The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ゼブラフィッシュの模様形成における長距離作用をDelta-Notchシグナル経路が制御する
Author(s)	浜田, 裕貴
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34594
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

2013 年度　博士論文

ゼブラフィッシュの模様形成における長距離作用を Delta-Notch シグナル経路が制御する

Long-range signaling in zebrafish pigment pattern formation is mediated by Delta-Notch signaling

大阪大学生命機能研究科

時空生物学講座・パターン形成研究室

浜田　裕貴

要旨

動物の体表に見られる模様は、アラン・チューリングにより提唱された反応拡散理論の最適なモデルとして研究されてきた。実験的な証明により、ゼブラフィッシュの模様形成においては 2 種類の色素細胞（黒色素胞、黄色素胞）の相互作用が重要であり、その相互作用は反応拡散理論の要素を満たすものであった。その相互作用とは、これら2種類の色素胞が近距離では互いに他方の色素胞存在を抑制しあうが、遠距離では黄色素胞は黒色素胞の生存を維持する働きがあるというものであった。しかし、この色素胞間の相互作用は主に in vivo での観察結果から確認されたものであり、その作用の分子的な基盤はほとんどわかっていなかった。今回この分子的な基盤を解明することを目指した。遺伝子発現の解析から黄色素胞に Notch リガンドが黒色素胞に Notch 受容体が発現していることと、Notch シグナル阻害剤への暴露とトランスジェニックフィッシュの作製から黒色素胞の生存には黒色素胞への Notch シグナルの入力が重要であることがわかった。更に、黒色素胞が黄色素胞に対して長い突起構造を伸ばしていることを発見した。これらの結果から Delta-Notch シグナル経路が黒色素胞の突起構造を通じて、色素胞間で見られた黄色素胞が黒色素胞の生存を助けるのに働いていることが示唆された。今回の結果からゼブラフィッシュの反応拡散モデルで考えられていた遠距離の作用は、物質の拡散を介さない形で成り立っていることがわかってきた。

目次

I 章　序 5

1 節　パターン形成原理の研究における体表模様の重要性 5

2 節　体表模様形成と反応拡散理論 6

3 節　ゼブラフィッシュの体表模様形成 8

4 節　色素細胞間の相互作用 9

i.　黄色素胞と黒色素胞の近距離での相互阻害 10

ii.　黄色素胞による遠距離での黒色素胞の生存活性化 10

5 節　本研究の目的と方針 13

II 章　材料と方法 15

1 節　ゼブラフィッシュの系統と飼育 15

2 節　Tol2 ベクターの作製とトランスジェニック系統の作製 15

3 節　色素胞の回収 16

4 節　色素胞間の遺伝子発現量比較 17

5 節　DAPT 処理 18

6 節　*notch1a* ナンセンス変異体（des^{th35b}）の解析 19

7 節　色素胞の観察 19

8 節　レーザーに依る色素胞除去実験 20

III 章　結果と考察 20

1 節　Delta-Notch シグナル経路は、模様形成に関与している 20

2 節　黒色素胞は Notch 受容体を黄色素胞は Notch リガンドを発現している 22

3 節　Delta-Notch シグナル経路の阻害は黒色素胞の細胞死を引き起こす 25

4 節　黒色素胞への Notch シグナル入力が黒色素胞の生存に重要である 29

5 節　黒色素胞での Notch シグナル活性化は、黄色素胞の消失による黒色素胞の細胞死を回避する 31

6 節　黒色素胞は、黄色素胞に対して長い突起を伸ばしている..... 34
IV 章　総括 37
1 節　結果のまとめと考察..... 38
2 節　今後の課題..... 38
3 節　反応拡散モデルの実態としての Delta-Notch シグナル経路 40

I章　序

1節　パターン形成原理の研究における体表模様の重要性

生物の体の構造がどのような原理で形成されるのかは発生学最大のテーマである。生物の体の構造は複雑な3次元構造であり、直接実験的なアプローチをすることが難しいが、良く見ると局所では単純な構造の繰り返しを見ることができる。例えば脊椎や小腸の絨毛、口蓋、植物の葉序パターンなどである（図1）。一見複雑な生物の体も、単純な構造の繰り返しによって複雑な体を作り上げていると考えられないだろうか。だとすれば、単純な構造の繰り返しがどのような原理で作られているのかが分かれば、それは複雑な体の構造形成を理解する第一歩となるだろう。

図１．生物に見られる繰り返しパターンの例、脊椎、小腸、口蓋、植物の葉序

そのような単純な構造の繰り返しの中でも、体表模様は魅力的な構造の一つだ。なぜならば、この構造は種ごとに多彩でありながら遠縁種にも似た構造が現れることから、多くの生物種でその形成原理を共通して使っていると考えられるからだ。更に、体表に現れる形態であるためその形成過程の観察が容易であり、一部の生物では体表模様は成長に伴い大きく変化することから、形態形成現象が成長を通して継続していること

とが期待できる。

このような利点から、繰り返し構造を形成するための原理の研究対象として模様形成現象が研究されている。そして「反応拡散理論」を用いたモデルが模様形成現象を説明できる有力なモデルとして提唱されてきた。

2節　体表模様形成と反応拡散理論

反応拡散理論は、イギリスの数理学者アラン・チューリングにより提唱された自律的な繰り返し構造の形成を説明することができる数理理論である(1)。この理論は、拡散係数の違う2つの因子の間に特定の関係がある条件下で、この2つの因子の濃度が繰り返し的に変化すること説明している。特定の関係とは、例えば自己合成活性能力を持つ活性因子（A 因子）と、A により合成が活性化され A の合成を抑制または A の分解を促進する抑制因子（I 因子）で行われる反応である（図2.A）。そして、このような 2 種類の因子のうち I 因子の拡散係数が A 因子の拡散係数よりも十分に大きい時、2 種類の因子が存在する空間に A 因子の濃い領域と I 因子の濃い領域による繰り返し構造が自律的に形成され安定化する(図2.B)。

この理論の要素は、A 因子が濃い領域では A 因子の合成が大きいという A 因子間の「近距離の活性化」と、I 因子の拡散係数が大きいため起こる、A 因子の濃い領域付近では I 因子の濃度の方が高くなり A 因子が抑制されるという A 因子間の「遠距離の不活性化」という2つである(2)。

この反応拡散理論で形成される周期的なパターンが自然界に見られる生物の体表模様に相似性がみられることと（図3.A）(3)、体表模様の動態がこの周期的な構造の動態と同じであること（図3.B、C）(4，5)から、体表模様の形成は反応拡散理論により説明できることが示されてきた。

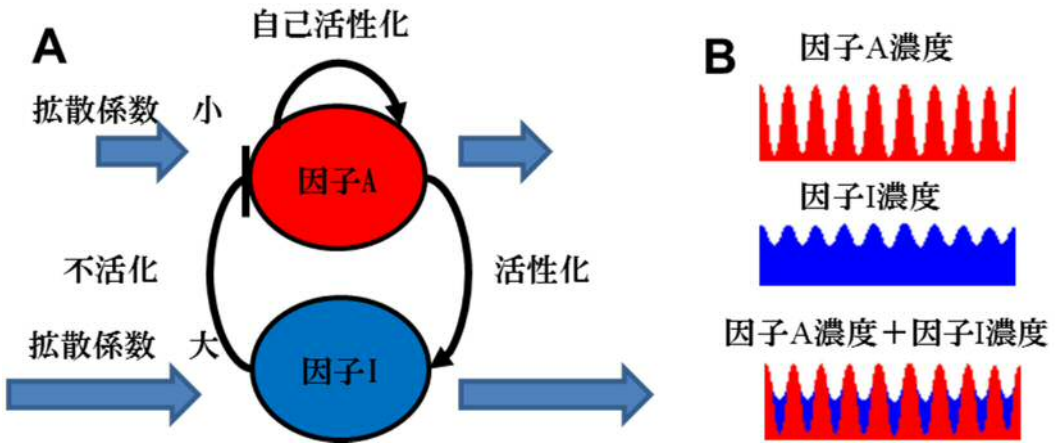

図２．反応拡散理論の要素
(A)因子 A と因子 I を活性化する能力があり拡散係数の小さい“因子 A”と、因子 A を不活化し拡散係数の大きい“因子 I”。**(B)**反応拡散理論で形成されるパターンの例。２つの因子の各反応速度と拡散係数が適当であると、因子 A が濃い領域と因子 I が濃い領域が空間内に周期的に現れ安定化する。

動物の模様は、近縁種間でも大きく異なっている場合が多く存在する。しかし、これらの模様の変化を反応拡散理論のシミュレーションでは、反応係数のパラメータの違いにより再現することができる（図3.A）。このように、パラメータの違い大きな周期構造の変化を再現することができることができるということは、近縁種でも大きく模様の違う生物が出現しすることをよく説明できている。

タテジマキンチャクダイの体表模様の形成過程を観察すると体の成長に伴い、新たな縞が増える。この際、もともと形成されていた縞の一部が分岐し新たな縞が形成される様子が観察されている（図3.B）。また、ゼブラフィッシュの模様の一部を除去し続けると、他の模様を形成している細胞が動き、その模様の除去された部分を埋めるような特徴的な模様の変化を示すことが観察された（図3.C）。これらの模様の成長・動きは、反応拡散理論を用いたシミュレーションで再現・予測することができた(4, 6)。

これらのことから、体表模様形成原理は反応拡散理論で説明できるがわかってきた。では、体表模様の形成における A 因子と I 因子は何に当たるのであろうか？

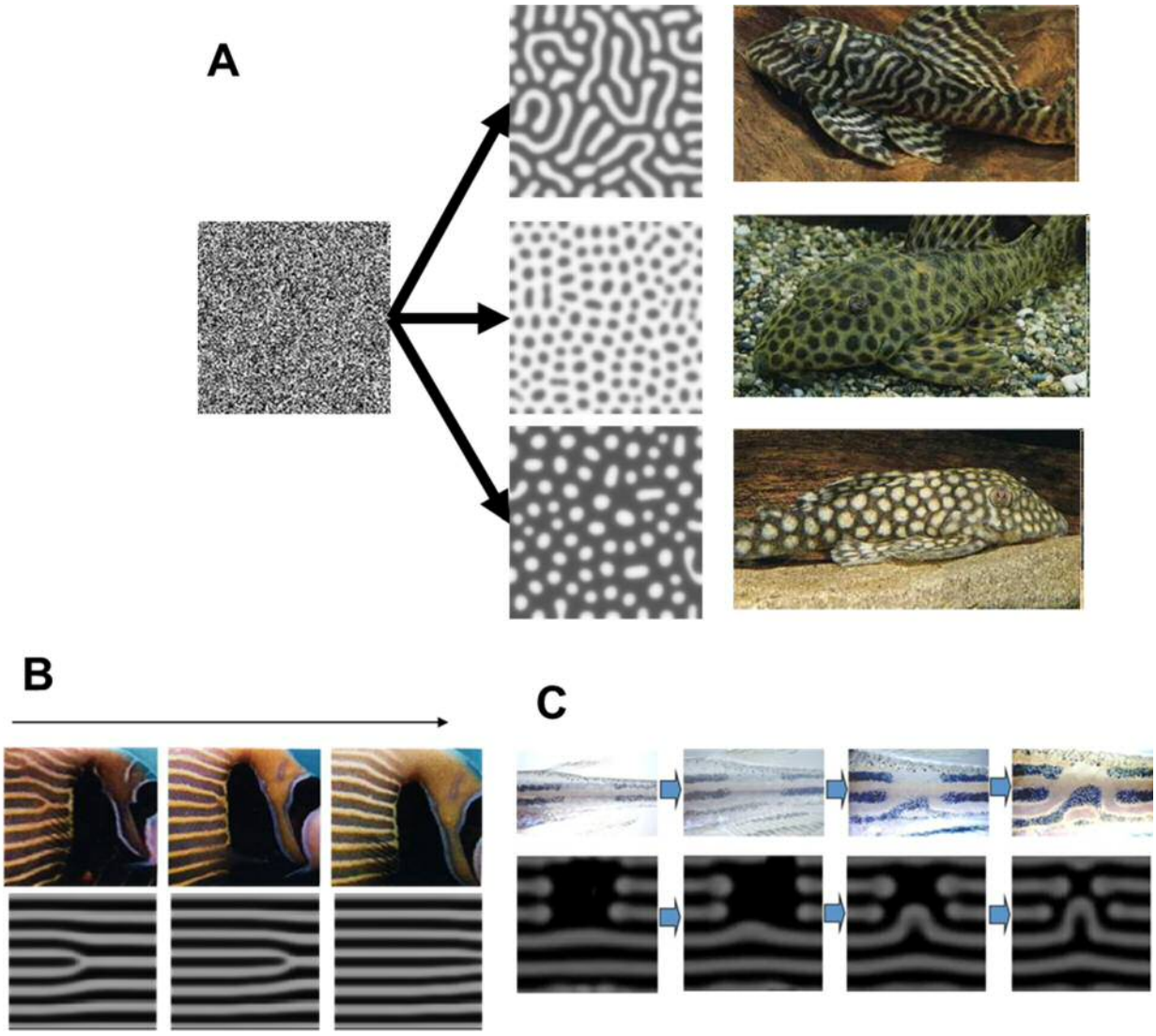

図３．体表模様と反応拡散モデルで形成されるパターンの相同性
（A）反応拡散理論のシミュレーションに現れる多様性。シミュレーションに関わるパラメータの違いにより、同じ条件(左)からでも多様な模様が形成される（中央）。このような模様の変化は、近縁種間でも見られる。（右、写真はプレコ内に見られる模様の多様性）。(B)タテジマキンチャクダイの模様形成過程とシミュレーションで形成されたパターンの成長の相同性。枝別れ構造から２本の縞が形成されていく。(C)ゼブラフィッシュの模様の再生とシミュレーションで形成されたパターンの再生の相同性。(B)は S. Kondo, R. Asai, Nature. (1995) vol.376, 765-768. (C)は M. Yamaguchi, E. Yoshimoto, S. Kondo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2009) **106**, 8429　より引用し修正を加え作製した。

