

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15803

研究課題名(和文) スペルミジンによる体表模様形成機構の解明

研究課題名(英文) The study for mechanism of zebrafish skin pattern formation by spermidine

研究代表者

臼居 優 (Usui, Yuu)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：10868615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はギャップ結合タンパク質Cx39.4のイメージングと、Cx39.4とポリアミン化合物スペルミジンの結合親和性解析から、ゼブラフィッシュの体表模様形成に関与する分子メカニズムの解明を目指した。Cx39.4のイメージングでは、Cx39.4のC末端領域に蛍光タグを挿入した融合遺伝子を細胞に発現させることにより、蛍光顕微鏡下でCx39.4のギャップ結合を可視化することができた。一方、等温滴定型カロリメトリーを用いた結合親和性の解析については、実験条件を最適化し、改めて実験を行う必要がある。以上により、当初予定していたプロジェクトの半分は達成したと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物は細胞分裂と細胞分化により多様な細胞を生成しながら「同種細胞の集団サイズ」と「異種細胞集団間の境界」を決定し、特定の「形と大きさ」へ収束していく。本研究ではゼブラフィッシュの縞模様形成の仕組みの解明に取り組み、「形と大きさの制御にはどのような分子が関与し、どのようなメカニズムで決められているか？」という疑問の解決に努めた。これにより、形態形成の原理に一步迫ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this project, I aimed to elucidate the molecular mechanism of zebrafish skin pattern formation by imaging the gap junction protein Cx39.4 and investigating the binding affinity value between Cx39.4 and spermidine. I succeeded in Cx39.4 visualizations by inserting a fluorescent protein tag into the C-terminal domain of Cx39.4. Although I tried to measure the binding affinity value between Cx39.4 and spermidine using isothermal titration calorimetry, I had to optimize the experimental conditions.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 形態形成 スペルミジン 色素細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュの黒と黄色の縞模様は、黒色素細胞と黄色素細胞の相互作用により形成される¹⁻³。ギャップ結合タンパク質コネキシン 39.4 (Cx39.4) の欠損やポリアミン化合物のスペルミジンの細胞内濃度の低下により、黒色素細胞が減少し、体表模様に変化する⁴⁻⁷。また、Cx39.4 を含むギャップ結合では、スペルミジンの濃度依存的にチャンネル通過する電流が抑制される⁸。

(1) Cx39.4 のイメージング

Cx39.4 が黒色素細胞に発現していることは明らかになっていたが、ギャップ結合を形成しているのかは不明であった。

(2) Cx39.4 とスペルミジンの結合

スペルミジンは正のチャージをもつ低分子の生理活性物質であり、負にチャージしたグルタミン酸と結合する。Cx39.4 はチャンネルの開閉を調節する N 末端領域に 4 つのグルタミン酸残基を有しているが、何番目のグルタミン酸残基がスペルミジンとの相互作用に重要なのか不明であった。

2. 研究の目的

Cx39.4 とスペルミジンの解析を通じて、ゼブラフィッシュの体表模様形成における分子メカニズムの一端を解明する。

(1) Cx39.4 のイメージング

- ① ギャップ結合のチャンネル活性やアセンブリー、局在の制御を阻害しない領域に EGFP タグを挿入したコンストラクト (Cx39.4-EGFP) を作製する。
- ② クローニングした融合遺伝子 Cx39.4-EGFP がギャップ結合を形成するのか、培養細胞を用いて確認する。
- ③ Cx39.4-EGFP を色素細胞で発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュの作製と観察を行う。

(2) Cx39.4 とスペルミジンの結合

- ① スペルミジンが Cx39.4 と結合する領域を同定する。
- ② スペルミジンと Cx39.4 N 末端領域との結合親和性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Cx39.4 のイメージング

- ① Cx39.4-EGFP のクローニング
- ② 培養細胞 Neuro2a へ Cx39.4-EGFP を導入し、蛍光シグナルの局在を観察する。
- ③ *cx39.4*^{-/-}ゼブラフィッシュの受精卵へ Cx39.4-EGFP を導入し、系統化された遺伝子組換えゼブラフィッシュの色素細胞と体表模様の観察を行う。

