The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	黒色素胞の柔軟な挙動が体表模様形成の頑強性に資する
Author(s)	澤田, 莉沙
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73481
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

平成 31 年度 博士論文

黒色素胞の柔軟な挙動が体表模様形成の頑強性に資する

Flexibility of pigment cell behavior permits the robustness of skin pattern formation

令和元年 6 月修了

時空生物学講座　パターン形成研究室

澤田　莉沙

Abstract

Zebrafish have striped pigmentation pattern in most of the body regions. In regardless of the environmental difference among each skin regions, the resulting patterns made by the pigment cells are very similar. This fact suggests the robustness of the patterning mechanism. However, recent observation of the process of pattern formation showed that the cellular behavior is substantially different on the timing and position in the body. This raised the possibility that different mechanism could be operate in different environment. To address this question, we investigated the behavior of melanophores at various environment; different developmental stages, different body positions and different genetic back grounds. Normally, when embryonic melanophores are excluded from the yellow stripe in the body trunk, two different cellular behaviors are observed. Melanophores migrated to join the black stripe or disappeared though apoptosis. In the environments where the melanophore migration is restricted, we observed that most melanophores are disappeared (dead) at their position, resulting the complete exclusion of melanophore in the yellow stripe. In the environments where the cell death of melanophores is restricted, most melanophores migrated to join the black stripes, resulting also the complete exclusion. When both migration and cell death is restricted, melanophores remained alive in the yellow stripes. These results showed that the migration and the cell death complement each other in the exclusion of melanophore. This flexibility is assumed to be the basis of the mechanistic robustness of skin pattern formation.

要旨

ゼブラフィッシュは、体表と鰭に縞模様をもつ。この色素胞によってつくられる縞模様は、その模様形成をとりまく条件が異なる場合でも、同じ縞模様を形成する。しかしながら、近年の模様形成過程の詳細な観察により、個々の細胞の挙動は発生段階や発生場所によって異なることが示された。細胞レベルでの挙動が異なるのに、マクロレベルでは同じ模様を作っているのである。この柔軟性は、どのように実現されているのだろうか。この問題に対処するために、私は異なる発達段階、異なる場所および異なる遺伝的背景における黒色素胞の挙動を調べた。通常、初期黒色素胞が体幹部の黄縞領域から除外されるとき、2 つの異なる細胞行動が観察される。黒色素胞は移動して黒縞領域に加わるか、または細胞死により消失する。黒色素胞の移動が制限されている環境では、ほとんどの黒色素胞がその位置で消失し、黄色の縞で黒色素胞が完全に排除されることを観察した。黒色素胞の細胞死が制限されている環境では、ほとんどの黒色素胞が移動して黒い縞に加わり、排除は完了した。移動と細胞死の両方が制限されているとき、黒色素胞は黄縞領域に残留し、排除が完了しない結果を得た。これらの結果は、黒色素胞の排除において遊走と細胞死が互いに補完しており、いずれかの挙動さえ機能していれば、正常な模様を作れることを示した。このような柔軟性が、体表模様形成メカニズムの頑強性の基盤になっていると推察される。

目次

序章
1. パターン形成研究の背景…… 5
2. ゼブラフィッシュの体表模様研究…… 8
3. 近年におけるゼブラフィッシュの模様研究…… 11
4. 本研究の意義…… 13

材料と方法…… 14

結果
1. in vitro 培養下でのパターン形成再現
1-1. 密度を高くしてパターンを形成するか…… 16
1-2. 黒色素胞の生存率をあげる因子の同定…… 17
1-3. ゼブラフィッシュ黒色素胞と cAMP の関係…… 18

2. 黄縞領域から排除される黒色素胞の２つの挙動を解析
2-1. 黄縞から排除される黒色素胞の２つの挙動について…… 20
2-2. 黒色素胞の発現時期が異なる場合…… 21
2-3. 黒色素胞の存在する場所が異なる場合…… 24
2-4. 黒色素胞の挙動を制限させた場合…… 26

考察
1. 模様の発生時期によるパターン形成過程の違い…… 31
2. 周囲の環境による違いによるパターン形成過程の違い…… 31
3. 培養条件下でのパターン形成因子…… 32
4. 今後の展開…… 33

参考文献…… 34

謝辞…… 38

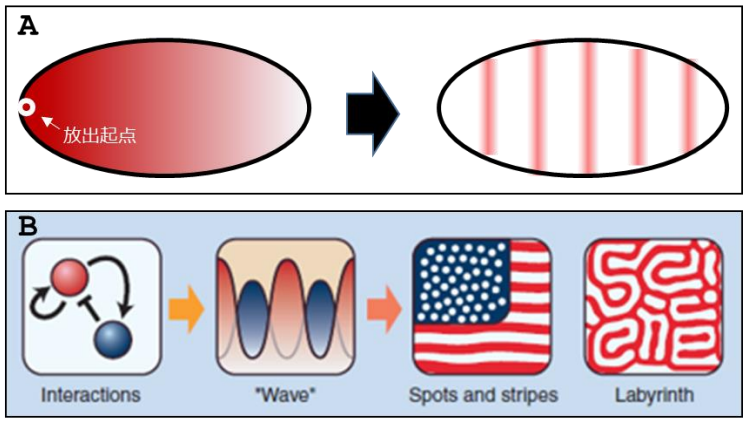
業績…… 39

序章

1. パターン形成研究の背景

1-1. 自律的な位置情報形成の必要性

生物学において、生きものの体が作られる原理を知ることは重要な課題の 1 つである。複雑な生きものの体を正確に作るためには、正確な位置情報が必要となる。1970 年代に Wolpert は位置情報を決定する原理として、濃度勾配モデルを提唱した(Wolpert, 2011)。このモデルは、モルフォゲンと呼ばれる位置情報分子を仮定し、このモルフォゲンが胚の一部分を起点として放出されることで、胚の中における放出起点からの距離によって生じる濃度勾配が位置情報を生み出しているというものである（図 I1A)。この考え方は、非常に単純で理解しやすいことから、ショウジョウバエの体節形成をはじめ、多くのパターン形成現象の説明に使われてきた。しかしこのモデルは、胚のどの位置を起点にして因子が拡散し勾配が生じるかという「初期条件」に依存しているため、プラナリアや両生類の初期杯でみられるような調整的な形態形成現象を説明することができない。調整的な形態形成現象とは、形態形成過程において何らかの障害が生じた場合、その障害を克服して正常な形態形成を維持するメカニズムのことである。例えば、プラナリアは前後で半分に分割しても切断した両方から完全な個体を再生できることが知られているが、全身の形態形成を指令するモルフォゲン分子の放出する起点が一つしかない場合にはこの再生は説明ができない。したがって、障害に対して何らかの調整を行うメカニズム、もしくは初期条件に依存しない自律的な位置情報決定のメカニズムが存在していると考えられる(Kondo & Miura, 2010)。



(B) Kondo & Miura (2010)より改変して引用

図 I1　位置情報決定メカニズムに関する二つの理論

(A) モルフォゲン勾配説の解説図。勾配ができることでパターンが生じる。(B) チューリングモデルの解説図。二つの物質が反応することでパターンの波が生じる。

この自律的な位置情報決定メカニズムに関しては、Wolpert が濃度勾配モデルを提唱したよりも以前に、ある数学者がモデルを提唱していた。1952 年に数学者である Turing は、生体内で二種類の物質が互いに反応し合いながら拡散すると物質の濃淡の波ができ、それがパターンを作り出しているというチューリングモデルを提唱した(図 I1B)(Turing, 1952)。このモデルでは、初期条件が存在しなくても、二種類の反応し合う拡散物質の存在だけで自律的なパターン形成が成立し、濃度勾配モデルで弱点となっていた調整的な形態形成現象を説明することができる。

1-2. チューリングモデルの説明

チューリングモデルは、偏微分方程式で書き表すことができ、定数の値（パラメーター）を変化させることで、様々なパターンを再現することができる(Liu et al., 2006; Maini, 2004; Murray & Myerscough, 1991)。数理学者のギーレルとマインハルトは、チューリングモデルを受けて、実際に生体内でチューリングパターンができるためには、どのような反応が起こればよいかを提示した(Gierer & Meinhardt, 1972)。まず彼らは、反応拡散系で示される二種類の物質を活性化因子、抑制因子と名付けた。活性化因子は、自分自身と抑制因子の合成を促進し、抑制因子は活性化因子の合成を止める作用をする。その結果、図 I2 のように二つのフィードバック回路ができる。この条件を満たす生体内の反応が起こるとき、チューリングモデルで示されるようなパターンが現れる。しかし、そのような反応が生体内で起きているという確信的な証拠は挙がらず、生物学者の間で長い間このモデルは無視されてきた。

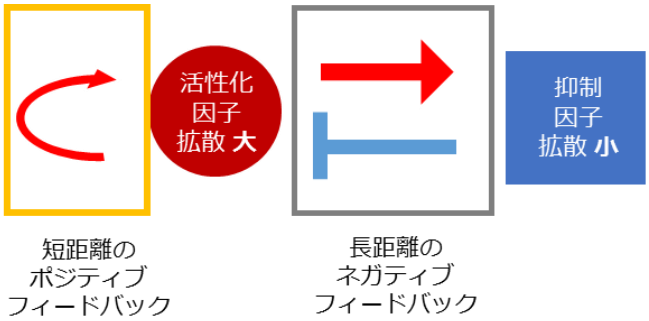


図 I2　チューリングモデルにおける二つの拡散因子の相互作用

拡散速度の速い活性化因子と拡散速度の遅い抑制化因子が、図にあるような反応を行うことで、因子の濃度パターンが空間上に作られる

1-3. 生体内におけるチューリングモデル

1995 年に近藤は、魚の体表模様がチューリングモデルの原理で形成されていることを報告した(Kondo & Asai, 1995)。熱帯魚であるタテジマキンチャクダイは、体の成長に伴って体表模様が変化する。その模様変化の過程が、チューリングモデルを再現したシミュレーションでパターンがつくられる過程と一致することを証明したのである（図 I3A)。その後、タテジマキンチャクダイ以外の魚でも、魚の体表模様がチューリングモデルの原理で形成されていることを支持する報告が続く。2006 年には、チューリングモデル上で一つのパラメータが相対するパターンの、黒斑点模様の魚と白斑点模様の魚を交配させハイブリットを作製すると、パラメータの中間条件で現れる迷路模様の魚が産まれることが分かった（図 I3B）(Miyazawa et al., 2010)。また、2009 年には、縞模様をもつ魚であるゼブラフィッシュの体表模様をレーザー照射により人為的に消し、そこから再生する模様の形成過程がチューリングモデルのシミュレーションと一致することが報告された（図 I3C）(Yamaguchi et al., 2007)。

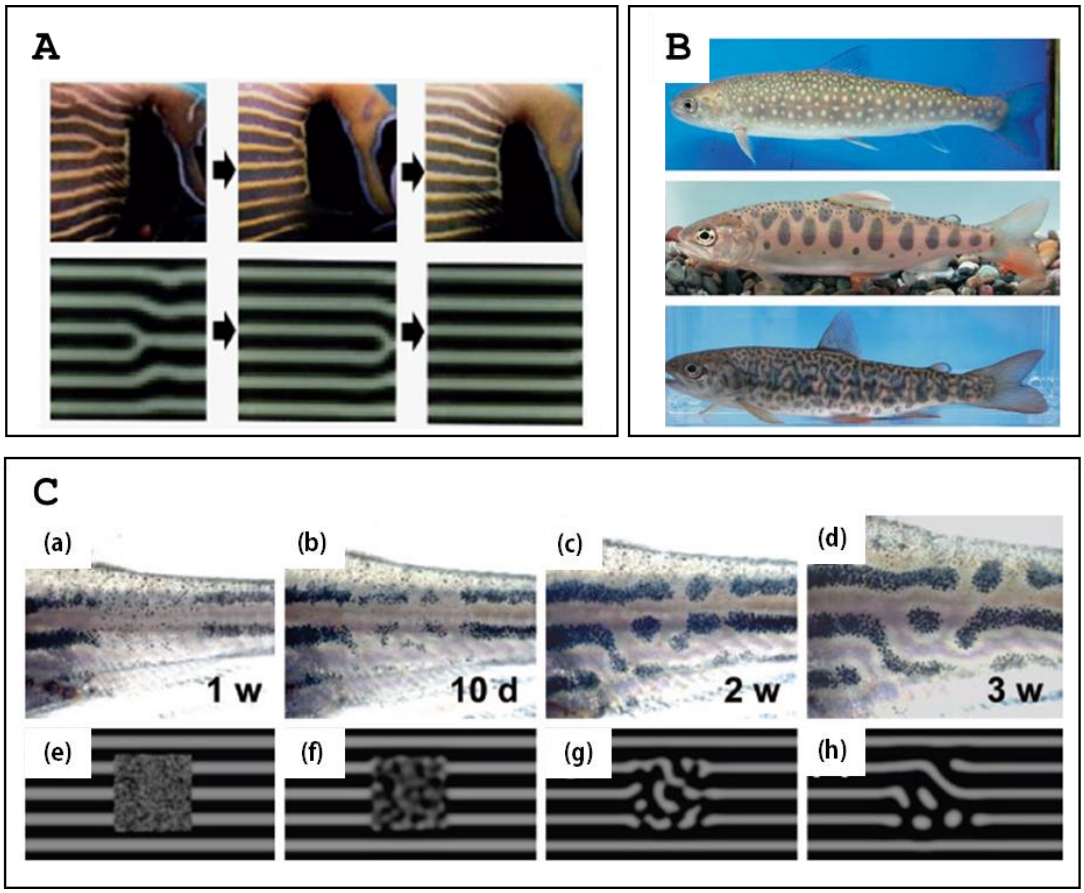


図 I3　魚の体表模様形成はチューリングパターンで再現される

(A) 上段：タテジマキンチャクダイの模様形成過程。縞が増える過程では、一本の縞が二本に分かれていく。下段：チューリングモデルのシミュレーション結果。初期状態をタテジマキンチャクダイの模様形成前段階に設定すると、実際の生体上でみられる模様形成と同じように縞が増える。(B) 白斑点模様の魚（上段）と黒斑点模様の魚（中段）とそれら二種を交配させた、迷路模様の魚（下段）。(C) レーザー照射後のゼブラフィッシュの模様再生過程（上段）とそのシミュレーション結果（下段）