3節　ゼブラフィッシュの体表模様形成

ゼブラフィッシュは、モデル生物の一つであり体表に模様を持っている（図4．A）。ゼブラフィッシュは、3 種類の色素細胞、黒色素胞、黄色素胞、虹色素胞の3種類の色素細胞を体表に持っている。黄色素胞の細胞で構成された黄ストライプと黒色素胞により構成された黒ストライプが交互に並び体表に縞模様を形成しており（図4.B）、虹色素胞は体表全体に広く存在している。

図４．ゼブラフィッシュの模様
（A)体表に縞模様を持つモデル生物ゼブラフィッシュ。（B）縞模様の拡大写真。黒いドットと黄色いドット一つ一つが、黒色素胞、黄色素胞一つ一つを示す。

ゼブラフィッシュの模様形成現象は、以前より変異体の解析等を通して研究されてきた(7)が、その形成原理についてはほとんどわかっていなかった。しかし、模様変異体に対して野生型から色素胞を移植すると体表模様が回復する実験(8)や、レーザーによる色素細胞の除去とそこからの模様の回復の様子の観察(図 3.C)(6, 9)から、模様の形成に重要なのは模様を形成している黒色素胞と黄色素胞自身であることと、ゼブラフィッシュの模様が反応拡散理論で予想される模様の特性を持っていることがわかってきた。これらのことから、ゼブラフィッシュの模様形成現象においても反応拡散理論がその形成原理として働いており、黄色素胞と黒色素胞が先述の反応拡散理論におけるＡ因子とＩ因子の働きを担っていることが予想された。

4節　色素細胞間の相互作用

反応拡散理論におけるＡ因子とＩ因子の働きを黄色素胞と黒色素胞が果たすとするならば、この2種類の色素細胞の間には「近距離の活性化」と「遠距離での不活性化」という2つの関係性があるはずである。その関係性が色素胞間にあることは、変異体

解析やレーザーを使った色素細胞の除去実験から証明されてきた。以下にその関係性とそれが示された実験について詳述する。

i. 黄色素胞と黒色素胞の近距離での相互阻害

ゼブラフィッシュの縞模様形成途中において、黒ストライプ内に黄色素胞が逆に黄ストライプ内に黒色素胞が発生する。この時、これらの別種の色素胞に囲まれた色素胞は、別種色素胞がない領域まで移動するか、細胞死を起こして消えるという現象が観察される(10)。しかし、この現象は囲んでいる別種細胞をレーザーにより除去することで見られなくなることがわかっている(9)。また、黒ストライプと黄ストライプが形成されるとその中に新たに別種の色素胞が発生することはない。

これらのことから、黄色素胞と黒色素胞の間に近距離で互いに別種色素胞の発生、生存を阻害し移動を活性化する作用があることがわかった。そして、この作用は黄色素胞同士、または黒色素胞同士にとっては、他種の色素胞が排除されるため活性化的に働いている。つまりこの作用が反応拡散理論における「近距離の活性化」の関係性を満たしている。

この作用については、関連する遺伝子も報告されている。*kir7.1* 変異体ゼブラフィッシュでは、この作用が欠損しており黒色素胞と黄色素胞が混在している(11)。in vitro での実験によりこの変異体の黒色素胞が黄色素胞の接触により移動が活性化されないことが、この主な原因であることがわかっている(12)。

ii. 黄色素胞による遠距離での黒色素胞の生存活性化

ゼブラフィッシュの模様変異体の一つとして、黄色素胞が正常に発生しない変異体として *colony stimulating factor 1 receptor a* (*csf1ra*)変異体が得られていた(13, 14)。この変異体では、体表に黒色素胞と虹色素胞のみが発生するが、その黒色素胞数は

野生型に比べて少なく縞模様も形成していない（図5. A）。そして、この変異体に野生型ゼブラフィッシュの黄色素胞を移植することでその模様が回復することが知られていた(8)。また、この遺伝子に温度感受性の変異がある変異体についても、研究が行われている。この変異体は通常の飼育環境下（24℃）で飼育した場合には正常な縞模様を形成するが、高温条件下（33℃）で飼育した場合には黄色素胞が細胞死を起こし、それについで黒色素胞が細胞死を起こす現象があることが観察されている（図5. B）(15)。

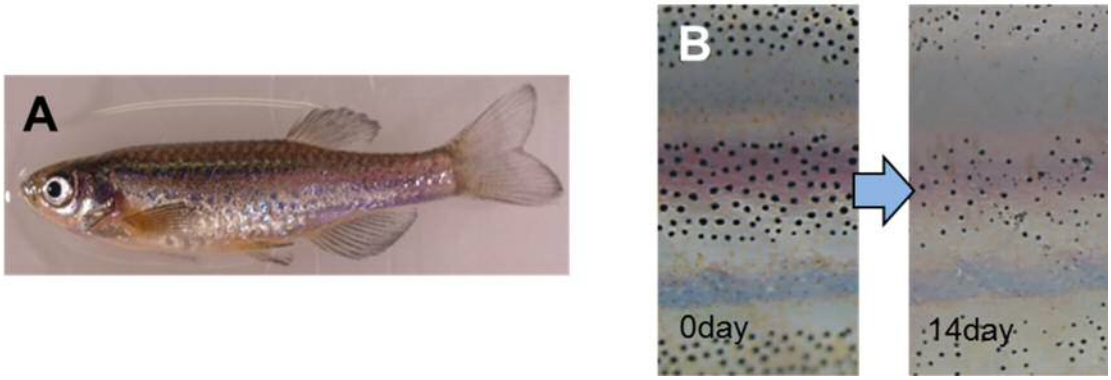

図 5. 黄色素胞発生に欠損のある *csf1ra* 変異体
(A)*csf1ra*^{j4e1}変異体。体表に黄色素胞が見られず、模様は形成されず黒色素胞の数も少ない。(B) *csf1ra*^{utr4174A}変異体。この変異体は、温度感受性変異体であり24℃条件の場合には正常な模様を形成するが（写真左）、そこから33℃条件で飼育すると黄色素胞細胞死を起こし、次いで黒色素胞が細胞死を起こす（写真右）。

同様の現象は、黄色素胞をレーザーで除去した場合にも見られている。縞模様が形成された後に、その縞模様の黒ストライプをレーザーで除去した場合には周囲の黄色素胞には特に変化は見られないが（図6.A）、黄ストライプを除去した場合には周囲の黒色素胞が細胞死を起こすという現象が観察されている(図6.B)(9)。

これらの結果は、黄色素胞の存在が黒色素胞の生存を助ける作用があることを示している。そして、黄色素胞が減少した場合の黒色素胞の細胞死は黒ストライプ内での位置にかかわらず起こっていることから、この作用が遠距離、黄色素胞から数細胞離

れた先にある黒色素胞にも働く作用であることが示唆されている。

この黄色素胞が離れた黒色素胞の生存を助けるという作用は、先述の通り黄色素胞と黒色素胞の間に相互阻害の作用があることから、黄色素胞にはネガティブに働く。この作用は反応拡散理論における「遠距離の不活性化」の関係性を満たしているのである。しかし、この作用に関わる分子は全くわかっていない。

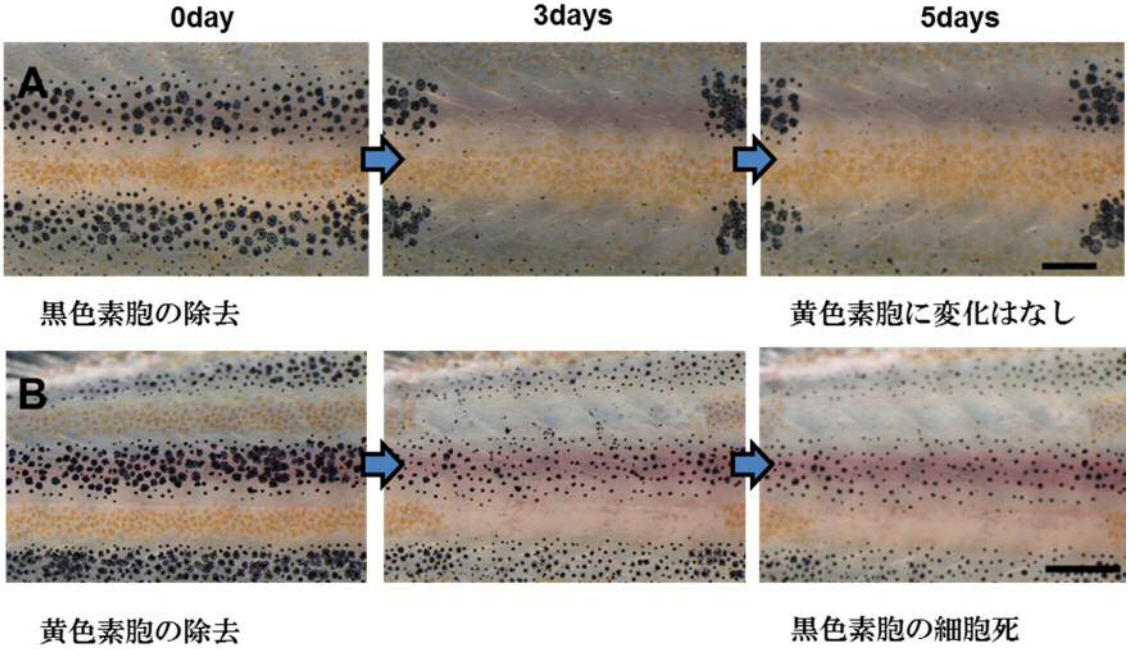

図６．レーザーに依るストライプの除去の影響。
(A)黒ストライプの除去。黒ストライプを除去した場合には、その間に挟まれた黄ストライプには特に変化は見られない。(B)黄ストライプの除去。黄ストライプを除去した場合、その間に挟まれた黒ストライプに含まれる黒色素胞は細胞死を起こす。A. Nakamasu, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 26;106(21):8429-34 より引用し修正を加え作製した。

以上に述べたように黒色素胞と黄色素胞の間には、反応拡散理論を満たす「近距離の活性化」と「遠距離の不活性化」の関係が成り立っている。この in vivo, in vitro で得られた知見を元に、反応拡散理論の因子 A が黄色素胞にあたり因子 I が黒色素胞にあたるという、ゼブラフィッシュの模様形成の「反応拡散モデル」が提唱されており、このモデルがゼブラフィッシュの模様形成の根幹となる部分を説明していると考えられ

ている(図7)(9)。

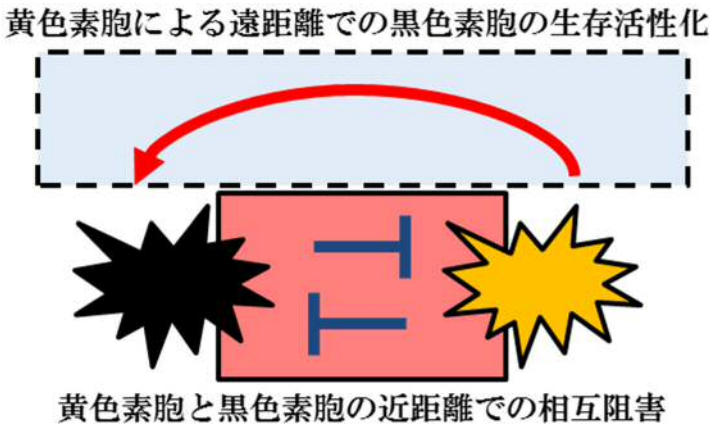

図７．色素胞間の相互作用の模式図　（反応拡散モデル）
近距離で黄色素胞と黒色素胞は互いに排除、発生・生存の阻害をする。また、黄色素胞は遠距離で黒色素胞の生存を活性化する。

5節　本研究の目的と方針

しかし本研究の開始時点では、多くの模様形成変異体の解析から模様形成に関わると考えられる遺伝子が同定されてきていたが、この反応拡散モデルに関わる遺伝子については全く情報がなかった。相互作用に関わる分子メカニズムを発見することは、模様形成現象を理解するために重要であるだけでなく、反応拡散理論が他の形態形成現象に関わるのかを考えるきっかけになることが期待された。

本研究において私は黄色素胞にNotchリガンドが黒色素胞にNotch受容体が発現していることに着目し、Delta-Notch シグナル経路が模様形成における黄色素胞と黒色素胞の相互作用に関係していると考え、模様形成における Delta-Notch シグナル経路の働きを解析した。

Delta-Notch シグナル経路は多くの生命現象に働くシグナル経路である(16, 17)。このシグナル経路は、細胞膜結合型のリガンド Delta とその受容体である Notch の結合

により伝達される。リガンドとの結合により Notch が段階的に切断され下流への伝達のコアになる Notch 細胞内ドメイン（NICD）が切り離される（図7）（16）。この NICD が核内に移行することで、様々な遺伝子の発現制御を行うことが知られている。そして、このシグナル経路はリガンドが細胞膜結合型であることから、近距離でのシグナル伝達経路として使われることが多い。