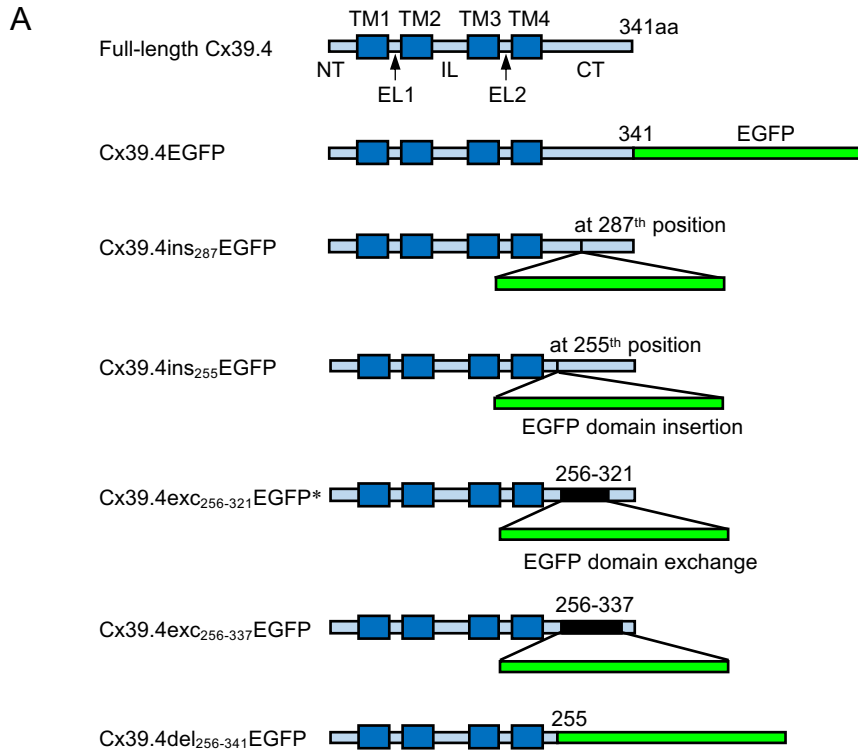
(2) Cx39.4 とスペルミジンの結合

- ① グルタミン酸残基をリシン残基に置換した Cx39.4 のクローニング
- ② 等温滴定型カロリメトリーを用いた結合親和性の解析

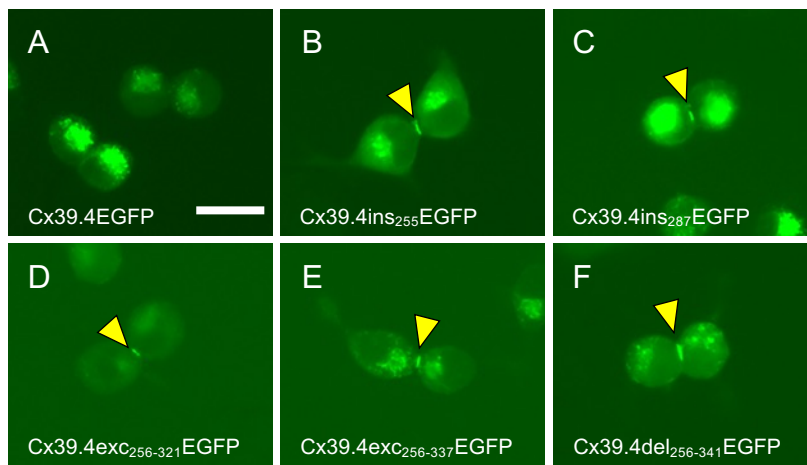
4. 研究成果

(1) Cx39.4 のイメージング

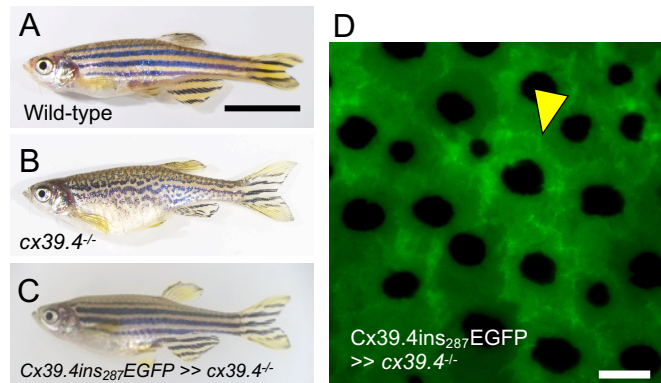
① : Cx39.4 の全長配列の C 末端側に EGFP を融合したコンストラクト (Cx39.4EGFP) や C 末端領域の途中に EGFP を挿入したコンストラクト (Cx39.4ins287EGFP, Cx39.4ins255EGFP)、C 末端領域を部分的に除去して EGFP を挿入したコンストラクト (Cx39.4exc256-321EGFP, Cx39.4exc256-337EGFP, Cx39.4del256-341EGFP) のクローニングを行った。培養細胞実験用として、CMV プロモーターの下流に標的遺伝子を挿入した。また、遺伝子組換えゼブラフィッシュ作製には、黒色素細胞で外来遺伝子が過剰発現するように、ゼブラフィッシュ *mitfa* プロモーター⁹ を搭載したプラスミド DNA に Cx39.4-EGFP シリーズを挿入した。



② : (1)-①で作製したプラスミド DNA を導入した Neuro2a 細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、Cx39.4EGFP 以外のコンストラクト Cx39.4ins287EGFP, Cx39.4ins255EGFP, Cx39.4exc256-321EGFP, Cx39.4exc256-337EGFP, Cx39.4del256-341EGFP において、ギャップ結合の形成を示すプラークの検出に成功した。ギャップ結合を形成したコンストラクトのうち、Cx39.4del256-341EGFP のギャップ結合形成効率が他に比べて低かったことから、Cx39.4 の C 末端の 4 アミノ酸はタンパク質のアセンブリーもしくは局在制御に関わっていることが示唆された。



