



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

ゼブラフィッシュの体表模様形成に関する
ギャップジヤ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

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

臼居 優

修了年月 令和元年 9月

Abstract

The stripe pattern of zebrafish consists of two types of pigment cells, melanophores and xanthophores, and interaction among pigment cells are crucial for the stripe pattern formation. Two gap junction proteins, Connexin39.4 (Cx39.4) and Connexin41.8 (Cx41.8), are involved in the stripe pattern formation; *cx39.4* and *cx41.8* are expressed in both melanophore and xanthophore, and mutants fish show labyrinth and spot skin patterns, respectively. Although the importance of gap junction for pattern formation is obvious, the question how these connexins contribute to the skin pattern formation remains unclear. In this study, to elucidate the connexin function in pigment cells, I investigated how connexin proteins contribute to the pattern formation.

Firstly, using melanophore- and xanthophore-specific promoters, I generated transgenic zebrafish lines, in which *cx39.4* and/or *cx41.8* is expressed in melanophores and/or xanthophores. From this experiment, I extracted the minimal gap junction network required for stripe pattern formation, namely, Cx41.8 in xanthophore and Cx39.4 in melanophore. Along with this experiment, I also found that Cx41.8 expressed in melanophore has a function to stabilize melanophore stripe. To examine the connexin localizations, I generated fluorescent protein-tagged Cx39.4 and Cx41.8. The case of Cx39.4, the insertion of EGFP into the Cx39.4 C-terminal domain is effective, and the C-terminal domain is required for its function in vivo and in vitro. On the other hands, C-terminal deletion of Cx41.8 is effective; EGFP fused 240aa-Cx41.8 was functional in vivo, although it did not form a gap junction plaque in vitro.

Next, to verify the hypothesis that gap junction between xanthophore to melanophore mediates survival signal for melanophore, I examined Cx39.4-gap junction property. EGFP-tagged Cx39.4 was expressed in N2a cells, and pairs of N2a cells which showed gap junction plaque between them, were applied to the patch clamp experiments. By this experiment, I successfully detected spermidine dependent rectification property of Cx39.4. Taken together with the transgenic experiments, I presented a gap junction network model that xanthophores are connected with Cx41.8-gap junction, melanophores are connected with Cx39.4 gap junction, and xanthophore and melanophore are connected with Cx41.8-Cx39.4 heterotypic gap junction which may mediate directional controlled signal flow from xanthophore to melanophore.

Along with the experiments above, I noticed that a half of melanophores is

multinucleated. I hypothesized that the multinucleation might be important for melanophore survival and stripe pattern formation. To elucidate this question, I examined the relationship between multinucleation and cell size, motility, and its survival, and also examined the multinucleation mechanism of melanophore. As the results, I found that the multinucleation of melanophore correlated with survival of melanophore, and that there are at least 3 multinucleation pathways in melanophore.

要旨

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、黑色素胞と黃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、*cx39.4* 変異体は迷宮模様を、*cx41.8* 変異体は斑点模様を示す。さらに *cx39.4* と *cx41.8* 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黃色素胞、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。

まず、黑色素胞と黃色素胞の網羅的な遺伝子発現解析を行い、黑色素胞と黃色素胞に発現するコネキシン遺伝子が *cx39.4* と *cx41.8* 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黃色素胞特異的に *cx39.4* または *cx41.8* 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 *cx39.4* を発現した系統では、*cx41.8* 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、黃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 *cx39.4* を発現した系統よりも *cx41.8* 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ebraフィッシュの交配により、黑色素胞で *cx39.4*、黃色素胞で *cx41.8* を同時に発現する二重遺伝子組み換えゼebra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、黑色素胞に *cx39.4*、且つ黃色素胞に *cx41.8* の発現はゼebra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み換え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 *in vivo* と *in vitro* 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、*in vitro*ではギャップジャンクションプラーカーを形成しなかった。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プラーカーが確認された。

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プラーカー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。

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わ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、黄-黑色素胞間にCx41.8-Cx39.4のギャップジャンクションを単離した。さらに、黑色素胞に存在するスペルミジンにより黄-黑色素胞間のギャップジャンクションが方向性を持ち、黄色素細胞から黑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黑色素胞はおよそ半数が多核化している。黑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た。そこで1核と2核の黑色素胞を比較したところ、黑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、黑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。

目次

1. 序論	7
2. 色素細胞の多核化について	
2.1. 研究背景	11
2.2. 材料と方法	13
2.3. 結果	17
2.4. 考察	23
2.5. 結論	25
3. 色素細胞間のギャップジャンクションネットワークについて	
3.1. 研究背景	26
3.2. 材料と方法	30
3.3. 結果	44
3.4. 考察	66
3.5. 結論	72
4. 今後の展望	73

引用文献

謝辞

業績

1.序論

1.1 細胞集団サイズの規定について

生物は細胞分裂と細胞分化により多様な細胞を生成しながら形態形成を行う。生成された細胞は、大きさと形状の変化や細胞運動を介して、同種細胞同士の接着、異種細胞の排除、細胞集団を維持するための生存シグナルの伝達と共有などを行う。これらの同種細胞間あるいは多種細胞間の相互作用は、同種細胞の細胞集団サイズや異種細胞集団との境界を決定する。この過程を通して、生物は特定の形と大きさの繰り返し構造、すなわち「パターン」を持つことができる（図1）。

生物のパターン形成は、それを再現する有力な数理モデルが提唱されている一方で、パターン形成に関わる細胞間相互作用を担う分子メカニズムに関しては不明な点が多い。そこで本研究は、数理モデルに基づき、パターン形成に関わる細胞間シグナルの解明に取り組み、生物の形態形成原理の理解を試みた。

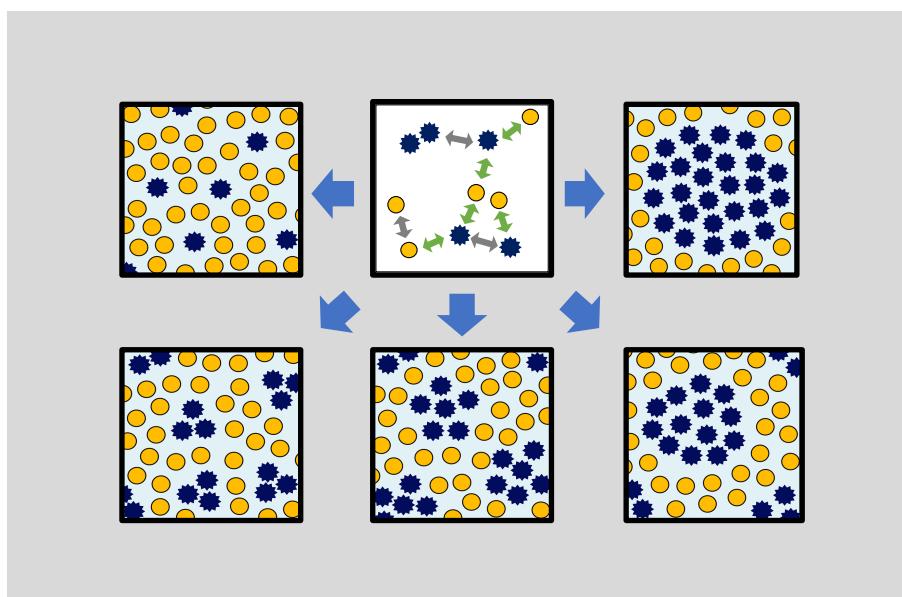


図1. 同種・異種細胞間の相互作用により形成される様々な細胞集団サイズのパターン
同種細胞間の相互作用を灰色の矢印で示し、異種細胞間の相互作用を緑色の矢印で示した。

1.2 反応拡散系

生物が空間中にパターンを自発的に形成する現象を再現する数理モデルとして反応拡散系がある。反応拡散系は、Alan Turing が提唱した数理理論である¹。この

理論では、拡散係数の異なる2つの仮想因子（活性化因子と抑制因子）の相互作用の仕方の違いにより、多彩なパターンを作り出すことができる。これらのパターン形成は、活性化因子の自己活性化による「短距離のポジティブフィードバック」と、活性化因子が抑制因子を活性化し、抑制因子が活性化因子を抑制する「長距離のネガティブフィードバック」という2つの関係性を基本要素とする^{2,3}。

動物の体表模様は反応拡散系に基づいて形成されることが古くから考えられていた。この推測はタテジマキンチャクダイ (*Pomacanthus imperator*) の体表模様形成や貝殻の模様形成の観察から実証され、生物のパターン形成を説明できる数理理論として認められた^{4,5}。

1.3 ゼブラフィッシュの体表模様形成

野生型(WT)のゼブラフィッシュは黒色と黄色のストライプを示す(図2A)。ゼブラフィッシュの体表模様は主に2種類の色素細胞から構成されており、黒色領域に黑色素胞の集団、黄色領域に黄色素胞の集団が存在する(図2B)。ゼブラフィッシュは黑色素胞と黄色素胞以外に2種類の色素細胞を有しており、黑色素胞と黄色素胞の下層には虹色素胞が存在している^{6,7}。また最近、新たに白色素胞が背ヒレの前端部と尾ヒレの末端部に存在していることが明らかになった⁸。

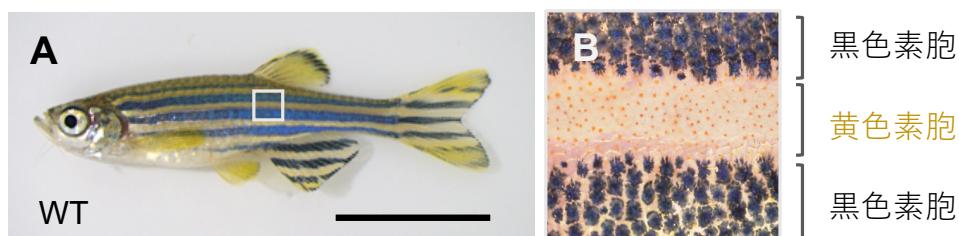


図2. ゼブラフィッシュの体表模様

(A) 野生型ゼブラフィッシュは黒色と黄色のストライプを呈している。(B) (A) の白枠領域の拡大写真。黒色領域のドット一つ一つは黑色素胞、黄色領域のドットは黄色素胞を示す。スケールバーは10 mmを示す。

ゼブラフィッシュの体表模様は黑色素胞と黄色素胞の相互作用により形成される。変態期(生後20日頃)のゼブラフィッシュの体側面には頭尾軸方向に沿って一

列に黒色素胞が配置されている。その数日後に、黒色素胞が配列している領域に黄色素胞が現れ、黒色素胞と黄色素胞が混在した状態になる。すると黒色素胞が黄色素胞領域から排除される、もしくは黄色素胞領域の外側へ移動することに加え、黄色素胞領域の外側から新しい黒色素胞が体表面に現れる⁹。この期間中に、黒色素胞に隣接する黄色素胞をレーザー照射により除去すると、黒色素胞の排除や移動が起こらなかった¹⁰。これらの結果は、黑色領域と黄色領域の境界を形成するために黒色素胞と黄色素胞が互いに反発していることを示した。一方、体表模様が形成された後で黄色領域にレーザーを照射し、黑色領域周辺の黄色素胞を広範囲に除去したところ、取り残された黑色領域の黒色素胞数が減少した¹⁰。この結果から、黄色素胞が黒色素胞の生存に必要であることを明らかにした。

以上のことから、「黒色素胞と黄色素胞の反発シグナルと、黄色素胞から黒色素胞への活性化シグナル」の存在が明らかになった(図3A)。そして、これらの黒色素胞と黄色素胞の相互作用を「短距離のポジティブフィードバックと、長距離のネガティブフィードバック」の関係として表すことができたため、ゼブラフィッシュの体表模様形成の原理も反応拡散系を用いて説明することができた(図3B,C)^{10,11}。

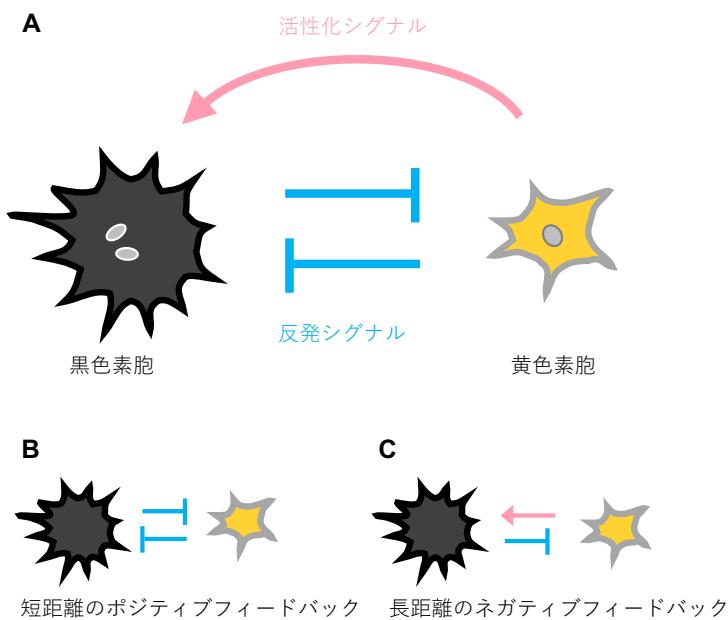


図3. 黒色素胞と黄色素胞の相互作用を示す模式図

成体ゼブラフィッシュの体表に存在するほとんどの黒色素胞と黄色素胞は、ニューラルクレストから分化した共通の色素幹細胞に由来する¹²。また細胞系譜追跡実験から、体表の黒色素胞はほとんど細胞分裂を行わず、黒色素胞の前駆細胞が増殖し、分化することで増加していることが明らかになった^{13,14}。対照的に、黄色素胞は体表でも増殖することが示された。

1.4 黒色素胞と黄色素胞の細胞間相互作用を担う分子について

現在までに、ゼブラフィッシュの体表模様形成や色素細胞の分化に関わる多くの遺伝子がクローニングされてきた¹²。そのなかでも Kir7.1 (*kcnj13*)、Tetraspanin3c、Igsf11、Base2、Notch、Cx39.4、Cx41.8 は、ストライプの太さやパターンの変化を示すゼブラフィッシュから発見され、黒色素胞と黄色素胞の細胞間相互作用に関わる分子として同定された¹⁵⁻²¹。

Kir7.1、Tetraspanin3c、Igsf11、Base2 は黒色素胞の移動や細胞運動に関わる分子であり、特に Kir7.1 (*obelix/Jaguar*) 変異体は黒色素胞の領域と黄色素胞の領域の境界が不明瞭な表現型を示す^{16,22}。そのため、これらは「黒色素胞と黄色素胞の反発シグナル」を担う分子として説明できる。一方、Notch1a 由来の NICD (Notch intracellular domain) を黒色素胞に過剰発現したゼブラフィッシュや Notch2 (*asterix*) 変異体は黒ストライプの幅が大きくなる^{21,23}。また、黒色素胞に受容体の *notch1a* と *notch2*、黄色素胞にリガンドの *deltaC* と *delta-like 4* が発現していることから、Delta-Notch シグナルは「黄色素胞から黒色素胞への活性化シグナル」を担う分子として説明できる。ギャップジャンクションタンパク質の Cx39.4 と Cx41.8 はともに黒色素胞と黄色素胞の両方に発現しており、黒一黒、黄一黄、黒一黄色素胞の直接的なコミュニケーションの場となっていることが考えられる。

2. 色素細胞の多核化について

2.1 研究背景

2.1.1 細胞の多核化

ゼブラフィッシュの体表模様を形成する黑色素胞には 1 核と多核化した細胞が存在するが（図 5 B-D）、多核化した黑色素胞のパターン形成への寄与や、黑色素胞が多核化する経路については明らかになっていない。

一般的に、動物細胞の多核化は、核分裂または細胞融合により生じる²⁴。哺乳類の多核化細胞には心筋細胞や巨核球、横紋筋、破骨細胞、肝細胞、合胞体性栄養膜細胞などがある。心筋細胞は生後まもなく核分裂を引き起こす、もしくは損傷に伴い核分裂が起きる^{25,26}。巨核球は核分裂により多核化し、細胞を大きくすることにより血小板を産生する²⁷。横紋筋や破骨細胞、栄養芽細胞は細胞融合により多核化する²⁸⁻³⁰。肝細胞は核分裂と細胞融合の両方の経路から 2 核化する^{31,32}。また、多核化細胞は組織修復や再生過程で一時的に観察される他、病変組織においても観察される。例えば、一部の悪性度の高いがん細胞の核は多核化、多倍化している。さらにウイルス感染や結核菌の感染はマクロファージの細胞融合を誘導し、ラングハンス巨細胞や異物巨細胞、トートン型巨細胞と呼ばれる肉芽組織を形成する³³。ゼブラフィッシュでは、卵黄シンシチウム層（yolk syncytial layer）に、2-40 核化した細胞が存在する³⁴。

2.1.2 多核化細胞のメリット

多核化した（多倍化も含む）細胞は 1 核 2 倍体細胞と比べて、5 つの利点を有している。その一つ目として、多核化した細胞は体積および表面積が大きくなり、組織のエンベロープやバリアとして機能する。例えば、合胞体性栄養膜細胞は胎盤の絨毛と子宮の間に存在し、母体の免疫細胞が胎児を攻撃しないように保護している。二つ目の利点として、分化した細胞に生じる多核化は、細胞分裂能を欠如していることが多く、これにより代謝の活性化を引き起こす。三つ目にクローン性が挙げられる。周辺細胞の細胞分裂により組織修復を行う場合、2 倍体細胞では分裂や増殖に伴い細胞の性質が変異する可能性がある。対照的に、一部の細胞が多核化し巨大化することで組織修復を行うことにより、組織を構成する細胞が安定した分化状態を保つことを可能にする。また多核化細胞は、一方のゲノムに機能喪失型の突然変異が生じた場合

でも、別の核に含まれるゲノム DNA からの遺伝子発現が代償的に機能することにより、細胞を保護することが可能である。五つ目として、一部の多核化および倍数体細胞ではアポトーシスが不活性化され、細胞の寿命が延びることが示されている。

2.1.3 色素細胞の多核化経路

先行研究にて、哺乳類の色素細胞や魚類のメラノーマ細胞株が多核化することが報告されている。C57BL マウスマラノblast由来の細胞株（Melan-a 細胞）は核分裂と細胞融合の両方の経路から多核化することが継時観察した実験から示されている³⁵。またヒトの母斑の周囲に存在するメラノサイトでは、巨大な多核化した細胞が観察される³⁶。多核化したメラノサイトは β -Gal 染色で強く染まることから、細胞老化を起こしている^{35,36}。細胞老化（oncogene-induced senescence; OIS）を起こし多核化したメラノサイトではステムセルマーカー (*oct3/4, sox2, nanog*) の発現が上昇しており、この多核化メラノサイトから分裂した単核の細胞が腫瘍を誘導する。このことから、多核化したメラノサイトは tumor initiate cell であると同時に、細胞老化が細胞周期の進行を停止し、がんを抑制いると考えられている³⁷⁻⁴⁰。また、タイワンキンギョやソードテールフィッシュのメラノーマ細胞株（PSM-1）は *cdkn2ab* (p21) の過剰発現により細胞が多核化し、細胞増殖及び腫瘍形成が抑制されることが報告されている^{41,42}。