[(A) Kondo and Asai (1995), (B) Miyazawa et al. (2010) (C) Yamaguchi et al. (2009) より図を改変して引用]

さらに近年では、魚の模様だけでなく、動物の四肢形成や鳥の羽毛パターンなどといった、生体内のさまざまなパターン形成においても反応拡散系が働いていることが証明されており、パターン形成原理がチューリングモデルで説明できることが発生学の中で浸透した概念となっている(Kondo & Miura, 2010; Marcon & Sharpe, 2012)。

2. ゼブラフィッシュの体表模様研究

2-1. モデル動物としてのゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュは、体表に縞模様をもつコイ科の魚であり、モデル動物として非常に有用である。ゼブラフィッシュは小型で多頭飼いができることから、実験室で飼育管理がしやすい。また、多産であることや世代交代が早いことから、遺伝学の分野で多く研究がなされており、ゲノム情報がそろっている。また、体表の縞模様は再生することが分かっており、観察が容易である(Parichy et al., 2009)。体表模様変異体の報告もある(Haffter et al., 1996; Mullins et al., 1994; Odenthal et al., 1996)。これらの理由により、模様形成の研究の多くはゼブラフィッシュを用いて行われてきた。

2-2. ゼブラフィッシュの模様変異体

ゼブラフィッシュの模様変異体として、縞模様が斑点模様になる leopard 変異体や、縞模様の幅が広がる jaguar 変異体が見つかっていた(Odenthal et al., 1996)。遺伝子解析技術の発展により、これらの変異体に伴う原因遺伝子が特定されている(Iwashita et al., 2006; Watanabe et al., 2006)。その他にも様々な模様変異体の原因遺伝子を特定することにより、ゼブラフィッシュ模様形成に関わる様々な遺伝子が分かってきた(Larson et al., 2010; Lister et al., 1999; Parichy et al., 2000b, 2000a)。

2-3. 模様は色素胞が形成している

ゼブラフィッシュの縞模様は、黒、黄、虹色の色素胞の配置によって作られている。黒縞には黒色素胞が多く存在し、黄縞には、黄色素胞、虹色素胞が多く存在している。Maderspacher らは、黄色素胞を欠損した変異体ゼブラフィッシュ（fms）と黒色素胞を欠損した変異体ゼブラフィッシュ（nac）を用いたキメラ実験を行い、黄色素胞と黒色素胞の両方の存在が模様形成に必要であることを示した（図 I4）(Maderspacher & Nüsslein-Volhard, 2003)。また Parichy らは、温度感受性の fms 変異体を用いた実験により、黒色素胞の生存維持に黄色素胞が必要であることを報告した。さらにこの報告では、鰭の縞模様形成でも体幹と同様な細胞間の関係があることも示している(Parichy & Turner, 2003)。この結果は、黒色素胞と黄色素胞の細胞間相互作用が体幹や鰭に関係なく模様形成に重要であることを証明する重要な報告である。

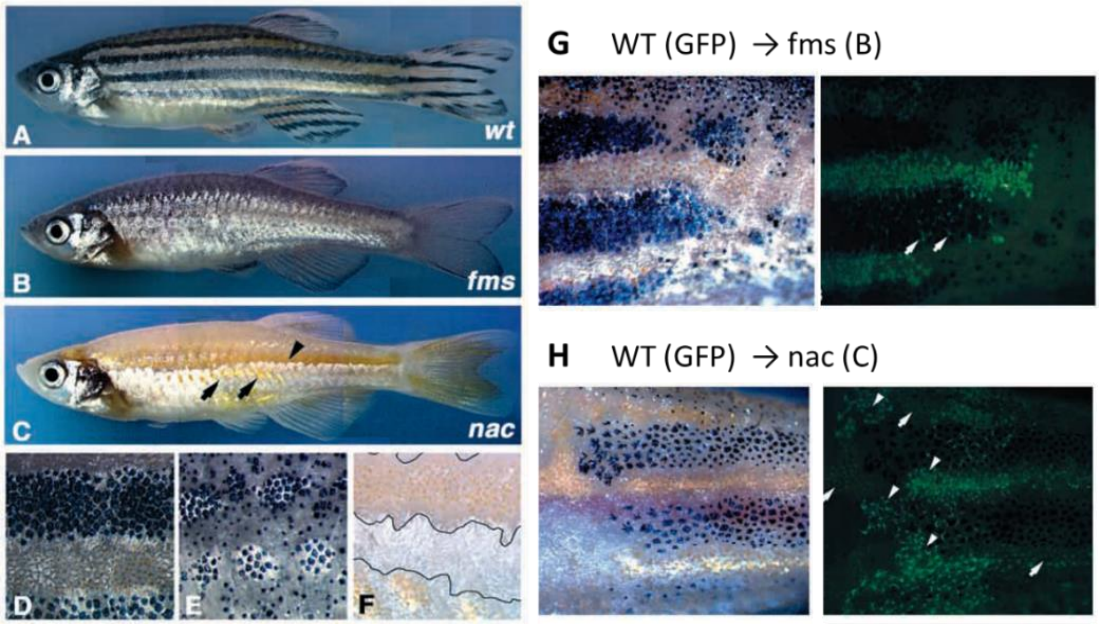


図 I4 ゼブラフィッシュの野生型と変異体のキメラ実験

(A,D) ゼブラフィッシュ野生型と体表模様の拡大図、(B,E) 黄色素胞を欠損した変異体(fms)と体表模様の拡大図、(C,F) 黒色素胞を欠損した変異体(na)と体表模様の拡大図、(G) 野生型をドナーとし、fms 変異体をレシピエントとした移植実験。正常な黄色素胞が移植されれば、fms の黒色素胞は模様を形成する。 (H) 野生型をドナーとし、nac 変異体をレシピエントとした移植実験。正常な黒色素胞が移植されれば、nac の黄色素胞は模様を形成する。

[Maderspacher and Nüsslein-Volhard (2003)より図を引用]

2-4. 黒―黄の色素胞間相互作用が模様形成に重要である

黒色素胞と黄色素胞が行う細胞間相互作用をみるため、中益らはレーザーアブレーションを用いた実験を行った。模様形成初期の段階で、黄色に囲まれている一つ一つの黒色素胞を狙って消去し、黒色素胞と黄色素胞の間に（１）近距離の黒色素胞と黄色素胞は互いに反発し合う、（２）黄色素胞は遠距離にある黒色素胞の生存を助ける、という２つの関係があることを見出した（図 I5）(Nakamasu et al., 2009)。

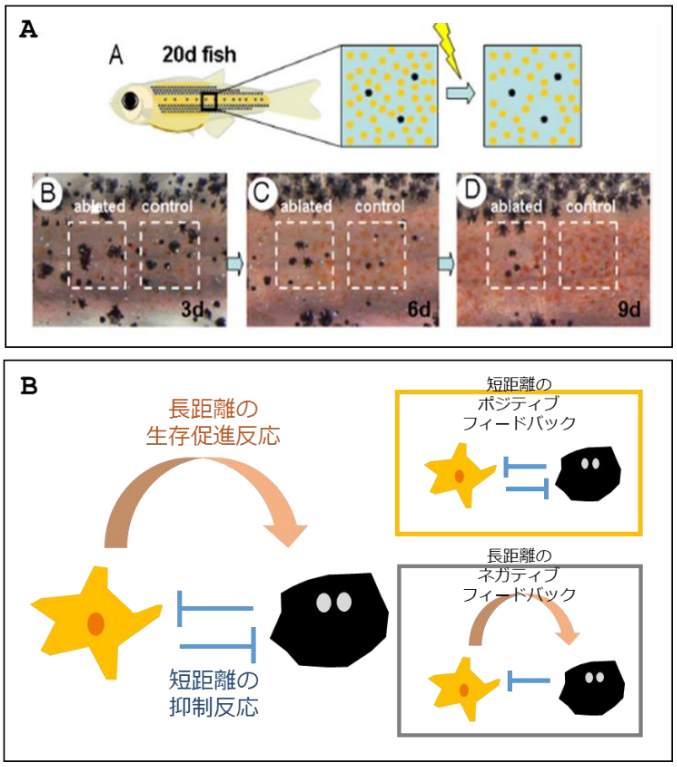


図 I5　模様形成における黒色素胞と黄色素胞の細胞間相互作用とチューリングモデル

(A) ゼブラフィッシュの体表で黄色素胞に囲まれた黒色素胞は、黄色素胞の働きによって排除される。(B) 細胞間相互作用をまとめた図。相互作用は２種類のフィードバックに分けて考えることができ、チューリングモデルの条件と同等になる。

[(A) Nakamasu et al. (2010) より図を引用]

相互作用をするそれぞれの細胞を単離して培養下で観察する実験も有効である。黒色素胞と黄色素胞をゼブラフィッシュから単離し、ディッシュ上に播種すると、約 48 時間程度まで培養することができる。その際に、タイムラプスで細胞の動きをみてやると、色素細胞は自律的に動くことが観察された。さらに、これらの色素細胞は互いに接触した際に、黄色素胞が黒色素胞を追いかけるという反応がみられる(Yamanaka & Kondo, 2014)。稲葉らは、この接触時になにが起きているのかを、膜電位感受性色素を用いて可視化した。その結果、黄色素胞が黒色素胞に触れた瞬間に、黒色素胞の膜電位が変化し脱分極するということが分かった(Inaba et al., 2012)。この実験系は、黄色素胞と黒色素胞が短距離において反発する作用をもつことを示す。

また、ゼブラフィッシュの黒色素胞に膜移行シグナルのついた蛍光タンパク質を発現させると、黄色素胞に向けて伸びる細胞仮足が観察できる。この仮足では、delta-Notch 系シグナルを介した色素胞間の情報伝達を行っていることが報告されている(Hamada et al., 2014)。これは、黒色素胞が離れた位置にある黄色素胞と相互作用を行っていることを示唆する。

2-5. 細胞間相互作用とチューリングモデルについて

これまでの研究より、ゼブラフィッシュの縞模様を構成する黒色素胞と黄色素胞の間には、短距離の反発作用と長距離の生存促進作用という関係があることが示唆される。これは、長距離の負のフィードバックと短距離の正のフィードバックがあると解釈することができ、マインハルトらが報告しているチューリングモデルで表すことができるのである(Watanabe & Kondo, 2015)。ただ、異なる点としては、予想されていたような拡散物質ではないということである。しかしこの場合でも、細胞の仮足の長さでの違いによって、反応する“距離”が異なるという点が拡散速度の違いと同じ意味をもち、チューリングモデルで示されるような定常パターンが生み出される（図 I5B)。これを受けて 2017 年に近藤は、細胞の仮足の長さによる反応距離の違いを取り込んだモデルとして、Kernel モデルを提唱した(Kondo, 2017)。

3. 近年におけるゼブラフィッシュの模様研究

3-1. 相互作用分子の特定について

ゼブラフィッシュ模様形成には、黒色素胞と黄色素胞の異なる距離の２つの反応が重要であることがわかり、その反応はチューリングモデルで説明できることが示されている。しかし、実際にどのような分子が色素細胞間の相互作用に働いているのかは、未知の点が多くある。一方、短距離の反発作用では、相互作用による黒色素胞の膜電位変化が重要であることがわかっている。膜電位の調節に異常をきたした変異体である jaguar 変異体は、内向き整流性カリウムチャネルに変異をもつ(Iwashita et al., 2006)。細胞の膜電位変化が細胞移動にどのように影響を及ぼしているのかは、現在そのメカニズムを解明されつつある。また、縞模様が斑点模様へと変わる leopard 変異体は、Connexin 分子に変異があることがわかっている(Watanabe et al., 2006)。Connexin は細胞間をトンネルのようにつなぐ Gap junction を担う分子であり、細胞間相互作用に大きく影響していることが考えられる