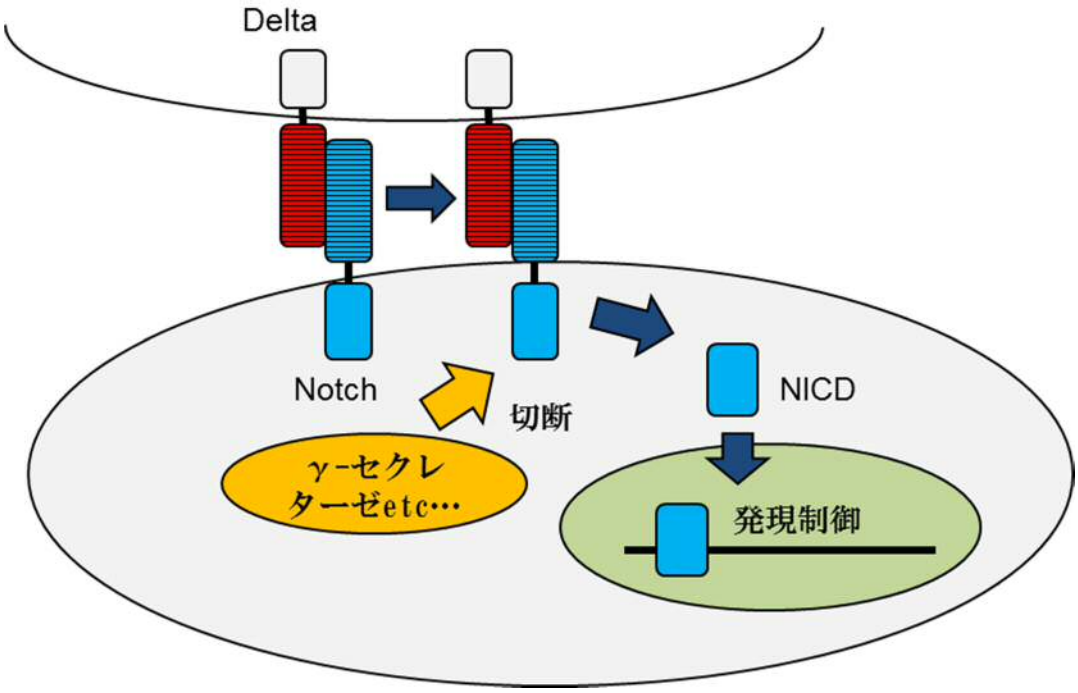

図8. Delta-Notch シグナル経路の概略図

本研究では、Delta-Notch シグナル経路の阻害剤による処理と Delta-Notch シグナル経路の恒常活性化トランスジェニックフィッシュの作製により、色素胞への Delta-Notch シグナル経路の効果を解析した。その結果、Delta-Notch シグナル経路の黒色素胞における入力が、黒色素胞自身の生存をコントロールしていることを発見した。更に、黒色素胞の観察から黒色素胞は黄色素胞対して長い突起状の構造を伸ばしていることを発見した。これらの結果から、黄色素胞は黒色素胞の生存を Delta-Notch シグナル経路を介して制御しており、それは黒色素胞の突起構造を通し

て離れた細胞間でもシグナル伝達を可能にしていることが示唆された。この色素胞間のDelta-Notchシグナル経路の働きは、先述の模様形成に重要な「黄色素胞による遠距離での黒色素胞の生存活性化」に当たるものであると考えられた。つまり、これまで反応拡散モデルにおいて考えられていた遠距離での作用は、拡散性の物質を介した遠距離でのシグナル伝達ではなく、離れた距離にある色素胞が直接接触することにより伝達されているのだということが明らかになってきた。

II章　材料と方法

1節　ゼブラフィッシュの系統と飼育

野生型(WT)としてＴü 系統を用いた。また、今回の研究に用いた *csf1ra*^{j4e1}変異体はWashington UniversityのJohnson研究室から、*brass*変異体,*notch1a*^{th35b}変異体はMax Planck Institute のZebrafish Stock Centerから供与を受けた。

2節　Tol2ベクターの作製とトランスジェニック系統の作製

成体ゼブラフィッシュで安定して外来遺伝子を発現させ、特定の分子メカニズムをかく乱するために、トランスジェニックゼブラフィッシュの作製を行った。トランスジェニックの作製には、Tol2 トランスポゾンを用いた遺伝子組換え技法を用いた(18)。国立遺伝学研究所の川上研究室で開発されたpT2AL200R150Gプラスミドを基に、黒色素胞の発生・維持に必要である *Mitfa* 遺伝子(小眼球症原因遺伝子 *mitf* のゼブラフィッシュホモログ)のプロモーター配列 1.3kb を組み込んだ。このプロモーター配列を使うと黒色素胞特異的に遺伝子を強く発現させることができることは、先行研究により確認されていた(12，19，20)。Tol2認識配列に挟まれた遺伝子配列は、Tol2 トランポザーゼの働きによりゲノム中へと転移する。トランスジェニックフィッシュ F1世代で挿入した遺伝

子配列が維持されていることは、挿入配列特異的に増えるプライマーセットを用いて確認した。

上述の pTol2mitfapro-EGFP に、外来遺伝子（*cax1, agrp, hpca, deltaC, mhc1uba, igfbp1a*）のオープンリーディングフレーム（ORF）全長,*notch1a* の細胞内ドメイン（1745 V～2437K、*NICD1a*）の配列(21)を *mitfa* プロモーター下に組み込んだ遺伝子組換え用プラスミドを作製した(図9.A)。また、緑色蛍光タンパク質（EGFP）下流に 11 アミノ酸のリンカーと4アミノ酸の CAAX モチーフ（CVLM）(22-24)を組み込んだ、pTol2-mitfapro-EGFP:CAAX という細胞膜観察用のプラスミドを作製した(図9.B)。

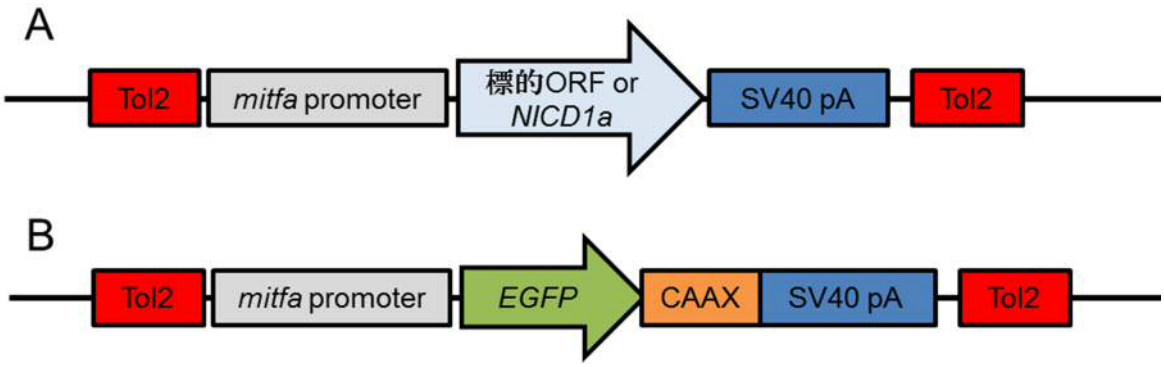

図9.トランスジェニックの作製に使用した Tol2 プラスミドの設計

遺伝子組換え用プラスミドは H_2O で希釈し1～10 ng/μl に調整し、標識用の Dye、Tol2トランスポザーゼの mRNA(25 ng/μl)と共に1～2細胞期ゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションした。

ゼブラフィッシュ自体は Tol2 トランポザーゼ遺伝子を持たないため、インジェクションした Tol2 トランスポザーゼ mRNA から翻訳された Tol2トランスポザーゼの働きによってのみ Tol2 トランスポゾンが起き、その後 Tol2 トランスポゾンは起こらなくなるため、安定したトランスジェニック系統が作製できる。

3節　色素胞の回収

色素胞間の遺伝子発現量を比較するために、黄色素胞と黒色素胞を分離して回収することにした。そのために、5匹の野生型ゼブラフィッシュの尾鰭と尻鰭を用いた。各鰭から黒ストライプ部分と黄ストライプ部分を色素胞が混じり合わないように切り分け、その後はそれぞれ別に処理した。各ストライプ部位を Trypsin 処理液（2.5 mg/ml trypsin, 1.2 mg/ml bovine serum albumin、1 mM EDTA）1ml 中に加え、28℃で 10 分間静置した。その後、各ストライプから Trypsin 処理液を除き 1×PBS 1ml で、5 分間 28℃1000rpm 振盪条件で 5 度洗浄した。次に各ストライプ部位を collagenase 処理液（0.1 mg/ml collagenase I, 0.1 mg/ml DNaseI, 0.1 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 1.2 mg/ml bovine serum albumin）500ul 中で、28℃、1,000rpm で 60 分間振盪した。ここまでの処理により、ストライプに含まれていた細胞がバラバラに分離する。

各ストライプ部位から得られた細胞懸濁液を、25μm 穴のナイロンメッシュでろ過し鰭条等の大きな構造を除いた。次に、ろ過した細胞懸濁液を 50%パーコール上に重層し28℃、30G、15 分間の条件で密度勾配遠心をした。この遠心により沈殿した細胞塊は、黄色素胞または黒色素胞を多く含んでいることを顕微鏡観察で確認した。この細胞塊を1×PBS で懸濁し、黒色素胞画分と黄色素胞画分を得た。

4節　色素胞間の遺伝子発現量比較

色素胞の分画により得られた黒色素胞画分と黄色素胞画分を RNeasy kit (Qiagen) を用い RNA を精製した。この操作の途中に RNase free DNase kit set (Qiagen)を用い、ゲノムDNAの除去する操作を行った。ここで得られたmRNAをもとに、SuperScript III First-Strand Synthesis system (Invitrogen)で total cDNA を合成した。逆転写には、Poly(T)プライマーを用いた。

黒色素胞画分より得られた cDNA と黄色素胞画分より得られた cDNA を鋳型として

EX-taq(TaKaRa)を用いて PCR を行った。PCR の条件は、95℃30秒、60℃30秒、72℃30秒の温度条件で Notch 受容体の解析では40サイクル、Notch リガンドの解析では45サイクルまわした。

各遺伝子発現量の比較実験において、cDNA 量の調節はβ-actin 発現量を比較することで行った。また、各細胞画分が正常に分画されていることは黒色素胞のマーカー遺伝子である *dct*(*dopachrome tautomerase*)、黄色素胞のマーカー遺伝子である *aox3*(*aldehyde oxidase 3*)を用いて確認した。PCR 操作のポジティブコントロールとして尾鰭・尻鰭の totalcDNA 用いた。

解析には、以下のプライマーセットを用いた。

遺伝子名 e	Forward primer	Reverse primer
dct	ATCAGCCCGCGTTCACGGTT	ACACCGAGGTGTCCAGCTCTCC
aox3	AGGGCATTGGAGAACCCCCAGT	ACACGTTGATGGCCCACGGT
notch1a	GTCTGCTGGAGTCGTGCGCC	ACAGCAGCCGCCCAGTGAAG
notch1b	ACCAGACAGACCGCACGGGT	ATGCCCTCGACCGCCAGTCT
notch2	CTGCACTGGGCTGCTGCTGT	TCCAGGACGCATGCCGAGGA
notch3	CAGGCCGTGAGACGCGCATT	GCTGTGTTCACGCTTGCGGC
deltaA	CGGCATCCACGTCGGCTTGT	GCCTACAGGCCACCACTGCC
deltaB	CTGCCGGCCGGGATTTGGAG	GTCGGTGGGCATCGGCAGAC
deltaC	GACCGGTGCAGCAGTGACCC	TGTGCCCATGAAGCCTGCCG
deltaD	AGCGACGGCGACAAAAACGGA	TGTGGCGTTACACCTCGGTTGC
delta-like4	AGTGTGACAGCAGCCCACGC	CTGGCCAGTGAAGCCCGCTC
β-actin	CGGTTTTGCTGGAGATGATG	CGTGCTCAATGGGGTATTTG

表.1 Notch 受容体とリガンドの発現解析に用いたプライマーセット

5節　DAPT 処理

N- [N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]- S - phenylglycine t-butyl ester (DAPT)は、Delta-Notch シグナル経路の伝達に重要な酵素である γ-secretase の働きを阻害する薬剤である。この薬剤を含む水槽中でゼブラフィッシュを飼育すること

により、ゼブラフィッシュの Delta-Notch シグナル経路の阻害を試みた。そのために、DMSO 中に 10mM になるように DAPT を溶解しこれをストックとした。このストックを 50ml 水槽水中に 50μl 添加し 10μM DAPT 水槽水を作り、この中で成体ゼブラフィッシュ（1～2 ヶ月齢）を15日間飼育した。なお、コントロールとして50μlの DMSO を50ml水槽水中に添加した水槽液中でも成体ゼブラフィッシュを飼育した。DAPT 水槽水は、3 日毎に交換しその際にゼブラフィッシュの写真を撮影した。15日間の DAPT 処理の後、DAPT を含まない水槽水中で3日間飼育しその後の写真を撮影した。 DAPT の効果の比較は、体幹中央部分の領域（図8）における黒色素胞の密度を比較することで行った。