これまでに、ゼブラフィッシュの1核と多核化黒色素胞の機能的な違いについては、検証されていない。そのため多核化した黒色素胞の利点については明らかになっていない。また、ゼブラフィッシュの黒色素胞の多核化経路について、どの分化ステージで生じているのか、核分裂と細胞融合のどちらの経路で生じているか、さらに多核化にどのような分子が関わっているのかについても明らかになっていない。そこで本研究では、まず尾ヒレより回収した1核または2核の黒色素胞を初代培養し、これらの細胞の性質を比較した。次に、黒色素胞およびその前駆細胞を初代培養し、多核化する過程の観察を行なった。

2.2 材料と方法

2.2.1 ゼブラフィッシュの飼育と系統

ゼブラフィッシュは水温 28.5 度、明暗を 14/10 時間サイクルの標準環境下で飼育した⁴³。給餌については、成体はアルテミア (VETNAM BRINE SHRIMP EGGS)、生後 3 日目から約 1 ヶ月の個体にはゾウリムシとヒカリ Labo (MEITO system) を与えた。

本研究では Tübingen 系統 (野生型) を用いて、実験を行なった。また、ヒストン H2B と蛍光タンパク質 RFP を融合したタンパク質を発現する *Tg(mitfa-H2BRFP)WT* と細胞膜移行シグナル CAAX と蛍光タンパク質 EGFP を融合したタンパク質を発現する *Tg(mitfa-EGFPCAAX)WT* を用いて、黑色素胞と黑色素胞の前駆細胞、黄色素胞を標識した。

2.2.2 Tol2 ベクター作製と遺伝子組み換え系統の作製

遺伝子組み換えゼブラフィッシュの作製には、Tol2 トランスポゾンシステムによる遺伝子組み換え技法を用いた^{44,45}。インジェクション溶液 (30 ng/μL Plasmid DNA, 25 ng/μL Tol2 mRNA, 0.5% FastGreen) を作製し、1 細胞期のゼブラフィッシュ胚に 1~5 nL/egg をマイクロインジェクションすることにより遺伝子導入を行い、F0 世代を作製した。Tol2 mRNA は mMACHINE mMESSAGE SP6 (Ambion) を用いて Plasmid DNA pCS-TP から合成した⁴⁶。F0 世代の遺伝子キメラ個体を、野生型あるいはコネキシン変異体と交配させ、F1 世代を取得した。ジェノタイピングおよびレポータータンパク質 H2BRFP の観察には BZ-X700 オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence) を使用した。

2.2.3 プラスミドコンストラクション

遺伝子組み換えゼブラフィッシュ作製に使用したプラスミドは pT2AL200R150G を元にして、EF1a プロモーター配列を、microphthalmia-associated transcription factor a (*mitfa*) 遺伝子の 1st ATG から上流約 1.5kb の配列に置換した^{47,48}。続いて、この配列の下流に EGFPCAAX または H2BRFP を搭載した (図 4A)。



図4. 遺伝子組み換えゼブラフィッシュ作製に使用したTol2トランスポゾンを搭載したプラスミドの模式図

黒色素胞及び前駆細胞の細胞膜あるいは核を標識するために、*mitfa*プロモーター (*mitfa-pro*) の下流に EGFPCAAX または H2BRFP を挿入したプラスミドを作製した。黒色四角は tol2 トランスポゾン配列を示し、白色四角の pA は SV40 poly A シグナルを示す。

EGFPCAAX のクローニングは以下に記すプライマーセットを用いて pT2AL200R150G をテンプレートに PCR (KOD Fx Neo, Toyobo) をを行い、PCR 産物を 制限酵素で処理して、*mitfa* プロモーターを搭載した Tol2 ベクターにライゲーション (Ligation high Ver.2, Toyobo) した。

EGFPCAAX

Forward; 3'- AAAGAATTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA -5'

Reverse; 3'- AATCATGCGGCCGCCTACATAATTACACACTTG -5'

2.2.4 色素細胞の初代培養

2.2.4.1 黒色素胞、黃色素胞の初代培養

色素細胞の単離と回収方法は先行研究に倣った⁴⁹。麻酔処理したゼブラフィッシュから尻ヒレと尾ヒレを切除し、3 mm 角に切断した。次に、ヒレ片を PBS で洗浄したのち、トリプシン溶液 (2.5 mg/ml trypsin (Worthington)、1.2 mg/ml BSA (Sigma)、1 mM EDTA in PBS) に入れ、振盪 (1000 rpm, 30 min, 28°C) した。ヒレ片を PBS で 5 回洗浄したのち、コラゲナーゼ溶液 (1 mg/ml collagenase I (Worthington)、0.1 mg/ml DNaseI (Worthington)、0.1 mg/ml STI (Worthington)、1.2 mg/ml BSA in PBS) に入れ、振盪 (1000 rpm, 30 min, 28°C) した。続いて、コラゲナーゼ処理されたヒレをポアサイズ 250 μm のナイロンメッシュシート (サンプラテック) で濾過した。濾過した細胞懸濁液を 50% Percoll 溶液 (sigma) に重層し、遠心 (30×g, 10 min, RT) した。比重

遠心により回収したペレットを BSA 溶液 (2 mg/ml BSA in PBS) で懸濁し、2%アガロースを薄層コーティングした 35 mm dish (Iwaki) に播種した。次に、手動式マイクロインジェクションシステム (CellTram Air/Oil/vario, Eppendorf) とヒートポリッシュしたガラス針 (Glass Capillary, Narishige) を用いて、顕微鏡下で黒色素胞と黃色素胞を一つずつピックアップして回収した。ピックアップした細胞をコラーゲン IV でコーティングしたガラスボトムディッシュに移し、セルピックアップ後 12-17 時間は L15 培地 (Serum free、Antibiotic-Antimycotic、Kanamycin、Gentamycin (WAKO)) を用いて培養 (28°C, Air) し、色素細胞が接着したのち 10%血清 (Hyclone, gelifesciences) を含む L15 培地に置換した。

2.2.4.2 黒色素胞の前駆細胞の初代培養

1 回の実験につき、2-4 匹の 3-4 週齢ゼブラフィッシュ (Standard length; 8.0-9.0 mm) を使用した。麻酔処置したゼブラフィッシュを断頭し、数 mm 角に切断した。次に、コラゲナーゼ溶液に入れ、振盪した。続いて、コラゲナーゼ処理されたヒレをポアサイズ 250 μm のナイロンメッシュシートで濾過した。濾過した細胞懸濁液を L15 培地 (Serum free) に懸濁し、コラーゲン IV でコートしたガラスディッシュに播種した。細胞を播種してから数時間後に 10% 血清を含む L15 培地に置換した。

2.2.5 色素細胞の観察、計測方法

2.2.5.1 タイムラプス撮影

黒色素胞、前駆細胞のタイムラプス撮影には倒立光学顕微鏡 IX81 (Olympus) または IX83 (Olympus) を使用し、イメージングソフトウェアおよび連続画像ファイルの作成にはセルセンス (Olympus) とメタモルフ (molecular devices) を使用した。

2.2.5.2 黒色素胞の細胞サイズ、移動距離、生存期間の計測

2.2.4.1 に記した方法で色素細胞の核が蛍光タンパク質 H2BRFP を発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュ (*Tg(mitfa-H2BRFP)* WT) から黒色素胞を単離し、10% 血清を含む L15 培地に置換した後からタイムラプス撮影を開始した。黒色素胞のサイ

ズは撮影開始から 0 時間、24 時間、48 時間後のサイズを Image J の measure ツールを用いて計測し、3 時点の面積の平均を求めた。

黒色素胞の移動距離は、撮影開始から 48 時間の間に移動した距離求めた。撮影開始から 3 時間ごとの写真を抜き出し、ImageJ の tracking tool を用いて移動距離を計測した。

1 核と 2 核の黒色素胞の生存数は、撮影開始から 48 時間まで 3 時間毎に計測した。細胞中央にメラノソームが凝縮し、細胞が丸まった状態を細胞死と判定した。

2.2.5.3 黄色素胞の多核化の割合の計測、細胞サイズ

Tg(mitfa-H2BRFP) WT の黄色素胞に蛍光タンパク質 H2BRFP が発現している系統を選定し、2.2.4.1 の方法で、黄色素胞を初代培養した。10% 血清を含む L15 培地に置換した直後の黄色素胞を倒立光学顕微鏡 IX83 にて撮影し、核の数を計測した。さらに黄色素胞のサイズを ImageJ の measure ツールを用いて計測した。

2.2.6 統計処理、グラフ作製

色素細胞の密度の計測や電気整理実験から取得したデータは *t* 検定による解析を行い、信頼区間（P 値）が 95% より大きくなった場合に有意差ありとした。また、統計処理およびグラフ作成には Origin version 2015 (OriginLab) 使用した。

2.3 結果

2.3.1 多核化した黒色素胞の割合

多核化した黒色素胞の割合を測定するために、黒色素胞の核を標識する遺伝子組み換えゼブラフィッシュ (*Tg(mitfa-H2BRFP) WT*) を使用した（図 5A）⁵⁰。このゼブラフィッシュはヒストン H2B と蛍光タンパク質 RFP の融合タンパク質を発現する。H2BRFP は核局在タンパク質として機能する。

このゼブラフィッシュをエピネフリン処理し、メラノソームを細胞中央に凝集させた状態で体幹部と尾ヒレの黒色素胞の観察を行い、1 核、2 核、3 核の黒色素胞を確認した（図 5B-D）。体幹部（3 匹）と尾ヒレ（2 匹）の 1 核、2 核、3 核の黒色素胞の割合を検証したところ、1 核と 2 核の黒色素胞がおよそ 1 対 1 の割合存在していた（図 5E）。また、3 核の黒色素胞が全体の 1 %程度だった。

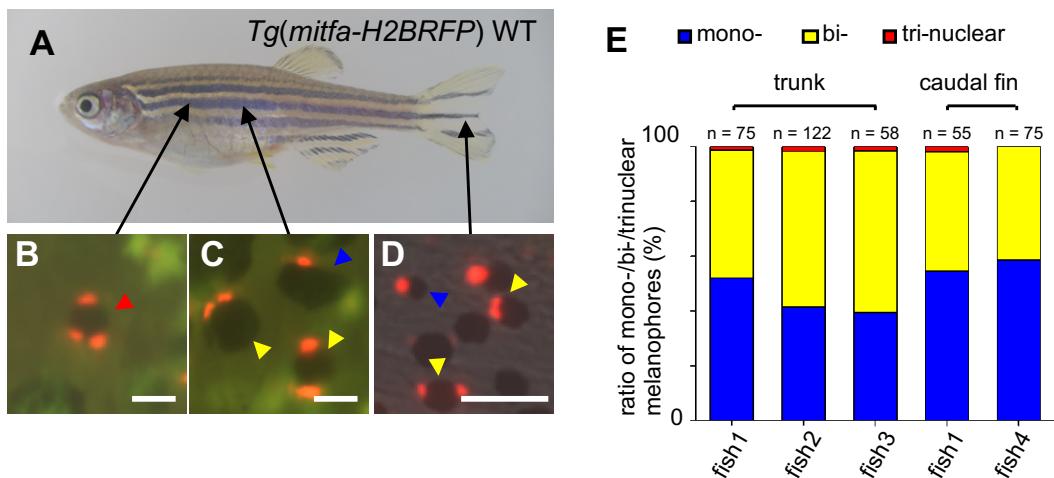


図 5. 体幹部と尾ヒレの多核黒色素胞の割合

(A) 黒色素胞の核を標識する遺伝子組み換えゼブラフィッシュ *Tg(mitfa-H2BRFP)WT* の全身画像。(B) 体幹部で観察された 3 核の黒色素胞の明視野と蛍光写真のマージ画像。(C) 体幹部で観察された 1 核の黒色素胞と 2 核の黒色素胞の明視野と蛍光写真のマージ画像。(D) 尾ヒレ体幹部で観察された 1 核の黒色素胞と 2 核の黒色素胞の明視野と蛍光写真のマージ画像。(E) 1 核、2 核、3 核の黒色素胞の割合。1 核の黒色素胞は青色、2 核の黒色素胞は黄色、3 核の黒色素胞は赤色で示した。体幹部では 3 匹、尾ヒレでは 2 匹の *Tg(mitfa-H2BRFP)WT* を使用した。計測した黒色素胞の数は各棒グラフの上部に記載した。スケールバーはいずれも 50 μm を示す。

3.2.2 1核の黒色素胞と2核の黒色素胞の比較

次に、多核化した黒色素胞の性質を明らかにするため、初代培養したヒレの1核と2核の黒色素胞の細胞サイズと移動距離、生存割合について比較した。

3.2.2.1 細胞サイズの比較

初代培養した1核の黒色素胞（17個）と2核の黒色素胞（37個）の細胞サイズを測定した。その結果、1核の黒色素胞の平均サイズは $841.35\pm404.10\text{ }\mu\text{m}^2$ で、観察した1核の黒色素胞のうち、最も大きかったのは $1622.77\text{ }\mu\text{m}^2$ だった。一方、2核の黒色素胞の平均サイズは $1968.58\pm1524.17\text{ }\mu\text{m}^2$ であり、1核の黒色素胞と比較すると有意に大きかった（P値；4.49E-05）（図6A）。

3.2.2.2 移動距離の比較

次に、初代培養した1核の黒色素胞（17個）と2核の黒色素胞（37個）が48時間で移動した距離を計測した。その結果、1核の黒色素胞の平均移動距離は $77.48\pm40.94\text{ }\mu\text{m}$ 、2核黒色素胞は $97.76\pm49.28\text{ }\mu\text{m}$ であり、両者の移動距離に有意な差はなかった（P値；0.090）（図6B）。

3.2.2.3 生存割合の比較

初代培養した1核の黒色素胞（27個）と2核の黒色素胞（47個）を3時間ごとに観察し、観察期間中に細胞死を起こした黒色素胞の数を計測した1核の黒色素胞は観察開始から15時間を過ぎると細胞死を起こす黒色素胞が現れ、48時間後に生存していた黒色素胞はおよそ6割（17/27個）だった。一方、2核の黒色素胞は観察開始から24時間後に細胞死を起こす黒色素胞が現れたが、48時間後の時点では約9割（41/47個）の黒色素胞が生存していた（図6C）。

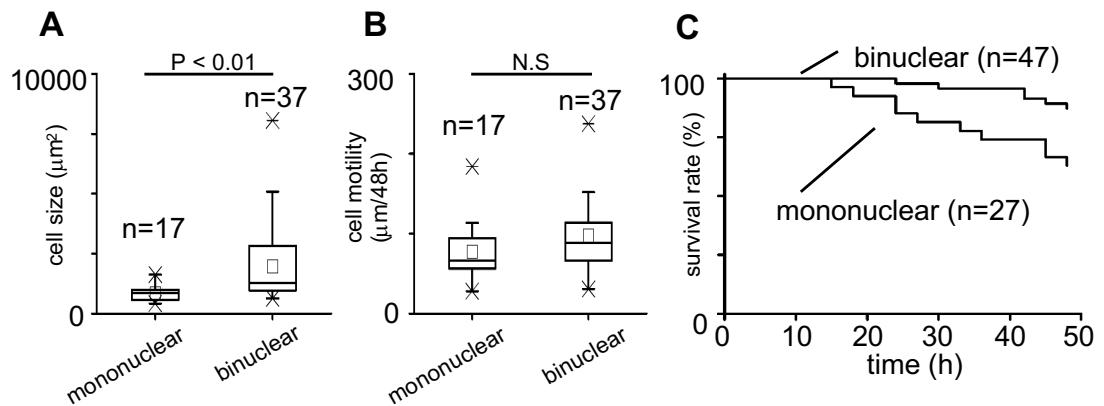


図 6.1 1核の黒色素胞と2核の黒色素胞の比較

(A) 1核の黒色素胞と2核の黒色素胞の細胞サイズをボックスチャートで示した。(B) 初代培養した1核の黒色素胞と2核の黒色素胞の48時間中の移動距離をボックスチャートで示した。(C) 初代培養した1核の黒色素胞と2核の黒色素胞の生存細胞数の推移を示した。ボックスの中の水平線は平均値、小さな四角は中央値、エラーバーは標準偏差を示す。*は最小値と最大値を示す。P値はt検定より算出した。N.Sは有意差なしを示す。

3.2.3 1核の黄色素胞と2核の黄色素胞の比較

次に多核化した黄色素胞の割合を計測した。*mitfa* プロモーターは、黄色素胞にも標的遺伝子の発現がリークする場合がある。そこで、黄色素胞に H2BRFP の発現がリークした *Tg(mitfa-H2BRFP)* WT 系統を選定し、黄色素胞の核の数を測定した。

初代培養したヒレの黄色素胞の核を観察すると、多くが1核の黄色素胞だったが、2核の黄色素胞が1-2割程度観察され、3核の黄色素胞が1%以下の割合で存在していた（図 7A-C）。また1核の黄色素胞（38個）と2核の黄色素胞（20個）の細胞サイズを測定した。その結果、1核の黒色素胞の平均サイズは $617.20 \pm 189.95 \mu\text{m}^2$ 、2核の黄色素胞の平均サイズは $876.46 \pm 230.57 \mu\text{m}^2$ であり、2核の黄色素胞の方が有意に大きかった（P値: 0.18E-03）（図 7D）。

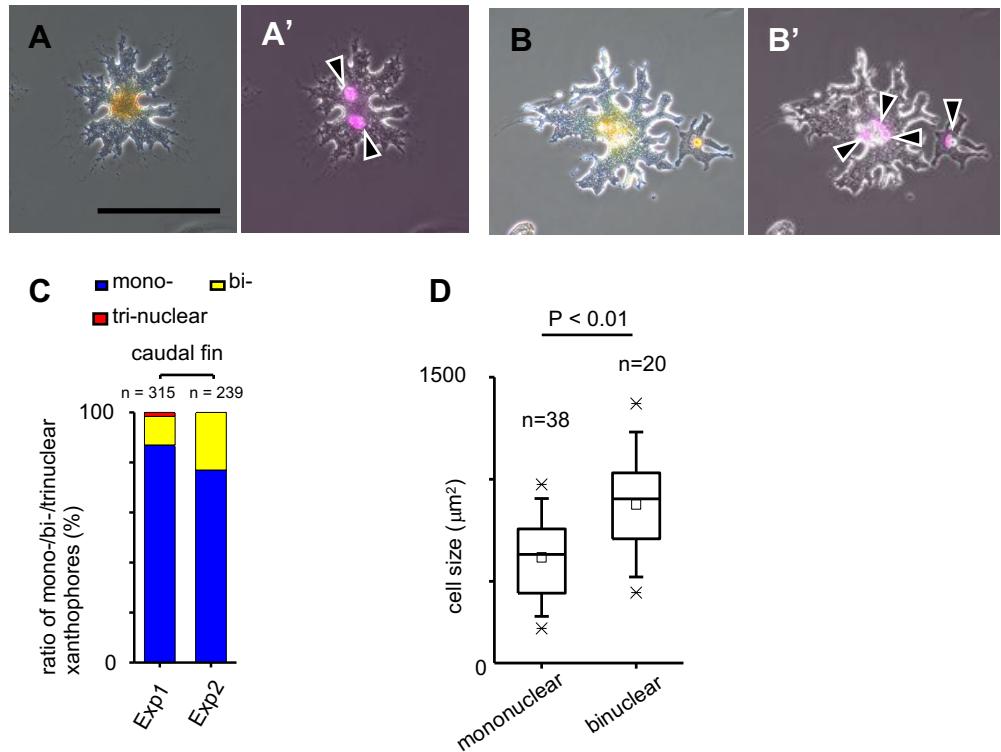


図 7.1 核の黄色素胞と 2 核の黄色素胞の割合とサイズ比較

(A) 2核の黄色素胞の明視野像。(A') (A) と蛍光写真とのマージ画像。(B) 3核の黄色素胞(左)と1核黄色素胞(右)の明視野像。(B') (B) と蛍光写真のマージ画像。スケールバーは 50 μm、黒色矢頭は黄色素胞の核を示す。(C) 尾ヒレの1核、2核、3核の黄色素胞の割合、1核の黄色素胞は青色、2核の黄色素胞は黄色、3核の黄色素胞は赤色で示した。各実験で計測した黄色素胞の数は棒グラフの上部に記載した。(D) 1核黄色素胞と2核黄色素胞の細胞サイズをボックスチャートで示した。ボックスの中の水平線は平均値、小さな四角は中央値、エラーバーは標準偏差を示す。*は最小値と最大値を示す。P 値は t 検定より算出した。

