S., and Watanabe, M.	4. 巻 146
2. 論文標題 The minimal gap-junction network among melanophores and xanthophores required for stripe pattern formation in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev181065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.181065	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 Burendei, B., Shinozaki, R., Watanabe, M., Terada, T., Tani, K., Fujiyoshi, Y., and Oshima, A	4. 巻 6
2. 論文標題 Cryo-EM structures of undocked innexin-6 hemichannels in phospholipids.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaax3157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax3157	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 Usui, Y., Kondo, S., and Watanabe, M.	4. 巻 60
2. 論文標題 Melanophore multinucleation pathways in zebrafish.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ	6. 最初と最後の頁 454-459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12564.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Denis, J. F., Diabougoua, M. R., Molica, F., Hautefort, A., Linnerz, T., Watanabe, M., Lemeille, S., Bertrand, J. Y., and Kwak, B. R	4. 巻 10
2. 論文標題 KLF4-Induced Connexin40 Expression Contributes to Arterial Endothelial Quiescence.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Physiol	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2019.00080	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 該当する

1. 著者名 Chanson, M., Watanabe, M., O'Shaughnessy, E. M., Zoso, A., and Martin, P. E	4. 巻 19(5)
2. 論文標題 Connexin Communication Compartments and Wound Repair in Epithelial Tissue	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 1354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19051354.	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 該当する

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 渡邊正勝
2. 発表標題 ゼブラフィッシュのストライプの中に存在するギャップジャンクションネットワーク
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masakatsu Watanabe
2. 発表標題 Gap junction network for stripe pattern formation of zebrafish
3. 学会等名 2019 International Gap junction Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuu Usui, Shigeru Kondo, and Masakatsu Watanabe
2. 発表標題 Melanophore multinucleation pathways in zebrafish
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白居優、近藤滋、渡邊正勝
2. 発表標題 黒色素細胞の多核化について
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Seita Miyazawa, Masakatsu Watanabe & Shigeru Kondo	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 472
3. 書名 Theoretical Studies of Pigment Pattern Formation/Pigments, Pigment Cells and Pigment Patterns	

〔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
---------	---------