③：(1)–①で作製した Cx39.4-EGFP シリーズをそれぞれ発現する *cx39.4*^{-/-}ゼブラフィッシュの体表模様を観察した。その結果、(1)–②でギャップ結合プラークを形成した Cx39.4-EGFP を発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュは、体表模様を回復した。以上のことから、Cx39.4ins287EGFP, Cx39.4ins255EGFP, Cx39.4exc256–321EGFP, Cx39.4exc256–337EGFP, Cx39.4del256–341EGFP についてはギャップ結合のチャネル特性を阻害しないことが示唆された。また、これらの標的遺伝子を発現するゼブラフィッシュの黒色素細胞間には、ギャップ結合の形成を示すプラークが観察された。



(2) Cx39.4 とスペルミジンの結合

①：ラット Cx40 や Cx41.8 の先行研究^{4,10,11}を参考に、Cx39.4 の N 末端領域のグルタミン酸 (E) をリシン (K) に置換した。Cx39.4 の N 末端領域には 4 つの E があるが、本研究ではそのうちの 1 つが K に置換されたコンストラクト (Cx39.4E10K, Cx39.4E14K, Cx39.4E15K, Cx39.4E18K) と、2 つが K に置換されたコンストラクト (Cx39.4E10,14K) のクローニングを行った。

A

Name	Amino Acid sequences
Cx39.4	MSRADWGFL E HLL E EGQ E YS TGV...
Cx39.4 E10K	MSRADWGFL K HLL E EGQ E YS TGV...
Cx39.4 E14K	MSRADWGFL E HLL K EGQ E YS TGV...
Cx39.4 E15K	MSRADWGFL E HLL E K GQ E YS TGV...
Cx39.4 E18K	MSRADWGFL E HLL E EGQ K YS TGV...
Cx39.4 E10,14K	MSRADWGFL K HLL K EGQ E YS TGV...

10 14 15 18

②：スペルミジンと Cx39.4 の N 末端領域の分子間相互作用を調べるため、等温滴定型カロリメトリーを用いて結合解析を行ったが、Cx39.4 と Cx39.4E10,14K はどちらもスペルミジンと結合しないことを示す結果が得られた。この実験の結論を出すためには、Cx39.4 の N 末端ペプチドの溶媒の選択や、2,2,2-trifluoroethanol の添加によるヘリックス構造の形成誘導、基質とリガンドの濃度比といった実験条件の精査と最適化が必要である。

<引用文献>

1. Inaba, M., Yamanaka, H. & Kondo, S. Pigment pattern formation by contact-dependent depolarization. *Science* 335, 677 (2012).
2. Nakamasu, A., Takahashi, G., Kanbe, A. & Kondo, S. Interactions between zebrafish pigment cells responsible for the generation of Turing patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8429–8434 (2009).
3. Watanabe, M. et al. Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene. *EMBO Rep* 7, 893–897 (2006).
4. Watanabe, M., Watanabe, D. & Kondo, S. Polyamine sensitivity of gap junctions is required for skin pattern formation in zebrafish. *Sci Rep* 2, 473 (2012).

5. Watanabe, M., Sawada, R., Aramaki, T., Skerrett, I. M. & Kondo, S. The Physiological Characterization of Connexin41.8 and Connexin39.4, Which Are Involved in the Striped Pattern Formation of Zebrafish. *J Biol Chem* 291, 1053-1063 (2016).
6. Irion, U. et al. Gap junctions composed of connexins 41.8 and 39.4 are essential for colour pattern formation in zebrafish. *Elife* 3, e05125 (2014).
7. Frohnhof, H. G. et al. Spermidine, but not spermine, is essential for pigment pattern formation in zebrafish. *Biol Open* 5, 736-744 (2016).
8. Usui, Y., Aramaki, T., Kondo, S. & Watanabe, M. The minimal gap-junction network among melanophores and xanthophores required for stripe pattern formation in zebrafish. *Development* 146, dev181065 (2019).
9. Lister, J. A., Robertson, C. P., Lepage, T., Johnson, S. L. & Raible, D. W. nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development* 126, 3757-3767 (1999).
10. Musa, H. & Veenstra, R. D. Voltage-dependent blockade of connexin40 gap junctions by spermine. *Biophys J* 84, 205-219 (2003).
11. Musa, H. et al. Amino terminal glutamate residues confer spermine sensitivity and affect voltage gating and channel conductance of rat connexin40 gap junctions. *J Physiol* 557, 863-878 (2004).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院 生命機能研究科 パターン形成研究室 https://www.fbs-osaka-kondolabo.net 川崎医科大学 医学部 生理学 1 https://m.kawasaki-m.ac.jp/classroom/course.php?id=202

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
研究協力者	渡邊 正勝 (Watanabe Masakatsu)	大阪大学・生命機能研究科・准教授	

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
---------	---------