(Watanabe & Kondo, 2012)。この Gap junction が模様形成にどのような影響を及ぼしているかは、現在調査が進められている。

3-2.　詳細な観察データとの齟齬

近年、実験技術の発達で多様な条件下での模様形成が観察可能になったことにより、統一的なメカニズムの解明による説明に代わって、異なった条件で観察されるそれぞれの“場に合わせた”メカニズムで模様が形成されるという仮説が提唱されつつある。Singh らは、黒色素胞とゼブラフィッシュの第三の色素胞である虹色素胞を前駆細胞の状態から経時的に観察を行い、黒色素胞が黄色素胞よりも寧ろ虹色素胞と相互作用を行っている可能性と報告している(Singh et al., 2014)。さらにこの報告では、発生初期に現れる初期黒色素胞と発生後期に現れる後期黒色素胞とが性質が異なる細胞として分けて考えられており、後期黒色素胞はほとんど模様形成に寄与していないと推察されている（図 I6)。また、Patterson らは、虹色素胞が体幹部の縞模様形成の維持に必要であることを示した(Patterson et al., 2014)。虹色素胞が欠損したゼブラフィッシュでは、鰭の縞模様は形成されるのに対して、体幹の縞模様は形成されない（図 I6)。Patterson らによると、体幹部の虹色素胞から放出される csf1 が黄色素胞の生存を維持することで、模様が形成できる。一方で、鰭では虹色素胞以外の細胞が csf1 を放出しているために、黄色素胞の生存が維持され、模様が形成すると示唆されている。つまり、体幹と鰭における虹色素胞の有無の違いが、模様形成に重要な役割を果たしていると考察しているのである。加えて Mahalwar らは、体幹の黄色素胞の動態を経時的に観察することで、体幹の模様形成メカニズムが鰭で見られるような黒色素胞と黄色素胞の相互作用とは異なるものではないかという仮説を提示している(Mahalwar et al., 2014)。

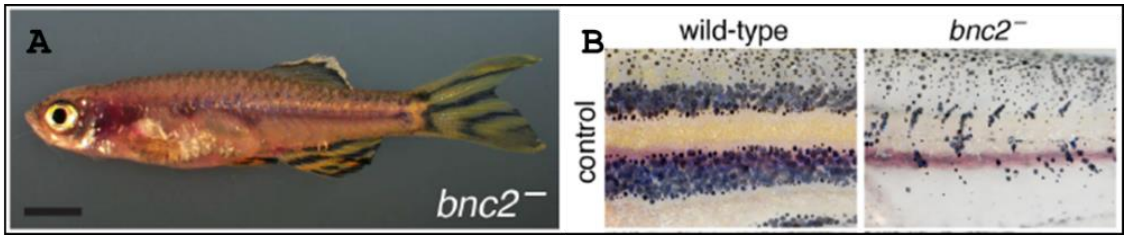


図 I6 虹色素胞を欠損した変異体では、体幹で縞模様ができない

(A) 虹色素胞を欠損した変異体、 (B) 野生型と変異体の体表模様を拡大した図

[A,B ともに、Patterson and Parichy (2013)より図を改変して引用]

以上のように色素細胞が模様を形成するには、細胞一つ一つの挙動が重要となる。細胞を単離して、ディッシュ上に培養した in vitro 条件下では、黒色素胞が黄色素胞から逃げるように移動することから、黒色素胞の細胞移動は色素細胞相互作用において重要な役割を担うことが予想される。一方で生体内の in vivo 条件では、模様形成初期の黒色素胞は、黄色素胞に囲まれると、黒色素胞が多い黒縞領域に“移動”するか、黄色素胞に囲まれたまま“死ぬ”という挙動が観察される。Singh らの研究によると、模様形成後期の黒色素胞は、そもそも体表面に出てくる際に黒縞の部分にしか出てこないため、挙動をしめさずにただ存在し、模様形成に関与していないのではないと報告されている(Singh et al., 2014)。

4. 本研究の意義

これまでの数理的な研究や実際の生態を用いた観察の結果から、ゼブラフィッシュの縞模様形成に関しては、大まかな原理としてチューリングの模様が適用できること、さらに模様を作る色素細胞の相互作用がチューリングモデルの形成条件を満たしていること、が既にわかっている。しかし、近年の詳細な研究によると、実際の魚の皮膚における細胞レベルの挙動は、模様形成の時期、場所、遺伝的な背景の違いにより、かなり異なっていること知られており、このことから理論と実験の整合性が問題となっている。黒色素胞の発生時期や虹色素胞の有無などといった細胞が存在する環境により、形成原理が違う可能性を主張する研究グループも存在する。これらの問題に対する単純で直接的な結論は、異なる環境では異なるメカニズムが作用していると考えることである。しかし、異なる環境においても同じメカニズムが作用し、それを保存するための十分な柔軟性があると考えることもできる。

本研究はこの問題を解決するために、二つのアプローチを考案した。一つは、色素細胞間相互作用以外の因子を除けるように色素細胞の単離培養下でパターンを形成させ、模様形成メカニズムの解明を目指す。もう一方は、模様形成の時期、場所、遺伝的な背景が異なる条件下で、黒色素胞の挙動について調べ、色素細胞を取り巻く状況が違っても共通するメカニズムがあるかどうかを調べた。その結果、黒色素胞が、黄色素胞の領域から排除されるやり方には、①黒色領域への移動、②細胞死による消失、の２通りがあり、そのどちらかが起きない条件でも、他方が相補することで正常な排除が起きることを明らかにした。

材料と方法

・　魚の飼育、系統維持

実験に用いたゼブラフィッシュは、野生型 Tübingen (Tü)、dali 変異体（$dali^{wpr21e1}$）である。すべてのゼブラフィッシュは、28℃で 14 時間の明期と 10 時間の暗期の条件のもとに研究室内で飼育をした。本研究におけるすべての実験は、大阪大学の実験動物取扱法に基づくものである。

・　体表の色素胞を経時観察

実験で用いるゼブラフィッシュを、0.01％MMS（Ethyl 3-Aminobenzoate Methanesulfonate）で麻酔をかけて、アガロース加工を施したプラスチック製の計量皿の上に置き、立体顕微鏡（Leica MZ16FA; Leica）で観察した。黒色素胞の位置を見定めやすくするため、0.2mM Epinephrine 溶液を麻酔液中に混入し、黒色素顆粒を細胞の中心に凝集させた状態で画像を取得した。取り込んだ画像は、GIMP2 で調整した。魚の成長に合わせて適宜リサイズを行い、胸鰭、尻鰭、筋節を基準として、細胞の同定を行った。

・　レーザーアブレーション分析

麻酔をかけた魚をアガロース加工済みの 35mm ディッシュの上に置き、顕微鏡上で 20 倍の対物レンズに焦点を合わせた MicroPoint パルスレーザーシステム（Photonic Instruments）からの 440nm の波長でレーザー照射を行った。一般に、各色素細胞は、4～5 回のレーザーパルスによって十分に焼き切ることができた。その翌日、焼き切った細胞のデブリを観察することで、細胞死を確認した。

・　トランスジェニックゼブラフィッシュの作製

cAMP シグナル関連の改変遺伝子を異所的に発現させるために、Tol2 トランスポゾンを用いた遺伝子改変技術を使用した。 RNeasy キット（Qiagen）を用いてマウス 3T3 細胞から全 RNA を単離し、caGas(Graziano & Gilman, 1989), dnGas(Gilchrist et al., 1999), caPKA(Orellana & Mcknight, 1992), dnPKA(Cleggs et al., 1987)のそれぞれについて、SuperScript III First-Strand Synthesis System （Invitrogen）を用いて逆転写 PCR を行った。プロモーターは、黒色素胞での遺伝子発現を促進するために、黒色素胞に特異的に発現する遺伝子である Mitfa の上流に 1.3kb の領域を用いた（Lister et al.,1999）。プラスミド DNA（25ng / μl）および Tol2 mRNA（25ng / μl）を、野生型または $dali^{wpr21e1}$ 受精卵に 1 細胞段階で導入した。導入遺伝子を確認するために、レポーターとして IRESH2BRFP を用いて、傾向顕微鏡下で発現を確認した。

・　細胞培養実験

成熟したゼブラフィッシュから採取した尾鰭と尻鰭を切り刻み、1ml のトリプシン処理液［2.5mg/ml trypsin (Worthington) , 1.2mg/ml BSA (Sigma), 1mM EDTA in PBS］に浸して 28℃で 1 時間インキュベートした。鰭を PBS で 5 回洗浄した後、500ul のコラゲナーゼ処理液［1 mg/ml collagenase I (Worthington), 0.1 mg/ml DNase I (Worthington), 0.1 mg/ml soybean trypsin inhibitor (Worthington), 1.2 mg/mL BSA in PBS］に浸して 28℃、1,000 r/min で 1 時間振盪し組織を溶解した。細胞懸濁液を 22-um メッシュを使って濾した後、40% Percoll (SIGMA) を用いて 28℃、60 × g で 15 分遠心を行った。細胞ペレットを 1% FBS を含んだ L15 培地（Gibco）で懸濁し、コラーゲン IV コートを施したディッシュ上で培養を行った。

結果

1. in vitro 培養下におけるパターン形成の再現

1-1. 高密度細胞培養条件を検討

ゼブラフィッシュの模様形成には、色素細胞以外にも、色素細胞を取り巻くさまざまな環境要因が存在する。色素細胞以外の要因を排除するため、色素細胞を単離した培養下で相互作用を観察できないかと考えた。

色素細胞は、先行研究の成果により、単離培養が可能となっている。山中らは、単離培養した黒色素胞と黄色素胞を近づけた際に、黄色素胞が黒色素胞を追いかける反応を示すことを報告している(Yamanaka & Kondo, 2014)。これは、ゼブラフィッシュ体表で黄縞の領域から黒色素胞が排除されるときに見られる、短距離の反発作用を表していると考えられている。山中らの実験は、色素細胞を単離した状態または低密度の状態で培養を行い、その挙動を観察している。私は、この培養条件で、さらに色素胞の密度を上げた状態の細胞の挙動、ないしは細胞全体の挙動を観察し、色素胞のパターンができるかどうかを調べた。

本条件で培養した結果を図１に示す。培養初日は、色素胞はディッシュ上にはりついているのが分かる。播種後２日目までは細胞の状態は悪くないが、４日目以降になると一気に生存している細胞の数が減る（図 1)。図から目立つのは、黒色素胞だが、黄色素胞も同様に４日目以降に死んでしまう。そして、色素胞で形成されるパターンは観察できなかった。

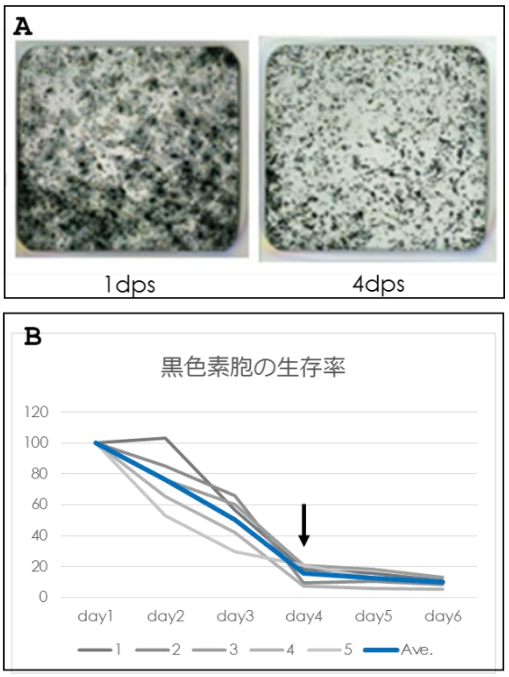


図１　通常状態での高密度色素細胞培養

(A) 高密度培養時の 1dps と 4dps の色素細胞の状態, dps … day post seeding, (B) 高密度培養時の黒色素胞の生存率, 矢印は培養後 4 日目を示し、生存率が著しく下がっている

ゼブラフィッシュ生体上でパターンができるまでには、短くても二週間が必要である。現在の培養条件では、パターンができる前に細胞が死んでしまうことが原因でパターンが形成されないのではないかと考えた。そこで、色素胞の生存を延ばす因子の同定を行った。

1-2. 生存促進因子の探索

検討実験に用いた薬品は、10 種類である。それぞれの薬品の濃度をふって、培養時の色素細胞生存率を確認した。その結果、膜透過性の cAMP 誘導体である DBcAMP を加えたときに、黒色素胞の生存率が著しく上がることを発見した（図 2）。