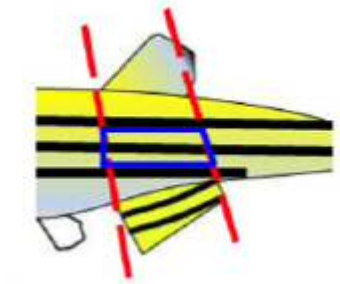

図10. DAPT の効果を検証するために設定した領域
尾鰭・背鰭の端と端が囲む領域（赤破線）の体幹中央の黒ストライプ部分（青枠）。この領域に存在する黒色素胞数を数え比較した。

6節　*notch1a* ナンセンス変異体（des^{th35b}）の解析

des^{th35b} ヘテロ個体同士を掛け合わせて des^{th35b} 変異体を得ることを試みた。受精卵の時点と1ヶ月齢の時点でそれぞれゲノムをとり、遺伝型を解析した。

7節　色素胞の観察

in vivo 条件下での色素胞の観察・細胞数計測は、その色素胞の持つ色素を基準に行った。 しかしながら、in vivo における色素胞内での色素の分布は常に一定ではなく時に近隣の色素胞との境界が曖昧になる場合があった。 そこで、今回 in vivo で色素胞を観察する際には、事前にゼブラフィッシュをエピネフリン（アドレナリン）を含む水槽水中に置くことにより、色素を細胞中央に凝集させて観察することとした。

また、in vivo における色素胞の概形を観察するために、ゼブラフィッシュをヨヒンビン（アドレナリンα2受容体遮断薬）を含む水槽水中に30分間暴露することにより、色素を色素胞中に広げさせた。

8節　レーザーに依る色素胞除去実験

黒色素胞維持での黄色素胞への依存を、WT とトランスジェニック間で比較するために黄色素胞のレーザー除去実験を行った。麻酔をかけたゼブラフィッシュをデッシュ上に寝かせ、このゼブラフィッシュに対して、顕微鏡に設置した MicroPoint pulse laser system (Photonic Instruments) を用い 440nm のパルスレーザーを照射した。 パルスレーザーは 1 つ黄色素胞に対し2、3回照射し、顕微鏡に依る観察でその破壊を確認した。その後は、1日毎に写真をとり黒色素胞の数の変化を計測した。

III章　結果と考察

1節　Delta-Notch シグナル経路は、模様形成に関与している

当研究室では先行研究として、Microarray を用いて黄色素胞と黒色素胞での発現遺伝子の網羅的解析を行っていた。私は、その中でも黄色素胞で発現が優勢な遺伝子に着目した。網羅的な解析のスコアで黄色素胞での発現が十分に大きく黒色素胞よりも 2.5 倍以上高い遺伝子で、かつ細胞間のシグナル伝達に重要または細胞膜上に発現しているタンパクをコードしている遺伝子の中から6遺伝子を候補遺伝子として選択した。

遺伝子名	黄色素胞　発現量スコア (X)	黒色素胞発現スコア(M)	発現スコア比 (X/M)
type II CAX Cation/proton exchanger (zgc:136271)	2592.3	83.8	30.9

similar to agouti related protein 2	2800.6	192.9	14.5
calcium channel inhibitor activity (zgc:73126)	953.7	88.8	10.7
deltaC	333.4	57	5.85
mhc class I UBA	1004.4	371.7	2.7
insulin like growth factor binding protein 1	2209.3	835.2	2.65

表.2 標的とした遺伝子と Microarray による発現スコア
発現スコアが黄色素胞で十分に大きく(300 以上)かつ、黒色素胞の発現スコアと比較した際に 2.5 倍以上黄色素胞での発現量が大きい遺伝子を候補遺伝子として選択した。

これら6つの候補遺伝子について、もしこれらの遺伝子が模様形成に関わっているならば、本来の発現が弱い黒色素胞で過剰発現させる事によりその働きのかく乱が起こり、体表模様に変化が合われるのではないかと期待しトランスジェニックフィッシュを作製した。各候補遺伝子の過剰発現トランスジェニックを10匹以上作製し、F0世代での体表模様を観察した。その結果、*deltaC* 遺伝子を黒色素胞で過剰発現させた場合[*Tg(mitfa:deltaC)*]にのみトランスジェニックの F0 世代に体表模様の乱れが見られた(図11.A)。この系統から得られた次代の F1世代には、縞模様ではあるものの黒ストライプ部分が太くなり、ストライプの本数が減少するという模様の変化が見られた(図11.B)。このことから、この *deltaC*が関わる分子メカニズムである Delta-Notch シグナル経路が模様の形成に何らかの関与があるものと考え以後の解析を行った。

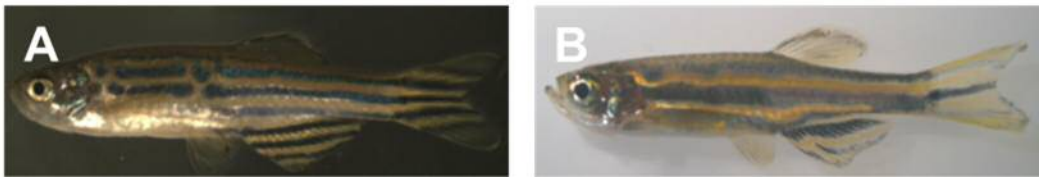

図 11.*deltaC* 黒色素胞過剰発現トランスジェニック系統の表現型
(A)F0 世代。所々ストライプが途切れている。(B)F1 世代。黒ストライプ部分が太くなり、ストライプの本数が減少している。

2節　黒色素胞は Notch 受容体を黄色素胞は Notch リガンドを発現している

模様形成における Delta-Notch シグナル経路の働きを調べるために、最初に色素胞で発現する Notch 受容体とリガンドの解析を行うことにした。以前の Microarray の解析においては、黄色素胞と黒色素胞間の重量の違いと黄色素胞が自家蛍光を持つことを用い、黄色素胞と黒色素胞を分画した。しかし、この方法に依る細胞分画法では多くの個体と時間を必要とし、色素胞以外の細胞が多く混ざっていた正確な遺伝子発現量を比較できないと考えた。そこで、当研究室の山中・網濱らと共同し、遺伝子発現量比較用の細胞分画法を考案した。その結果、最初に鰭を切り離す際に黒ストライプと黄ストライプを厳に切り分けることが、最も簡単に分画できることがわかった。更に細胞分画法を変えることで（材料と方法参照）、色素胞以外の細胞が混じることを抑えることができた。黒色素の合成に関わる遺伝子 *dct* と黄色素胞の合成に関わる遺伝子 *aox3* の発現がこの分画の結果をよく反映することもわかった。

この方法を用い黄色素胞と黒色素胞を分画し、Notch 受容体とリガンドの黄色素胞と黒色素胞で比較した。その結果、Notch 受容体の一つ *notch1a* が黒色素胞で発現量が大きく（図12.A）、Notch リガンドである *deltaC* と *delta-like4* が黄色素胞で発現量が大きいことがわかった（図12.B）。*deltaD*、*notch2* についても発現が見られたが、弱く混じった他の細胞に依る発現だと考えられた。また、*deltaC* が体表上では黄色素胞特異的に発現していることは、Washington University の Parichy 研究室でも確認されている。野生型と黄色素胞に欠損のある変異体（*csf1ra*$^{-}$）の *deltaC* 発現を in situ ハイブリダイゼーション法で比較した。その結果、野生型では黄色素胞の出来る領域に *deltaC* の発現が強く見られたのに対し、黄色素胞が欠損している *csf1ra* 変異体ではその発現は全く見られなかった（図 12.C,D）。

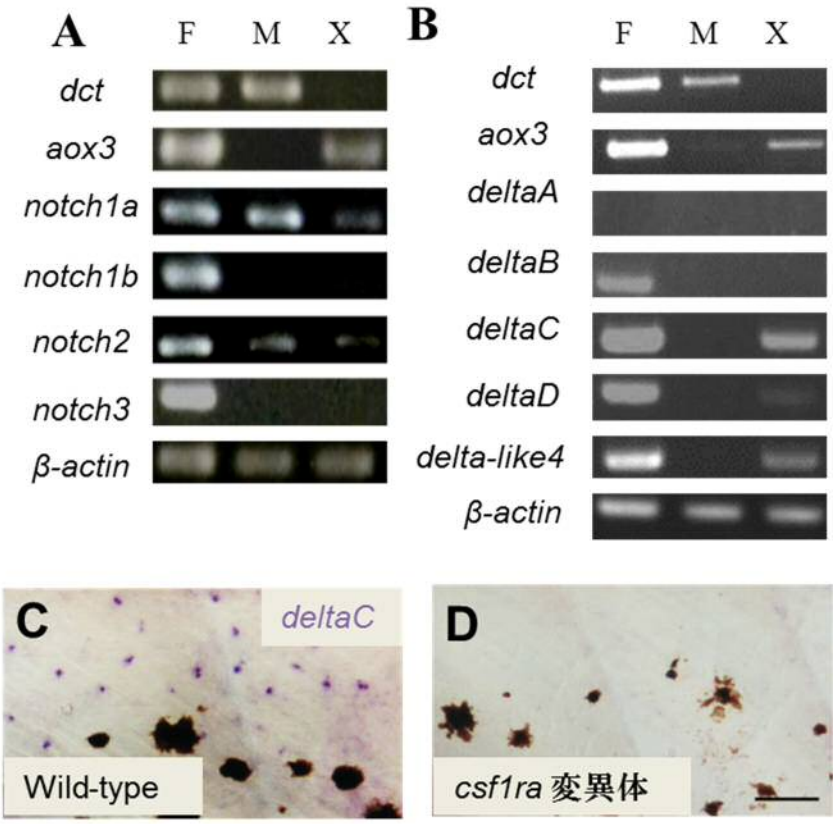

図 12. Notch シグナル経路関係遺伝子の遺伝子発現

(A,B) Notch 受容体 (A)、Notch リガンド (B) の色素胞における発現。鰭より回収した黒色素胞 (M) と黄色素胞 (X) での発現を比較した。ポジティブコントロールとして、鰭の cDNA (F) を使用した。黒色素胞と黄色素胞の分離が正常に行われていることは、各色素胞のマーカー遺伝子（黒色素胞：*dct*,黄色素胞:*aox3*）を用いて確認した。(C,D) *deltaC* を標的とした、in situ ハイブリダイゼーション法による発現解析。野生型 (C) と黄色素胞欠損変異体（*csf1ra*$^{-}$, D) とを比較した。スケールバー＝50μm。(C,D) は共同研究者である Washington University の Parichy 研究室で得られた結果。

黒色素胞では Notch 受容体が黄色素胞では Notch リガンドが多く発現していることがわかった。このことと in vivo における色素胞間の相互作用の知見から、黄色素胞と黒色素胞間に直接の Delta-Notch シグナルによる作用があるものと想定した。Delta-Notch のシグナルは、受容体とリガンドがどちらも細胞膜上に存在しているため

近距離でのシグナル伝達経路であることが知られていた。この Delta-Notch シグナル経路の模様形成現象における働きを知るために次に Delta-Notch シグナル経路の阻害を試みた。

*deltaC*と *notch1a*については、ナンセンス変異を持つ変異体が報告されている。しかしながら、*delaC* の変異体（dlc^{tit446}）は体表模様の変化も見られず(25),*notch1a* の変異体($notch1a^{th35b}$)は1ヶ月齢までに全て致死になるという表現型を示していた(図13)(26)。*notch1a* 変異体稚魚は、正常に浮袋が形成されないことが観察されこれが致死になる原因だと考えられる。この浮袋の異常は、他の notch1a 変異体でも浮袋の異常は見られている(27)。これらのことから、変異体を使った Delta-Notch シグナル経路阻害の解析は難しいと考えて、阻害剤である DAPT を使った解析を行うこととした。

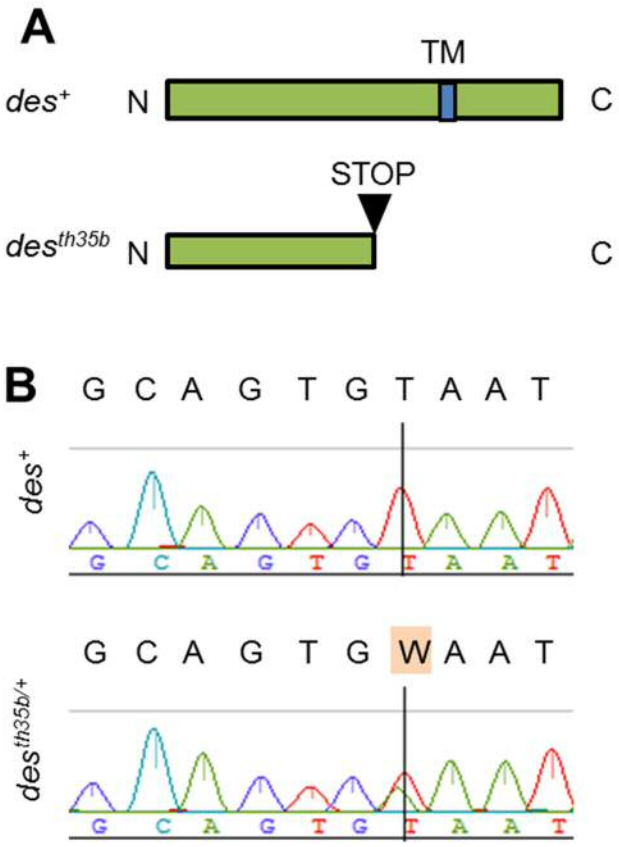

図１３．notch1a 変異体は致死性を示す

(A) notch1a のナンセンス変異体の一つ des^{th35b}。点突然変異により膜貫通領域(TM) よりも N 末端側に終止コドン（黒矢印）が挿入される。(B) $des^{th35b/+}$同士の掛け合わせに依って得られた次代の遺伝子型。成体（約１ヶ月齢）の遺伝型を調べた所、des^{+} (23 匹中 9 匹)、または $des^{th35b/+}$ (23 匹中 14 匹) しか見られなかった。

