

動物の皮膚模様形成原理の分子レベルでの全容解明

●近藤 滋

大阪大学生命機能研究科

<研究の目的と進め方>

目的：生体の空間パターン（形態）を構築する原理を解明することは、発生学の究極の目的の一つである。これまでに行われた分子生物学的な解析により、形態形成にかかわる遺伝子やシグナル伝達の種類に関する情報は蓄積されたが、形そのものを作る一般的な原理は知られていない。イギリスの数学者チューリングが提唱した反応拡散波原理と呼ばれる数理モデルが存在し、それによれば形態形成に必要な位置情報が「波」として自然に発生するとの、数理理論が存在しているが、発生が学者の間では分子レベルの証拠がないのほぼ無視されている状態であった。近藤は、1995年に魚の縞模様が成長に伴って変化し、それが反応拡散波であることを強く示唆するデータを得た。その後、ゼブラフィッシュを使い、模様が反応拡散波であることの状況証拠を積み重ねてきた。しかしながら、ゼブラフィッシュの模様形成を研究している研究者の間でも、実験的な証拠の少なさから、一つの仮説として扱われていた。本プロジェクトでは、ゼブラフィッシュの縞模様形成がどのような仕組みで行われているかを細胞レベル、分子レベルで明らかにすることを目的とする。

進め方：研究は、(1)皮膚の中での色素細胞動態を測定する研究、(2)模様変異を起こす突然変異のクローニングと遺伝子の作用の解析、(3)新しい模様変異遺伝子をスクリーニング、の3つの方向から進められた。また、それぞれのデータを常に計算機シミュレーションにフィードバックすることで、細胞ベースの詳細なシミュレーションにより、模様形成を再現することを目的とした。

<研究開始時の研究計画>

以下に挙げるプロジェクトを進める

- (1) 色素細胞の動態解明
- (2) 色素細胞の接触と移動
- (3) シミュレーションによる模様の再現
- (4) 遺伝子のクローニング
- (5) 遺伝子導入による模様のレスキュー
- (6) 改変遺伝子による模様の操作
- (7) 新たな模様遺伝子のスクリーニング
- (8) インビトロでの色素細胞間の相互作用の観察

これらを遂行することで、模様形成にかかわる細胞間相互作用、分子ネットワーク等が明らかになっていくと考えた。

<研究期間の成果>

(1) 色素細胞の動態解明

ゼブラフィッシュの模様は、2種類の色素細胞（黄色、黒色）の相互作用で作られることが、突然変異の解析から予測されている。レーザーを使って一部の細胞を消去すると、それに誘導されて、模様が移動することから、ゼブラフィッシュの模様が、基本的に反応拡散波であることが強く示唆された。(論文①) 次に、細胞集団の周辺にある細胞を消去したときに、消去する細胞の

数、位置によって再生してくる細胞の種類数が変化することを利用して、2種類の色素細胞間の相互作用のネットワークを解明した。(論文9)

(2) 色素細胞の接触と移動

インビボの状況において、色素細胞間の移動傾向を測定した結果、細胞は常に近傍の細胞から離れる傾向があることが明らかになった。この事実は従来の予測に反していた。(論文6)

(3) シミュレーションによる模様の再現

(1)、(2)の細胞動態を組み込んだ、細胞レベルのシミュレーションを行うと、正常個体や突然変異個体のすべての模様を再現することができた。抽象的な数値計算でなく、実際の測定結果を細胞に組み込んでパターン形成を再現できたのはこれが初めてであり、我々の考えが正しいことが証明されたと考えている。(論文8,9)

(4) 遺伝子のクローニング

分子レベルでの解明を行うため、模様が斑点になる変異体（レオパード）と縞の幅が広がる変異体（ジャガー）の遺伝子を、ポジ所なるクローニングにより同定したところそれぞれ、コネキシン418、Kir7.1をコードしていた。(論文3,4)

(5) 遺伝子導入による模様のレスキュー

クローニングされた遺伝子を、エンドのプロモーターで発現させたところ、模様変異をレスキューした。したがってこれらの遺伝子が原因遺伝子であることが証明された。(論文3,4)

(6) 改変遺伝子による模様の操作

遺伝子を任意のプロモーターの制御の下で導入したり、改変したものを導入することで、これらの分子の働きがある程度明らかになった。たとえばKir7.1は黒色素細胞のみに発現させることで模様のレスキューを行うので、この遺伝子が黒色素細胞でのみ働いていることがわかる。また、Kirの内向き清流性をなくすと、模様が大きめの斑点に変化することが見つかった。コネキシン418を黒色素細胞で発現させると、縞の幅が減り、本数が2倍になった。これらのことは、2つのチャンネル活性が模様形成を行うシグナルそのものに非常に近いところにあることを強く示唆する。(論文未発表)