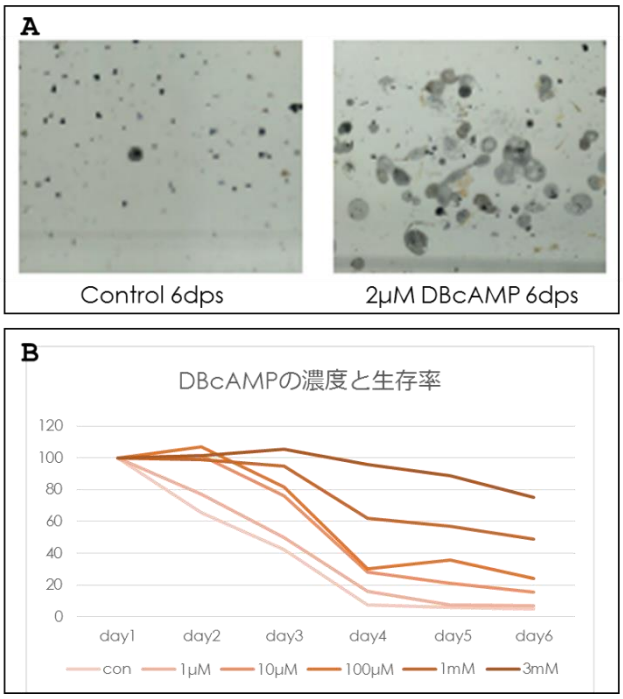


図 2　通常状態での高密度色素細胞培養

(A) 高密度培養時の 1dps と 4dps の色素細胞の状態，dps … day post seeding，(B) 高密度培養時の黒色素胞の生存率，矢印は培養後 4 日目を示し、生存率が著しく下がっている

cAMP は、セカンドメッセンジャーとして知られるシグナル分子である。これまで哺乳類の黒色素細胞で報告されており、黒色素細胞のマスタージーンである mitf の転写活性を上げることが知られている。mitf は黒色素細胞の増殖、分化、生存促進に関わることが報告されている。

1-3. ゼブラフィッシュの黒色素胞と cAMP の関係

内在性の cAMP が黒色素胞の生存に関わっているかどうかを調べるため、トランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。黒色素細胞に関わる cAMP-mitf の主要なシグナル経路は、マウスを用いた研究により明らかにされており、それを参考にして導入遺伝子を決めた。

まずは、内在性の cAMP のはたらきを抑えるため、cAMP の直下で作用する PKA にドミナントネガティブ型変異を加えた遺伝子を導入し、色素細胞特異的に発現させたトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した（図 3D）。Tg (mitfa-dnPKA)では、体表の縞模様を形成する黒色素胞の数が激減した。この表現型は、複数のトランスジェニックラインで確認ができている。このことから、内在性の cAMP は、黒色素胞の生存に何かしら関与していることが示された。

また、ゼブラフィッシュにおける cAMP シグナル経路との関連を調べるため、シグナル経路それぞれにおける変異をいれたトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。（図３）

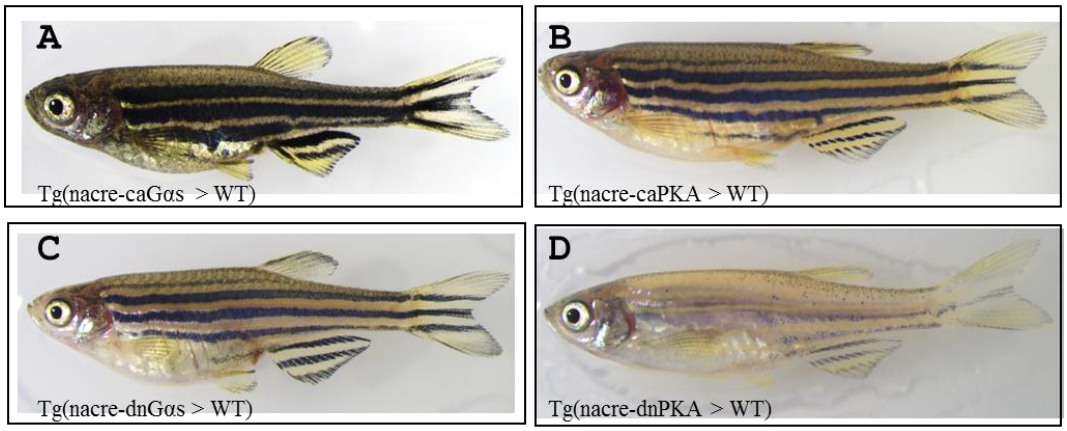


図 3　cAMP シグナル関連遺伝子を改変したトランスジェニックゼブラフィッシュ
(A) Tg(nacre-caGas)を野生型に導入した F1, (A) Tg(nacre-caPKA)を野生型に導入した F1, (A) Tg(nacre-dnGas)を野生型に導入した F1, (A) Tg(nacre-dnPKA)を野生型に導入した F1

これらの結果から、cAMP はゼブラフィッシュの黒色素胞の生存に関与していることが示された。

cAMP が色素胞の生存を促進することが分かったため、DBcAMP を加えた条件で高密度培養を行った。しかし、パターンは形成しなかった。

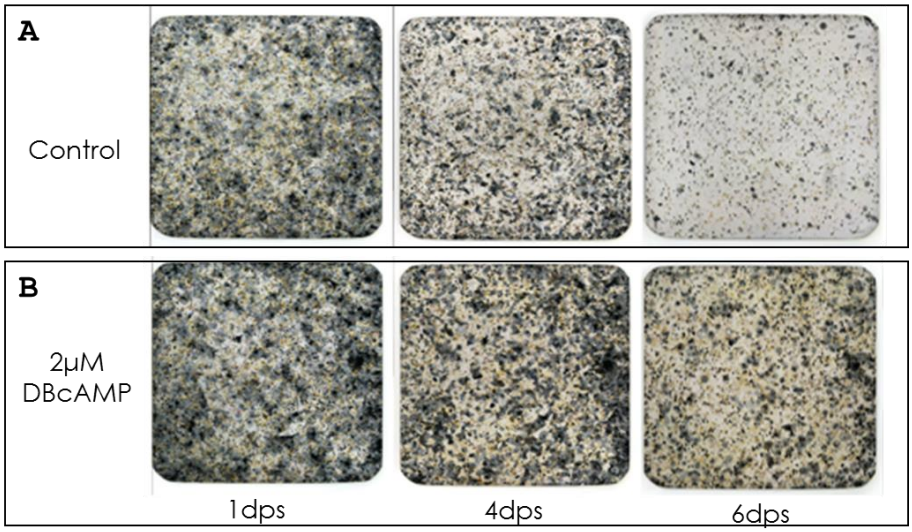


図 4　生存を延ばしてもパターンは形成されなかった

(A) control での高密度培養。6dpf で細胞はほとんど生存していいない。(B) 2 μ M DBcAMP 投与下での高密度培養。

2. 黄縞領域から排除される黒色素胞の２つの挙動を解析

2-1. 黄縞から排除される黒色素胞の２つの挙動について

生体でパターン形成に重要であるのは、色素細胞間相互作用である。先の実験では、色素細胞のみを単離した状態でパターンが形成されないかを試してみたが、形成されなかった。この理由としては、２つの原因が考えられる。一つは、培養条件下では生体で行われている相互作用や細胞の挙動が再現できていないということである。もう一方は、色素細胞間相互作用には黒色素胞と黄色素胞以外にも、細胞間相互作用に必要な因子があるということである。前者の原因を確かめるべく、培養条件下で、生体上でみられる細胞間相互作用が再現されているかどうかを確認するために生体上の黒色素胞の挙動を観察した。

生体上でパターンが形成される際、黄色素胞に囲まれている黒色素胞は２つの挙動を示す。黒色素胞は、黄色素胞が多い黄縞領域から黒縞領域まで移動してその場から逃げるか、黄色素胞に囲まれたまま消失する(Nakamasu et al., 2009; Takahashi & Kondo, 2008)。これにより、パターン形成の根幹ともいえる領域の分離が行われる。培養条件下では、黄色素胞が黒色素胞を追いかけるような、細胞の移動は再現することができるが、黄色素胞に囲まれた黒色素胞の消失は再現することができていない。

この黒色素胞の２つの挙動に関しては、様々な研究グループからの示唆が上がっている。山口らは、レーザーアブレーション実験で縞模様の一部を構成する黒色素胞を焼ききると、その領域を埋めるように別の黒色素胞が移動してくることを報告している(Yamaguchi et al., 2007)。また、山中らは、細胞培養実験と遺伝子改変技術を用いて、細胞の移動が模様形成に重要であることを示している(Inaba et al., 2012; Inoue et al., 2014; Yamanaka & Kondo, 2014)。一方で、Volhard らのグループでは、マーカー遺伝子を用いた詳細なパターン形成観察結果をもとに、黒色素胞の移動は重要ではなく、消失が重要であると報告している(Singh et al., 2014) 。この報告では、黒色素胞の発生時期によって初期と後期に分け、模様形成においてそれぞれの黒色素胞の振る舞いは異なるということも示唆している。
また、別の Parichy らのグループでは、場所によって模様形成メカニズムが違うのではないかとの仮説を提示している。これは、第三の色素胞である虹色素胞を欠損したゼブラフィッシュ変異体が、体幹部で模様がなくなり鰭の縞模様は残ることから、体幹部では黒と黄色の色素胞間相互作用よりも、虹色素胞を加えた新たな相互作用の関係があるのではないかと考えているからである(Patterson & Parichy, 2013)。

本テーマでは、これらの議論を検証し、なおかつ黒色素胞２種類の振る舞いが模様形成にどのように関わるのかを調べるために、黄色素胞に囲まれた黒色素胞の振る舞いを様々な条件で観察し研究を行った。

2-2. 黒色素胞の発現時期が異なる場合

2-2-1. 野生型ゼブラフィッシュの体幹部における初期黒色素胞の排除

野生型ゼブラフィッシュでは、孵化後 2 週間前後（SL7mm 程度）で黒色素胞が筋節中隔に現れ、一本の黒縞ができる(図 5A)。この時期から模様形成が終わる SL15mm 程度（図 5B）までのゼブラフィッシュの体表模様を 1 日おきに観察し、初めの一本の黒縞を形成していた黒色素胞の各々の挙動を観察した。その際、画像編集ソフトを用いて、1 日前のゼブラフィッシュの観察画像と筋節の位置を合わせることにより、各細胞の同定を行った。今回観察した魚の数は 7 匹で、独立して実験を行った回数は 4 回である。

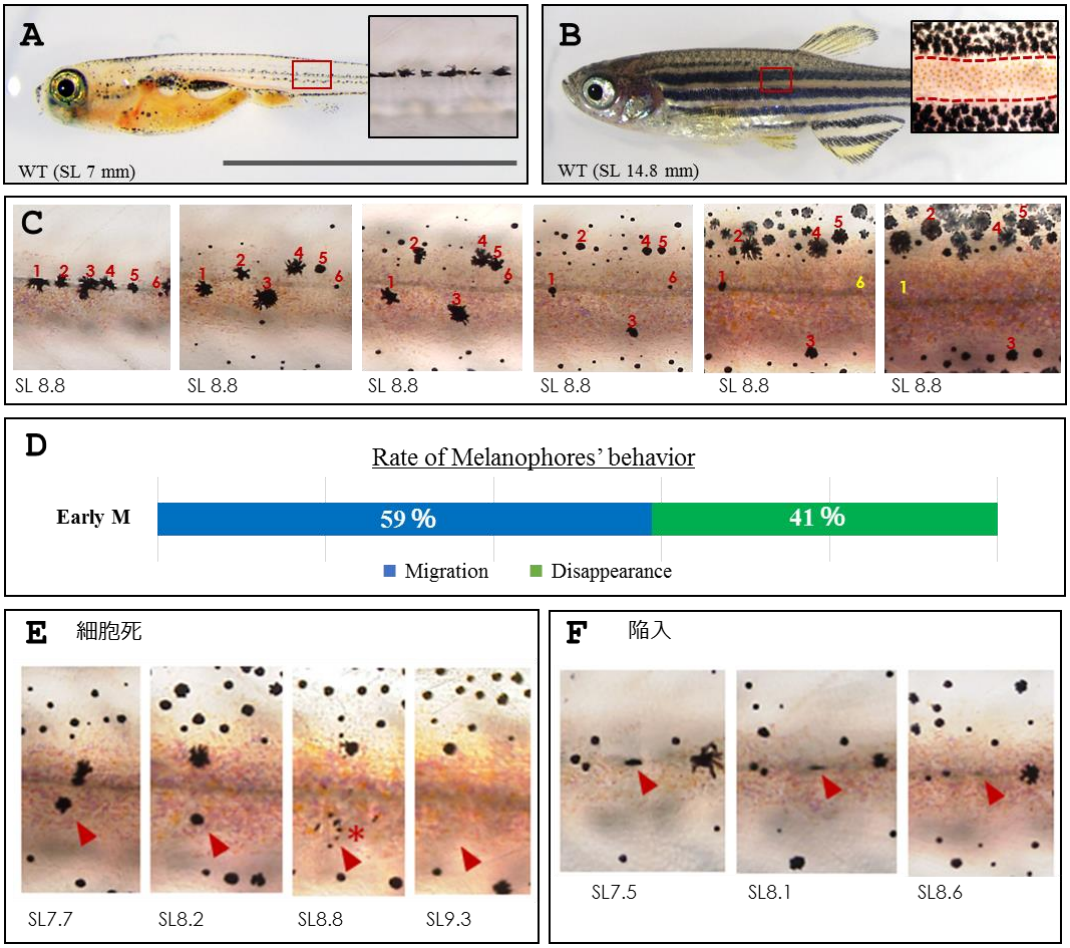


図 5 野生型ゼブラフィッシュの模様形成過程

(A) 模様形成が始まる前の野生型ゼブラフィッシュの稚魚（SL7mm）(B) 模様形成が完了した野生型ゼブラフィッシュ（SL13mm）(C) 野生型ゼブラフィッシュ体表における黒色素胞の排除過程 (D) 模様形成過程において初期黒色素胞が行う移動と消失の割合 (E) 黒色素胞の細胞死過程 (F) 黒色素胞の陥入過程