3節　Delta-Notch シグナル経路の阻害は黒色素胞の細胞死を引き起こす

先行研究により模様形成における色素胞の相互作用は一度模様が形成された後も継続されていることが知られていた(5)。γ-セクレターゼは、Delta-Notch シグナル経路の入力の際に行われる複数の Notch 切断に必須な酵素の一つであることが知られている。DAPT でこのγ-セクレターゼの機能が阻害されるために、Delta-Notch シグナル経路を阻害することができることが知られている(28, 29)。このDAPTを用いて、成体ゼブラフィッシュの Delta-Notch シグナル経路を阻害し、その効果からこのシグナル経路の色素胞における働きを解析することにした。

野生型のゼブラフィッシュを、15日間 DAPT を含む水槽水中で飼育した結果、黒色素胞数が段階的に減少し、15日間の暴露後には処理前の約60%にまで減少した(図14.A, 図15,C)。黒ストライプ内で黒色素胞が減少すると、その空白になった空間を埋めようと他の黒色素胞が移動し細い黒ストライプが形成される様子も見られた(図14.A)。通常黒色素胞は一度模様が形成された後はほとんど細胞死を起こすことはない(30)。このことから、黒色素胞の更新が阻害された為に黒色素胞の減少が起こったのではないと考えられた。更にこの黒色素胞の減少において、黒色素胞内の色素がクラスターを作り細胞表面に遊離している様子が観察された(図 15.A,B)。この色素の遊離は、色素胞の細胞死の際に見られることが知られており、DAPT による色素胞の減少は黒色素胞の細胞死により引き起こされたものと考えられた。またこの時、黄色素胞には目立った細胞数の減少は見られていない(図16)ことから、DAPT による細胞死は黒色素胞特異的であることがわかった。

15日のDAPT処理後に、ゼブラフィッシュをDAPTを含まない水槽水に移すとすみやかに黒色素胞が回復する様子が観察された(図 14. A,D、図 15.C)。このことから、黒色素胞の前駆細胞は今回のDAPTの暴露によって細胞死を起こすことはなかったと考えられる。

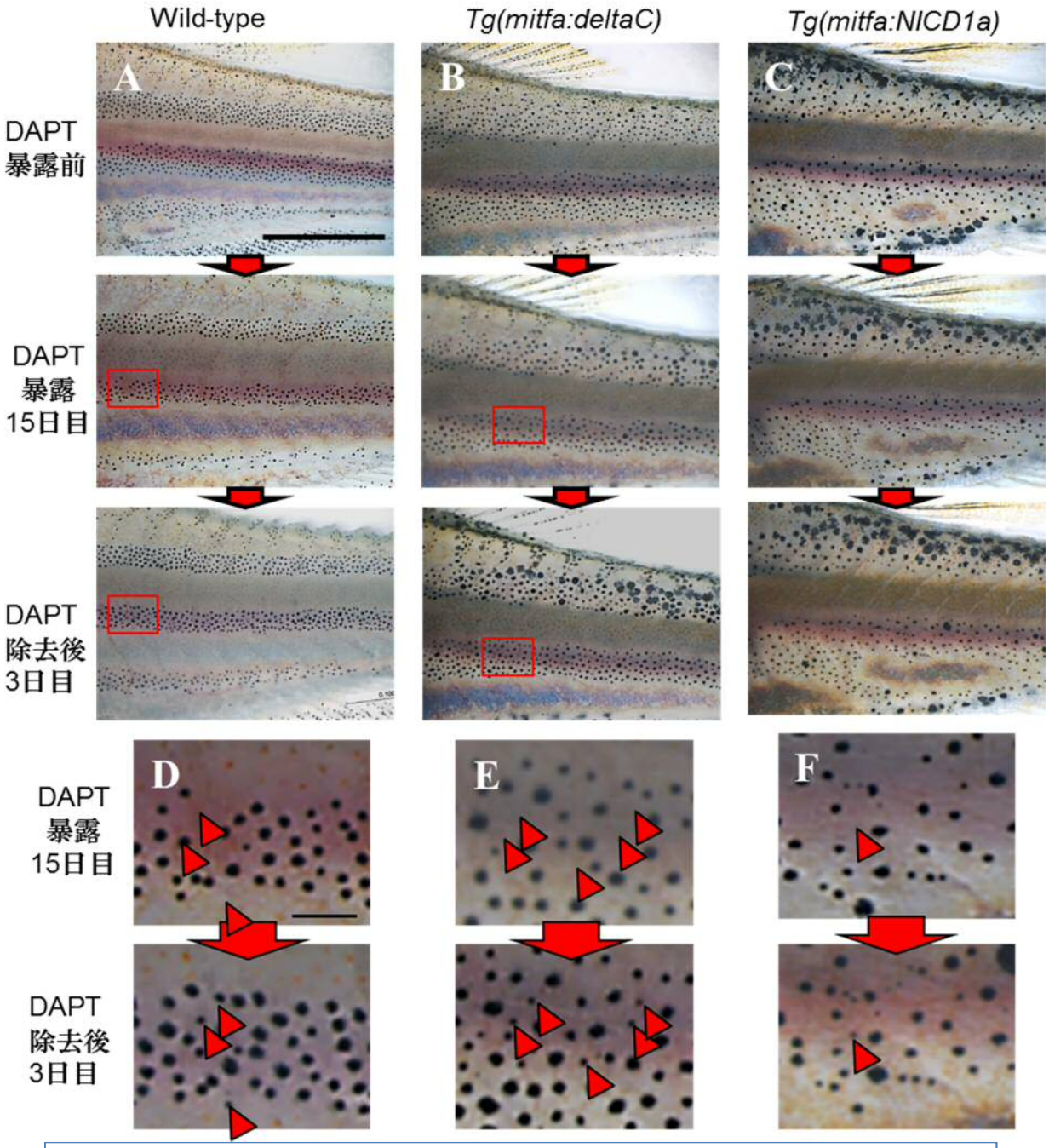

図 14. Notch シグナル阻害剤(DAPT)に依る効果

野生型(A,D)、黒色素胞 *deltaC* 過剰発現個体[*Tg(mitfa:deltaC)*](B,E)、 黒色素胞 Notch シグナル恒常活性化個体[*Tg(mitfa:NICD1a*](C,F)で比較した。(A-C)各個体の成体(写真上段)を DAPT を含む水槽水に 15 日間飼育し(写真中段)その後 DAPT を含まない水槽水で飼育した(写真下段)。(D-F)DAPT に 15 日間暴露後とその後 3 日間 DAPT 除去環境で飼育した後の比較(A-C,赤枠内を拡大)。赤矢頭は、DAPT 除去後に新しく発生した黒色素胞を示す。スケールバー＝1mm(A-C),100μm(D-F)

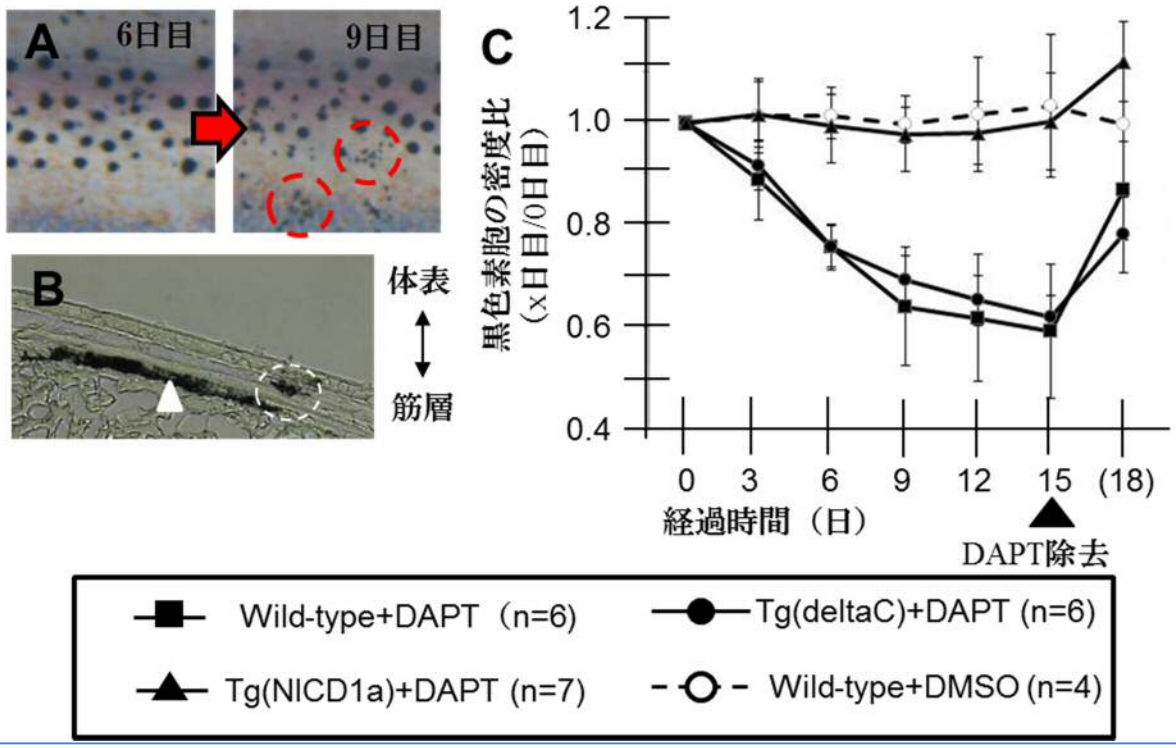

図 15. Notch 阻害に依る黒色素胞減少の様子

(A)DAPT 暴露 6 日目と 9 日目の比較。赤丸部分に見られる黒色素の拡散は黒色素胞が細胞死を起こした際に特異的に見られる。この付近で黒色素胞が減少していることも確認できた。(B)DAPT 暴露個体の凍結切片像。本来黒色素胞は真皮層と筋層の間に存在する（白矢頭）だが、そこからより体表側に浮き上がっている黒色素の塊（白丸）が観察された。(C)黒色素胞密度の経時的な変化。15 日間 DAPT に暴露した後（黒矢頭）、3 日間 DAPT 除去環境下で飼育した。エラーバーは標準偏差を表す。

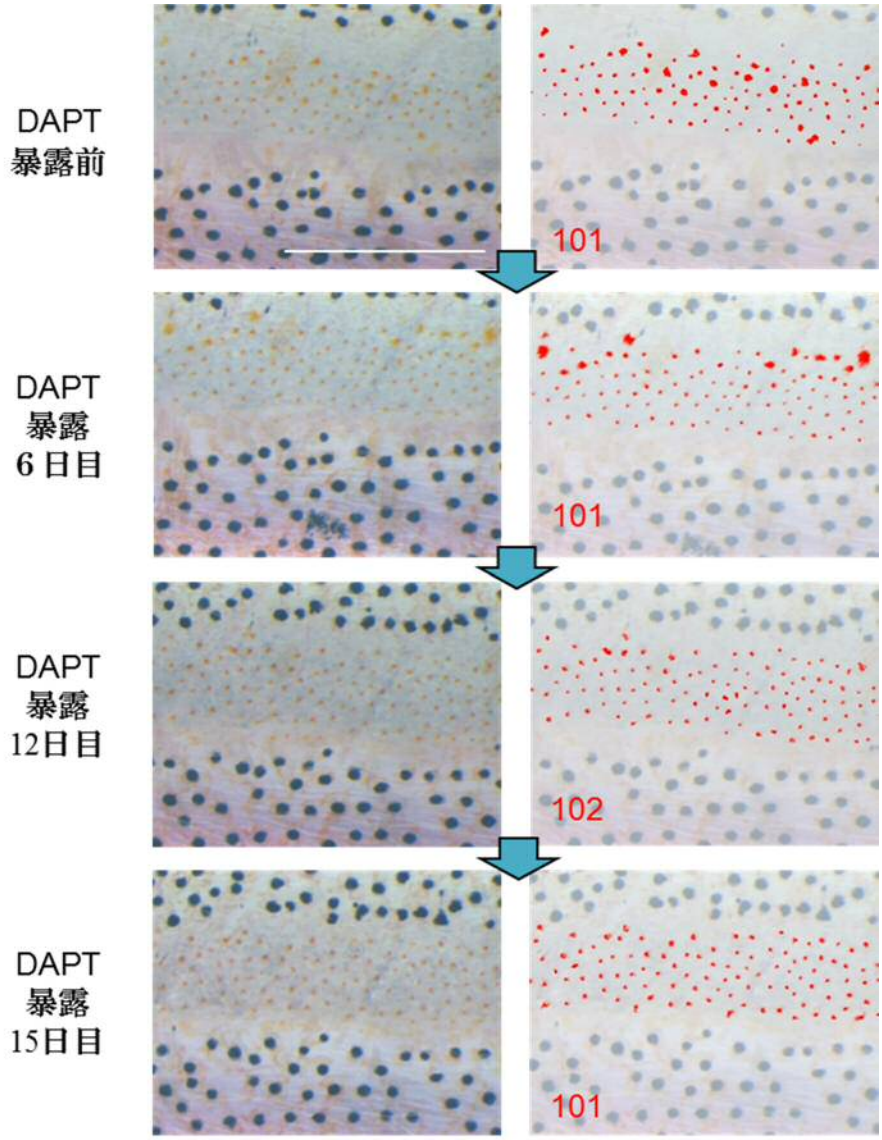

図 16. DAPT 暴露による黄色素胞への効果
野生型ゼブラフィッシュを DAPT に 15 日間暴露し、黄色素胞の数の変化を観察した。格段の左の図は観察時の写真、右の図はその写真中の黄色素胞を赤く色付けし見やすくしその数を計測した（左下数字）。スケールバー＝500μm