3.2.4 黒色素胞の多核化の観察

黒色素胞が多核化する過程を明らかにするため、初代培養した黒色素胞を継時観察した。その結果、核分裂を起こして 2 核化する黒色素胞を観察した(図 8A)。黒色素胞は、観察開始から 20 分後に核が分裂したが、その 2 時間後も細胞質分裂が起らなかった。一方、細胞分裂を起こした黒色素胞では、細胞が収縮した 20 分後に細胞質分裂が生じた(図 8B)。

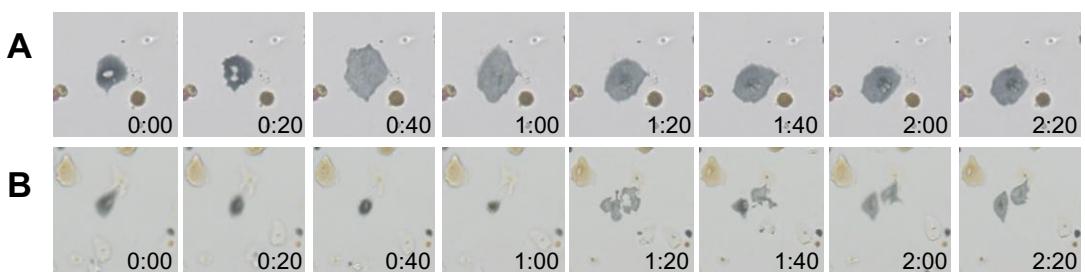


図 8. 初代培養した黒色素胞の観察

(A) 黒色素胞が細胞質分裂を伴わない核分裂を起こす様子。タイムラプス撮影した画像を 20 分間隔で抜き出した。(B) 黒色素胞が細胞分裂する様子。タイムラプス撮影した画像を 20 分間隔で抜き出した。

3.2.5 黒色素胞の前駆細胞の多核化の観察

黒色素胞の多核化が前駆細胞でも起こる様子を観察した。成体ゼブラフィッシュの黒色素胞は成体色素幹細胞から分化する⁵¹。成体色素幹細胞は、黒色素細胞の前駆細胞に分化して、体表面に移動する⁵²。続いてメラノソームを合成して黒色素胞に分化する。また、前駆細胞にも *mitfa* が発現する⁵²。本研究では、遺伝子組み換えゼブラフィッシュ (*Tg(mitfa-EGFPCAAX)* WT) を使用して、前駆細胞の分化および多核化の観察を行なった。EGFPCAAX は細胞膜移行シグナル (CAAX box) を持つ蛍光タンパク質であり、細胞の輪郭を同定することができる。

Tg(mitfa-EGFPCAAX) WT の体表面に存在する色素顆粒を有していない EGFPCAAX 発現細胞を継時観察したところ、観察 3 日目以降にメラノソームを合成し、黒色素胞に分化した（図 9）。このことから、EGFPCAAX 細胞が黒色素胞の前駆細胞であることを確認した。本研究では、EGFPCAAX 発現細胞が黃色素胞に分化する様子は観察できなかった。

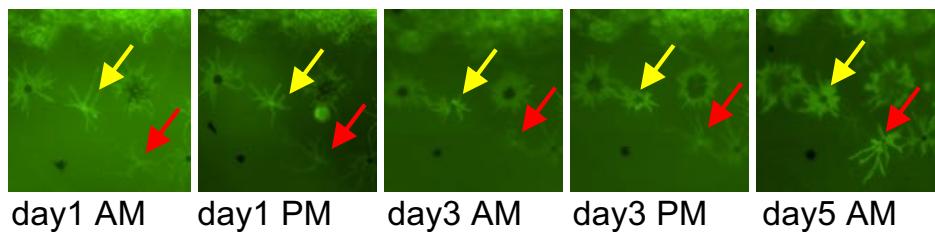


図 9. 黒色素胞の前駆細胞がメラノソームを合成する様子

黄矢印と赤矢印は継時観察した黒色素胞の前駆細胞を示す。

続いて、黒色素胞の前駆細胞の初代培養を行なったところ、細胞融合または核分裂を経て多核化する様子が観察された。隣接した2つの前駆細胞を観察すると、観察開始からおよそ3時間後に一つの細胞に融合した（図10A）。またH2B-RFPを発現した前駆細胞は観察開始から20分後に核分裂を起こした（図10B）。この核分裂した細胞を10時間以上観察し続けたが、細胞質分裂は観察されなかった。通常の細胞分裂を起こした前駆細胞では、核分裂直後から細胞がくびれ始め、細胞質分裂を完了した（図10C）。

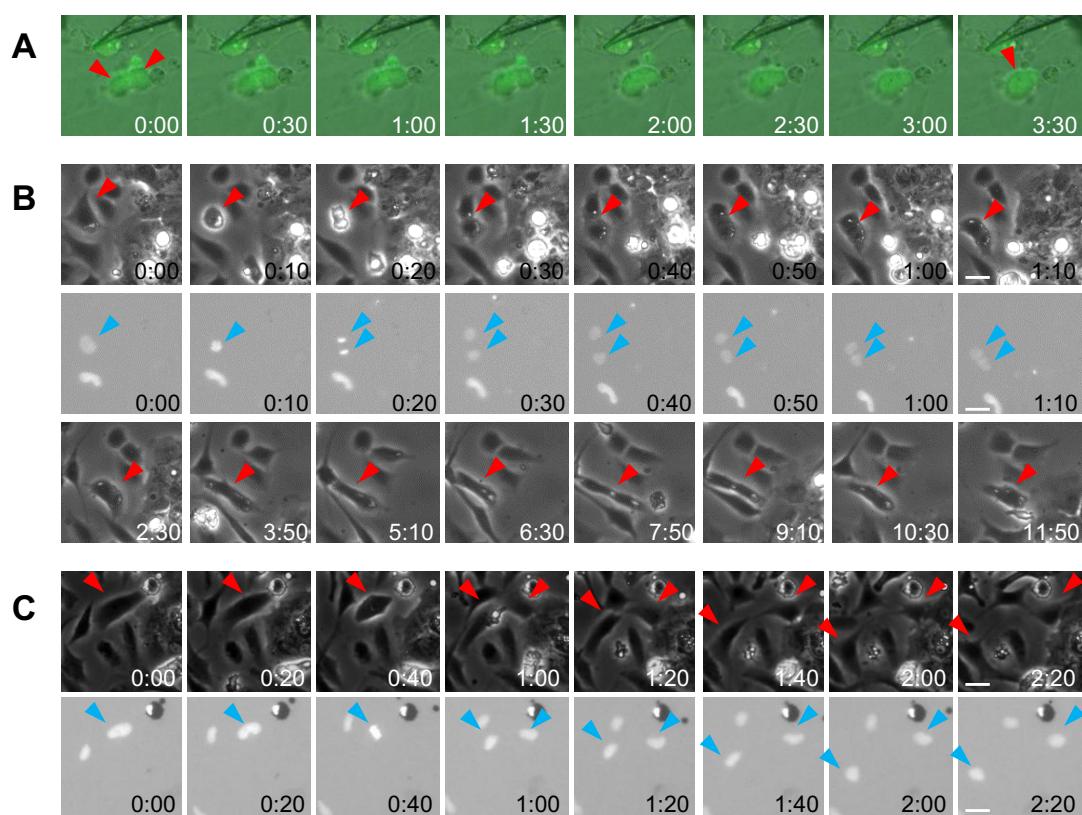


図10. 初代培養した黒色素胞の前駆細胞の観察

(A) 黒色素胞の前駆細胞が細胞融合する様子。タイムラプス撮影した位相差像と蛍光画像のマージ画像を30分間隔で抜き出した。(B) 黒色素胞の前駆細胞が細胞質分裂を伴わない核分裂を起こす位相差像と蛍光画像。タイムラプス撮影した画像を10分間隔で抜き出し、核分裂後は80分間隔で抜き出した。(C) 黒色素胞の前駆細胞が細胞分裂する位相差像と蛍光画像。タイムラプス撮影した画像を20分間隔で抜き出した。赤矢頭は黒色素胞の前駆細胞、青矢頭は赤矢頭で指された黒色素胞の前駆細胞の核を示す。

2.4 考察

2.4.1 色素細胞の多核化と細胞老化

ゼブラフィッシュの体表の黑色素胞は約半数が多核化している（図 5E）。本研究では多核化した黑色素胞が、黑色素胞の核分裂もしくは、その前駆細胞の核分裂や細胞融合によって生じることを明らかにした（図 8, 10）。

哺乳類の色素細胞は多核化することにより細胞老化を誘導する^{35,36}。ゼブラフィッシュの黑色素胞は SA- β -Gal 染色でよく染まることから、細胞老化が起きている^{14,53}。また体表の黑色素胞は細胞分裂や増殖しない¹⁴。このことから黑色素胞は多核化することで、積極的に細胞老化を誘導し、黑色素胞の増殖や分裂を抑制していることが考えられる。一方、黄色素胞は体表で増殖することができ、SA- β -Gal 染色で染色されない^{14,14,53}。黄色素胞は多核化及び細胞老化を抑制することにより、体表でも分裂能を維持していることが考えられる。

2.4.2 黒色素胞の多核化と体表模様形成

ゼブラフィッシュの体表模様は、安定した模様が完成すると、黒色素胞は長期間同じ場所に留まり、細胞の入れ替わりはほとんど起こらない⁵⁴。ゼブラフィッシュの 1 核の黑色素胞と 2 核の黑色素胞を初代培養したところ、48 時間中の生存率は 2 核の黑色素胞の方が 1 核の黑色素胞に比べて高かった（図 6C）。このことから、黒色素胞は多核化したことで細胞の寿命が延長することで体表模様の長期維持に関わっている可能性が示唆された。

ゼブラフィッシュの体表模様形成において、黒色領域と黄色領域の境界を形成するために黒色素胞は移動または消失（細胞死）を引き起こす^{9,55}。模様形成時に、黒色素胞が移動と消失のどちらの経路を選択するのか、そのトリガーは明らかになっていない。しかし、1 核の黒色素胞が多核化した黒色素胞よりも細胞死を起こしやすいことから、黄色素胞に囲まれた 1 核の黒色素胞は速やかに消失している可能性が考えられる。

本研究では、1 核の黒色素胞と多核化した黒色素胞の遺伝子発現の比較解析は行なっていない。そのため、1 核と 2 核の黒色素胞は遺伝子発現の違いや、色素細胞の核分裂と細胞融合に関する分子については分からず。しかし最近、甲状腺ホ

ルモンの分泌が低下したゼブラフィッシュでは、2核の黒色素胞が2割程度しか現れないことが報告され、甲状腺ホルモンを介したシグナル伝達が多核化を誘導する分子の一つであることが示唆された⁵³。甲状腺ホルモンは黒色素胞の分化と成熟に関わる⁵⁶。甲状腺ホルモンが低下したゼブラフィッシュでは黒色素胞の最終分化マーカーの発現が野生型に比べて低下していた。このことから、黒色素胞の1核と2核の違いは、黒色素胞の成熟に依存している可能性がある。また、哺乳類細胞の細胞融合にはギャップジャンクション (Cx43)、Tetraspanin ファミリー、Igsf ファミリーなどの分子が関連していることが示されている⁵⁷。細胞融合に関連する遺伝子ファミリーの中には4遺伝子、*cx39.4* や *cx41.8*、*tspan3c*、*igsf11* の変異は体表模様が変化する遺伝子も含まれている。このことから、体表模様変異体と色素細胞の多核化が関連している可能性も示唆された。

2.5. 結論

本研究では、ゼブラフィッシュの黒色素胞が多核化する3通りのプロセスを明らかにした。黒色素胞は核分裂することで多核化する。また黒色素胞の前駆細胞が核分裂または細胞融合したのち、分化することで多核化した黒色素胞が現れる(図11)。さらに、黒色素胞の多核化と黒色素胞の生存には相関があることを見出した。このことから黒色素胞は多核化して生存能を上げることでゼブラフィッシュの体表模様を長期間維持している可能性がある。

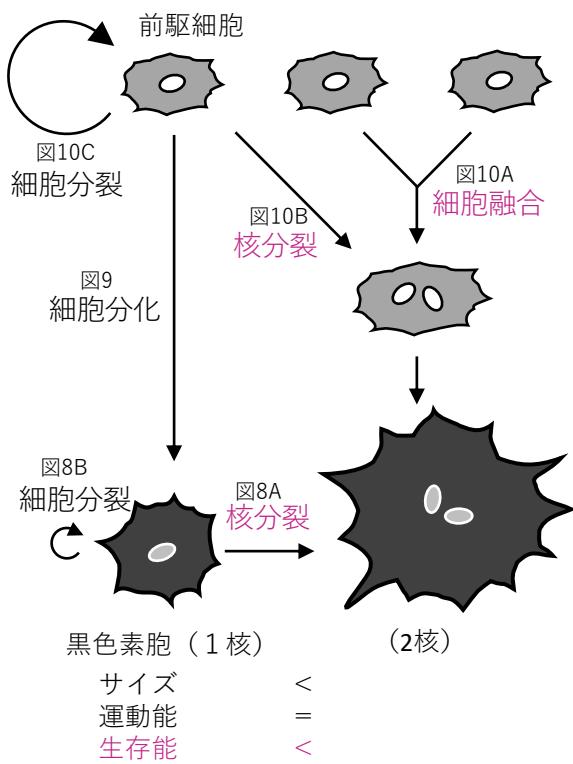


図11. 黒色素胞が多核化する経路と、1核と2核黒色素胞の特徴の比較

3. 色素細胞間のギャップジャンクションネットワークについて

3.1 研究背景

3.1.1 黄色素胞から黒色素胞への遠距離活性化シグナルについて

ゼブラフィッシュの体表模様は、2種類の色素細胞、黒色素胞と黄色素胞の相互作用により形成される。これまでの研究から、この体表模様形成の原理は反応拡散に基づいていることが証明され、黒色素胞と黄色素胞が相互反発する作用（反発シグナル）と黄色素胞から黒色素胞へ生存維持を促す作用（活性化シグナル）が示された¹⁰。

黄色素胞から黒色素胞への活性化シグナルについては、これまでに唯一 Delta-Notch シグナルが同定されている。これは、黒色素胞に受容体の *notch1a* と *notch2*、黄色素胞にリガンドの *deltaC* と *delta-like 4* が発現していることや、NICD (Notch intercellular domain) を野生型ゼブラフィッシュの黒色素胞で過剰発現することにより、黒ストライプの幅が大きくなることを示した実験により証明された²¹。また、体表模様形成が一通り完成した黒色素胞は細胞仮足を伸ばして黄色素胞と接触しており、Notch シグナルは黒色素胞の細胞仮足を介して入力される可能性が示唆されている（図 12）。一方、*deltaC* のナンセンス変異を持つ変異体 *dlc^{tit446}* はストライプを示し、体表模様が変化せず、黒色素胞の減少もない⁵⁸。そのため、色素細胞がストライプを形成するにあたり、Delta-Notch シグナル以外の活性化シグナルの存在が示唆された。

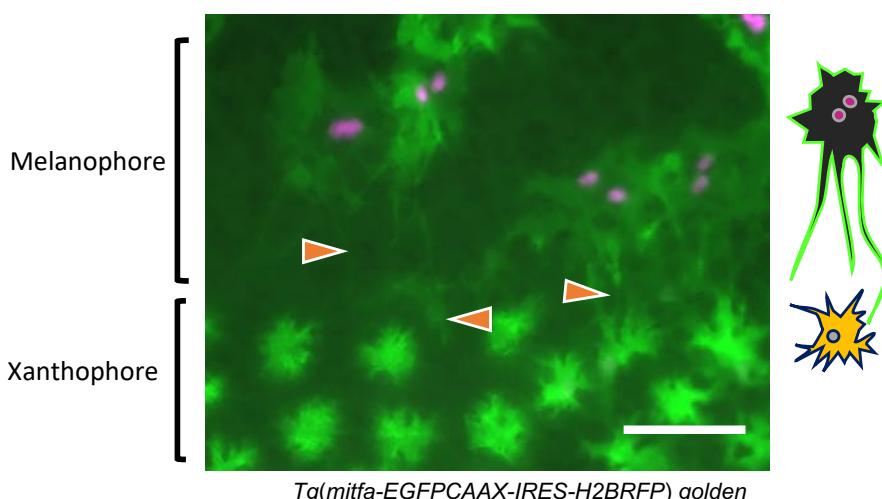


図12. 黒色素胞の細胞仮足
(説明文の続きは次のページに記載)

図 12. 黒色素胞の細胞仮足

golden (色素のない黒色素胞を有する) 変異体に対して、黒色素胞特異的に EGFP-CAAX (CAAX は細胞膜移行シグナル) を発現させた F0 世代の拡大蛍光写真。黒色素胞が黃色素胞領域に細胞仮足を伸長している。黒色素胞は IRES-H2BRFP により核が標識されている。黃色素胞は自家蛍光を持つ。オレンジ色の矢頭は黒色素胞の細胞仮足を示す。スケールバーは 100 μm を示す。

3.1.2 コネキシン変異体について

本研究では、ギャップジャンクションタンパク質、*connexin39.4* (*cx39.4*) と *connexin41.8* (*cx41.8*) に焦点を当て、2種類のコネキシンがゼブラフィッシュの体表模様形成に果たす役割について検証した。*cx39.4* ノックアウト変異体 (*cx39.4^{-/-}; luchs*) は迷宮模様を示し (図 13A, A')^{17,59}、*cx41.8* ノックアウト変異体 (*cx41.8^{-/-}; leopard*) は斑点模様を示す (図 13B, B')^{15,17}。さらに両方遺伝子を欠損した *cx39.4^{-/-}; cx41.8^{-/-}* (WKO) は黒色素胞がほとんど存在しない (図 13C, C')。このことから Cx39.4 と Cx41.8 が協調して黒色素胞の生存維持に関わっていることが予想された。また RT-PCR による遺伝子発現解析や *cx39.4* や *cx41.8* のプロモーター配列を含む BAC ベクターを使用したレポーター解析から、*cx39.4* と *cx41.8* は黒色素胞と黃色素胞の両細胞での発現が確認されている^{17,59-61}。これらの先行研究から、ギャップジャンクションタンパク質 Cx39.4 と Cx41.8 が黃色素胞から黒色素胞への生存シグナルを伝達するという仮説を立てた。