黒色素胞が黄縞領域から排除され始めるのは、筋節中隔の周りに黄色素胞と虹色素胞が現れ始める孵化後 17 日程度（SL9mm）の頃である。図 1C で番号を記しているものが、筋節中隔に並ぶ黒色素胞である。黄縞の部分がはっきりし始める頃に、黒色素胞は黄縞部分から逃げるように黒縞部分へ「移動」し、そこで安定するか、もしくは、黄縞領域内で「消失」するというどちらか一方の挙動を示す（図 5C）。消失する黒色素胞には、２つの消失方法がみられた。一つは、細胞が破裂しデブリを出すという細胞死である（図 5E）(Parichy et al., 1999)。もう一つは、筋節中隔の内部に陥入していくというものである（図 5F）。筋節中隔の内部に陥入するという現象は、これまでの先行研究において記述がない。ゼブラフィッシュの黒色素胞は、体内の臓器の周りや血管の周りにも存在するため、そこに移動した可能性も考えられる。

排除された黒色素胞の移動率（移動した黒色素胞の数 / 排除された黒色素胞の数）を調べたところ、およそ 62%となり、ほとんどのゼブラフィッシュで両方の挙動が約半数の割合で観察された（図 5D）。この結果は、山口や中益が行った先行研究の結果と一致する(Nakamasu et al., 2009; Yamaguchi et al., 2007)。

2-2-2. 野生型ゼブラフィッシュにおける体幹部の後期黒色素胞の排除

初期黒色素胞と後期黒色素胞の大きな違いは、発生段階のどの時期に現れてくるか、ということである。初期黒色素胞は SL7mm ごろに筋節中隔に現れる一方で、後期黒色素胞は SL9mm ごろに初めから黒縞領域に現れる(Singh et al., 2014)。そのため、通常の模様形成過程では後期黒色素胞の排除される挙動を観察することが不可能である。黒色素胞が現れる SL9mm で、レーザーを用いて体幹の一領域の色素胞（黄色素胞と黒色素胞の両方）をアブレーションし、黒―黄が分離した領域がない状態を作り出した状態で、模様再生過程を観察した（図 6A,B,B'）。この状態では、黄縞領域に、黄色素胞と新しく分化した後期黒色素胞が同時にランダムに現れる。現れる量は、黄色素胞の方が多い。そして最終的に黄縞領域になるため、黄色素胞は黒色素胞を排除する。そこから黒色素胞が排除されていく過程を観察することで、後期黒色素胞がどのように排除されるのかを観察することができる。図

6C は、黄色ストライプの 8 つの後期黒色素胞が出現し、それらのすべてが除外されたことを示す。 4 つの細胞が移動して黒縞領域に移動しし、4 つの細胞が消失し、点線の円でマークされている。121 個の黄縞から排除される後期黒色素胞を観察した結果、黒色素胞の移動率は、およそ 45%であった。これは、初期黒色素胞の移動率と比較したときに、ほぼ半数という意味で同様の結果であった（図 6D,E）。

これらの結果は、初期黒色素胞と後期黒色素法が、移動および細胞死の組合せによって黄縞領域から排除される点においてほぼ同等であるということを示す。

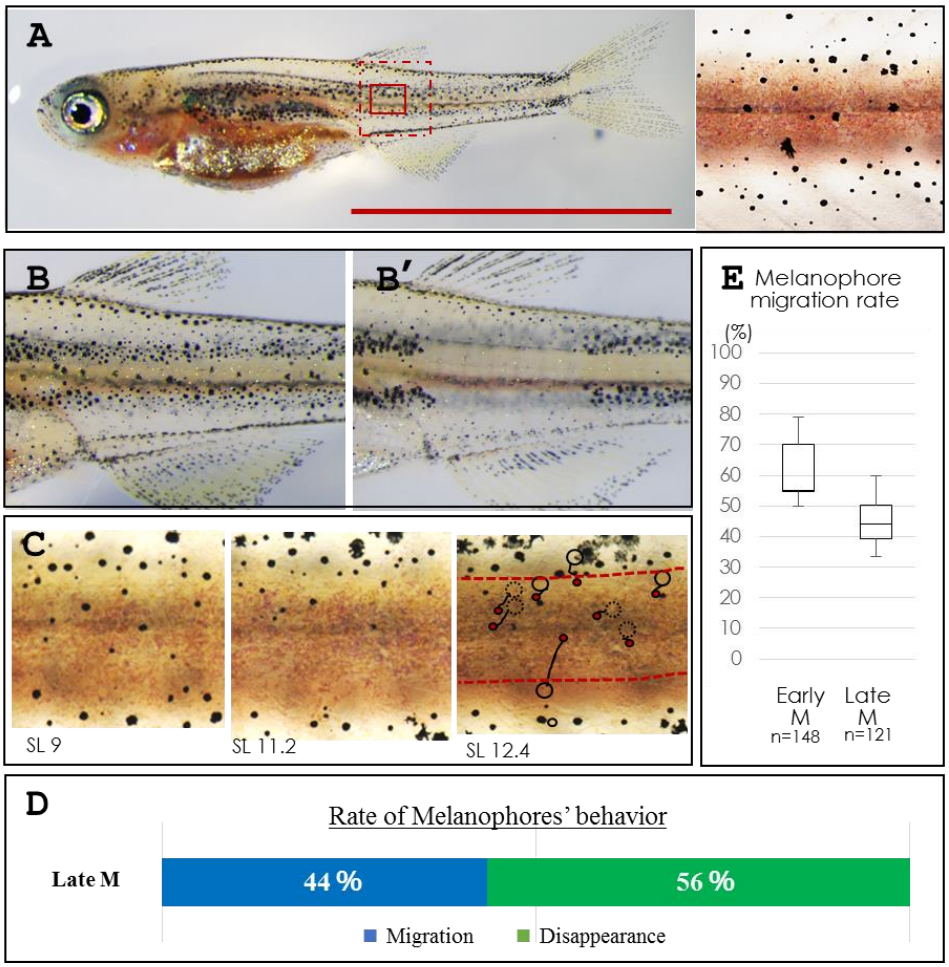


図 6 後期黒色素胞の排除機構

(A) 後期黒色素胞が出現し始める時期のゼブラフィッシュ（SL9mm）（B,B'）レーザーで模様の一部分を消失させた前後（C）模様再生時の黒色素胞排除過程（D）後期黒色素胞が排除されるときの移動と消失の割合（E）初期と後期の黒色素胞の移動率

2-3.　黒色素胞の存在する場所が異なる場合

2-3-1.　場所の違いよる黒色素胞排除メカニズム

ゼブラフィッシュには、体幹部だけでなく尾鰭と尻鰭にも縞模様がある（図 7B,D）。体幹部では鰭に比べて、虹色素胞の数が多く、色素胞に筋肉細胞が隣接している(Hirata et al., 2003)。一方で、鰭では、骨細胞が隣接していたり、細胞のＺ軸方向の移動が行われなかったりといった、黒色素胞と黄色素胞を取り巻く周囲の環境は異なっている(Hirata et al., 2005)。また、細胞の様相に関しては、体幹部では体表に沿って広がっているのに対し、鰭では、鰭の鰭条骨に沿って広がっている。尻鰭と尾鰭では、細胞系譜や環境は類似しているが、模様に対する鰭条骨の配向性が大きく異なっており、細胞が移動する方向性に違いがあるため、別々に観察を行った。

2-3-2.　尻鰭の模様形成における黒色素胞の排除

ゼブラフィッシュの稚魚では、SL6.5mm ごろに尾鰭が形成し始める（図 3A）。基部から黒色素胞が鰭の先端部方向に移動し始める。SL7mm の尻鰭では、黄色と黒の色素胞がまざって存在している。SL8.2mm ごろの尻鰭で、黄縞の領域が顕著になりはじめ、そこにいた黒色素胞が排除される。この黄縞になる領域から排除される黒色素胞を、体幹と同じように一つ一つの黒色素胞をトレースして、その挙動の割合を調べた。

ゼブラフィッシュの鰭条骨は、成長に伴って先端方向へと伸びていくが、本数は一貫して変わらない。そこで、鰭条骨の節との位置関係からそれぞれの黒色素胞を同定した。図 3E で示しているように、黒色素胞は、黄縞領域から将来の黒色領域に向かって移動していることがわかる。この、鰭における黒色素胞の移動は、ほとんどの黒色素胞が鰭条骨に沿って移動していた。また、黄色領域から移動せずに、そこにいるまま消失する黒色素胞も観察できた。鰭における黒色素胞の消失は、ほとんどが細胞死であった。体幹部でみられるようなデブリも観察された。体幹でまれにみられた黒色素胞の陥入は、鰭ではそもそも陥入する場所がないためか、観察されなかった。

体幹で観察した方法と同様に、排除される黒色素胞をトレースし、その挙動の移動率を算出した（図 7G,H）。尻鰭の黒色素胞の移動率は 46%であった。移動と消失の行われる割合は、おおよそ半分ずつであり、これは体幹でみられる黒色素胞の挙動の割合と類似している。

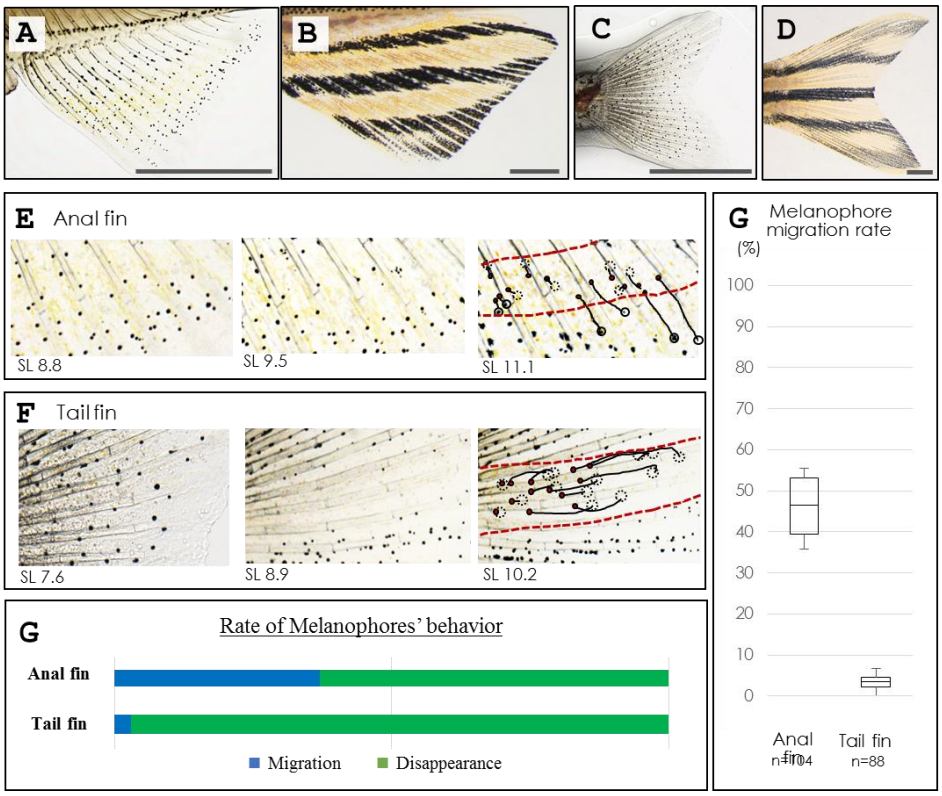


図 7　鰭の黒色素胞排除機構

(A) 野生型ゼブラフィッシュ尻鰭の模様形成開始時（SL7mm） (B) 模様形成完了時 (C) 野生型ゼブラフィッシュ尾鰭の模様形成開始時（SL7mm）(D) 模様形成完了時 (E) 尻鰭の黒色素胞排除過程 (F) 尾鰭の黒色素胞排除過程 (G) 排除される黒色素胞が行う移動と消失の割合 (H) 尾鰭と尻鰭における黒色素胞の移動率

2-3-4. 尾鰭の模様形成における黒色素胞の排除

次に、尾鰭の模様形成過程も尻鰭と同じように観察した。ゼブラフィッシュでは、SL6mm ごろに尾鰭が形成し始める（図 7C）。SL6.8mm ゼブラフィッシュの尾鰭では、黄色と黒の色素胞が混在している。SL7.5mm ごろになると、黄色の領域がはっきりし始め、そこから黒色素胞が排除される。成長に伴って、鰭条骨の基部から先端方向に移動する黒色素胞が観察された。しかし、黄縞部から黒縞部へと移動する細胞はほとんど観察されなかった。