この結果は、Delta-Notch シグナル経路の働きが黒色素胞の生存を制御していることを示していた。この結果と先の Delta-Notch シグナル経路関連遺伝子の色素胞での発現、そして色素胞間には「黄色素胞による遠距離での黒色素胞の生存活性化」という関係が有ることから、このシグナル経路を介して黄色素胞が黒色素胞の生存を

制御しているという仮説をたてた。

4節　黒色素胞への Notch シグナル入力が黒色素胞の生存に重要である

その仮説を実証するために、黒色素胞での Notch シグナル入力の働きを調べることにした。そのためにまず新たなトランスジェニック系統を作製した。Delta-Notch シグナルはその伝達過程において、Notch 発現細胞内で Notch 受容体の細胞内ドメイン（NICD）が切り離されて細胞核へと移行することが重要であることが知られている(16)。そこで、黒色素胞特異的に *Notch1a* の NICD（*NICD1a*）を発現させることにより、黒色素胞に恒常的に Notch シグナルの入力が起こっているという状況を作ることにした(21)［*Tg(mitfa:NICD1a)*］。

このトランスジェニック系統の F1世代においても先に作製した黒色素胞特異的に *deltaC* 過剰発現させた個体［*Tg(mitfa:deltaC)*］同様に、野生型に比べて黒ストライプ部分が太くなりストライプの本数が減少しているという表現型を示した(図17.A-D)。しかし *Tg(mitfa:deltaC)* においては黒色素胞の密度の上昇が見られたのに対し、*Tg(mitfa:NICD1a)* ではそのような密度の上昇は見られなかった（図17．E）。このような違いがどうして現れたかについては不明である。

DAPT により阻害されるγ-セクレターゼは Notch リガンドと Notch 受容体の結合後 NICD の切断を司っていることがわかっている。このため、過剰発現させた *deltaC* によって Notch シグナルを活性化させている *Tg(mitfa:deltaC)* は DAPT に依る影響を受けるが、恒常的に NICD を発現させることで Notch シグナルが活性化されている *Tg(mitfa:NICD1a)* には、DAPT の効果が無いと予想された。そこで *Tg(mitfa:deltaC)* と *Tg(mitfa:NICD1a)* を野生型と同様に DAPT で15日間処理した結果、*Tg(mitfa:deltaC)* においては野生型同様の黒色素胞の減少が見られたものの、*Tg(mitfa:NICD1a)* において黒色素胞はほとんど減少しなかった（図14．B,C，図 15.C）。

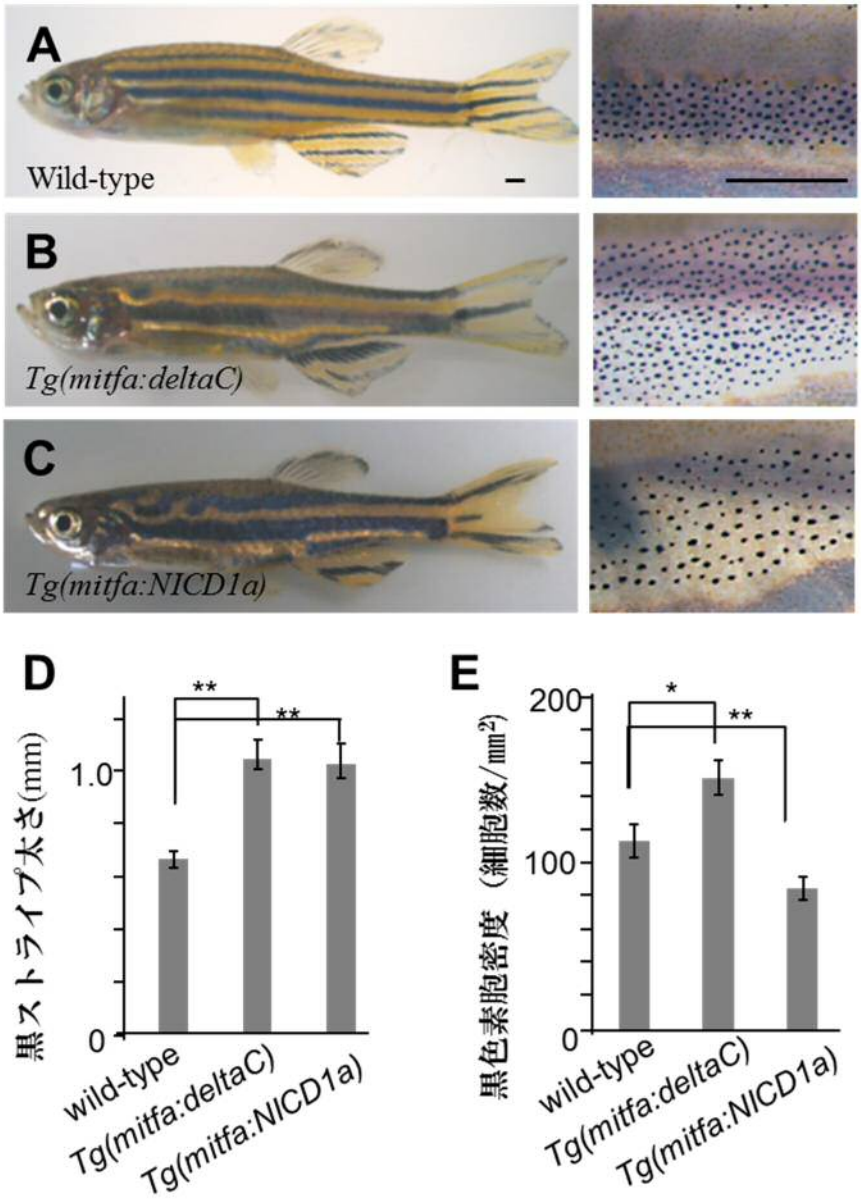

図 17.Notch シグナル活性化に依る体表模様の変化
(A-C)体表模様の比較、右は体幹中央部の拡大写真。野生型(A)、トランスジェニック、DeltaC 過剰発現系統（図 8 と同じ、B)、Notch 恒常活性系統(C)。(D,E)黒色素胞の黒ストライプ部分での幅(D)と黒ストライプ部分の黒色素胞密度(E)。(n=12,エラーバーは標準偏差を示す。*:P＜0.005、**:p<0.001 であることを T 検定により求めた)。スケールバー＝1mm

黒色素胞への Notch シグナルの入力を回復することで、DAPT による黒色素胞の細胞死誘導をほぼ無効化することができたことから、黒色素胞への Notch シグナル入力

が黒色素胞の生存にポジティブに働いていることがわかった。これは先行するマウスでの研究結果と一致した。成体マウスに置いても黒色素細胞の生存は、黒色素細胞自身への Notch シグナルの入力が重要であるいうことがわかっていた(31)。ゼブラフィッシュでも同様に、通常黒色素胞への Notch シグナルの入力がありそれが黒色素胞の生存を維持しているのだと考えられた。では、この黒色素胞への Notch シグナルの入力は黄色素胞により引き起こされているものなのだろうか？

5節　黒色素胞での Notch シグナル活性化は、黄色素胞の消失による黒色素胞の細胞死を回避する

序論でも述べた通り先行研究において、近隣の黄ストライプが消失することにより黒色素胞の細胞死が誘発されることがわかっており(9，15)、これが色素胞間に「黄色素胞による遠距離での黒色素胞の生存活性化」という関係性があることの大きな証拠となっていた。では、黒色素胞特異的に Notch シグナルを恒常活性化した個体[*Tg(mitfa:NICD1a)*]においても、この現象は観察されるのだろうか？もし、黄色素胞が黒色素胞の Notch シグナル入力に寄与しているならば、*Tg(mitfa:NICD1a)*では黄色素胞の消失に依る影響は少なくなるものと予測された。

そこで、レーザーによる黄ストライプに依る除去実験を野生型と *Tg(mitfa:NICD1a)*において行い、その結果を比較した。レーザー除去実験は成体ゼブラフィッシュで行い、1 つの黒ストライプ部分を挟む 2 本の黄ストライプ部分に含まれる黄色素胞を除去した(図18．A,B)。野生型では、この処理を行うと処理後 8 日目までに黒色素細胞の約 3 割が細胞死を起こすのに対し、*Tg(mitfa:NICD1a)*ではその様な細胞死はほとんど観察されなかった(図18．C-E)。

このことから、黒色素胞における Notch シグナルの恒常活性化は、黄色素胞消失による黒色素胞の細胞死を回避することができることがわかった。この黒色素胞の生存

が黄色素胞に依存しなくなることが、先の2種類のトランスジェニック系統における模様の変化を起こしたのだろうと推測された。つまり、本来黄色素胞から離れては生存できない黒色素胞が、Notch シグナルが恒常的に活性化されることにより黄色素胞から離れても生存できるようになり、黒ストライプが太くなるような模様になったのだと考えられた。

これらの結果は、黄色素胞が黒色素胞の生存のために Delta-Notch シグナルを使用していることを示唆している。しかし、「黄色素胞による遠距離での黒色素胞の生存活性化」は直接接触の見られない黒色素胞の生存も維持していることがしている事がわかっている(9)。この作用の実態として、隣接する細胞間でのシグナル伝達が主である Delta-Notch シグナル経路を考えることは難しかった。

ショウジョウバエの剛毛の位置決定は、Notch シグナル経路の働く有名な形態形成現象の一つである(16)。シート状に並んだ均一な細胞の中から剛毛原基細胞となる細胞が決定されるが、この剛毛原基細胞は隣り合うことはない。これは剛毛細胞が近隣の細胞の剛毛原基細胞への分化を Notchシグナル入力することで阻害するためであることが知られている。近年この形態形成現象において、剛毛原基細胞が長い仮足を出し見た目上接触していな細胞とも仮足を通して接触し、遠距離で他の剛毛原基細胞への分化を阻害していることがわかってきた(32)。これは Delta-Notch シグナル経路が離れた細胞間でも働くことを示唆している。

現象は違うものの、色素胞間の相互作用においてもこのような仮足を通して離れた黄色素胞、黒色素胞間に接触がありこれを通じて Delta-Notch シグナル経路が伝達されているのではないかと予想した。その仮説を検証するために、in vivo における色素胞の形態をより詳細に観察することにした。

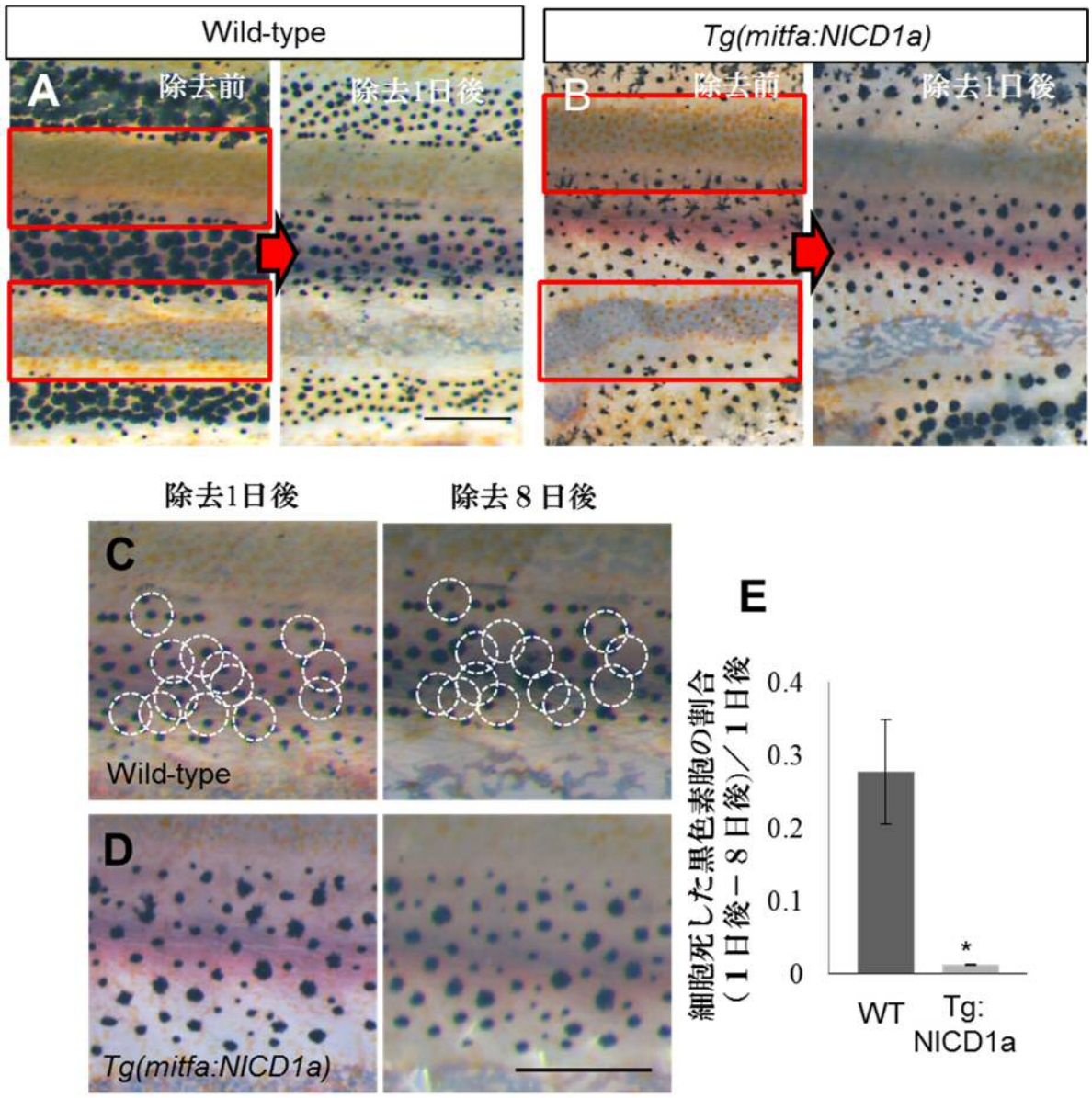

図 18.黄色素胞除去に依る効果の比較

(A,B)黄色素胞除去操作。野生型(A)と Notch シグナル恒常活性化トランスジェニック系統「*Tg(mitfa:NICD1a)*、B]の黄色素胞を1～2mm に渡り除去した(写真左、赤枠内)。除去後3日後(写真左)を見ると除去した領域は色素胞が殆ど見られなくなっている。(C,D)黄色素胞除去に依る黒色素胞への影響。白丸は1日後と8日後を比べて細胞死を起こした黒色素胞を示している。(E)細胞死を起こした黒色素胞の割合。[野生型(WT、n=4)。トランスジェニック(Tg:NICD1a、n=7)。エラーバーは標準偏差を示す。*:$p<0.001$ であることを検定により求めた。スケールバー＝0.5mm

