

動物の皮膚模様形成メカニズムの分子レベルでの解明

●近藤 滋

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

<研究の目的と進め方>

発生に伴うパターン形成現象の中でも、皮膚模様形成はモデル実験系としての価値が高い。その理由は

1) 皮膚の模様は内部構造とはまったく異なるので、自律的なパターン形成であることが明白。

2) 人工的に乱されても自己修復を行うような、動的な性質を持っている

である。

これらの特徴から、皮膚の模様は Turing の反応拡散系による定常波パターンであると考えられる。実際に、いろいろな魚類で模様変化を記録すると、反応拡散の理論予測と一致することが証明されているが、いまだに分子レベルでの解明はなされていない。どのような分子機構が TuringPattern を作っているのかわかれば、パターン形成の分野への影響は大きい。また、Turing の原理は、分子間の相互作用によって生まれる「波」の性質が作り出すパターンであり、単なる分子の性質ではなく「システム」そのものであるため、システム研究の観点から見ても、重要な先導的役割を果たすだろう。

以上の観点に立ち、我々はゼブラフィッシュを用いて、縞模様形成原理の解明を分子レベルで目指している。

<2007 年度の研究の当初計画>

研究は主に2つの流れで行っている。一つ目は、インビボでのレーザーによる模様パターンの一部消去に誘導される色素細胞の挙動を調べることで、色素細胞を単位とした細胞間ネットワークを解明すること、二つ目は、模様パターンミュタントなどから、模様形成に関係する分子を同定していくことである。

インビボの系では、既に黒色細胞と黄色細胞との間に、TuringPattern を形成することのできる相互作用ネットワーク同定しているが、実際に個々の細胞の動きまで観察すると、完全に説明できない状況も存在するため、今後も詳細な実験が必要であると考えている。特に、色素細胞の動きに関しては重要と考えており、それぞれの色素細胞がどのようなロジックで移動していくのかを正確に解析したい。また、色素細胞間の相互作用の一つ一つをダイセクトして示すためには、インビトロ系への移行が必要と考えている。現在黒い炉色素細胞に関しては、インビトロでの細胞間相互作用が見れる常態になってきており、今後、黄色色素細胞でも同様の解析を行う予定である

関連分子の同定を目的とする実験では、まず、黄色、黒色素細胞に特異的に発現する膜タンパク、分泌タンパクを gene chip で選び出し、それらが模様形成にどのような影響を与えているかを、色素細胞特異的なプロモーターの下流で発現させることで調

べていく。現在、特異的なプロモーターのチェックと遺伝子の選び出しを行っている。

また、既にクローニングした2つの模様変異遺伝子がイオンチャンネル（Kチャンネル、ギャップジャンクション）であったことから、イオン等の低分子がシグナル伝達に関与している可能性があるため、さまざまな低分子透過性のチャンネル遺伝子を、色素細胞に異所性に発現させることで、模様にもどのような変化が起きるかを調べたい。

<2007 年度の成果>

色素細胞相互作用にかかわる分子の特定

黒、黄の2つの色素細胞が共存してパターンを作っている野生型のゼブラフィッシュと、黒色素細胞のみが存在するパンサー変異体から黒色素細胞を精製し、DNAマイクロアレイにより、黄色色素細胞との相互作用依存的に発現する遺伝子を同定した。そのうち、5つのクローンに関して黒色素細胞特異的、あるいは黄色色素細胞特異的なプロモーターの制御下に野生型のゼブラフィッシュに発現させたところ、1つのクローンに関しては、模様変異が観察された。現在この遺伝子が本当に模様形成に関与しているかどうかについての解析を進めている。

縞模様の幅が大きくなるジャガー変異に関して2つ進展があった。この変異は縞の幅が大きくなるという興味深い変異であり既に原因遺伝子が内向き整流Kチャンネル（Kir7.1）であることがわかってきた。しかしながら発現レベルが低いため、どの細胞で発現しているのか、同細胞で発現することが必要であるかについては不明であった。今回、黒色素細胞に特異的なプロモーターの制御下で変異体に Kir7.1 を発現させたところ、模様形成の回復が観察された。このことから、Kir7.1 は黒色素細胞で発現することが模様形成に必要なことがわかった。