体幹部や尻鰭と同様に、黄縞領域から排除された黒色素胞の縞を跨いだ移動率を算出したところ、およそ 3%であった（図 7G,H）。これは、体表や尻鰭でみられた黒色素胞の移動率とは著しく異なる結果である。

黒色素胞の移動率が尻鰭に比べて低い原因として、鰭条の配向性による黒色素胞の移動方向の制限が考えられる。鰭において色素細胞は、鰭条を移動時の足場として利用していることが観察の結果から分かる。尻鰭と尾鰭の構造上の違いとして、前者では鰭条が領域の分離方向と同方向に配向しているのに対し、後者では垂直に配向している。このことから尾鰭では、一度黄縞の領域に存在してしまうと、その領域から黒縞の領域まで移動するための手段がなくなってしまう。その結果、尾鰭では色素胞の移動方向に鰭条が存在しその移動の方向に制限が生まれ、消失反応が優位になると推測する。

2-4. 黒色素胞の挙動を制限させた場合

2-4-1. 黒色素胞の移動能が欠失した突然変異体 *dali*

尻鰭での黒色素胞の排除は、鰭条骨によって黒色素胞の移動が制限されるため、本来移動する黒色素胞が代わりに消失したのではないかと考えた。そこで、この「片方の挙動が制限された場合、もう一方の挙動が起こる」ことにより黒色素胞の排除が遂行するのかどうかを調べるため、突然変異体とトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて、これまでと同様の実験系を用い、黒色素胞の排除過程を観察した。

黒色素胞の移動が制限された状態の個体として、突然変異体である dali を用いた。dali は、膜タンパク質である Tetraspanin3c を機能欠損した変異体である。この dali の体表から採取した黒色素胞をディッシュ上で培養した際、野生型と比べて、その移動能が落ちる。この dali の模様は、野生型のような綺麗な縞模様は形成されないが、黄縞の領域から黒縞が排除されている（図 8A）。

dali では、SL7mm で筋節中隔部に黒色素胞が現れ始める。その後、野生型と同じように黄色素胞が現れ始め、始めの黄縞を形成する。将来の黄縞になる領域にいる黒色素胞は、領域の外へと移動が起きる野生型と異なり、移動がほとんど見られず、その場でとどまっているものが多かった（図 8B）。その後、SL10.5mm 頃までにすべての黒色素胞が排除された。黄縞領域から排除された黒色素胞を経時的に観察し、その移動率を調べたところ、13%となった（図 8C）。これは野生型の移動率に比べて、著しく低い結果である。

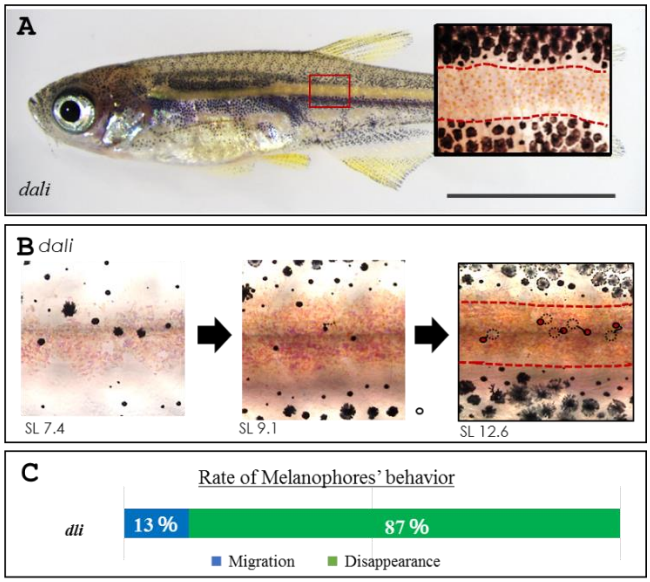


図 8　dali 変異体の黒色素胞排除機構

(A) dali 変異体の体表模様（SL13mm）

(B) dali 変異体の黒色素胞排除機構

(C) dali 変異体の黒色素胞が行う移動と消失の割合

2-4-2.　黒色素胞の消失（死）を制限したトランスジェニックゼブラフィッシュ

次に、もう一つの挙動である消失が制限された黒色素胞では、排除が行われるのかどうかを調べた。

黒色素胞の生存率を上げる方法として、黒色素胞の消失を抑制することにした。しかし、黒色素胞の生存率が上がる変異体は、これまで報告されていない。そこで、まずは黒色素胞の生存率を上げるトランスジェニックゼブラフィッシュの作製を行った。

黒色素胞の生存率を上げる遺伝子候補を探すため、まずは、培養条件下で単離した黒色素胞の生存率が上がる物質を調べた。その結果、膜透過性の cAMP 誘導体である DBcAMP を投与した際に生存率が上がることを確認した（図 9C）。

cAMP の機能は、ほ乳類の黒色素細胞の生存や分化に関わることが知られている(Hirobe, 1992, 2011)。色素細胞への作用については、主にメラノーマの研究などで詳細なデータが積み重ねられておりシグナル経路が分かっている(Rodríguez & Setaluri, 2014)。cAMP がゼブラフィッシュ生体でも黒色素胞の生存維持に関わっているのかを調べるため、cAMP シグナル経路の下流で働く PKA のドミナントネガティブ型変異を黒色素胞特異的に発現するように改変し、トランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。その結果、体表の色素沈着した黒色素胞がほぼなくなる表現型をもつゼブラフィッシュができた（図 9D）。このことは、ゼブラフィッシュ生体内で黒色素胞の維持に cAMP が関わっていることを示唆する。

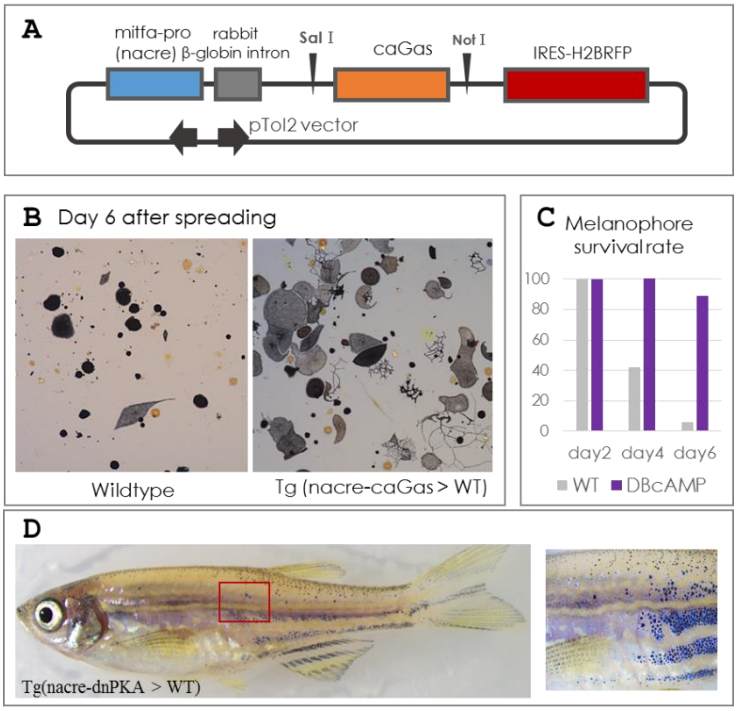


図 9　cAMP 活性型 Tg ゼブラフィッシュの作製

(A) 作製したプラスミドコンストラクト (B) 野生型から採取した黒色素胞と Tg (nacre-caGas)から採取した黒色素胞を初代培養した際の 6 日後の状態 (C) DBcAMP を投与した状態での黒色素胞の生存率 (D) Tg (nacre-dnPKA) の表現型

生体内 cAMP が黒色素胞の維持に関わっていることが分かったため、今度は細胞内で cAMP の濃度を上げるトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した（図 10A)。cAMP シグナル経路の上流に位置する三回膜貫通型 G タンパク質に恒常活性型の変異をいれたプラスミドを作製し、色素胞特異的に発現させた。その結果、黒色素胞の数が増加したゼブラフィッシュができた。このトランスジェニックゼブラフィッシュの縞模様は、野生型や dali 変異体と同じように、黄縞領域から黒色素胞が排除されている（図 10A 拡大図)。また、この個体から採取した色素細胞を培養すると、培養 6 日目の生存率が野生型に比べて著しく伸びた。この個体でも、模様形成過程を経時観察を行った。

このトランスジェニックゼブラフィッシュでは、野生型や dali に比べて、SL7mm の頃に筋節中隔に現れる黒色素胞の数が多い。また、黒色素胞の仮足が伸びているものが多く観察できる。黄色素胞が現れ始めると、黒色素胞の顆粒が凝集し小さくなる。その後、黒いストライプの領域に向かって移動する（図 10B)。経時観察の結果、殆どの黒色素胞が移動により排除されるが、中にはそのまま萎んでいくように小さくなり消失するものもあった。移動率は 82%であり、野生型の移動率に比べると、高い結果となった（図 10C,D)。

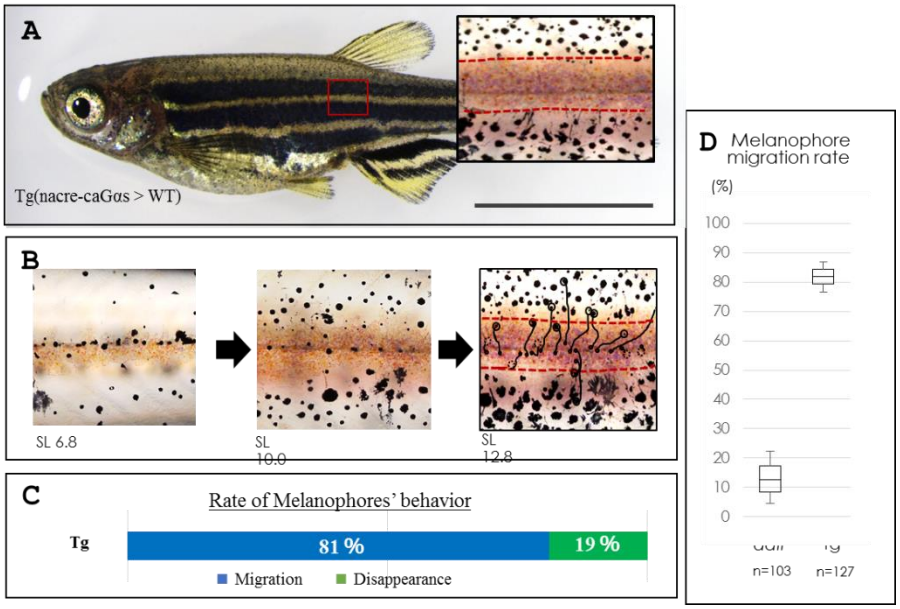


図 10　Tg(nacre-caGas>WT) の黒色素胞排除機構

(A) Tg(nacre-caGas>WT)の体表模様（SL13mm）　(B) Tg(nacre-caGas>WT)の黒色素胞排除機構（C) Tg(nacre-caGas>WT)の黒色素胞が行う移動と消失の割合（D) dali 変異体と Tg(nacre-caGas>WT) の模様形成過程における黒色素胞移動率

これらの結果は、黒色素胞が『死ぬことができない』場合には、移動の割合を増やすことによって、黄縞から黒色素胞の排除がおこなわれていることを示している。

2-4-3. 両方の挙動を制限した場合

移動と消失の両方の挙動を制限した状態では、黒色素胞の排除はどうなるのか疑問を抱いた。そこで、移動を制限した dali 変異体のバックグラウンドに、三量体 G タンパクの恒常活性型遺伝子を黒色素胞で強制発現させた魚を作製した。

dali やトランスジェニックゼブラフィッシュでは、およそ SL10.5mm で黄縞からの黒色素胞の排除が完遂する。しかし、この魚では、SL13mm になっても、黄縞の中に黒色素胞が残ったままである（図 11A,B)。このことから、移動と消失を両方同時に制限すると、黒色素胞の排除が行われないということが明らかになった。

また、SL10.3mm の Tg(nacre-caGas>WT)ゼブラフィッシュの尾鰭を観察したところ、黄縞の部分に黒色素胞が残っていた（図 11C,D）。これは、野生型の尾鰭では排除機構のほとんどが消失によって行われていたが、トランスジェニックゼブラフィッシュでは黒色素胞が死ねない状態になっているため、黄縞領域に残っている状態であると推測される。

