



Title	ゼブラフィッシュの体表模様形成に関するギャップ ジャンクションネットワークに関する研究
Author(s)	臼居, 優
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73594
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (臼居 優)	
論文題名	ゼブラフィッシュの体表模様形成に関するギャップジャンクションネットワークに関する研究 (A study of gap junction network in zebrafish skin pattern formation)
論文内容の要旨	
<p>ゼブラフィッシュの体表に見られる黒と黄色のストライプは、2種類の色素細胞、黑色素胞と黄色素胞から構成され、その形成には色素細胞間の相互作用が重要な役割を担っている。この細胞間相互作用を担う分子として、ギャップジャンクションタンパク質のConnexin39.4 (Cx39.4) とConnexin41.8 (Cx41.8) が存在する。これらコネキシンの変異体は特徴的な体表模様変化を引き起こし、<i>cx39.4</i>変異体は迷宮模様を、<i>cx41.8</i>変異体は斑点模様を示す。さらに<i>cx39.4</i>と<i>cx41.8</i>の二重変異体 (WKO) は体表にほとんど黑色素胞が存在しない。ところで、Cx39.4とCx41.8はmRNAレベルでは黑色素胞と黄色素胞、両細胞での発現が確認されているが、体表模様形成においてどのような役割を担っているのかについては明らかにされていなかった。そこで本研究では、体表模様形成におけるCx39.4やCx41.8の役割について解析を行い、それぞれの機能の解明を目指した。</p> <p>まず、黑色素胞と黄色素胞の網羅的な遺伝子発現解析を行い、黑色素胞と黄色素胞に発現するコネキシン遺伝子が<i>cx39.4</i>と<i>cx41.8</i>だけであることを確認した。次に、WKOを用いて、黑色素胞特異的あるいは黄色素胞特異的に<i>cx39.4</i>または<i>cx41.8</i>を発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュを作製し、体表模様形成へのコネキシンの効果を検証した。その結果、WKOの黑色素胞特異的に<i>cx39.4</i>を発現した系統では、<i>cx41.8</i>を発現した系統に比べて黑色素胞数の著しい増加が見られた。対照的に、黄色素胞特異的にコネキシンを発現したゼブラフィッシュでは<i>cx39.4</i>を発現した系統よりも<i>cx41.8</i>を発現した系統において黑色素胞数の増加が見られた。これら遺伝子組み換えゼブラフィッシュの交配により、黑色素胞で<i>cx39.4</i>、黄色素胞で<i>cx41.8</i>を同時に発現する二重遺伝子組み換えゼブラフィッシュを作製したところ、ストライプの回復が見られた。この結果から、黑色素胞で<i>cx39.4</i>、且つ黄色素胞で<i>cx41.8</i>の発現はゼブラフィッシュがストライプを形成するための十分条件であることが明らかとなった。一方で、これ以外の組み合わせの二重遺伝子組換体ではストライプの回復が見られず、それぞれの色素細胞でそれぞれのコネキシン特異的な機能が必要とされていることが明らかとなった。続いて、色素細胞内のコネキシンの分布を観察するため、EGFPタグを付加したCx39.4とCx41.8を用いて、ギャップジャンクションの可視化を試みた。その結果、Cx39.4はC末端領域にEGFPを挿入した融合タンパク質が有効であり、C末端領域が <i>in vivo</i> と <i>in vitro</i> の両方で機能的なギャップジャンクション形成に必要だった。一方、Cx41.8に関してはC末端の細胞内領域を全て取り除きEGFPを融合した融合タンパク質が有効であり、変異体の表現型を相補したが、<i>in vitro</i> ではギャップジャンクションラークを形成しなかった。またEGFPを付加したCx39.4やCx41.8を発現するゼブラフィッシュの観察から、黑色素胞間にギャップジャンクションの形成を示すラークが確認された。</p> <p>次に、黒-黄色素胞間に形成されるギャップジャンクションが黑色素胞への生存シグナルを伝達するという仮説を検証するため、Cx39.4-ギャップジャンクションの機能解析を行った。C末端領域にEGFPを挿入したCx39.4をNeuro2a細胞に発現させ、ギャップジャンクションラークを形成した細胞対にパッチクランプを行なった。片方の電極にスペルミジンを入れて解析することにより、Cx39.4-ギャップジャンクションがスペルミジン依存的な整流性を持つことを明らかにした。</p> <p>以上の結果から、ゼブラフィッシュのストライプ形成に関するギャップジャンクションネットワークとして、黑色素胞間にCx39.4-Cx39.4、黄色素胞間にCx41.8-Cx41.8、黒-黄色素胞間にCx41.8-Cx39.4のギャップジャン</p>	

クションを単離した。さらに、黒色素胞に存在するスペルミジンにより黄-黒色素胞間のギャップジャンクションが方向性を持ち、黃色素細胞から黒色素細胞へ与えられる活性化シグナルはギャップジャンクション依存的であることが示唆された。

またゼブラフィッシュの黒色素胞はおよそ半数が多核化している。このことから黒色素胞の多核化が体表模様形成に重要な役割を担っていると予想し、1核と2核の黒色素胞の性質を比較した。その結果、黒色素胞の多核化が細胞サイズと生存能に関連していることを明らかにした。また、黒色素胞の多核化には3種類の経路があることも明らかにした。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名(白居優)		氏名
	(職)	
論文審査担当者	主査	教授
	副査	教授
	副査	教授
	副査	教授
		近藤 滋
		佐々木 洋
		甲斐 歳恵
		八木 健

論文審査の結果の要旨

白居優氏の研究は、動物の皮膚模様形成の原理における、ギャップジャンクションの機能の詳細を明らかにしたものである。皮膚の模様は、色の異なる色素細胞が、互いの反発・集合作用により、自己組織化することで現れることが解っているが、その分子的な詳細は未知のままであった。その原因は、色素細胞間の相互作用が、分子レベルの研究が難しいギャップジャンクションによって仲介されることと、2種類のコネキシンが発現しているため、それらの役割分担が解らなかったことである。白居氏は、2つのコネキシンをKOした個体に、細胞特異的にコネキシン遺伝子を発現させることで、ミニマムなギャップジャンクションのネットワークを見出した。これは、今後の分子レベルの研究の基礎となるものであり、博士号取得に十分に値するものと評価された。