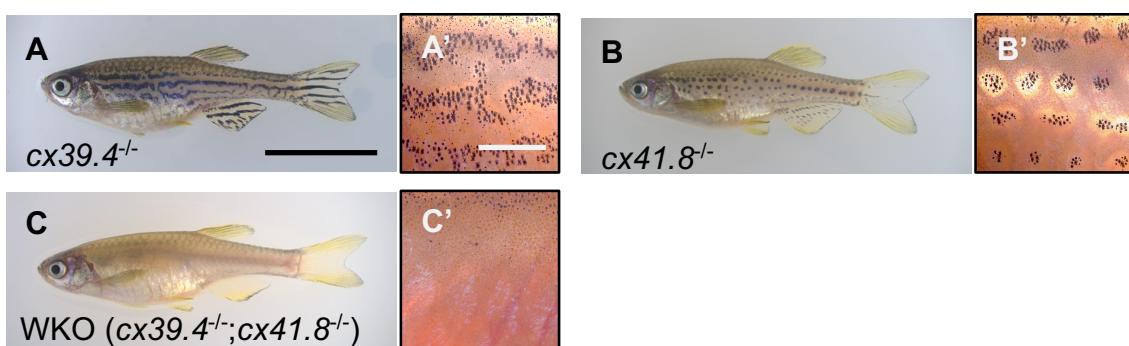


図 13. コネキシン変異体の体表模様

(A) *cx39.4^{-/-}* は迷宮模様を示す。(B) *cx41.8^{-/-}* は斑点模様を示す。(C) *cx39.4* と *cx41.8* の二重変異体 (WKO) はほとんど黒色素胞が存在しない。(A'-C') (A-C) の体表の拡大写真を示す。スケールバー (A) は 10 mm、(A') は 500 μm を示す。

3.1.3 ギャップジャンクションについて

ギャップジャンクションは、隣接した細胞同士の直接的なコミュニケーションを行う場であり、分子量 1000 以下の低分子化合物やイオン (cAMP、ATP、IP₃、Ca²⁺、K⁺など) が通過するチャネルである (図 14)⁶²⁻⁶⁴。ギャップジャンクションは、コネキシンの 6 量体からなるコネクソンが、隣接する細胞のコネクソンと結合することで形成される。コネキシンはアミノ末端 (N 末端) 領域とカルボキシル末端 (C 末端) 領域を細胞質側に持つ 4 回膜貫通型タンパク質である^{65,66}。N 末端領域はボルテージセンサーとしての機能を持ち、チャネルの開閉を制御する^{67,68}。C 末端領域はチャネルの開閉に関与することに加え、Zo-1、Tubulin、キナーゼタンパク質 Src などと結合する⁶⁹⁻⁷³。

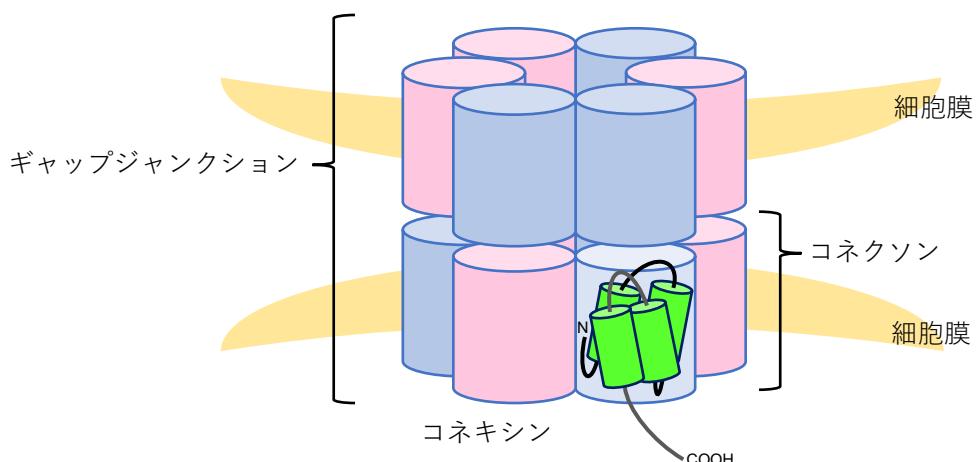


図 14. ギャップジャンクションの模式図

コネキシンが 6 量体のコネクソンを形成し、隣接する細胞のコネクソンとギャップジャンクションを形成する。青色と赤色の円筒はコネキシン、黄緑色の円筒はコネキシンの膜貫通ドメインを示す。N はアミノ末端、COOH はカルボキシル末端を示す。

哺乳類ではおよそ 20 種類のコネキシン遺伝子が同定されており⁷⁴、魚類はおよそ 40 種類のコネキシン遺伝子を持つ⁷⁵。コネキシンは種類の異なるコネキシンと 6 量体を形成したヘテロメリックコネクソンを形成することがある。また、種類の異なるコネクソンが結合したヘテロティピックギャップジャンクションを形成することもある^{76,77}。さらに Cx26 と Cx32 から形成されるホモメリック-ヘテロティピックギ

ギャップジャンクションは、各コネキシンの持つイオン透過性の違いにより、分子の通過に方向性を生じる⁷⁸。その他にも、ラットの Cx40 はスペルミンやスペルミジン存在化で整流性を示し、外向きの電流を抑制する。スペルミンやスペルミジンは Cx40 の N 末端領域の 9 番目と 13 番目のグルタミン酸 (E) を含む ExxxE モチーフと相互作用して、チャネルの開閉を制御する⁷⁹⁻⁸¹。

ギャップジャンクションに関する研究は神経細胞や心筋細胞を対象にした研究だけでなく、最近では発生や組織再生との関連についても報告されている⁸²。例えば、ゼブラフィッシュは *cx43* の発現量の低下によりヒレが短縮し⁸³、Cx43 のヘミチャネル活性の異常は脊椎骨の頭尾軸方向の短縮を引き起こす⁸⁴。またコネキシンはゼノパス胚の左右決定や再生中のプラナリアの頭尾決定に関与することも報告されている^{85,86}。

3.2 材料と方法

3.2.1 ゼブラフィッシュの飼育と系統

ゼブラフィッシュは水温 28.5 度、明暗を 14/10 時間サイクルの標準環境下で飼育した⁴³。給餌については、成体はアルテミア (VETNAM BRINE SHRIMP EGGS)、生後 3 日目から約 1 ヶ月の個体にはゾウリムシとヒカリ Labo (MEITO system) を与えた。

本研究では Tübingen 系統 (野生型)、*Leo^{tl}* (*cx41.8^{-/-}*)^{15,61}、*cx39.4^{-/-}*^{17,59} を用いて、実験を行なった。

3.2.2 Tol2 ベクター作製と遺伝子組み換え系統の作製

遺伝子組み換えゼブラフィッシュの作製には、Tol2 トランスポゾンシステムによる遺伝子組み換え技法を用いた^{44,45}。インジェクション溶液 (30 ng/μL Plasmid DNA, 25 ng/μL Tol2 mRNA, 0.5% FastGreen) を作製し、1 細胞期のゼブラフィッシュ胚に 1~5 nL/egg をマイクロインジェクションすることにより遺伝子導入を行い、F0 世代を作製した。Tol2 mRNA は mMACHINE mMESSAGE SP6 (Ambion) を用いて Plasmid DNA pCS-TP から合成した⁴⁶。F0 世代の遺伝子キメラ個体を、野生型あるいはコネキシン変異体と交配させ、F1 世代を取得した。ジェノタイピングおよびレポータータンパク質 H2BRFP の発現確認は BZ-X700 オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence) を使用した。

3.2.3 プラスミドコンストラクション

3.2.3.1 遺伝子組み換えゼブラフィッシュ作製用プラスミド

遺伝子組み換えゼブラフィッシュ作製に使用したプラスミドは pT2AL200R150G を元にして、目的のプロモーター配列や標的遺伝子の配列を搭載した⁸⁷。黒色素胞特異的に標的遺伝子を発現させるために、Microphthalmia-associated transcription factor a (*mitfa*) 遺伝子の 1st ATG から上流約 1.5kb をプロモーター配列として使用し (図 15A)、黃色素胞特異的に標的遺伝子を発現させるために、Aldehyde oxidase 5 (*aox5*) 遺伝子の 1st ATG から上流約 1.7kb をプロモーター配列として使用した (図 15B)^{47,48}。*aox5* プロモーターを搭載したプラスミドには、Tet-off システムを組み込み、標的遺伝子発現の安定化とドキソルビシンの添加により標的遺伝子の発現を

抑制できるように設計した。*mitfa* プロモーターまたは *aox5* プロモーターを組み込んだ Tol2 ベクターは、標的遺伝子の発現を確認するレポーターとして、ヒストン H2B と蛍光タンパク質 RFP を融合したタンパク質を発現する IRES-H2BRFP カセットを標的遺伝子の下流に搭載した。*cx41.8* プロモーターは 1st エクソンから上流約 4 kb の配列を使用した（図 15C）⁶⁰。

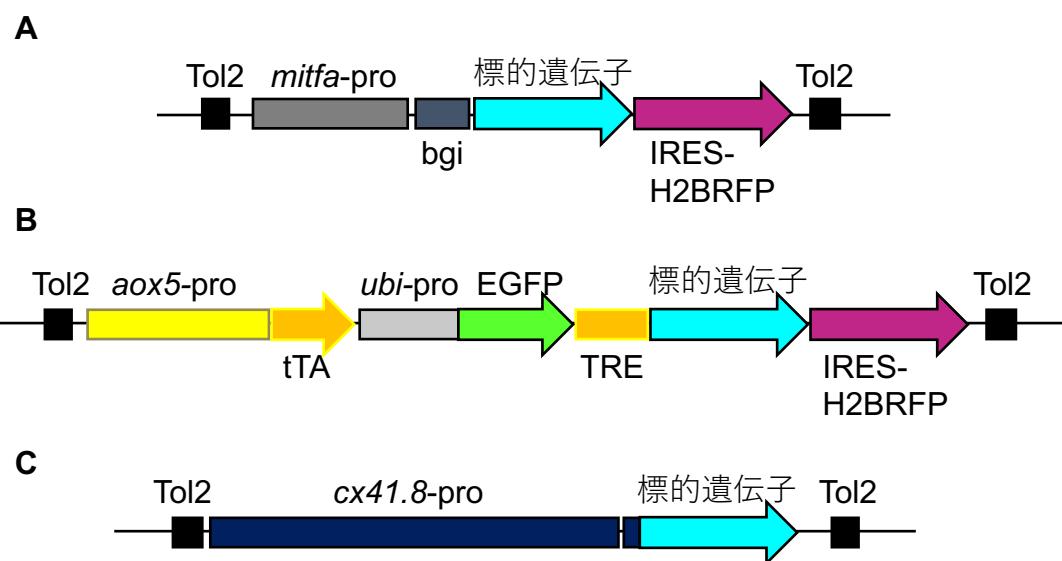


図 15. 遺伝子組み換えゼブラフィッシュ作製に使用した Tol2 トランスポゾンを搭載したプラスミドの模式図

(A) 黒色素胞特異的に標的遺伝子を発現するためのプラスミドは、*mitfa* プロモーターの下流に Rabbit β-globin gene intron (bgi) とクローニングした標的遺伝子を挿入した。また、遺伝子発現確認のために IRES-H2BRFP カセットを用いた。(B) 黄色素胞特異的に標的遺伝子を発現するためのプラスミドは *aox5* プロモーターの下流に Tet-OFF システム (tTA; tetracycline-controlled transactivator, TRE; Tet-responsive element) を挿入し、標的遺伝子をその下流に挿入した。また、標的遺伝子の発現を確認するために IRES-H2BRFP カセット挿入し、遺伝子導入個体のジェノタイピングを簡便化するためにユビキチンプロモーター (*ubi*-pro) で EGFP 発現させた。(C) Cx41.8 の可視化に使用したプラスミドは、*cx41.8* の 1st エクソンから上流約 4 kb をプロモーター配列として使用し、その下流に標的遺伝子を発現させた。

cx39.4, *cx41.8* 及び *cx43* のコーディング領域のクローニングは以下に記すプライマーセットを用いてゼブラフィッシュのゲノム DNA をテンプレートに PCR (KOD Fx Neo, Toyobo) を行い、PCR 産物を制限酵素で処理して、Tol2 ベクターにライゲーション (Ligation high Ver.2, Toyobo) した。ゲノム DNA の抽出には DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN) を使用した。

cx39.4

Forward; 3'-AAACTCGAGGCCACCATGTCCAGAGCTGACTGGGGTTCTG-5'

Reverse; 3'-AAAGCGGCCGCTAACATAATGTCTCGGT-5'

cx41.8

Forward; 3'-AAAGTCGACGCCACCATGGCCGACTGGAGTCTGCTGGG-5'

Reverse; 3'-AAAGCGGCCGCTATACCGCAAGGTCTCGTCCG-5'

cx43

Forward; 3'-AAAGTCGACGCCACCATGGGTGACTGGAGTGCCTT-5'

Reverse; 3'-AAAGCGGCCCTAGACGTCCAGGTCAAG-5'

spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase (*ssat*) のコーディング領域のクローニングは野生型ゼブラフィッシュの脳から作製した cDNA ライブライリーをテンプレートに使用した。cDNA ライブライリーを作製するために、Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt (Sigma) で麻酔処理したゼブラフィッシュから脳を摘出、RNA を抽出し (RNeasy mini kit, QIAGEN)、逆転写反応 (Super Script III, invitrogen) を行なった。cDNA ライブライリーは以下に示すプライマーセットを用いて PCR を行い、PCR 産物を制限酵素処理して Tol2 ベクターにライゲーションした。

ssat

Forward; 3'-AAAGTCGACGCCACCATGGCCAATTAAATTGCG-5'

Reverse; 3'-AAAGCGGCCGCTCACTCTCAGCAGACATTT-5'

cx39.4 と *egfp* の融合遺伝子の作製には、上述の方法でクローニングした *cx39.4* と pT2AL200R150G に搭載されている *egfp* の配列を利用した。*cx39.4* と *egfp* の融合遺伝子 *cx39.4ins₂₈₇EGFP*, *cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP* のクローニングは、(i) *Cx39.4* の N 末側、(ii) EGFP、(iii) *Cx39.4* の C 末側の配列を以下に記すプライマーセットを用いてそれぞれ増幅した。次に(i)-(iii)の PCR 産物をまとめ、(i)で使用したフォワードプライマーと (iii)で使用したリバースプライマーを用いて、再度 PCR をを行い、制限酵素処理して、mitfa プロモーターを組み込んだ Tol2 ベクターに挿入した。*cx39.4exc₂₅₆₋₃₃₇EGFP* のクローニングは、*cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP* をテンプレートに使用して、以下に記すプライマーセットを用いて PCR で増幅し、制限酵素処理を行い、ベクターにライゲーションした。

cx39.4ins₂₈₇EGFP

(i) Forward; 3'-AAATTGAATTGCCACCATGTCCAGAGCTGACTGGGG-5'

(i) Reverse; 3'-TCCTCGCCCTTGCTCACCATCCACCATGTGCTACAGGAAG-5'

(ii) Forward; 3'-TTCCTGTAGCACATGGTGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-5'

(ii) Reverse; 3'-TCCAACCCTCGGTAGGGTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-5'

(iii) Forward; 3'-GCATGGACGAGCTGTACAAGTACCCCTACCGAAGGGTTGGAT-5'

(iii) Reverse; 3'-AAATTGCGGCCGCTAACATAATGTCTCGGTT-5'

cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP

(i) Forward; 3'-AAATTGAATTGCCACCATGTCCAGAGCTGACTGGGG-5'

(i) Reverse; 3'-TCCTCGCCCTTGCTCACCATCACCTCTGCCTGATATTCTCTCT-5'

(ii) Forward; 3'-AGAAATATCAGGCAGAGGTGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT-5'

- (ii) Reverse; 3'-TTTAGGAAGATTGTTTGTTCTGTACAGCTCGTCCATGC-5'
- (iii) Forward; 3'-GCATGGACGAGCTGTACAAGAACAAAAACAATCTCCTAAA-5'
- (iii) Reverse; 3'-AAATTGCGGCCGCTCAAACATAATGTCTCGGTT-5'

cx41.8 と *egfp* または *rfp* の融合遺伝子の作製には、上述の方法でクローニングした *cx41.8* と pT2AL200R150G の *egfp* 配列を利用した。*cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀EGFP* と *cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀RFP* のクローニングは以下に記すプライマーセットを用いて、(i) *Cx41.8* の N 末端側と (ii) EGFP または mRFP の配列をそれぞれ PCR で増幅した。次に(i)-(ii)の PCR 断片をまとめ、(i)で使用したフォワードプライマーと(ii)で使用したリバースプライマーを用いて、再度 PCR し、制限酵素処理を行い、*cx41.8* プロモーターを組み込んだ Tol2 ベクターにライゲーションした。

cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀EGFP

- (i) Forward; 3'-CCTCGAATTGCCACCATGGCCGACTGGAGTCT-5'
- (i) Reverse; 3'-TCCTGCCCTGCTCACCAATTGGAAGCCTGTATCCGTG-5'
- (ii) Forward; 3'-ACGGATACAAGGCTCCAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-5'
- (ii) Reverse; 3'-AAAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCC-5'

cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀RFP

- (i) Forward; 3'-CCTCGAATTGCCACCATGGCCGACTGGAGTCT-5'
- (i) Reverse; 3'-ACGTCCTCGGAGGAGGCCATTGGAAGCCTGTATCCGTG-5'
- (ii) Forward; 3'-ACGGATACAAGGCTCCAAAATGGCCTCCGAGGACGTC-5'
- (ii) Reverse; 3'-AAAGCGGCCGCTTAGGCGCCGGTGGAGTGGC-5'

3.2.3.2 培養細胞導入用のプラスミドの作製

哺乳類培養細胞を用いたギャップジャンクションプレートの形成効率の測定や電気生理学的解析を行うために、pIRES2 DsRed-Express2 (Clontech) や pEGFP-N1

vector (Clontech) にタグを付加した *cx39.4* や *cx41.8* を組み込んだプラスミドを作製した。Cx39.4ins₂₈₇EGFP、Cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP、Cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀EGFP、Cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀RFP、は以下に記すプライマーセットを用いて、遺伝子組み換えゼブラフィッシュ作製用に作製したプラスミドをテンプレートに PCR をを行い、制限酵素処理して、培養細胞用のベクターにライゲーションした。

cx39.4ins₂₈₇EGFP, cx39.4 exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP