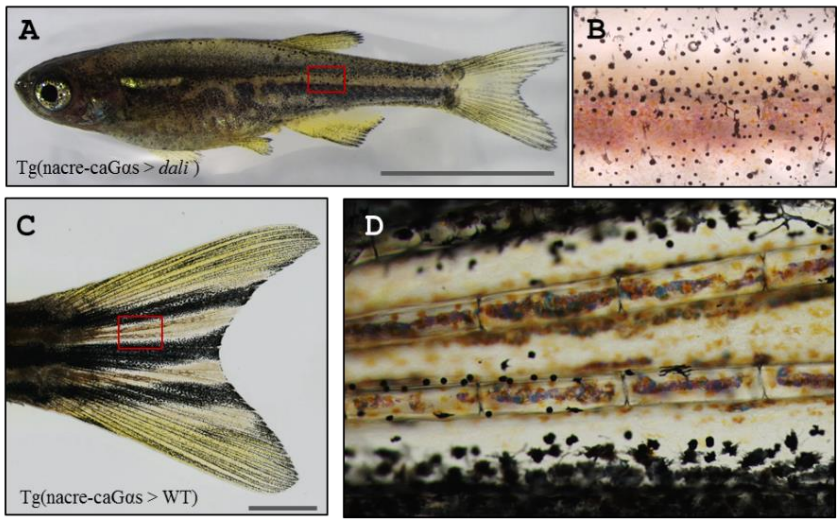


図 11　黒色素胞の移動と消失を制限した場合の表現型
(A) Tg(nacre-caGas>dali)の表現型 (B) 黄縞領域の拡大図 (C) Tg(nacre-caGas>WT)の尾鰭の表現型 (D) 黄縞領域の拡大図

以上の結果から、これらの挙動の割合の違いが、移動の制限などによる環境によって生まれることが明らかになった。しかし重要なことは、挙動の相対比が変わったとしても、黄色素胞からの『移動』と『消失』という黒色素胞の２つの振る舞いが排除機構を成立させているといったことは、体幹でも鰭でも同じであるということである。

まとめると、黒色素胞の「移動」と「消失」という二つの挙動が組み合わさって黄縞領域から排除されているという原理は、異なる条件でも共通していることが明らかになった。

考察

本研究では、黄色素胞に囲まれた黒色素胞の挙動を異なる条件下（時間、場所、遺伝的背景）で観察することで、黒色素胞の排除には、移動と消失という相補的な二種類の方法があることを明らかにした。これは。少なくとも黒色素胞の挙動に関しては、異なる条件においても同じメカニズムが作用し、二種類の相補的な挙動によって、柔軟性が生じていることを示唆する。この知見を踏まえ、模様の発生時期、体の部位におけるパターン形成過程の違いが生じる理由を、以下に考察する。

1. 模様の発生時期によるパターン形成過程の違い

これまでの研究では、発生段階で黒色素胞が体表に現れるタイミングの違いで模様形成メカニズムの違いがある可能性が疑われていたが、少なくとも黄色素胞から排除される黒色素胞の挙動に関しては、違わないことが明らかになった。模様形成初期では、先に筋節中隔域に黒色素胞が現れるため、後から現れる黄色素胞によって排除される。一方で模様形成後期では、もうすでに筋節中隔域に黄色素胞が存在した状態で黒色素胞が、その領域を避けるようにして黒縞領域に現れる。レーザーで縞の一部を構成する色素胞を全て焼ききると、黒色素胞は約二日後に元の黒縞の場所と無関係に出現する（図 6C）。これは、色素沈着がおきる前の透明な黒色素胞前駆細胞が黄縞領域内に存在していることを示唆している。このことから、通常の模様形成過程の後期では、黒色素胞前駆細胞が分化する前に黄色素胞が現れることによって、黒色素胞前駆細胞が黄色素胞に排除され、黒縞領域に移動し、その後で分化と色素沈着が行われることで、後期黒色素胞は黒縞領域に現れるということが予測される。Eom らによる最近の報告では、黒色素胞が黄色素胞からの微細な細胞仮足によって排除されているという相互作用を経時的に観察している(Eom et al., 2015)。分化前の状態から細胞間相互作用が行われている可能性検証するために、色素胞前駆細胞を用いて本研究と同じ挙動を示すかを調べることが今後の課題となる。

2. 周囲の環境による違いによるパターン形成過程の違い

野生型ゼブラフィッシュの体幹の縞は、線幅を変えずに尾鰭まで伸びていることから、同じメカニズムで模様が形成されていると考えられている。しかし、虹色素胞を欠損した変異体ゼブラフィッシュでは、鰭では正常な縞模様をもつ一方で、体幹できれいな縞模様を形成することができない(Frohnhöfer et al., 2013; Patterson & Parichy, 2013)。これは体幹と鰭で模様形成に伴う何かが異なっていることを示している。またそれは、模様形成メカニズ

ムが違うのか、それとも模様形成メカニズムを支える環境が違うのか、という問題となる。本研究の結果から黒色素胞の挙動は体幹と鰭の両方で同じであることが分かったため、この原因は黄色素胞の挙動にあるのではないかと考えられる。Parichy らは、体幹の黄色素胞の維持には、虹色素胞が発現する *colony stimulation factor 1*（csf1）が必要であることを示している(Patterson & Parichy, 2013)。彼らはまた、鰭では、csf1 を発現する細胞が虹色素胞以外の鰭に存在する他の細胞によって発現されていることも報告している。これらの同定されていない鰭の csf1 発現細胞が、体幹での虹色素胞と同じような役割で黄色素胞と相互作用をしている場合に、チューリングモデルで示されるような黒色素胞と黄色素胞で行われている相互作用ネットワークを体幹および鰭の両方に適合させることができる。

3. 培養条件下でのパターン形成因子

本研究の観察結果から、ゼブラフィッシュの色素細胞では、黒色素胞の移動と消失のどちらか一方の挙動が成立すれば、排除が成立することが分かった。この結果をもとに、培養下での黒色素胞と黄色素胞の相互作用を考えた際に、黒色素胞の消失がなくても、移動だけでパターンができるはずである。しかし、実際はパターンができなかった。

培養下でパターンが形成されない理由としては、他の環境因子が必要であるということが考えられる。例えば、体幹部では色素細胞は真皮層に存在しており、周りに表皮細胞がたくさん存在する。虹色細胞が黒色素胞と黄色素胞の裏打ちとして存在していることも、環境因子の一つとして作用している可能性がある。また、鰭の色素細胞は、鰭条骨に沿って存在していることや、周りにファイブロブラストやケラチノサイトが存在することがわかっている。これらの細胞が、黄色と黒色の色素細胞間相互作用を“健全に”行わせるために必要であるのかもしれない。

色素細胞以外の細胞が、パターンを作ることに必要であるかを調べるために、色素細胞のみを単離している条件を変えて、鰭全体の細胞をディッシュに蒔いて培養させる実験も行った。その結果、変わったパターンが現れた（図 12）。しかし、このパターン形成をリアルタイムで観察したところ、黄色素胞と黒色素胞の相互作用というよりも、その下に存在する、他の透明な細胞が先導して動いているように見えた。また、体表の縞模様が斑点模様になる表現型のゼブラフィッシュ変異体や、黒色素胞と黄色素胞の“追いかけっこ反応”が行われない表現型をもつ変異体から採取した細胞たちで、同様の培養実験を行ったが、同じようなパターンが見られた。さらに、黄色素胞を欠損した表現型の変異体から採取した細胞たちでも行ったところ、パターンがみられた。これらの結果から、鰭全体から採取した細胞で形成されるパターンは、黒色素胞と黄色素胞の相互作用によって形成されるパターンとは異なることが示唆された。このパターンは、経時的に変化していくことから、表皮細胞の細胞選別が原因となり起きた現象なのではないかと考えられる。

図 12　色素細胞以外の細胞も共培養させたときの培養皿全体図

Patterson らは、黄色細胞の維持に csf1 が重要な因子であることを報告している。DBcAMP 投与時の培養下では、黄色素胞の生存は維持されることが確認できているが、もしかしたら“ただ”生存しているだけでは、正常な色素細胞間相互作用ができないのかもしれない。csf1 の働きにより、“追いかけっこ”だけではなく、例えば黒色素胞同士の団結を強める等といった指示が、黄色素胞から黒色素胞に作用するのかもしれない。

鰭では、csf1 を放出する細胞が同定できていない。今回のように、色素細胞とその他の表皮細胞などを共培養させた状態では、表皮細胞などが先導して動きまわってしまうことにより、色素細胞の相互作用を見ることができなかった。これらの表皮細胞などがコンフルエントで安定した状態を保持したうえで、色素細胞を上から培養したら、色素細胞間相互作用に必要な因子のみが色素細胞に作用し、パターンが形成されるかもしれない。

4. 今後の展開

体表模様が形成される際さまざまな色素胞間の相互作用が行われているため、細胞レベルの挙動を組み込んだシミュレーションが模様形成メカニズムの理解に必要である。近年、いくつかの数理分野の研究では、模様形成を担う色素胞のエージェントベースモデルを構築し、ゼブラフィッシュの縞模様をある程度まで再現することに成功している(Volkening & Sandstede, 2015)。しかし、これまでの模様形成の報告が模様形成初期段階の体幹から得られたものを基準に設計されているため、細胞の挙動を司るすべてのパラメータが実際の実験結果に則したものではない。本研究で得られた、体表模様形成の頑強性を担う二種類の相補的な挙動メカニズムは、エージェントベースモデルの模様形成シミュレーションを実現することに貢献できると考える。

参考文献

Cleggs, C.H., Correll, L.A., Cadd, G.G., & Mcknightq, G.S. (1987). Inhibition of Intracellular CAMP-dependent Protein Kinase Using Mutant Genes of the Regulatory Type I Subunit *.

Eom, D.S., Bain, E.J., Patterson, L.B., Grout, M.E., & Parichy, D.M. (2015). Long-distance communication by specialized cellular projections during pigment pattern development and evolution. *Elife* **4**, 1–25.

Frohnhöfer, H.G., Krauss, J., Maischein, H.-M., & Nüsslein-Volhard, C. (2013). Iridophores and their interactions with other chromatophores are required for stripe formation in zebrafish. *Development* **140**, 2997–3007.

Gierer, A., & Meinhardt, H. (1972). A Theory of Biological Pattern Formation. *Kybernetik* **12**, 30–39.

Gilchrist, A., Bu, M., Li, A., Hosey, M.M., & Hamm, H.E. (1999). A Dominant-Negative Strategy for Studying Roles of G Proteins in Vivo *. **274**, 6610–6616.

Graziano, M.P., & Gilman, A.G. (1989). Synthesis in Eschesichia coli of GTPase-deficiect Mutants of Gsa. *J. Biol. Chem.* **264**, 15475–15482.

Haffter, P., Odenthal, J., Mullins, M.C., et al. (1996). Mutations affecting pigmentation and shape of the adult zebrafish. *Dev. Genes Evol.* **206**, 260–276.

Hamada, H., Watanabe, M., Lau, H.E., Nishida, T., Hasegawa, T., Parichy, D.M., & Kondo, S. (2014). Involvement of Delta/Notch signaling in zebrafish adult pigment stripe patterning. *Development* **141**, 1418–1418.

Hirata, M., Nakamura, K. ichiro, Kanemaru, T., Shibata, Y., & Kondo, S. (2003). Pigment cell organization in the hypodermis of zebrafish. *Dev. Dyn.* **227**, 497–503.

Hirata, M., Nakamura, K.I., & Hondo, S. (2005). Pigment cell distributions in different tissues of the zebrafish, with special reference to the striped pigment pattern. *Dev. Dyn.* **234**, 293–300.

Hirobe, T. (1992). Melanocyte stimulating hormone induces the differentiation of mouse epidermal melanocytes in serum-free culture. *J. Cell. Physiol.* **152**, 337–345.

Hirobe, T. (2011). How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment Cell Melanoma Res.* **24**, 462–478.

Inaba, M., Yamanaka, H., & Kondo, S. (2012). Pigment pattern formation by contact-dependent depolarization. *Science (80-.).* **335**, 677.

Inoue, S., Kondo, S., Parichy, D.M., & Watanabe, M. (2014). Tetraspanin 3c requirement for pigment cell interactions and boundary formation in zebrafish adult pigment stripes.

Pigment Cell Melanoma Res. **27**, 190–200.
Iwashita, M., Watanabe, M., Ishii, M., Chen, T., Johnson, S.L., Kurachi, Y., Okada, N., & Kondo, S. (2006). Pigment pattern in jaguar/obelix zebrafish is caused by a Kir7.1 mutation: Implications for the regulation of melanosome movement. *PLoS Genet.* **2**, 1861–1870.
Kondo, S. (2017). An updated kernel-based Turing model for studying the mechanisms of biological pattern formation. *J. Theor. Biol.* **414**, 120–127.
Kondo, S., & Asai, R. (1995). A reaction diffusion wave on the skin of the marine angelfish Pomacanthus. *Nature* **376**, 765–768.
Kondo, S., & Miura, T. (2010). Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation. *Science (80-.).* **329**, 1616–1620.
Larson, T.A., Gordon, T.N., Lau, H.E., & Parichy, D.M. (2010). Defective adult oligodendrocyte and Schwann cell development , pigment pattern , and craniofacial morphology in puma mutant zebra fi sh having an alpha tubulin mutation. **346**, 296–309.
Lister, J.A., Robertson, C.P., Lepage, T., Johnson, S.L., & Raible, D.W. (1999). Nacre Encodes a Zebrafish Microphthalmia-Related Protein That Regulates Neural-Crest-Derived Pigment Cell Fate. *Development* **126**, 3757–3767.
Liu, R.T., Liaw, S.S., & Maini, P.K. (2006). Two-stage Turing model for generating pigment patterns on the leopard and the jaguar. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **74**, 24–29.
Maderspacher, F.., & Nüsslein-Volhard, C. (2003). Formation of the adult pigment pattern in zebrafish requires leopard and obelix dependent cell interactions. *Development* **130**, 3447–3457.
Maini, P.K. (2004). The impact of Turing's work on pattern formation in biology. *Math. Today* **August**, 140–141.
Marcon, L., & Sharpe, J. (2012). Turing patterns in development: What about the horse part? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 578–584.
Miyazawa, S., Okamoto, M., & Kondo, S. (2010). Blending of animal colour patterns by hybridization. *Nat. Commun.* **1**, 1–6.
Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., & Nüsslein-Volhard, C. (1994). Large-scale mutagenesis in the zebrafish: In search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr. Biol.* **4**, 189–202.
Murray, J.D., & Myerscough, M.R. (1991). Pigmentation pattern formation on snakes. *J. Theor. Biol.* **149**, 339–360.
Nakamasu, A., Takahashi, G., Kanbe, A., & Kondo, S. (2009). Interactions between zebrafish pigment cells. *Pnas* **106**, 8429–8434.