6節　黒色素胞は、黄色素胞に対して長い突起を伸ばしている

黄ストライプと黒ストライプの境界部分を観察すると、そのストライプの境界には色素胞の存在しない領域があり（図 19．A）これを境に黄色素胞と黒色素胞をきっちりと別れて分布している。しかし、色素を細胞内に十分拡散させ色素胞の概形を観察できるようにすると、 色素胞内の色素がこの境界を超えている様子が観察でき、色素胞はストライプ間の境界を超えて存在している事がわかる（図19．B）。だが、この方法では一つずつの色素胞を観察することができず、どこにある色素胞が境界を超えているのかはっきりとはわからない。

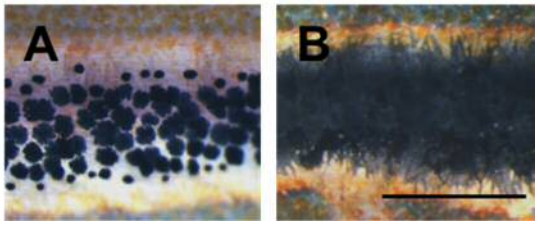

図 19．黒色素胞の観察
通常の黒色素胞（A）とヨヒンビンに30 分間暴露した後の黒色素胞（B）。ヨヒンビンの暴露により、黒色素胞内の色素が細胞内に拡散している。スケールバー＝１㎜

CAAX モチーフは、Rho タンパク等の細胞膜局在を支持する有名なモチーフである(33，34)。このモチーフを緑色蛍光タンパク（EGFP）の C 末端側に付けることにより、細胞膜に EGFP を局在させることができる(23，24)。そこで、このように設計した細胞膜結合型の EGFP を黒色素胞特異的に発現させるトランスジェニック系統を作製した。この系統は F0 世代においてキメラとなるため、一部の黒色素胞のみで細胞膜に EGFP が局在する状態となり、個々の黒色素胞細胞膜の観察が容易になると考えられた。

ゼブラフィッシュ変異体の一つである、*brass* 変異体は黒色素の形成ができないことが知られており、このために黒色素胞が透明となっている。しかし、体表模様の形成に異常はなく黒色素胞と黄色素胞のストライプ模様は正常に形成されている。そのため、模様形成に関わるメカニズムはこの変異体でも正常に働いていることがわかる。そこで今回、黒色素胞の細胞膜の観察をより明確に行うためにこの変異体をトランスジェニッ

ク系統のバックグラウンドとしてもちいた。

このトランスジェニック系統を観察すると、予想されたとおり黒色素胞の概形をはっきりと観察することができた（図 20．A-D）。これらの黒色素胞の概形の観察の結果、ほとんどの黒色素胞は長い突起状の構造を伸ばしていることがわかった。この突起状の構造は黒色素胞の存在する位置に関係なく存在していて、黒ストライプと黄ストライプの境界にある黒色素細胞でも（図 20．A）、黒ストライプ内部の黒色素細胞でも（図20．B）同様な構造を持っていることがわかった。

また、この突起構造はそのほとんどが方向性を持って伸ばされていた。黒ストライプ部分の中央から背側にある黒色素胞は背側へ、腹側にある黒色素胞は腹側へとその突起構造が伸びていた（図 20．A、B）。このような性質から、この突起構造は近い黄色素胞に対して伸ばされているものと考えられた。実際に、黒ストライプが途切れた部分にある黒色素胞は背腹軸に関係なく、最も近い黄色素胞のある方向へと伸びた突起構造を持っていた（図 20．C）。

また、黄色素胞が欠損している変異体（*csf1ra* 変異体）でも同様に黒色素胞の細胞膜の観察を行ったが、この変異体の黒色素胞はほとんど突起を伸ばす様子が見られなかった（図 20．E）。このことから、黒色素胞の突起構造の形成は黄色素胞に強く誘引されていることが推測された。

このトランスジェニック系統の F0 世代では、まれにではあるが細胞膜移行型 EGFP の黄色素胞での発現も起こった。この黄色素胞を観察するとその多くは、黒色素胞の場合と違い突起のような構造は出していないものの（図 20．F）、稀に黄色素胞にも突起のような構造を伸ばしている細胞があることも観察できた（図 20．G）。

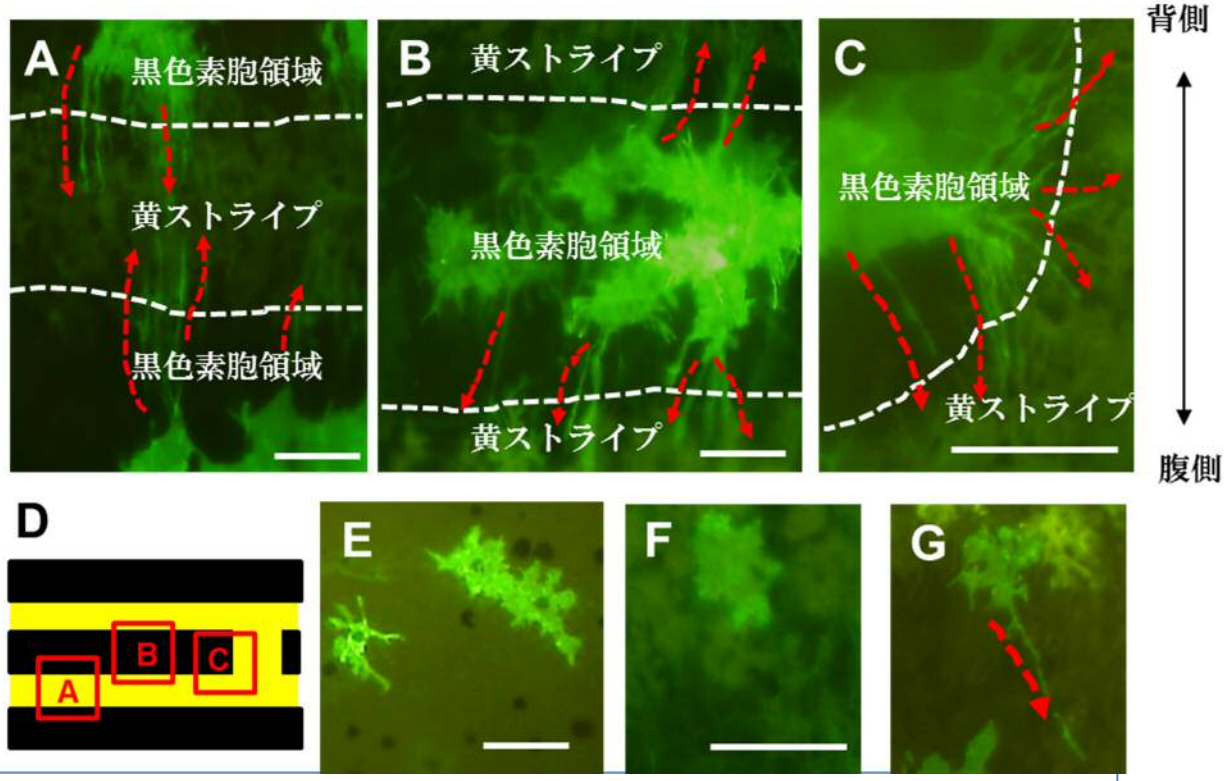

図 20.色素胞に見られる突起状構造
(A-D)黒色素胞の突起構造。黒色素胞特異的なプロモーター制御下で、細胞膜移行シグナルをつけた緑色蛍光タンパク質(EGFP：CAAX)を発現させた。(A-D)黒色素を作れない変異体(*brass*)に導入した結果。(D)で示されるような領域を観察した。黄ストライプの内部まで黒色素胞の突起構造（赤矢印）が伸びており(A)、黒ストライプの中央部にある黒色素胞も突起を伸ばしており(B)、黒ストライプが途切れている部分では頭尾軸側に沿わず突起を伸ばしている(C)。(E)黄色素胞欠損変異体（*fms*)の黒色素胞に EGFP：CAAX を発現させた。この変異体の黒色素胞には突起状の構造は見られなかった。(F,G)黄色素胞の突起構造。上記のような遺伝子導入を行った際、稀に黄色素胞でも EGFP:CAAX が発現してしまう場合がある。これを観察すると黄色素胞の多くは突起のような構造は見られない(F)ものの、まれに突起構造(赤矢印）を持つものも観察できた(G)。スケールバー＝100μm

今回の観察により、黒色素胞は離れた黄色素胞と直接接触可能な構造を持つことがわかった。しかしながら、先行する研究の中で黄ストライプと黒ストライプの間には虹色素胞が存在いることが観察されていた(図21．A)(35)。そこで、今回新たに大阪大

学内の超高圧電子顕微鏡センターにこのストライプ間の電子顕微鏡観察を依頼した。その結果、ストライプの境界にある虹色素胞の合間を通り抜けて、黒色素胞が長い突起状構造を伸ばしていることが観察された（図21. B,C）。

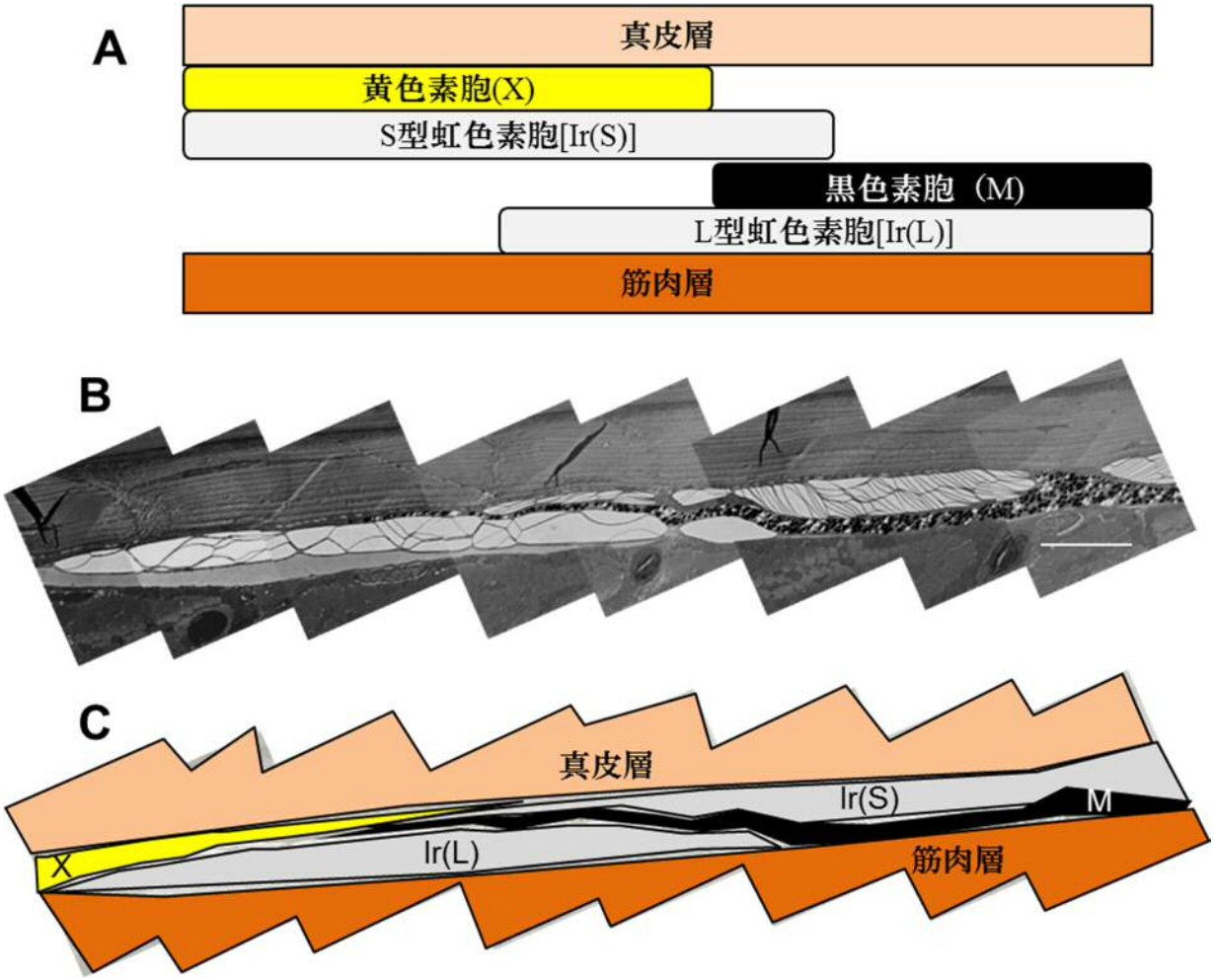

図 21.模様形成部分の電子顕微鏡観察
(A)平田等により示された従来の色素胞の配置モデル。黒色素胞と黄色素胞の間にはS 型虹色素胞があり、直接の接触はないように思われた。(B,C)新たな電子顕微鏡観察結果。黒ストライプと黄ストライプの境界面を観察した写真と(B)その模式図(C)。黒色素胞の突起が、S 型虹色素胞を通り抜けて黄色素胞に接近している。スケールバー＝10nm