Forward; 3'-CTTCGAATTCGCCACCATGTCCAGAGCTGACTGGGGTTCTG-5'

Reverse; 3'-TTTGGATCCTCAAACATAATGTCTCGGT-5'

cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀RFP

Forward; 3'-CCTCGAATTCGCCACCATGGCCGACTGGAGTCT-5'

Reverse; 3'-AAAGCGGCCGCTTAGGCGCCGGTGGAGTGGC-5'

cx39.4del₂₅₆₋₃₄₁EGFP

Forward; 3'-AAATTGAATTCGCCACCATGTCCAGAGCTGACTGGGG-5'

Reverse; 3'-AAAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCC-5'

3.2.4 ゼブラフィッシュ生体観察、色素細胞の観察

ゼブラフィッシュの模様の観察には、MZ16FA 顕微鏡—顕微鏡用デジタルカメラ DFC7000T (Leica) と BZ-X700 オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いた。この時、麻酔処理したゼブラフィッシュに 10mM エピネフリン (WAKO) を作用させ、色素顆粒を細胞中央に凝集させ、蛍光タンパク質を検出しやすくした。

3.2.5 体表面積あたりの黒色素胞の数の測定

麻酔とエピネフリン処理を施したゼブラフィッシュの体幹部を MZ16FA 顕微鏡-顕微鏡用デジタルカメラ DFC7000T で撮影した。ImageJ の Analyze Particles ツール

を用いて、取得した画像中の黒色素胞の数を自動計測した。計測範囲は、頭尾軸方向が背ヒレと尻ヒレの前端部から後端部、背腹軸方向がマイオセプタムから尻ヒレのつけ根で囲まれた領域とし(図16)、ImageJのmeasureツールを使用して面積を求めた。体表面積あたりの黒色素胞の数の測定には、体長(Standard Length) 26.13 ± 1.63 mm の成体ゼブラフィッシュを用いた。

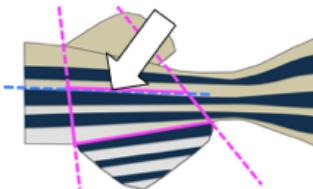


図16. 黒色素胞の数を計測した領域

マゼンタの実線で囲まれた領域の黒色素胞の数と面積を測定した。青の点線はマイオセプタムを示し、マゼンタの点線は測定領域の前端と後端を示す。

3.2.6 明領域の黃色素胞密度の測定

麻酔とエピネフリン処理を施したゼブラフィッシュの体幹部をBZ-X700オールインワン蛍光顕微鏡にて撮影した。ImageJのmeasureを使用して、取得した画像の明領域の面積を求め、黃色素胞の数をカウントし、密度を求めた。黃色素胞の密度の計測は成体ゼブラフィッシュのメスを使用した。

3.2.7 黒色素胞と黃色素胞のトランスクリプトーム解析

黒色素胞と黃色素胞に発現するコネキシン遺伝子の解析を行うため、野生型ゼブラフィッシュから黒色素胞あるいは黃色素胞を回収し、RNA-sequenceを行った。

3.2.7.1 色素細胞の回収

1回の実験につき、野生型の成体ゼブラフィッシュのオスとメス各5匹(計10匹)を使用した。色素細胞の単離と回収方法は先行研究に倣った⁴⁹。麻酔処理したゼebraフィッシュから尻ヒレと尾ヒレを切除し、3mm角に切断した。次に、ヒレ片をPBSで洗浄したのち、トリプシン溶液(2.5 mg/ml trypsin(Worthington)、1.2 mg/ml BSA(Sigma)、1 mM EDTA in PBS)に入れ、振盪(1000 rpm, 30 min, 28°C)した。ヒレ片

を PBS で 5 回洗浄したのち、コラゲナーゼ溶液 (1 mg/ml collagenase I (Worthington)、0.1 mg/ml DNaseI (Worthington)、0.1 mg/ml STI (Worthington)、1.2 mg/ml BSA in PBS) に入れ、振盪 (1000 rpm, 30 min, 28°C) した。続いて、コラゲナーゼ処理されたヒレをポアサイズ 250 μm のナイロンメッシュシート (サンプラテック) で濾過した。濾過した細胞懸濁液を 50% Percoll 溶液 (sigma) に重層し、遠心 (30×g, 10 min, RT) した。比重遠心により回収したペレットを BSA 溶液 (2 mg/ml BSA in PBS) で懸濁し、2%アガロースを薄層コーティングした 35 mm dish (Iwaki) に播種した。次に、手動式マイクロインジェクションシステム (CellTram Air/Oil/vario, Eppendorf) とヒートボリュームしたガラス針 (Glass Capillary, Narishige) を用いて、顕微鏡下で 25-50 個の黒色素胞と黄色素胞を一つずつピックアップして回収した。

3.2.7.2 RNA 抽出、cDNA ライブラリーの作製

回収した黒色素胞と黄色素胞は SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing-v3 (Clontech) を用いて RNA 抽出と cDNA 合成、增幅を行なった。細胞を PBS で 3 回洗浄したのち、10×Reaction Buffer (10×Lysis Buffer, RNase Inhibitor in RNase free mQ) にサスペンションした。この細胞溶解液に SMART CDS Primer II A (12 μM) を添加し、インキュベーション (72°C, 3 min) した。続いて 5×First-Strand Buffer, DTT (100 mM), dNTP Mix (20 mM), SMARTer II A Oligonucleotide (12 μM), RNase Inhibitor (40 U/μL), SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U/μL) を添加し、逆転写反応 (42°C-90 min, 70°C-10min) を行なった。

取得した cDNA に 2×SeqAmp PCR Buffer, PCR Primer II A-v3 (12 μM), SeqAmp DNA Polymerase, Nuclease-free water を加え、PCR (98°C-10 sec, 65°C-30 sec, 68°C-3 min, 18 cycles) を行なった。

増幅した cDNA の精製は SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing - v3, Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Ion Torrent)、AMPureXP beads (Beckman Coulter)、Magna Stand (Fast Gene) を使用した。cDNA 溶液に 10×Lysis Buffer と AMPureXP beads を混合し、静置 (8 min, RT) した。次に、Magna Stand にサンプルを設置し、すべての磁気ビーズが吸着したのち上清を除いた。続いて、80%エタノールで 2 度洗浄し、風乾した。このサンプルに Low TE を添加し、5 回ピッティング後、10 秒間ボルテッ

クスした。そして Magna Stand にサンプルを設置し、すべての磁気ビーズが吸着したのち上清を回収した。

cDNA の濃度測定は Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies) と Agilent expert 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies) を使用し 1 ng 以上の cDNA が回収できたことを確認した。

本研究では、約 400bp の cDNA 断片をシーケンス反応に使用するため、制限酵素処理により cDNA を断片化した。cDNA の断片化には、Ion Shear Plus Reagents Kit (Ion Torrent) と SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing-v3 を使用した。cDNA に Ion Shear Plus 10X Reaction Buffer と Nuclease-free water を添加し、続いて制限酵素 AfaI (10 U) と Ion Shear Plus Enzyme Mix II を添加し、インキュベーション (37°C, 8 min) した。酵素反応後のサンプルに Ion Shear Plus Stop Buffer を添加し、酵素反応を停止させ、cDNA を精製した。

3.2.7.3 cDNA バーコードライブラリーの作製

cDNA バーコードライブラリーの作製には Ion Xpress Plus Fragment Library Kit と Ion Xpress Barcode Adapters 16 kit (Ion Torrent) を用いた。精製した断片化 cDNA 溶液に 10×Ligase Buffer, Ion P1 Adapter, Ion Xpress Barcode X, dNTP Mix, Nuclease-free water, DNA Ligase, Nick Repair Polymerase を添加し、インキュベーション (25°C -15min, 72°C -5min) した。

次に、E-Gel iBase Power System, E-Gel Safe Imager, E-Gel Size select 2%, 50 bp DNA ladder (Invitrogen) 及び Ion Xpress Plus Fragment Library Kit を使用して cDNA のサイズセレクションを行なった。サンプルをゲルにアプライし、電気泳動 (20 min) を行い、回収ウェルから約 400 bp の cDNA のみを回収した。

サイズセレクションした cDNA の増幅には、Ion Xpress Plus Fragment Library Kit を使用した。cDNA 溶液に Platinum PCR Super Mix High Fidelity, Library Amplification Primer Mix を添加し、PCR (95°C -15 sec, 58°C -15 sec, 70°C -1 min, 11 cycles) を行なった。増幅後の cDNA を精製し、濃度が 100 pM 以上あることを確認した。

3.2.7.4 エマルジョン PCR

エマルジョン PCR には、Ion PGM Template OT2 400 kit (Ion Torrent) と Ion OneTouch2 Instrument (Ion Torrent) を使用した。100 pM に調整した cDNA 溶液に Reagent Mix と PCR Reagent B, Enzyme Mix, Reagent X, Ion Sphere Particles を添加し、Ion OneTouch2 Instrument で反応させた。反応後の溶液に Ion OneTouch Wash Solution を添加し、インキュベーション (50°C, 2 min) した。

エマルジョン PCR 反応後のサンプルの濃縮には、Ion PGM Template OT2 400 kit, Ion OneTouch ES (Ion Torrent)、Ion PGM enrichment beads (Ion Torrent)、Dynabeads (Invitrogen)、Magna Stand を使用した。Neutralization Solution と Melt-Off Solution (Tween Solution, 1M NaOH)、Ion PGM MyOne Beads Wash Solution を調整し、Ion OneTouch ES を用いてシーケンスサンプルを濃縮、精製した。

3.2.7.5 シーケンス

シーケンスサンプルの調整は、Ion PGM Sequence 400 kit (Ion Torrent) を使用した。cDNA ライブライマーに 5 μL Control Ion Spheres, Sequencing Primer を加え、インキュベーション (95°C-2 min, 37°C-2 min) した。次にシーケンスサンプルに Ion PGM Sequencing 400 Polymerase を添加し、インキュショーン (5 min, RT) した。シーケンスサンプルを Ion 318 Chip v2 (Ion Torrent) にロードし、Ion Personal Genome Machine にセットして、シークエンシングランを行った。

3.2.7.6 シークエンスデータの解析

シーケンスデータを Fastq 形式で出力し、遺伝子発現解析ソフトウェア CLC Genomics Workbench 11.0.1 を使用して Ensemble のゼブラフィッシュゲノムデータベース GRCz10 にマッピングを行なった。遺伝子発現量を TPM 換算した。

本研究では、黒色素胞と黃色素胞を 2 つの独立したサンプル (Biological Replicate 1, 2) から、3 回分 (Biological Replicate 1 は 2 回、Biological Replicate 2 は 1 回) のシーケンスデータを取得した (表 1)。取得した配列データは DNA Data Bank of Japan (DDBJ) データベースに登録した (登録番号 ; DRA008445)。

Organism	Sample	Bio sample ID	Replicate	Analysis type
Danio rerio	Tü 25 melanophores	SAMD00172014	Biological Replicate 1 _01	RNA-Sequencing (400 bp single)
Danio rerio	Tü 25 melanophores	SAMD00172015	Biological Replicate 1 _02	RNA-Sequencing (400 bp single)
Danio rerio	Tü 25 xanthophores	SAMD00172016	Biological Replicate 1 _01	RNA-Sequencing (400 bp single)
Danio rerio	Tü 25 xanthophores	SAMD00172017	Biological Replicate 1 _02	RNA-Sequencing (400 bp single)
Danio rerio	Tü 50 xanthophores	SAMD00172018	Biological Replicate 2	RNA-Sequencing (400 bp single)
Danio rerio	Tü 50 melanophores	SAMD00172019	Biological Replicate 2	RNA-Sequencing (400 bp single)

表 1. ゼブラフィッシュの黒色素胞と黃色素胞から取得した RNA-sequencing データのサンプル情報

3.2.8 RT-PCR

2.7.1 で記した方法で黒色素胞と黃色素胞をそれぞれおよそ 100 個回収した。遺伝子発現のポジティブコントロールとなる脳、眼、卵巣は野生型の成体ゼブラフィッシュから回収した。mRNA の抽出には RNeasy mini kit (Qiagen) を使用し、逆転写反応および cDNA ライブライリーの作成には ReverTra Ace (Toyobo) を使用した。cDNA は KOD Fx Neo を用いて PCR (98°C-10sec, 60°C-5sec, 68°C-20sec, 39 cycles) を行なった。標的遺伝子 (*cx39.4, cx41.8, cx40.8, cx43, cx31.7, cx34.4, cx35.4, cx43.4*) の検出には、以下に示す 20-24 mer のプライマーを設計した。一部のプライマーについては既報の配列を用いた⁸⁸。黒色素胞特異的な発現を示す遺伝子として *dct*、黃色素胞特異的な発現を示す遺伝子として *aox5*、PCR のポジティブコントロールとして *β-actin* を使用した。

cx39.4

Forward; TCTCAGCGGCAGAAGCTCCTCAC

Reverse; GCAGATTCCACAGCCGTGCCAAG

cx41.8

Forward; TCATCGGTCAACAGAGATAG

Reverse; CTAGTACCAAGATCCGGAAG

cx40.8

Forward; AAGGACTTATCATAGCACACG

Reverse; GGTGACTGGAGCGCACTGGGG

cx43

Forward; TTGGTGACTGAACTTCAGAG

Reverse; TTGAAAGCTGACTGCTCGTC

cx31.7

Forward; TTGAATCAACGATGAATTGGG

Reverse; GGGTTGCTGAGTATTGCAGG

cx34.4

Forward; ACACAATCACTGCGCTCCGAC

Reverse; AACCATGACTCTGAAAAGGAAGAC

cx35.4

Forward; TAATAAGAGACGGGAAACAG

Reverse; ATAAACCATGACCCTGAACAC

cx43.4

Forward; TTGACCGCCTGCGCAGGCACC

Reverse; TCTCAATCAAGCATGGATCC

dct

Forward; CGAATCAGCCCGCGTTCACG

Reverse; TATCCCTCCAGTGCATTCC

aox5

Forward; AGGGCATTGGAGAACCCCCAGT

Reverse; ACACGTTGATGGCCCACGGT

β-actin

Forward; CGGTTTGCTGGAGATGATG

Reverse; CGTGCTCAATGGGTATTTG

3.2.9 細胞培養

3.2.9.1 培養条件

Cx39.4 や Cx41.8 のプラークの観察と電気整理実験は、マウス神経芽細胞腫由来の Neuro 2a (N2a) 細胞株を用いて行なった⁸⁹。N2a 細胞は 37°C、5%CO₂ の条件下で培養を行い。細胞培地には DMEM (Sigma)、10%FBS (Hyclone, gelifesciences)、Antibiotic-Antimycotic (Gibco)、Kanamycin (Gibco) を使用した。

3.2.9.2 トランスフェクション

N2a 細胞へのプラスミドの導入は FuGENE HD Transfection Reagent (Roche) を使用した。トランスフェクション前日に 4x10⁴ cells/35mm dish/2mL Media で播種した。プラスミドのトランスフェクションは、Opti-MEM (Gibco) 100 μL、プラスミド 2 μg、FuGENE 6 μL (Plasmid DNA : FuGENE = 1 : 3) を混合し、インキュベーション (RT, 10 min) した後、N2a を播種したディッシュに添加した。

3.2.9.3 ギャップジャンクションプラーク観察

N2a 細胞に発現させた Cx39.4 または Cx41.8 の融合タンパク質のギャップジャンクションプラークの観察には、トランスフェクションから 24 時間後のサンプルを用いた。プラークの観察には、Keyence BZ-X700 オールインワン蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (ZEISS) または IX83 顕微鏡 (オリンパス) を使用した。

3.2.10 電気生理的解析

Cx39.4 のパッチクランプは、EPC 10 USB Double (HEKA Elektronik) を使用した。Cx39.4ecx₂₅₆₋₃₂₁EGFP をトランスフェクションしてから 24-72 時間後の N2a 細胞を PBS で 3 回洗浄し、バスバッファー (142 mM NaCl, 1.3mM KCl, 0.8mM MgSO₄, 0.9 mM NaH₂PO₄, 1.8 mM CaCl₂, 4.0 mM CsCl, 2.0 mM TEACl, 5.5 mM dextrose, 10 mM HEPES, pH7.4) に置換した。パッチクランプに用いたガラス電極 (NARISHGE G-1) の抵抗値が 4-6 MΩ になるように針先を加工し、内部ピペット溶液 (40 mM KCl, 4.9 mM CsCl, 2.0 mM TEACl, 3.0 mM CaCl₂, 5.0 mM K₄BAPTA, 1.0 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, pH = 7.4)

を充填した。スペルミジン感受性を解析する実験では、15 mM または 30 mM スペルミジン三塩酸塩（Calbiochem）を、一方の内部ピペット溶液にのみ充填し、接合部電流の測定を行なった。Dextrose と MgATP は実験直前に各溶液に加えた。

パッチクランプ実験には N2a 細胞にギャップジャンクション plaque が観察された細胞対のみを実験に使用した。ガラス電極を細胞にインジェクションし、ギガシールを形成させ、保持電圧を -40 mV に固定した。次に片方の電極に -140 mV から +60 mV まで 20 mV 間隔で 11 段階の電圧を 10 秒ずつ与え、もう一方の電極から接合部電流を計測した（図 17）。取得したデータは 42 Hz のフィルター処理を行なった。

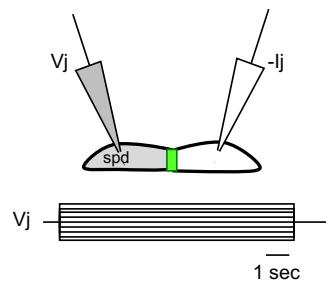


図 17. パッチクランプ実験の模式図

plaque を形成した N2a の細胞対に電極を刺し、電流量を計測した。スペルミジン感受性を評価する試行では、片一方の内部ピペット溶液にスペルミジンを混合した。Spd はスペルミジン、Vj は接合部電圧 (transjunctional voltage)、Ij は接合部電流 (junctional current) を示す。

3.2.11 統計処理、グラフ作製

色素細胞の密度の計測や電気整理実験から取得したデータは *t* 検定あるいは one-way ANOVA による解析を行い、信頼区間（P 値）が 95% より大きくなった場合と有意水準が 0.05 以下の場合に有意差ありとした。また、統計処理およびグラフ作成には Origin version 2015 (OriginLab) 使用した。

3.3 結果

3.3.1 黒色素胞と黃色素胞の遺伝子発現解析

まず、黒色素胞と黃色素胞に発現するコネキシン遺伝子を明らかにするため、野生型ゼブラフィッシュのヒレから単離した黒色素胞と黃色素胞のトランスクリプトーム解析を行なった。色素細胞は独立した 2 回の実験操作から回収し、Biological replicate 1 からから 2 回、Biological replicate 2 から 1 回の合計 3 回分のシーケンスデータを取得した（表 1）。各サンプルあたり 1-1.5 百万リードのシーケンスデータを取得した。シーケンスデータを CLC Genomics Workbench 11.0.1 を用いて Ensemble のゼブラフィッシュゲノムデータベース GRCz10 にマッピングした。次に、Transcript per million (TPM) 値を計算し、各コネキシン遺伝子の発現量を求めた（表 2）。黒色素胞では *cx39.4*, *cx40.8*, *cx41.8*, *cx43*, *cx31.7*, *cx34.4*, *cx35.4*、黃色素胞では *cx39.4*, *cx40.8*, *cx41.8*, *cx43*, *cx31.7*, *cx34.4*, *cx35.4*, *cx43.4* が 1 以上の TPM 値を示した。