また、Kir7.1 のこれまでに見つかった変異遺伝子は、Kイオンの透過性を欠くものであった。今回新たな変異アレルの遺伝子に関する解析を進めていたが、新しいアレルの変異では、両向きにイオンが流れるらしい。いずれにしろ、Kチャンネルの変異は静置膜電位に影響を与えることが考えられ、膜電位や細胞間隙のイオンの動態が模様形成を正常に起こすために重要であることがわかってきた。

一方、模様が斑点になるレオパード変異に関しては黒色素細胞特異的なプロモーターでの強制発現では、模様形質の買収が見られず、こちらの場合は黒色素細胞単独で働くのではないらしい。また、原因遺伝子である connexin41.8 がどのような形で働くのか（gap junction を作るのかあるいはヘミチャンネルとして働くのか）に関しては、強制発現系を使っていずれの状態でも存在して

いることを観察した。このどちらが模様形成に必要なのか（あるいは両方）は今後の研究課題である。

細胞の移動能力

黒色素細胞の移動に関し、前年度にこの細胞は常に同種の細胞から離れようとする、その効果はごく短距離でのみ働くことを報告したが、今回、その効果が他の模様変異体でも見られるかどうかを調べた。その結果、ジャガー変異体ではこの移動傾向が見られないことが明らかになった。ジャガーの変異には、黒色素細胞と黄色素細胞が混在する領域があり、それが分離しない理由のひとつが移動性の欠如である可能性がある。

<国内外での成果の位置づけ>

現時点で、色素細胞パターンの形成を研究しているラボは3つあるが、いずれも特段の進展は示していない。我々の結果はそれらをリードしている。特に他のラボでは、反応拡散の理論との結びつけがなされておらずその点での我々の優位は揺るいでいない。

一方、模様形成以外の実験系を使って反応拡散波の存在を示す研究が近年三件されるようになってきている。それらの実験系では、実際のシグナル分子の特定もなされているため、競争相手としては見過ごすことができないが、反面、魚の模様のように Turing Pattern 固有の動的性質を示すことが不可能である。そのため、魚の模様と他の実験系は互いに相手の不足を補完する関係にある。また、他の系での反応拡散原理の研究自体、魚の模様の研究に触発されたものであることも事実である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

インピトロ系での相互作用の特定は、現時点でうまくいっていない。原因の大きなものは、色素細胞を安定して培養できるような血清が無いことが考えられる。微量の培養系では胚の抽出液を使うことができるが、本実験ではある程度長期間の培養することが必要であり、胚の抽出液では少なすぎるので、鯉（ゼブラフィッシュはコイ科）の血清を使っている。しかしながら今のところ4～6日程度の培養期間しか達成できず、しかもその間に色素細胞の活動性はかなり制限されるようである。今後何らかの方法で改善を目指したいが、今のところ有望な方向性は見えていない。

トランスポゾンによる新たな突然変異体の分離も、今のところ効率が不十分であり、実用的な段階にいたっていない。

最近の傾向として、個々の分子、個々の細胞に関する情報は集まりつつあり、今後もそれは続いていくことは確かであるが、全体としてそれがどのようにまとまって行くかに関しては、あまり先が見えていないわけではない。特に模様変異体の原因遺伝子がチャンネル分子であったことが、問題を複雑にしている。つまり、
 (1) チャンネルを通る低分子そのものが、シグナル因子である、
 (2) チャンネルの変異は膜の応答性を変化させ、未発見のシグナル分子の反応を低下させる、のかが不明である。今のところ両方の可能性を考えて研究を進めている。

<今後の課題>

- 1) ジャガー変異に関して

Kir7.1 以外のイオンチャンネルを使って、ジャガー変異のレスキューを試みる。それにより、Kイオンそのものが重要なのか、膜電位に変化があればよいのか、Caイオンとの関係などが明らかになると考えられる。

- 2) レオパード変異に関して

まず、制御可能なプロモーターを使ってまず模様の回復を目指す。それができたら、ジャガー変異と同じように、他のクラスのコネクシンの変換実験を行い、connexin41.8の意義を調べる

- 3) マイクロアレイによるシグナル分子探し

今後も精力的に続ける。

- 4) ケミカルバイオロジーによるリガンド探し

他の実験系の成果と補完する形で、低分子による色素細胞パターンの影響を調べることが必要と考えている。

<成果公表リスト>

- 1) 論文

1. 0708101121

Yamaguchi M, Yoshimoto E, Kondo S:

'Pattern regulation in the stripe of zebrafish suggests an underlying dynamic and autonomous mechanism'

PNAS Vol.104 no.12 4790-4793 (2007)