IV章　総括

1節　結果のまとめと考察

今回の研究から、黄色素胞と黒色素胞それぞれに Delta-Notch シグナル経路の Notch リガンド（*deltaC*, *delta-like4*）と Notch 受容体（*notch1a*）が発現しているおり、このシグナル経路の入力が黒色素胞の維持を助けていることがわかった。また、黒色素胞内で Notch シグナルの入力を恒常的に活性化することで、黒色素胞の生存に黄色素胞は必須ではなくなった。更に、黄色素胞に対して黒色素胞から長い突起上の構造が伸びていることを発見した。

これらの結果から、in vivo で観察されていた「黄色素胞による遠距離での黒色素胞の生存活性化」が、黄色素胞から黒色素胞への直接的な Delta-Notch シグナル経路の入力を介して行われていることが考えられた（図22）。

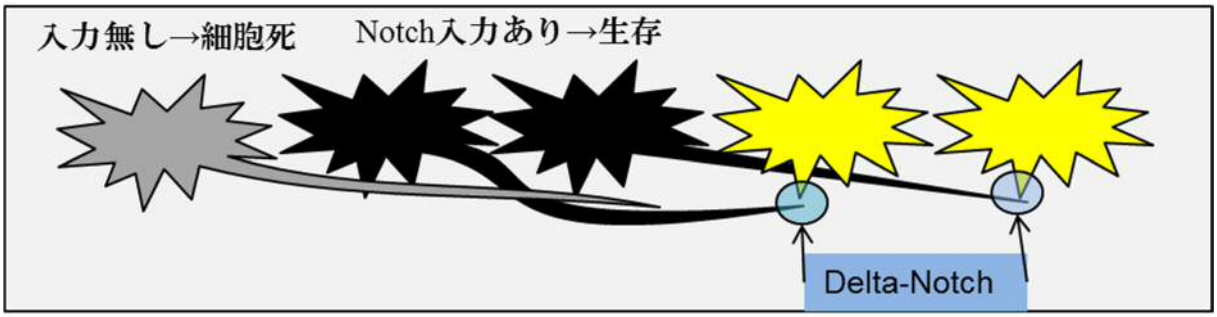

図 22.黒色素胞の生存制御メカニズム仮説
黒色素胞はながい突起状構造をもち、この構造が黄色素胞と接触するとその先端で Delta-Notch シグナル経路の入力が起こる。この入力があった黒色素胞のみが生き残り、入力が無いつまり突起が黄色素胞に接触していない黒色素胞は細胞死を起こす。

2節　今後の課題

今回の研究において黒色素胞の生存が Notch シグナルの入力により維持されていることは分かった。しかし、このシグナルの入力ソースが黄色素胞に発現している Notch リガンドであることは証明できていない。このことを証明するためには、黄色素胞特異的に *deltaC* と *delta-like4* 遺伝子をノックダウンしてその効果を解析するしかない。

また、このシグナル入力後のどのような遺伝子制御が黒色素胞の生存に重要である

かもまだわかっていない。これを証明するためには、野生型と Notch シグナルを阻害した個体で、黒色素胞同士を Microarray 解析で比較するという方法が考えられる。しかし、Notch シグナルの阻害により黒色素胞は細胞死し、更に Notch シグナルの阻害個体自体の取得が難しく、Notch シグナル阻害した個体から遺伝子発現の網羅的な解析に十分な黒色素胞を多く集めることが難しい。

今回黄色素胞へと伸びる黒色素胞の突起状構造を観察することができたが、この構造と模様形成との関わりはいまだによくわからない。突起構造の観察は 1 だけに黒色素胞に偶々膜融合型EGFP が発現することで観察できているので、狙った位置の黒色素胞を観察することが難しい。また、この構造がどのような細胞内骨格を用いて出来ているのかも全くわかっていない。今後は、この突起構造をより観察しやすい実験系の構築とこの構造の解析をおこないたい。そして、この構造の長さ、方向性を変えた時に模様がどのように変化するのかを調べたい。

また、この突起構造の方向性がどのように決定されているのかも不明である。今回観察した突起構造はほとんど近い黄色素胞に対して伸びていた。しかしながら、この形成過程は未だにはっきと観察出来ておらず、どのように構造の方向性が決定されていくのかわからない。今後は、この構造の出来る過程を観察することで方向性がどのように決定されて行くのか観察したい。

また先行研究により、黄色素胞と黒色素胞の接触により黒色素胞の移動が活性化されることが、反応拡散モデルでの「近距離での活性化」の実態の一つとして提唱されていた(12)。つまり、黒色素胞は近距離にある黄色素胞は忌避するが、今回見られたように遠距離にある黄色素胞には誘引されるという距離に依る反応の違いがあることになる。これらの黒色素胞の黄色素胞に対する反応の違いがどのように形成されてくるか、またどのように模様形成に重要になるかについても今後の課題となるだろう。

3節　反応拡散モデルの実態としての Delta-Notch シグナル経路

ゼブラフィッシュ体表模様形成の有力なモデルとして黒色素胞と黄色素胞の反応拡散モデル（図7）が提唱されてきた、このモデルにおいて「黄色素胞の遠距離での黒色素胞の生存活性化」の実態としては、拡散性の分子を介したものを想定していた。しかしながら、今回の結果は Delta-Notch シグナル経路による直接的な接触に依って生存の活性化が行われていることを示唆した。

しかし、今回の結果だけでは Delta-Notch シグナル経路が「黄色素胞の遠距離での黒色素胞の生存活性化」の実態であるとは断定できない。今後の継続的な研究により、この作用全体に関わる様々な分子の働きの解明が進めば Delta-Notch シグナル経路の働きもより明確に解明されていくだろうと期待される。

参考文献

1. Turing AM (1952) The chemical basis of morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 237(641):37-72.
2. Gierer A & Meinhardt H (1972) A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* 12(1):30-39.
3. Meinhardt H (1982) *Models of biological pattern formation* (Academic Press, London) pp xi,230p.
4. KONDO S & ASAI R (1995) A REACTION-DIFFUSION WAVE ON THE SKIN OF THE MARINE ANGELFISH POMACANTHUS. *Nature* 376(6543):765-768.
5. Asai R, Taguchi E, Kume Y, Saito M, & Kondo S (1999) Zebrafish leopard gene as a component of the putative reaction-diffusion system. *Mech Dev* 89(1-2):87-92.
6. Yamaguchi M, Yoshimoto E, & Kondo S (2007) Pattern regulation in the stripe of zebrafish suggests an underlying dynamic and autonomous mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(12):4790-4793.
7. Parichy DM (2007) Homology and the evolution of novelty during Danio adult pigment pattern development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308(5):578-590.
8. Maderspacher F & Nüsslein-Volhard C (2003) Formation of the adult pigment pattern in zebrafish requires leopard and obelix dependent cell interactions. *Development* 130(15):3447-3457.

9. Nakamasu A, Takahashi G, Kanbe A, & Kondo S (2009) Interactions between zebrafish pigment cells responsible for the generation of Turing patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(21):8429-8434.
10. Takahashi G & Kondo S (2008) 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(6):677-686.
11. Iwashita M*, et al.* (2006) Pigment pattern in jaguar/obelix zebrafish is caused by a Kir7.1 mutation: Implications for the regulation of melanosome movement. *PLos Genet.* 2(11):1861-1870.
12. Inaba M, Yamanaka H, & Kondo S (2012) Pigment pattern formation by contact-dependent depolarization. *Science* 335(6069):677.
13. Johnson SL & Zon LI (1999) Genetic backgrounds and some standard stocks and strains used in zebrafish developmental biology and genetics. *Methods Cell Biol* 60:357-359.
14. Parichy DM, Ransom DG, Paw B, Zon LI, & Johnson SL (2000) An orthologue of the kit-related gene fms is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, Danio rerio. *Development* 127(14):3031-3044.
15. Parichy DM & Turner JM (2003) Temporal and cellular requirements for Fms signaling during zebrafish adult pigment pattern development. *Development* 130(5):817-833.
16. Kopan R (2010) *Notch signaling* (Academic, Amsterdam ; London) pp xvi, 530 , [524] of plates.
17. Andersson ER, Sandberg R, & Lendahl U (2011) Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* 138(17):3593-3612.
18. Urasaki A, Morvan G, & Kawakami K (2006) Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* 174(2):639-649.
19. Lister JA, Robertson CP, Lepage T, Johnson SL, & Raible DW (1999) nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development* 126(17):3757-3767.
20. Watanabe M*, et al.* (2006) Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene. *EMBO Rep.* 7(9):893-897.
21. Del Monte G, Grego-Bessa J, Gonzalez-Rajal A, Bolos V, & De La Pompa JL (2007) Monitoring Notch1 activity in development: Evidence for a feedback regulatory loop. *Dev. Dynam.* 236(9):2594-2614.
22. Casey PJ & Seabra MC (1996) Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* 271(10):5289-5292.
23. Gomes AQ*, et al.* (2003) Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif. *Mol Biol Cell* 14(5):1882-1899.
24. Wright LP & Philips MR (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications.

CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res* 47(5):883-891.

25. Jülich D*, et al.* (2005) beamter/deltaC and the role of Notch ligands in the zebrafish somite segmentation, hindbrain neurogenesis and hypochord differentiation. *Dev Biol* 286(2):391-404.
26. Holley SA, Jülich D, Rauch GJ, Geisler R, & Nüsslein-Volhard C (2002) her1 and the notch pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis. *Development* 129(5):1175-1183.
27. Liu KS, Gray M, Otto SJ, Fetcho JR, & Beattie CE (2003) Mutations in deadly seven/notch1a reveal developmental plasticity in the escape response circuit. *J Neurosci* 23(22):8159-8166.
28. Dovey HF*, et al.* (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J. Neurochem.* 76(1):173-181.
29. Geling A, Steiner H, Willem M, Bally-Cuif L, & Haass C (2002) A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep.* 3(7):688-694.
30. Parichy DM & Tumer JM (2003) Zebrafish puma mutant decouples pigment pattern and somatic metamorphosis. *Dev. Biol.* 256(2):242-257.
31. Moriyama M*, et al.* (2006) Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J. Cell Biol.* 173(3):333-339.
32. Cohen M, Georgiou M, Stevenson NL, Miodownik M, & Baum B (2010) Dynamic Filopodia Transmit Intermittent Delta-Notch Signaling to Drive Pattern Refinement during Lateral Inhibition. *Dev. Cell* 19(1):78-89.
33. Trueblood CE*, et al.* (2000) The CaaX proteases, Afc1p and Rce1p, have overlapping but distinct substrate specificities. *Mol Cell Biol* 20(12):4381-4392.
34. Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, & Philips MR (2012) Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 13(1):39-51.
35. Hirata M, Nakamura K, Kanemaru T, Shibata Y, & Kondo S (2003) Pigment cell organization in the hypodermis of zebrafish. *Dev Dyn* 227(4):497-503.
36. Shoji H*, et al.* (2003) Origin of directionality in the fish stripe pattern. *Dev Dyn* 226(4):627-633.

謝辞

本研究は大阪大学大学院生命機能研究科パターン形成研究室において行った。研究に際しては、近藤滋教授、渡邉正勝准教授を始めパターン形成研究室の方々に、快適な実験環境、実験方法の指導、そして研究における有意義な示唆等、多大なご支援を頂いた。また、in situ ハイブリダイゼーションについては Washington

University の Parichy 研究室に所属していた Hiu Eunice Lau 氏が、電子顕微鏡観察については大阪大学超高圧電子顕微鏡センターの西田倫希特任研究員がデータの取得、提供をして下さった。トランスジェニックの作製に用いた Tol2 ベクターは国立遺伝学研究所・初期発生研究部門の川上浩一教授から分与を受けた。研究を支えてくださったこれらの方々にこの場を借りて、感謝を述べます。

以上の内容は、Development 誌に掲載された。(http://www.biologists.com)

業績

学会発表

7th European Zebrafish meeting (Poster presentation) 2013/7/6

Notch-Delta signal has critical role in the stripe pattern formation in zebrafish.

Hiroki Hamada, Masakatsu Watanabe, Shigeru Kondo

主著論文

Hamada H, et al. (2014) Involvement of Delta/Notch signaling in zebrafish adult pigment stripe patterning. Development 141(2):318-324.