(7) 新たな模様遺伝子のスクリーニング

新たな模様遺伝子を得る目的で、黄色、黒色素細胞間で発現に差のある遺伝子を遺伝子チップで選り出し、それを遺伝子導入することで新たな模様遺伝子を得ようと試みた。これまでにシグナル伝達因子とその受容体を中心に約40の遺伝子について、遺伝子導入によるテストを行ったが、残念ながら模様変異を誘導できるものは得られていない。この結果は、(6)のチャンネル分子

が模様形成に重要であることと表裏の関係にあるのかもしれない。すなわち色素細胞間の相互作用は、通常の形態形成過程で使われるタンパク性のシグナルでなく、ギャップジャンクションか、イオン（電位変化）であるという考えを後押しする。

(8) インビトロでの解析

成体から分離した色素細胞を使って、インビトロでの細胞の動態を解析するために、培養条件の最適化1を行った。その結果約7日間は、色素細胞をカルチャー条件下で買うことができるようになった。細胞の動態を観察すると、黒色素細胞は突起を伸ばし、盛んに他の細胞に接触しようとしているように見える。この突起による接触に意味があるかどうかは、今のところ不明であるが、突起の長さが縞の半分近くもあり、この突起の先端部での接触が長距離効果をになっているのであれば、拡散性のシグナルは必要でなくなる。今後、この接刺激についての解析を進めていく予定である。

(9) 結果の概要と今後の計画

当初の目的のうち、細胞レベルの模様形成の仕組みについては解明することができた。特に、細胞レベルのシミュレーションによって模様形成が再現できたことは、重要である。分子レベルでシグナルの正体を明らかにすることはできなかったが、Kチャンネルやギャップジャンクションの重要性が明らかになり、今後の研究の方向性が絞られてきており、解明には確実に近づいていると考えている。

<国内外での成果の位置づけ>

この研究は、世界的にも非常に注目されている。2009年だけでも、ゴードン会議（発生生物学）をはじめとする海外招待講演を4回行い、また有力国際専門誌に総説が2編掲載された。さらに現在 science 誌からの依頼で総説を執筆中である。

また、国際的にも本研究の独創性は際立っており、発生で反応拡散系を扱っている代表的な研究として認知されている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

概ね予定通りに進んでいるが、一番予想外だったのは、クローニングした遺伝子が、チャンネル分子であったことである。拡散性のタンパク因子、あるいはその受容体であれば、その時点で分子機構の解明は終了していたことになったのだが、低分子の同定は、動態の測定は極めて難しいため、今後も続けることになった。しかし、見つかったKチャンネルや、コネキシン遺伝子が、魚の鱗の長さを決めているとの報告が他のグループからあり、これらの分子が、反応拡散波形成に普遍的につかわれ、なおかつ模様以外の系でも機能している可能性が高くなったのは、予想外の吉報であった。

<今後の課題、展望>

これまでに我々の研究室で行ってきた研究で、魚類の皮膚模様は Turing 波であることが証明され、現在進んでいる模様形成遺伝子の解析から、Turing 波形成の分子機構も近い将来明らかになると考えられる。これはすなわち、「生物に起きる Turing 波（皮膚模様）を自在に操れるかもしれない」ということでもある。この基盤研究では、これまでに得た分子的、理論的な情報に基づき、ゼブラフィッシュ色素細胞のインビトロカルチャー系と、ゼブラフィッシュ以外の「模様の無い」魚類（メダカなど）や哺乳動物の皮膚で、模様を作り出すことが新たな目的となってきた。

インビトロや模様の無い生物に模様を作ることが夢物語でない

ことを説明するため、これまでに我々がゼブラフィッシュを使って得た知見、技術を簡潔にリストアップする。

(1) 魚の縞模様は Turing 波であることが解っている

(2) Turing 波を作る色素細胞間相互作用が解っている

模様を構成する黄色・黒の2種類の色素細胞は、近距離で排除しあい、遠距離で助け合う。このネットワークは Turing 波形成の理論的必要条件を満たす。

(3) 色素細胞間相互作用にかかわる主な分子

模様形成に最も重要と思われる遺伝子をクローニングした結果、connexin と K channel を特定した。

(4) 遺伝子の異所的な発現で、模様をある程度自在にコントロールできる

Kir 7.1 は黒色素細胞特異的に、connexin418 は両方の色素細胞に特異的に発現している。最近、これらの遺伝子のドーズを変えたり、発現細胞を変えたりすると、かなりの程度に模様をコントロールでき、今までにゼブラフィッシュや近縁種では存在しない模様の魚も作れることが解っている。これまでに、黒と黄色の太さの比、縞の数、斑点の大きさ、斑点⇄輪、などの変異を作ることによって成功しており、これは魚に見られる模様パターンのほぼ全てと言っても過言ではない。(未発表・右図) この事実は、この2種類の遺伝子が、Turing 波形成のシグナル伝達にとって、非常に重要であり、Kイオンか、ギャップジャンクションを通る分子が、波を作るシグナル因子であることを強く示唆する。