次に黒色素胞と黃色素胞から作製した cDNA ライブライバーに対して RT-PCR を行い、TPM 値が 1 より大きかったコネキシンの発現の検出を試みた。その結果、黒色素胞と黃色素胞の両方で *cx39.4* と *cx41.8* の発現を確認した。一方 *cx40.8*, *cx43*, *cx31.7*, *cx34.4*, *cx35.4*, *cx43.4* の遺伝子発現は検出感度以下だった（図 18）。

		Melanophore		Xanthophore	
		TPM	s.d	TPM	s.d
GJA	cx28.1	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx28.9	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx32.2	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx32.3	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx34.5	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx39.4	42.54	35.91	89.03	69.70
	cx39.9	0.16	0.22	0.00	0.00
	cx40.8	4.02	5.69	0.00	0.00
	cx41.8	43.01	35.07	7.99	10.73
	cx43	39.77	56.00	22.57	28.44
	cx44.1	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx45.6	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx48.5	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx50.5	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx52.6	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx52.7	0.16	0.23	0.00	0.00
	cx52.9	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx55.5	0.00	0.00	0.00	0.00
GJB	cx27.5	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx28.6	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx28.8	0.13	0.18	0.00	0.00
	cx30.3	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx30.9	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx31.7	8.44	11.94	0.00	0.00
	cx34.4	0.00	0.00	57.96	50.32
	cx35.4	23.50	18.71	121.58	95.69
GJC	cx43.4	0.00	0.00	16.74	14.33
	cx44.2	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx47.1	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx52.8	0.00	0.00	0.00	0.00
GJD	cx34.1	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx35	0.00	0.00	0.13	0.18
	cx36.7	0.00	0.00	0.00	0.00
	cx46.8	0.00	0.00	0.00	0.00
GJE	cx23	0.00	0.00	0.00	0.00

表2. 黒色素胞と黃色素胞のコネキシンの発現量

黒色素胞と黃色素胞の3回分のシーケンスデータから得られたTPM値の平均値を表記した。
s.dは標準偏差を示す。マッピングに用いたGRCz10に含まれていなかったcx24, cx40.5, cx34.7, cx44.2は上記のリストから除外した。

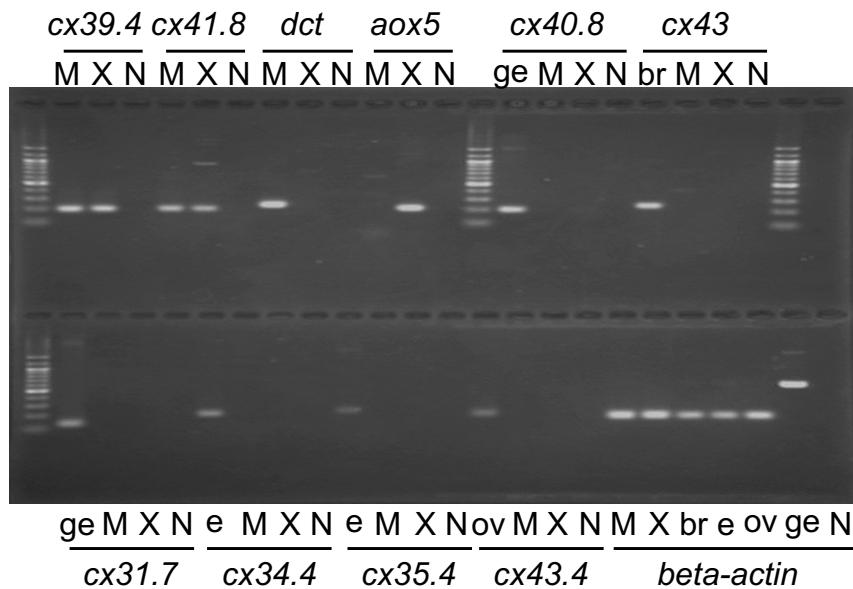


図 18. RT-PCR

黒色素胞と黃色素胞の *cx39.4*, *cx40.8*, *cx41.8*, *cx43*, *cx31.7*, *cx34.4*, *cx35.4*, *cx43.4* の遺伝子発現解析を行うため、2.8 で記したプライマーセットを用いて PCR を行なった。*dct* は黒色素胞特異的な遺伝子、*aox5* は黃色素胞特異的な遺伝子で、 β -*actin* は PCR のポジティブコントロール遺伝子として使用した。“ge”と“br”、“e”、“ov”は各コネキシンのポジティブコントロールとして使用し、“ge”はゲノム DNA、“br”は脳由来の cDNA、“e”は眼由来の cDNA、“ov”は卵巣由来の cDNA ライブライリーを用いたことを示す。N はネガティブコントロールを示し、cDNA テンプレートの代わりに mQ を加えた。

3.3.2 コネキシン再構成系統の作製と体表模様の解析

各色素細胞における Cx39.4 または Cx41.8 の役割を明らかにするために WKO (図 19B) に対して黒色素胞特異的に *cx39.4* または *cx41.8* を発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュと、黃色素胞特異的に *cx39.4* または *cx41.8*, *cx43* を発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュを作製した。次に、作製した遺伝子組み換えゼブラフィッシュの体表模様と体表面積あたりの黒色素胞の数、黃色素胞の密度について解析した。

黒色素胞特異的に *cx39.4* を発現したゼブラフィッシュ (*Tg(mitfa-cx39.4)* WKO) は斑点模様を示した (図 19C)。一方、黒色素胞特異的に *cx41.8* を発現したゼブラフ

イッショウ (*Tg(mitfa-cx41.8)* WKO) の体表模様は WKO と比べてほとんど変化がなかった (図 19D)。黃色素胞特異的に *cx39.4* を発現したゼブラフィッシュ (*Tg(aox5-cx39.4)* WKO) は数個の黒色素胞がクラスターを作った (図 19E)。また黃色素胞に *cx41.8* を発現したゼebraフィッシュ (*Tg(aox5-cx41.8)* WKO) は体幹部の一部と尾ヒレ、尻ヒレに幅の広いストライプを示した (図 19F)。*mitfa* プロモーターは黃色素胞系列に標的遺伝子の発現が漏れる場合があるが、本研究ではレポータータンパク質 H2BRFP の発現を確認し、黒色素胞特異的に H2BRFP が発現する系統を選定した (図 19C'-D")。また、*aox5* プロモーターを使用した系統も、黃色素胞に H2BRFP が発現していることを確認した (図 19E'-F")。続いて、作製した 4 系統を全て交配させ、野生型ゼebraフィッシュ (図 19A) の黒色素胞と黃色素胞が示すコネキシンの発現状態を再現したところ、四重遺伝子組み換えゼebraフィッシュ (*Tg(mitfa-cx39.4, mitfa-cx41.8, aox5-cx39.4, aox5-cx41.8)* WKO) はストライプを示した (図 19G)。このことから、コネキシン変異体の体表模様を再現する系統として、作製した 4 系統が利用できることを確認した。作製した 4 系統の体表面積あたりの黒色素胞の数を測定したところ、いずれの系統も WKO に比べて増加傾向を示し、*Tg(mitfa-cx41.8)* WKO 以外は有意な増加を示した (図 20A、表 3)。黒色素胞にコネキシンを発現した遺伝子改変ゼebraフィッシュは *cx39.4* を発現した系統の方が、*cx41.8* を発現した系統に比べて黒色素胞の数が増加した。一方、黃色素胞特異的にコネキシンを発現した系統では、*cx41.8* を発現した系統が *cx39.4* を発現した系統に比べて有意に黒色素胞の数を増やしたが、両系統の黃色素胞の密度は同程度だった (図 20A, B)。

次に、黃色素胞にコネキシンを発現した遺伝子組み換えゼebraフィッシュにおいて、黒色素胞の増加が黃色素胞の密度を増加するのかについて検証した。そこで、黃色素胞特異的に *cx43* を過剰発現するゼebraフィッシュ (*Tg(aox5-cx43)* WKO) を作製し、体表模様について評価した。その結果、黒色素胞は増加しなかった (図 21A-A")。一方で、黃色素胞特異的に *cx39.4*、*cx41.8*、*cx43* を発現した系統の明領域の黃色素胞密度はいずれも WKO に比べて有意に増加した (図 20B, 21)。このことから、黒色素胞非依存的に、黃色素胞に形成されるギャップジャンクションのチャネルあるいは接着の機能により、黃色素胞の密度は大きくなることが示唆された。

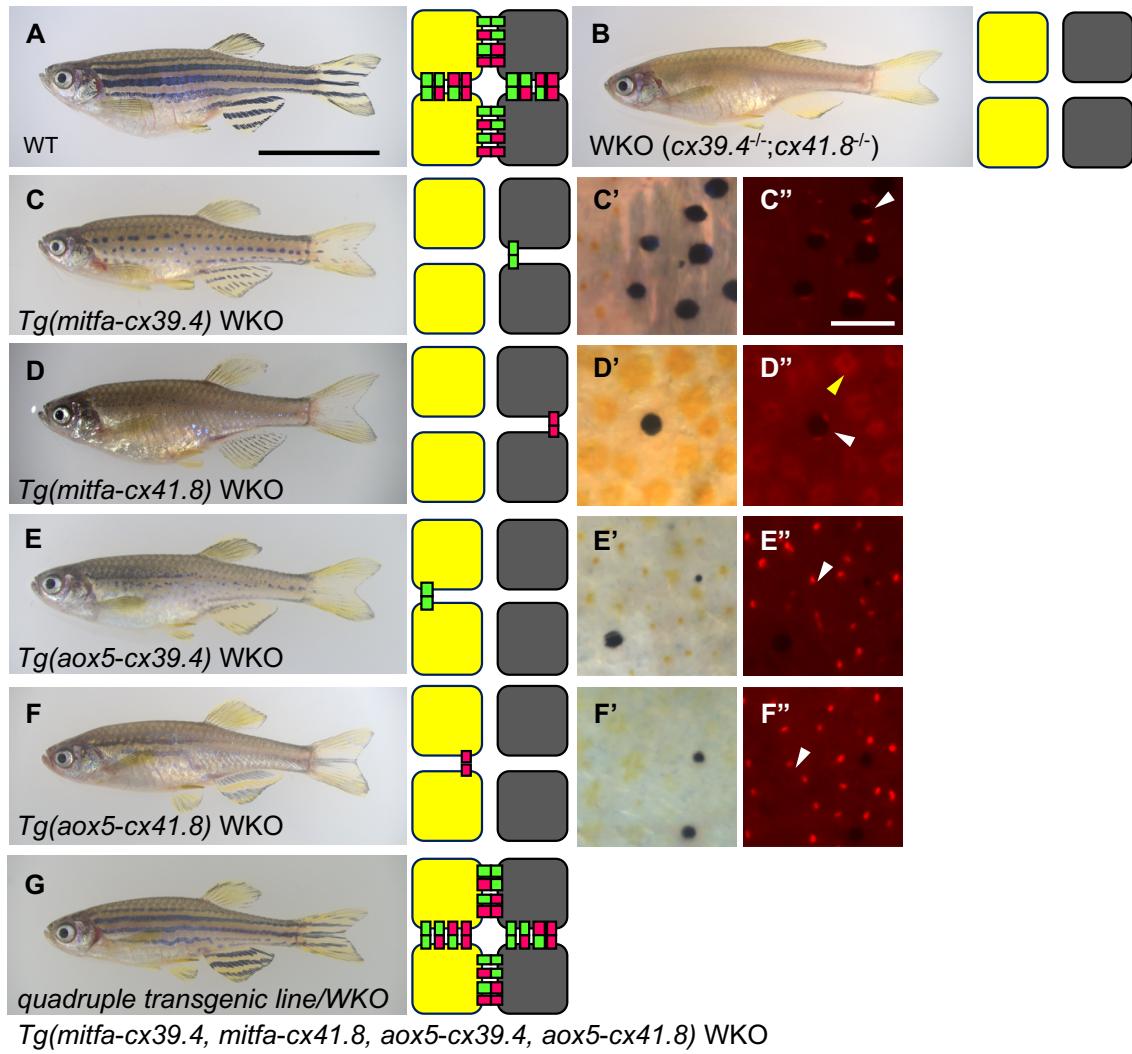


図 19. コネキシン再構成系統の作製

(A) 野生型。 (B) WKO。 (C) 黒色素胞特異的に *cx39.4* を発現した WKO バックグランドの遺伝子組み換えゼブラフィッシュ。 (D) 黒色素胞特異的に *cx41.8* を発現した WKO バックグランドの遺伝子組み換えゼebraフィッシュ。 (E) 黄色素胞特異的に *cx39.4* を発現した WKO バックグランドの遺伝子組み換えゼebraフィッシュ。 (F) 黄色素胞特異的に *cx41.8* を発現した WKO バックグランドの遺伝子組み換えゼebraフィッシュ。 (C'-F') (C-F) の体表模様の拡大写真。 (C''-F'') (C'-F') の蛍光写真。白矢頭は H2BRFP が発現した色素細胞を示す。黄矢頭は黄色素胞の自家蛍光を示す。 (G) (C-F) の全てのトランスジーンを持った 4 重遺伝子組み換えゼebraフィッシュ。各系統の色素細胞で想定されるギャップジャンクションネットワークを全身写真の横に示した。 黄色素胞を黄色の四角、 黒色素胞を黒の四角、 Cx39.4 のコネクソンを緑色の四角、 Cx41.8 のコネクソンを赤色の四角で表示した。スケールバー (A) は 10 mm、 (C'') は 100 μm を示す。

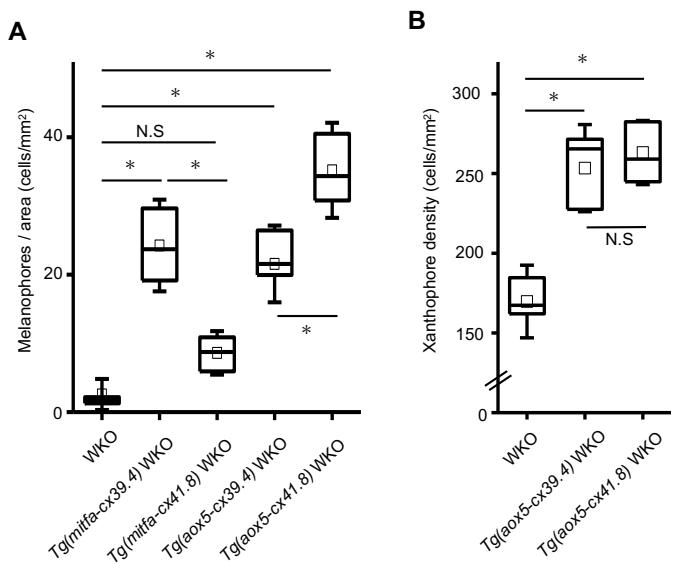


図 20. WKO と図 19 C-F の体表面積あたりの黒色素胞、黃色素胞の密度の比較

(A) 各系統の体表面積あたりの黒色素胞の数をボックスチャートで示した。平均値、標準偏差、計測した個体数については表 3 に記載した。(B) 黃色素胞にコネキシンを発現した遺伝子組み換えゼブラフィッシュの明領域の黃色素胞の密度をボックスチャートで示した。WKO ($169.71 \pm 20.35 \text{ cells/mm}^2$, n=5)、*Tg(aox5-cx39.4)* WKO ($253.39 \pm 17.98 \text{ cells/mm}^2$, n = 5)、*Tg(aox5-cx41.8)* WKO ($263.17 \pm 17.98 \text{ cells/mm}^2$, n=5)。ボックスの中の水平線は平均値、小さな四角は中央値、エラーバーは標準偏差を示す。検定水準 <0.05 とし、* は有意差があることを示す。N.S は有意差なしを示す。スケールバー (A) は 10 mm、(A'') は 100 μm を示す。ボックスの中の水平線は平均値、小さな四角は中央値、エラーバーは標準偏差を示す。検定水準 <0.05 とし、* は有意差があることを示す。

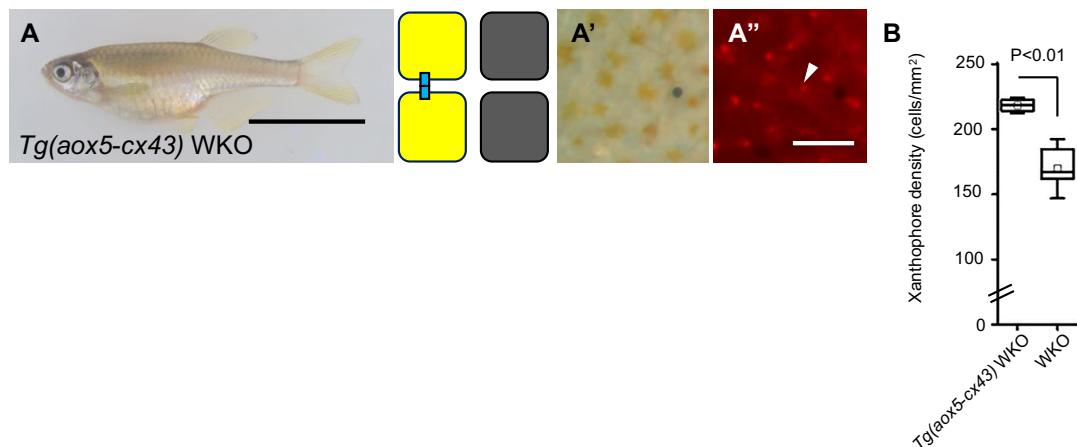


図 21. WKO の黃色素胞にコネキシンを発現した遺伝子組み換えゼブラフィッシュの比較
(説明文の続きは次のページに記載)

図 21. WKO の黄色素胞にコネキシンを発現した遺伝子組み換えゼブラフィッシュの比較
(A) 黄色素胞特異的に cx43 を発現した WKO バックグランドの遺伝子組み換えゼブラフィッシュ。**(A')** (A) の体表模様の拡大写真。**(A'')** (A') の蛍光写真。色素細胞で想定されるギャップジャンクションネットワークを全身写真の横に示した。黄色素胞を黄色の四角、黑色素胞を黒の四角、Cx43 のコネクソンを青色の四角で表示した。**(B)** 黄色素胞にコネキシンを発現した遺伝子組み換えゼブラフィッシュの明領域の黄色素胞の密度をボックスチャートで示した。 $Tg(aox5-cx43)$ WKO (218.35 ± 6.01 cells/mm², n=2)。ボックスの中の水平線は平均値、小さな四角は中央値、エラーバーは標準偏差を示す。P 値は t 検定より算出した。スケールバー (A) は 10 mm、(A'') は 100 μm を示す。