Odenthal, J., Rossnagel, K., Haffter, P., et al. (1996). Mutations affecting xanthophore pigmentation in the zebrafish, Danio rerio. *Development* **123**, 391–398.
Orellana, S.A., & Mcknight, G.S. (1992). Mutations in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase result in unregulated biological activity. **89**, 4726–4730.
Parichy, D.M., & Turner, J.M. (2003). Temporal and cellular requirements for Fms signaling during zebrafish adult pigment pattern development. *Development* **130**, 817–833.
Parichy, D.M., Rawls, J.F., Pratt, S.J., Whitfield, T.T., & Johnson, S.L. (1999). Zebrafish sparse corresponds to an orthologue of c-kit and is required for the morphogenesis of a subpopulation of melanocytes , but is not essential for hematopoiesis or primordial germ cell development. **3436**, 3425–3436.
Parichy, D.M., Mellgren, E.M., Rawls, J.F., Lopes, S.S., Kelsh, R.N., & Johnson, S.L. (2000a). Mutational Analysis of Endothelin Receptor b1 (rose) during Neural Crest and Pigment Pattern Development in the Zebrafish Danio rerio. **306**, 294–306.
Parichy, D.M., Ransom, D.G., Paw, B., Zon, L.I., & Johnson, S.L. (2000b). 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**, 3031–3044.
Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N., & Engeszer, R.E. (2009). Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev. Dyn.* **238**, 2975–3015.
Patterson, L.B., & Parichy, D.M. (2013). Interactions with Iridophores and the Tissue Environment Required for Patterning Melanophores and Xanthophores during Zebrafish Adult Pigment Stripe Formation. *PLoS Genet.* **9**, 1–14.
Rodríguez, C.I., & Setaluri, V. (2014). Cyclic AMP (cAMP) signaling in melanocytes and melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **563**, 22–27.
Singh, A.P., Schach, U., & Nüsslein-Volhard, C. (2014). Proliferation, dispersal and patterned aggregation of iridophores in the skin prefigure striped colouration of zebrafish. *Nat. Cell Biol.* **16**, 607–614.
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**, 677–686.
Turing, A.M. (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **237**, 37–72.
Volkening, A., & Sandstede, B. (2015). Modelling stripe formation in zebrafish: an agent-based approach. *J. R. Soc. Interface* **12**.
Watanabe, M., & Kondo, S. (2012). Changing clothes easily: Connexin41.8 regulates skin

pattern variation. *Pigment Cell Melanoma Res.* **25**, 326–330.
Watanabe, M., & Kondo, S. (2015). Is pigment patterning in fish skin determined by the Turing mechanism? *Trends Genet.* **31**, 88–96.
Watanabe, M., Iwashita, M., Ishii, M., Kurachi, Y., Kawakami, A., Kondo, S., & Okada, N. (2006). Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene. *EMBO Rep.* **7**, 893–897.
Wolpert, L. (2011). Principles of development (fourth edition). *Oxford Univ. Press* , doi: 10.1080/00219266.2011.592542.
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.* **104**, 4790–4793.
Yamanaka, H., & Kondo, S. (2014). In vitro analysis suggests that difference in cell movement during direct interaction can generate various pigment patterns in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 1867–1872.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始適切な助言を賜り、研究の進め方や考察の仕方、論文の書き方や発表方法など、研究者として必要であり大切な事を、毎日丁寧に指導してくださった近藤滋教授に深く感謝いたします。

研究者として右も左も分からない状態であった私に、研究について何から何まで大変丁寧にご指導くださり、朝から夜中まで研究に関する熱心な議論を頂戴し、いつも的確な助言をくださった荒巻敏寛氏には、大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

パターン形成研究室の研究者および大学院生の方々には、実験手法を懇切丁寧にご教示いただいたり、活発な議論を行ったりと、多くの刺激と示唆を頂きました。本当にありがとうございます。

My heartfelt appreciation goes to Prof. Kondo who provided helpful comments and suggestions. I also owe a very important debt to Dr. Aramaki who gave me invaluable comments and warm encouragements. I would also like to express my gratitude to my family for their moral support and warm encouragements. This research was supported by “Program for Leading Graduate Schools” of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

業績

【Academic paper】

1. Risa Sawada, Toshihiro Aramaki and Shigeru Kondo, “Flexibility of pigment cell behavior permits the robustness of skin pattern formation” , Genes to Cells, Vol. 23, No. 7 (2018), Page 537-545
2. Masakatsu Watanabe, Risa Sawada, Toshihiro Aramaki, I. Martha Skerrett and Shigeru Kondo, “The physiological characterization of Connexin41.8 and Connexin39.4, which are involved in the stripe pattern formation of zebrafish”, The Journal of Biological Chemistry, January 15 (2016), 291 (3), p.1053-63
3. Kenji Urai, Risa Sawada, Natsuki Hiasa, Masashi Yokota and Fabio DallaLibera, “Design and control of a ray-mimicking soft robot based on morphological features for adaptive deformation”, Artificial Life and Robotics, Volume 20, Issue 3 (2015), Page 237-243

【International conference】

1. ○Risa Sawada, Toshihiro Aramaki and Shigeru Kondo, “Two types of exclusion mechanism among pigment cells in zebrafish skin pattern formation”, Joint Events, the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan, Okinawa, Japan, November 2016. (Poster presentation)
2. ○Kenji Urai, Risa Sawada, Natsuki Hiasa, Masashi Yokota and Yutaka Nakamura, "Development of a Ray-like Robot as a Next Generation Bio-inspired Autonomous Underwater Vehicle", The 6th International Symposium on Aero Aqua Bio-mechanisms(ISABMEC), Proceedings of the Sixth International Symposium on Aero Aqua Bio-mechanisms ISABMEC 2014 pp. 171-175, Honolulu, USA, November 2014. (Oral presentation)
3. ○Kenji Urai, Risa Sawada, Natsuki Hiasa, Masashi Yokota and Fabio DallaLibera, "Design and Control of a Ray-mimicking Soft Robot based on Morphological Features for Adaptive Deformation", International symposium on artificial life and robotics (AROB), pp. 107-111, Beppu, Japan, January 2015. (Oral presentation)

【Domestic conference】

1. ○澤田莉沙，平井健司，近藤滋，渡邉正勝，「ギャップジャンクション変異体がもたらすゼブラフィッシュの模様変化」，新学術領域 動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成　第３回 若手の会，栃木, 2013 年 11 月.（ポスター発表）

2. ○澤田莉沙, 荒巻敏寛, 近藤滋, 渡邉正勝, 「ゼブラフィッシュの縞模様形成におけるギャップ結合の役割」, 日本動物学会第 85 回大会, 宮城, 2014 年 9 月.（口頭発表）
3. ○澤田莉沙, 近藤滋, 渡邉正勝, 「Role of gap junction for pre-pattern formation of zebrafish pigment cells」, 第 37 回日本分子生物学会年会, 神奈川, 2014 年 12 月.（ポスター発表）
4. ○澤田莉沙, 「ゼブラフィッシュの模様形成における cAMP シグナルの役割」, 第 2 回細胞生物若手の会シンポジウム, 京都, 2016 年 5 月.（フラッシュトーク）
5. ○澤田莉沙, 荒巻敏寛, 近藤滋, 「Two types of exclusion mechanism among pigment cells in zebrafish skin pattern formation」, 第 39 回日本分子生物学会年会, 神奈川, 2016 年 11 月.（ポスター発表）
6. ○澤田莉沙,「シマシマ魚のシマシマ形成 黄色素細胞が黒色素細胞を排除するしくみ」, 小型魚類研究会サテライトシンポジウム 第 2 回帰ってきたムシ vs.サカナ, 山梨, 2017 年 9 月.（口頭発表）
7. ○澤田莉沙, 荒巻敏寛, 近藤滋, 「Exclusion mechanisms among pigment cells in zebrafish pattern formation」, 第 23 回小型魚類研究会, 山梨, 2017 年 9 月.（ポスター発表）
8. ○澤田莉沙, 荒巻敏寛, 近藤滋, 「Exclusion mechanisms among pigment cells in zebrafish pattern formation」, 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017 年 12 月.（ポスター発表）

【Publication】

1. NIFREL の館内リーフレットの一部コラム, 「さかなの”もよう”メカニズムを解説！」, 澤田莉沙, 2016 年 11 月発行.
2. NIFREL の公式 Web ページ上のコラム「生きもののもよう 澤田研究員による紹介」, 澤田莉沙, 2017 年 4 月.

【Award】

1. ベストポスター賞, 大阪大学大学院生命機能研究科 第 7 回 若手合宿研究交流会, 京都, 2013 年 7 月.
2. ベストポスター賞, 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」 第 3 回 若手の会, 栃木, 2013 年 11 月.
3. アイデアコンペ準優勝, 博士課程教育リーディングプログラム フォーラム 2013 「ネクストビジョナリー」, 大阪, 2014 年 1 月.
4. ベストポスター賞, 大阪大学大学院生命機能研究科 第 8 回 若手合宿研究交流会, 京都, 2014 年 7 月.
5. ベストプレゼンテーション賞, 第 23 回小型魚類研究会 サテライトシンポジウム 第 2 回帰ってきたムシ vs.サカナ, 山梨, 2017 年 9 月.

【Other presentation】

1. ○澤田莉沙，「Connexin is the key which is the relation between pattern formation and RD system」，第 7 回 学生主催 若手合宿研究交流会，京都, 2013 年 7 月.（ポスター発表）
2. ○浦井健次，澤田莉沙，日浅夏希，横田将志，「エイの筋骨格構造を模した水中ロボットの開発」， 第 25 回 OACIS シンポジウム，大阪, 2013 年 11 月.（ポスター発表）
3. ○澤田莉沙，「Pattern Formation by Gap junction」，生命機能研究科 第 8 回 学生主催 若手合宿研究交流会，京都, 2014 年 7 月.（ポスター発表）
4. ○日浅夏希，浦井健次，澤田莉沙，横田将志，「A Study of a Underwater Propulsion Mechanism based on Morphological Features of Ray」，第 27 回 OACIS シンポジウム，大阪, 2014 年 12 月.（ポスター発表）
5. ○澤田莉沙，「How to create skin pattern in zebrafish」，生命機能研究科 第 9 回 学生主催 若手合宿研究交流会，奈良, 2015 年 7 月.（ポスター発表）
6. ○澤田莉沙，「魚の模様形成における cAMP シグナルの役割」，第 28 回おさかな勉強会，大阪, 2016 年 4 月.（口頭発表）
7. ○高田一輝，○Alex keeley，澤田莉沙，川田哲也，垣塚太志，平野三春. 「インフラの Re-naturalization —水資源の持続可能な利用を題材として—」，博士課程教育リーディングプログラムフォーラム 2013 ネクストビジョナリー，大阪, 2014 年 1 月.（口頭発表）
8. ○浦井健次，澤田莉沙，日浅夏希，横田将志，中村泰. 「エイの形態学的特徴を模倣した水中ロボットの開発」, The 1st HWIP 学生主催 Humanware Café，大阪, 2014 年 9 月.（ポスター発表）
9. ○澤田莉沙，浦井健次，日浅夏希，横田将志. 「多様な動きを実現したエイ形態模倣ロボットの開発」，大阪大学未来戦略シンポジウム ヒューマンウェアで描く未来 ～リーダー育成への布石～，大阪， 2014 年 11 月.（ポスター発表）
10. ○澤田莉沙，「おもろい学術研究：皮膚模様形成の原理」，Humanware Café 2016 一緒に，未来の話をしよう，2016 年 11 月.（口頭発表）
11. ○澤田莉沙，「いきものの色と模様」，株式会社海遊館スタッフ向けレクチャー，大阪，2016 年 12 月.（講義形式）
12. ○澤田莉沙，横田将志，浦井健次.「Development of a Underwater Soft Robot based on Morphological Features of Ray」, Humanware International Symposium 2017，大阪, 2017 年 1 月.（ポスター発表）