(5) インビトロカルチャーでの色素細胞の動態

最近、ゼブラフィッシュの皮膚から色素細胞を取り出し、培養皿の上で細胞間の相互作用を観察することが可能になった。黒、黄色の2種類の色素細胞は、in vitro 状態でも活発に突起を出して移動をするが、黄色細胞と黒細胞が接触すると、黒細胞は素早く接触点の反対方向に移動を始め、黄色細胞は逆に黒細胞を追うように移動することを見出した。一見すると、黄色細胞が黒細胞を培養皿上で追いまわす感じになる。また、接触は、突起の先端で起き、接着の強さなどから、そこにギャップジャンクションができてることが強く示唆される。

以上のデータ、特に4, 5は、色素細胞による空間パターンを、作り・操れることができる可能性を強く示唆する。「自由に操れる」ということは、「原理を理解した」ことを示す最も強い証明であり、また、操ることができなければ、理解しても実質的な意味は薄い。我々は、これまで行ってきた Turing 波の原理の解明の集大成として、いろいろな系で模様を作り・操りたいと考える。また、Turing 波は、模様以外の形態形成現象にも働いている可能性があり、その場合、体や臓器の形を調節する技術につながるかもしれない。

<研究期間の全成果公表リスト>

論文

1.906121000

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)

2.906151124

Kondo S, Shirota H: Theoretical analysis of mechanisms that generate the pigmentation pattern of animals. Semin Cell Dev Biol 20:82-89 (2009)

3.901161152

Takahashi G, Kondo S: Melanophores in the stripes of adult zebrafish do not have the nature to gather, but disperse when

they have the space to move. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:677-686 (2008)
 4.708101121
 Yamaguchi M, Yoshimoto E, Kondo S: Pattern regulation in the stripe of zebrafish suggests an underlying dynamic and autonomous mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4790-4793 (2007)
 5.608301533
 Watanabe M, Iwashita M, Ishii M, Kurachi Y, Kawakami A, Kondo S, Okada N: Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene. *EMBO Rep* 7:893-897 (2006)
 6.702151050
 Iwashita M, Watanabe M, Ishii M, Chen T, Johnson SL, Kurachi Y, Okada N, Kondo S: Pigment pattern in jaguar/obelix zebrafish is caused by a Kir7.1 mutation: implications for the regulation of melanosome movement. *PLoS Genet* 2:e197 (2006)
 7.608060956
 Horikawa K, Ishimatsu K, Yoshimoto E, Kondo S, Takeda H: Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature* 441:719-723 (2006)
 8.601311305
 Hirata M, Nakamura K, Kondo S: Pigment cell distributions in different tissues of the zebrafish, with special reference to the striped pigment pattern. *Dev Dyn* 234:293-300 (2005)

学会発表

1.S Kondo, Turing Pattern in the skin of animals., GRC, June 21, Boston (2009)
 2.S Kondo, Multi-Cell Simulations of Gastrulation and Somitogenesis in Chick., Mathematical Biosciences Institute Workshop, November 18, Ohio State University (2008)
 3.S Kondo, Cell-cell interaction network that generates the skin pattern of zebrafish., Frontier in Development Biology meeting, September 16, The VVF la Badine, Gien, France (2008)
 4.S Kondo, Zebras did not get the stripes, but lost the uniform color., Society for Mathematical Biology Conference, August 1, Centre for Mathematical Medicine, Toronto, Canada (2008)
 5.S Kondo, Interaction among the zebrafish pigment cells that makes the stripe pattern., IPCC-IMRC2008, May 7, Sapporo (2008)
 6. S Kondo, Pigment Cells Generates the Stripes in Animal's Skin., 2nd International Systems Radiation Biology Workshop, January 25, Washington (2008)
 7.S Kondo, Nonlinear dynamics in biological pattern formation: Interactions between pigment cells give rise to Turing patterns in zebrafish., Shanghai NSA'07, June 7, Fudan University, China (2007)
 8.S Kondo, Interactions among the pigment cells give rise to the Turing pattern in the skin of zebrafish., IUBMB 2006, June 18, Kyoto (2006)
 9.S Kondo, Interactions among the pigment cells that give rise to the stripe pattern., 2005 West Coast Zebrafish Meeting, September 9, University of Oregon, Eugene (2005)

その他

1.近藤滋、学研メディカル秀潤社、細胞工学7月号 (Vol.26

NO.7)、振動現象の生物学：リズムと波が生み出す動的な世界 (2007)

2.近藤滋、東京化学同人、現代化学6月号、たかがゲノム、されどゲノム (2007)