3.3.3 $cx39.4^{-/-}$ バックグラウンドの体表模様の解析

3.1.2 で作製した黑色素胞あるいは黄色素胞に $cx39.4$ を発現する系統をそれぞれ $cx39.4^{-/-}$ (図 22A) と交配し、 $cx39.4^{-/-}$ バックグラウンドの遺伝子組み換えゼブラフィッシュを作製した。黑色素胞特異的に $cx39.4$ 発現したゼブラフィッシュ ($Tg(mitfa-cx39.4) cx39.4^{-/-}$) はストライプを示した (図 22B)。一方、黄色素胞特異的に $cx39.4$ 発現したゼebraフィッシュ ($Tg(aox5-cx39.4) cx39.4^{-/-}$) は迷宮模様のままだった (図 22C)。

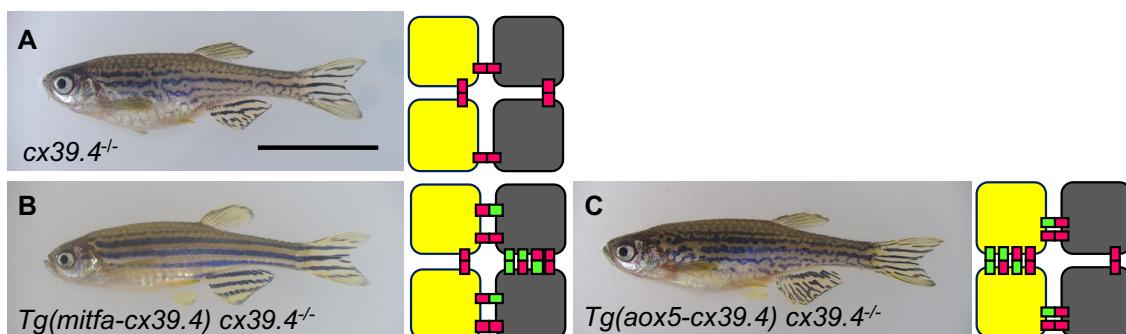


図 22. 黑色素胞あるいは黄色素胞特異的に $cx39.4$ を発現した遺伝子組み換えゼebraフィッシュの体表模様
(A) $cx39.4^{-/-}$ 。**(B)** 黑色素胞特異的に $cx39.4$ を発現した $cx39.4^{-/-}$ バックグラウンドの遺伝子組み換えゼebraフィッシュ。**(C)** 黄色素胞特異的に $cx39.4$ を発現した $cx39.4^{-/-}$ バックグラウンドの遺伝子組み換えゼebraフィッシュ。各系統の色素細胞で想定されるギャップジャンクションネットワークを全身写真の横に示した。黄色素胞を黄色の四角、黑色素胞を黒の四角、Cx39.4 のコネクソンを緑色の四角、Cx41.8 のコネクソンを赤色の四角で表示した。スケールバーは 10 mm を示す。

作製した 2 系統の体表面積あたりの黒色素胞の数を *cx39.4*^{-/-} と比較したところ、黒色素胞特異的に *cx39.4* を発現した系統は有意に黒色素胞の数が増加した（図 23A、表 3）。一方、黃色素胞特異的に *cx39.4* を発現した系統の黒色素胞は増加傾向がみられたが、有意差はなかった。また、黃色素胞特異的に *cx39.4* を発現した系統の明領域の黃色素胞の密度は *cx39.4*^{-/-} と同程度だった（図 23B）。

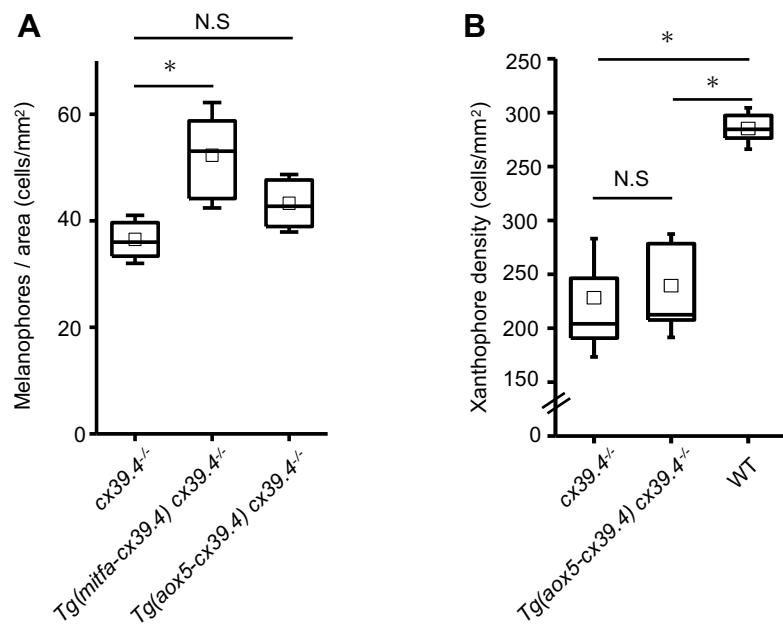


図 23. 黒色素胞あるいは黃色素胞特異的に *cx39.4* を発現した遺伝子組み換えゼブラフィッシュの体表模様の評価

(A) 図 22A-C の体表面積あたりの黒色素胞の数をボックスチャートで示した。平均値、標準偏差、計測した個体数については表 3 に記載した。(B) *cx39.4*^{-/-} (図 22A)、*Tg(aox5-cx39.4) cx39.4*^{-/-} (図 22C) と WT の明領域黃色素胞の密度を示した。*cx39.4*^{-/-} (228.24 ± 17.98 cells/mm², n=5)、*Tg(aox5-cx39.4) cx39.4*^{-/-} (242.77 ± 44.37 cells/mm², n=5)、WT (385.24 ± 17.15 cells/mm², n=5)。ボックスの中の水平線は平均値、小さな四角は中央値、エラーバーは標準偏差を示す。検定水準 <0.05 とし、* は有意差があることを示す。N.S は有意差なしを示す。

3.3.4 *cx41.8^{-/-}* バックグラウンドの体表模様の解析

3.1.2で作製した黒色素胞あるいは黃色素胞に *cx41.8* を発現する系統をそれぞれ *cx41.8^{-/-}* (図 24A) と交配し、*cx41.8^{-/-}* バックグラウンドの遺伝子組み換えゼブラフィッシュを作製した。黒色素胞特異的に *cx41.8* を発現したゼブラフィッシュ (*Tg(mitfa-cx41.8) cx41.8^{-/-}*) は部分的に細いストライプを示した (図 24B)。一方、黃色素胞に *cx41.8* を発現したゼebraフィッシュ (*Tg(aox5-cx41.8) cx41.8^{-/-}*) は部分的に途切れている箇所やガタガタしている箇所はあるが、野生型に近い模様を示した (図 24C)。

作製した 2 系統の体表面積あたりの黒色素胞の数を *cx41.8^{-/-}* と比較したところ、2 系統ともに有意に増加した (図 25A、表 3)。また、黃色素胞に *cx41.8* を発現した系統の方が、黒色素胞に *cx41.8* を発現した系統に比べて体表面積あたりの黒色素胞の数が大きかった。さらに、黃色素胞に *cx41.8* を発現した系統では、明領域の黃色素胞密度が野生型と同程度までレスキューした (図 25B)。

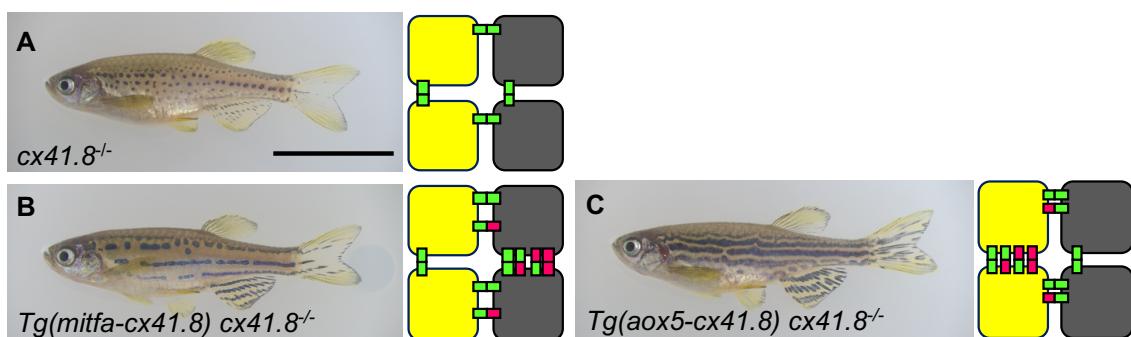


図 24. 黒色素胞あるいは黃色素胞特異的に *cx39.4* を発現した遺伝子組み換えゼebraフィッシュの体表模様

(A) *cx41.8^{-/-}*。(B) 黒色素胞特異的に *cx41.8* を発現した *cx41.8^{-/-}* バックグラウンドの遺伝子組み換えゼebraフィッシュ。(C) 黃色素胞特異的に *cx41.8* を発現した *cx41.8^{-/-}* バックグラウンドの遺伝子組み換えゼebraフィッシュ。各系統の色素細胞で想定されるギャップジャンクションネットワークを全身写真の横に示した。黃色素胞を黄色の四角、黒色素胞を黒の四角、Cx39.4 のコネクソンを緑色の四角、Cx41.8 のコネクソンを赤色の四角で表示した。スケールバーは 10 mm を示す。

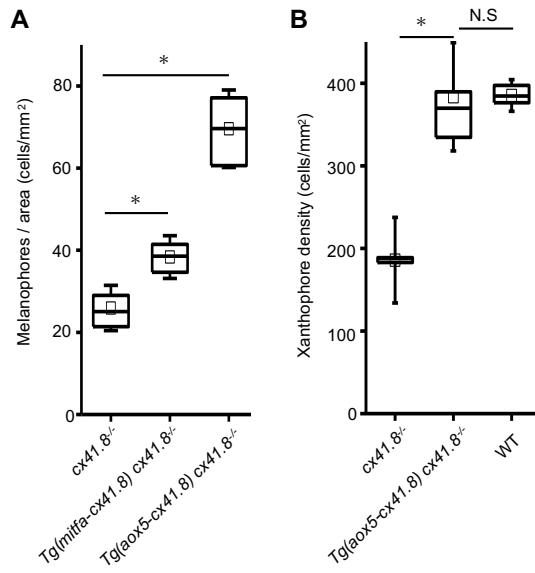


図25. 黒色素胞あるいは黃色素胞特異的に *cx41.8*を発現した遺伝子組み換えゼブラフィッシュの体表模様の評価

(A) 図24A-Cの体表面積あたりの黒色素胞の数をボックスチャートで示した。平均値、標準偏差、計測した個体数については表3に記載した。(B) *cx41.8^{-/-}* (図24A)、*Tg(aox5-cx41.8) cx41.8^{-/-}* (図24C) と WT の明領域の黃色素胞密度を示した。*cx41.8^{-/-}* (185.81 ± 49.08 cells/mm², n=5)、*Tg(aox5-cx41.8) cx41.8^{-/-}* (383.60 ± 28.63 cells/mm², n=5)、WT (385.24 ± 17.15 cells/mm², n=5)。ボックスの中の水平線は平均値、小さな四角は中央値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。検定水準<0.05とし、*は有意差があることを示す。N.S.は有意差なしを示す。

3.3.5 ストライプ形成に必要な最小ギャップジャンションネットワーク

3.1.2で作製した4系統を交配させ、黒色素胞と黃色素胞にそれぞれ1種類のコネキシンを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、その体表模様と色素細胞の数を評価した。

黒色素胞と黃色素胞の両方で *cx39.4* を発現するゼブラフィッシュ (*Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx39.4)* WKO) は斑点模様を示した(図26A)。また黒色素胞と黃色素胞の両方に *cx41.8* を発現するゼebraフィッシュ (*Tg(mitfa-cx41.8, aox5-cx41.8)* WKO) は迷宮模様を示し、*cx39.4^{-/-}*の体表模様を再現した(図26B)。次に黒色素胞に *cx39.4*、黃色素胞に *cx41.8* を発現するゼebraフィッシュ (*Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx41.8)* WKO) を作製するとストライプになった(図26C)。これに対して、黒色素胞に *cx41.8*、黃色素胞に *cx39.4* を発現するゼebraフィッシュ (*Tg(mitfa-cx41.8, aox5-cx39.4)* WKO) では迷宮

模様になった（図 26D）。

黒色素胞に *cx39.4*、黃色素胞に *cx41.8* を発現する系統（図 26C）は、体表面積あたりの黒色素胞の数が二重遺伝子組み換えゼブラフィッシュの中で最も大きく、同じくストライプを示した四重遺伝子組み換えゼブラフィッシュ（図 19G）と同程度まで増加した（図 27A, B, 表 3）。黒色素胞に *cx39.4*、黃色素胞に *cx41.8* を発現する系統（図 17C）の黒ストライプの幅も四重遺伝子組み換えゼブラフィッシュ（図 19G）と同程度だったが、野生型よりは細かった（図 27C）。

斑点模様を持つ *cx41.8^{-/-}* と黒色素胞特異的に *cx39.4* を発現する系統 (*Tg(mitfa-cx39.4)* WKO)（図 19C）、黒色素胞と黃色素胞の両方で *cx39.4* を発現する系統 (*Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx39.4)* WKO)（図 26A）において 1 つの斑点を構成する黒色素胞の数を測定すると、いずれも 15 個前後だった（図 28A-D）。つまり *cx39.4* は黒色素胞に発現するだけで *cx41.8^{-/-}* の体表模様を再現した。以上の結果から、ゼブラフィッシュがストライプを形成するためには、少なくとも黒色素胞に *cx39.4*、黃色素胞に *cx41.8* が発現していなければならないことが明らかになった。

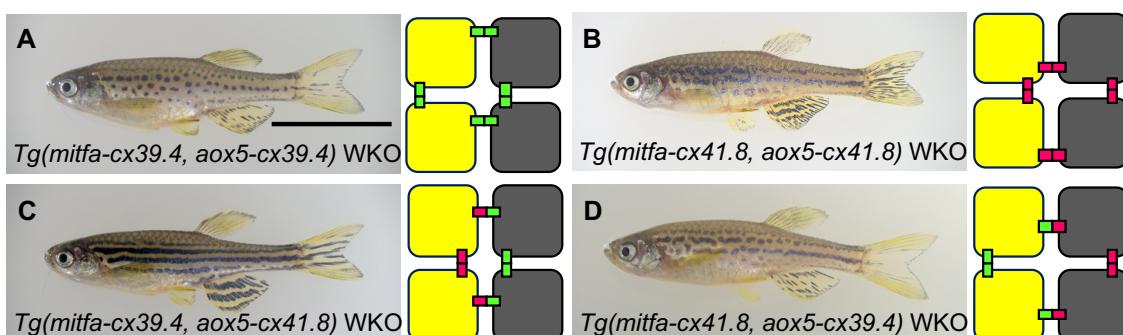


図 26. 黒色素胞と黃色素胞にそれぞれ一種類のコネキシンを発現した遺伝子組み換えゼブラフィッシュの体表模様

(A) 黒色素胞に *cx39.4*、黃色素胞に *cx39.4* を発現した WKO バックグランドの遺伝子組み換えゼブラフィッシュ。(B) 黒色素胞に *cx41.8*、黃色素胞に *cx41.8* を発現した WKO バックグランドの遺伝子組み換えゼebrafish。(C) 黒色素胞に *cx39.4*、黃色素胞に *cx41.8* を発現した WKO バックグランドの遺伝子組み換えゼebrafish。(D) 黒色素胞に *cx41.8*、黃色素胞に *cx39.4* を発現した WKO バックグランドの遺伝子組み換えゼebrafish。各ゼebrafish 系統で想定されるギャップジャンクションネットワークを全身写真の横に示した。黃色素胞を黄色の四角、黒色素胞を黒の四角、Cx39.4 のコネクソンを緑色の四角、Cx41.8 のコネクソンを赤色の四角で表示した。スケールバーは 10 mm を示す。

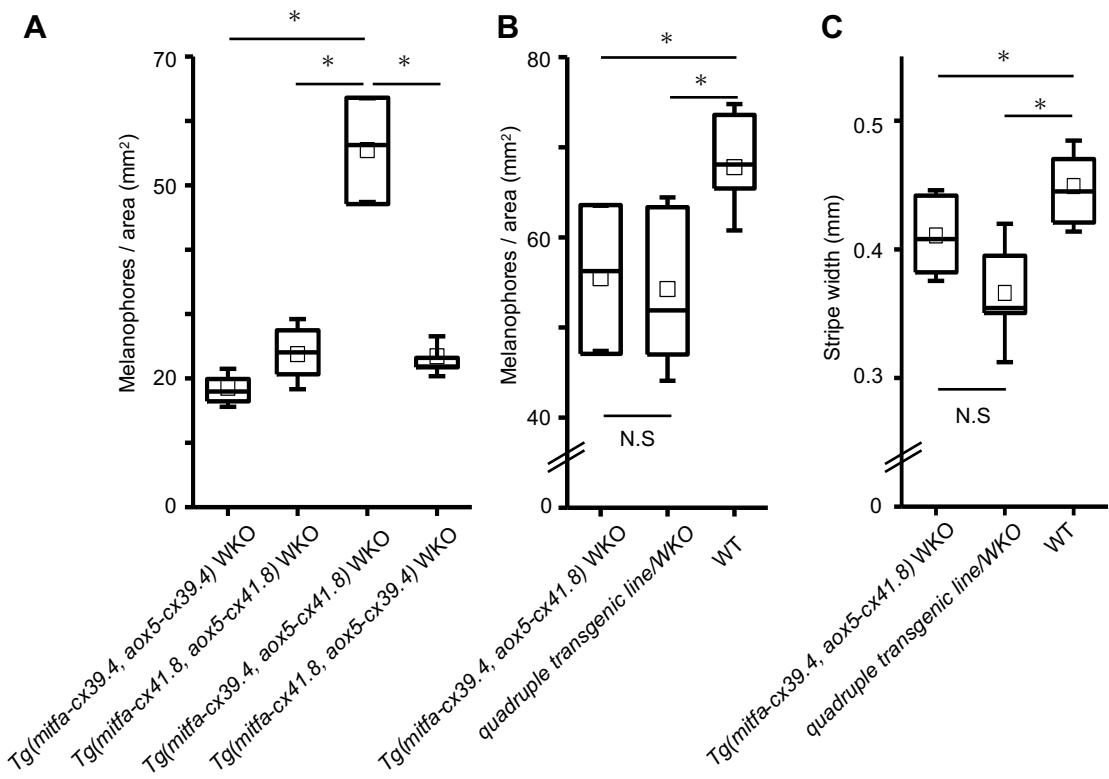


図 27. 図 26A-D ゼブラフィッシュの体表模様の評価

(A) 図 26A-D の体表面積あたりの黒色素胞の数をボックスチャートで示した。(B) *Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx41.8) WKO* (図 26C)、四重遺伝子組み換えゼブラフィッシュ (図 19G) と WT の体表面積あたりの黒色素胞の数をボックスチャートで示した。平均値、標準偏差、計測した個体数については表 3 に記載した。(C) *Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx41.8) WKO* (図 26C)、四重遺伝子組み換えゼブラフィッシュ (図 19G) と WT の黒ストライプ幅をボックスチャートで示した。*Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx41.8) WKO* (0.511 ± 0.034 mm, n=11)、四重遺伝子組み換えゼブラフィッシュ (0.466 ± 0.048 mm, n=5)、WT (0.549 ± 0.034 mm, n=11)。ボックスの中の水平線は平均値、小さな四角は中央値、エラーバーは標準偏差を示す。検定水準 <0.05 とし、* は有意差があることを示す。N.S は有意差なしを示す。

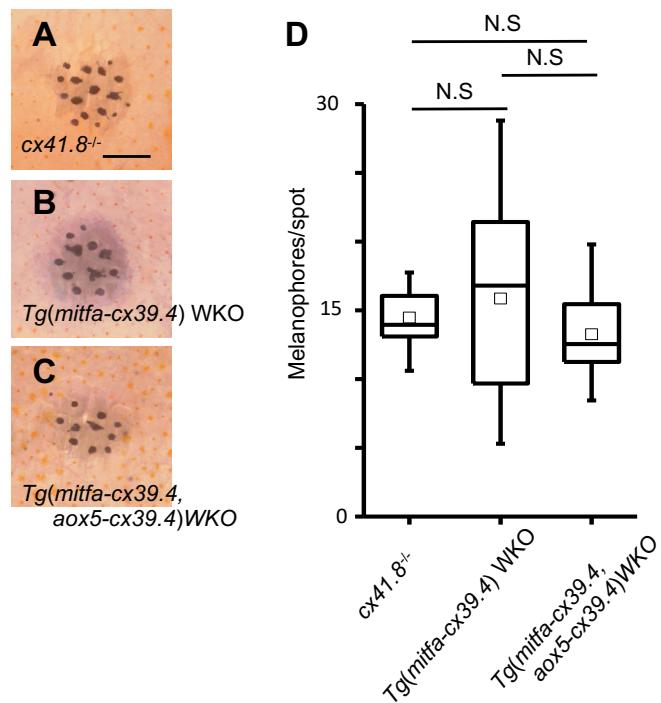


図 28. 1 つの斑点を構成する黒色素胞の数の比較

(A) *cx41.8^{-/-}* の斑点の拡大写真。 (B) *Tg(mitfa-cx39.4)* WKO の斑点の拡大写真。 (C) *Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx39.4)* WKO の斑点の拡大写真。 (D) *cx41.8^{-/-}*、*Tg(mitfa-cx39.4)* WKO、*Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx39.4)* WKO の 1 つの斑点を構成する黒色素胞の数をボックスチャートで示した。*cx41.8^{-/-}* (14.57 ± 2.06 cells, n=10)、*Tg(mitfa-cx39.4)* WKO (15.86 ± 6.58 cells, n=20)、*Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx39.4)* WKO (13.26 ± 3.36 cells, n=10)。ボックスの中の水平線は平均値、小さな四角は中央値、エラーバーは標準偏差を示す。検定水準 <0.05 とし、N.S. は有意差なしを示す。スケールバーは 200 μm を示す。

Line	melanophores/mm ²	s.d	N
WT	67.78	6.65	10
<i>cx39.4</i> ^{-/-}	36.51	4.28	10
<i>Tg(mitfa-cx39.4)cx39.4</i> ^{-/-}	52.30	9.16	7
<i>Tg(aox5-cx39.4)cx39.4</i> ^{-/-}	43.29	4.68	4
<i>cx41.8</i> ^{-/-}	25.94	5.23	10
<i>Tg(mitfa-cx41.8)cx41.8</i> ^{-/-}	38.34	4.94	10
<i>Tg(aox5-cx41.8)cx41.8</i> ^{-/-}	69.58	8.95	10
WKO	2.56	2.15	10
<i>Tg(mitfa-cx39.4)WKO</i>	24.25	6.48	18
<i>Tg(mitfa-cx41.8)WKO</i>	8.61	3.00	10
<i>Tg(aox5-cx39.4)WKO</i>	21.56	5.30	10
<i>Tg(aox5-cx41.8)WKO</i>	35.18	6.72	18
<i>Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx39.4)WKO</i>	18.54	2.80	10
<i>Tg(mitfa-cx41.8, aox5-cx41.8)WKO</i>	23.77	5.28	16
<i>Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx41.8)WKO</i>	55.46	7.68	11
<i>Tg(mitfa-cx41.8, aox5-cx39.4)WKO</i>	23.86	2.95	4
<i>Tg(mitfa-cx39.4, mitfa-cx41.8, aox5-cx39.4, aox5-cx41.8)WKO</i>	54.26	9.09	5

表 3. 体表面積あたりの黒色素胞の数のまとめ

各系統の体表面積あたりの黒色素胞の数の平均値、標準偏差（s.d）、計測した個体数（N）を表記した。

ここまで結果をまとめると、黒色素胞と黃色素胞に発現するコネキシン遺伝子は cx39.4 と cx41.8 だった。また、黒色素胞に cx39.4、黃色素胞に cx41.8 を発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュでは、体表面積あたりの黒色素胞の数が増加し、これらを同時に発現するとストライプを示した。以上のことから、ゼブラフィッシュの黒色素胞と黃色素胞は、黒色素胞間に Cx39.4-Cx39.4、黃色素胞間に Cx41.8-Cx41.8、黒色素胞—黃色素胞間には Cx39.4-Cx41.8 のギャップジャンクションネットワークを構築するとストライプを形成することが示唆された（図 29）。

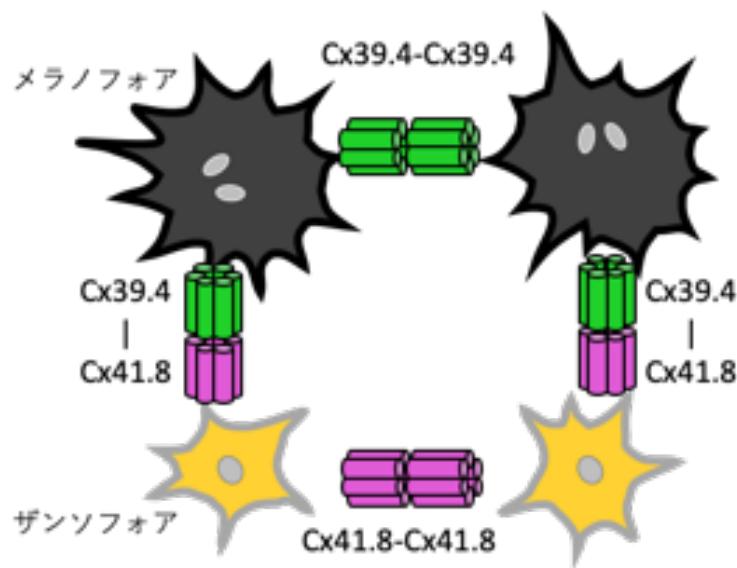


図 29. ゼブラフィッシュがストライプを形成するために必要な色素細胞間の最小ギャップジャンクションネットワークの模式図

3.3.6 ギャップジャンクションの可視化

Cx39.4 や Cx41.8 が色素細胞間にギャップジャンクションを形成していることを示すため、また、N2a 細胞を用いた電気生理学的解析を行うため、Cx39.4 と Cx41.8 の可視化を試みた。先行研究において、色素細胞は免疫染色法によるギャップジャンクションの検出が困難であること、また、コネキシンの全長配列と蛍光タンパク質の融合タンパク質は、コネキシン変異体の体表模様を回復できず、HeLa 細胞にギャップジャンクションを形成しないことを示している^{60,88}。

3.3.6.1 Cx39.4 の可視化

Cx39.4 が形成するギャップジャンクションを可視化するため、Cx39.4 の全長配列（図 30A-上段）の 256 番目から 321 番目のアミノ酸を除き EGFP を挿入した Cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP（図 30A-下段）を作製した。

作成した融合遺伝子を黒色素胞特異的に cx39.4^{-/-} バックグランドのゼブラフィッシュに発現させたところ、*Tg(mitfa-cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP)* cx39.4^{-/-} はストライプを

示し、黑色素胞間にギャップジャンクション plaque を示す蛍光タンパク質の集積が観察された（図 30B, C）。黑色素胞に EGFP を発現しただけでは、細胞膜への移行、細胞膜への蛍光タンパク質の集積は起こらなかった（図 30D, E）。次に、Cx39.4 $exc_{256-321}$ EGFP を N2a 細胞に発現させたところ、102 ペア中 38 ペア（37.25%）がギャップジャンクション plaque を形成した（図 30F）。

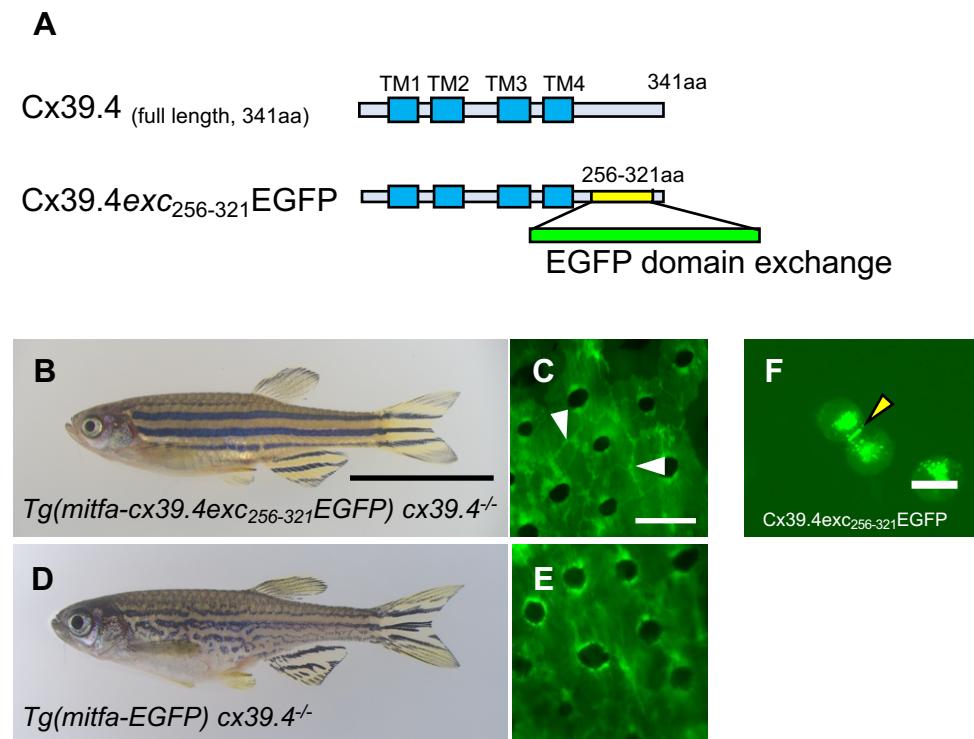


図 30. Cx39.4 の imaging

(A) Cx39.4 の可視化に用いたコンストラクトの模式図。(B) 黒色素胞特異的に $cx39.4exc_{256-321}$ EGFP を発現した $cx39.4^{-/-}$ バックグランドの遺伝子組み換えゼブラフィッシュ。(C) (B) の F0 世代の体表の拡大蛍光写真。(D) 黒色素胞特異的に EGFP を発現した $cx39.4^{-/-}$ バックグランドの遺伝子組み換えゼブラフィッシュ。(E) (D) の F0 世代の体表の拡大蛍光写真。(F) Cx39.4 $exc_{256-321}$ EGFP を発現した N2a 細胞。白矢頭、黄矢頭は plaque を示す。スケールバー (B) は 10 mm、(C) は 100 μ m、(F) は 10 μ m を示す。

3.1.6.2 Cx41.8 の可視化

次に、Cx41.8 が形成するギャップジャンクションの可視化を試みた。Cx41.8 の C 末端領域の 240 番目以降のアミノ酸を除去し、EGFP を融合した融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製した（図 31A-下段）。*cx41.8* プロモーターで *cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀EGFP* を *cx41.8^{-/-}* に発現したゼブラフィッシュ (*Tg(cx41.8-cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀EGFP) cx41.8^{-/-}*) はストライプを示し（図 31B）、F0 世代では黒色素胞間にギャップジャンクションプレートを示す蛍光タンパク質の集積を確認した（図 31C）。本実験では、黃色素胞が形成するギャップジャンクションプレートの観察も試みたが、黃色素胞の自家蛍光によりギャップジャンクションプレートを検出できなかった。

また Cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀EGFP を N2a 細胞にトランスフェクションしたところ、Cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀EGFP を発現する細胞は 562 ペア中 1 ペア (0.18%) しかギャップジャンクションプレートを形成しなかった（図 31D）。そのため、本研究では Cx41.8 の電気生理学的解析を行うことができなかった。

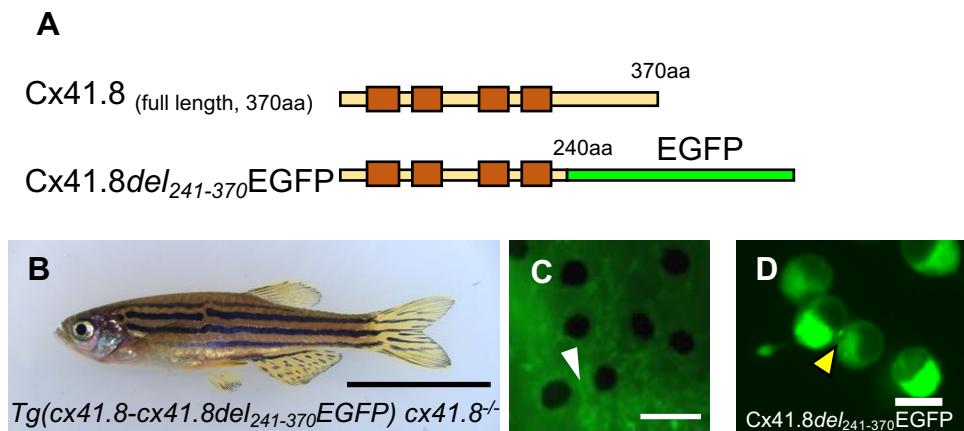


図 31. Cx41.8 の imaging

(A) Cx41.8 の可視化に用いたコンストラクトの模式図。(B) 黒色素胞特異的に *cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀EGFP* を発現した *cx41.8^{-/-}* バックグラウンドの遺伝子組み換えゼブラフィッシュ。(C) (B) の F0 世代の体表の拡大蛍光写真。(D) Cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀EGFP を発現した N2a 細胞。白矢頭、黄矢頭はプレートを示す。スケールバー (B) は 10 mm、(C) は 100 μm、(D) は 10 μm を示す。

3.1.6.3 ホモメリック-ヘテロティピックギャップジャンクションの形成

Cx39.4 と Cx41.8 は色素細胞において、ヘテロメリックギャップジャンクションを形成する^{17,59}。そこで、N2a 細胞に *cx39.4ins₂₈₇EGFP* (Cx39.4 の 288 番目の位置に EGFP を挿入したコンストラクト) を発現するプラスミドと *cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀RFP* (*cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀EGFP* の EGFP を RFP に置換したコンストラクト) を発現するプラスミドを同時にトランスフェクションした (図 32A)。2 種類のプラスミドが導入された N2A 細胞 237 ペア中 89 ペア (37.55%) が Cx39.4ins₂₈₇EGFP と Cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀RFP が混在したギャップジャンクションプラーカーを形成した (図 32B-D)。*cx39.4ins₂₈₇EGFP* を単独でトランスフェクションした時は 191 ペア中 73 ペア (38.21%)、Cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀RFP を単独でトランスフェクションした時は 463 ペア中 4 ペア (0.86%) にギャップジャンクションプラーカーが観察された。

次に、Cx39.4ins₂₈₇EGFP と Cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀RFP をそれぞれ N2a 細胞にトランスフェクションし、トランスフェクションから 24 時間後に両方の細胞を混同して、新しいガラスベースディッシュに播き直した。トランスフェクションから 48 時間後 (播き直しから 24 時間後) の細胞を観察すると、Cx39.4ins₂₈₇EGFP を発現する培養細胞と Cx41.8del₂₄₁₋₃₇₀RFP を発現する細胞のペアが低頻度 (79 ペア中 3 ペア (3.80 %)) でプラーカーを形成した (図 32E-G)。この結果から、Cx39.4 と Cx41.8 はホモメリック-ヘテロティピックギャップジャンクションを N2a 細胞でも作ることを確認した。

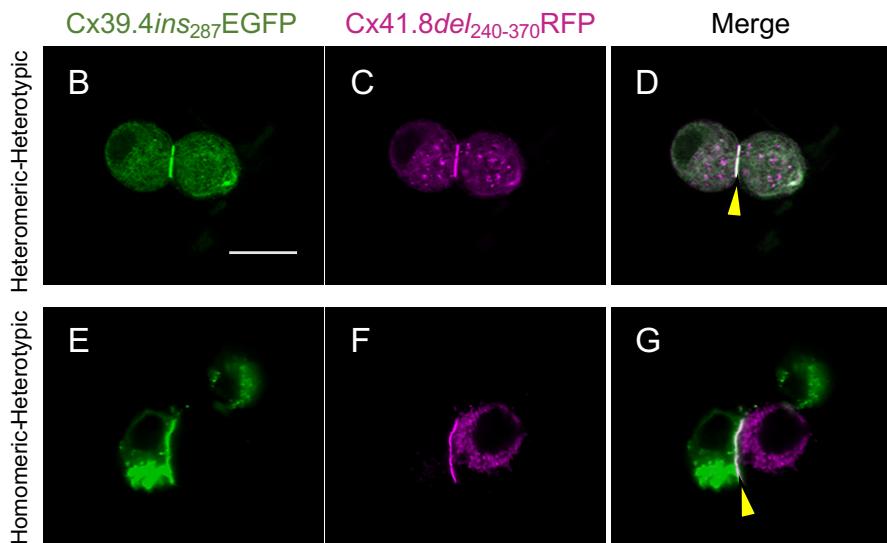
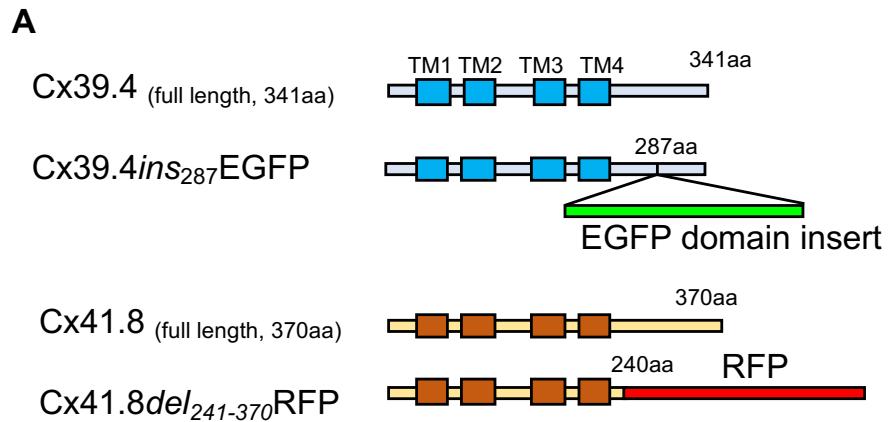


図 32. Cx39.4 と Cx41.8 の同時可視化

(A) Cx39.4_{ins}₂₈₇EGFP と Cx41.8_{del}₂₄₁₋₃₇₀RFP のコンストラクトの模式図。(B-D)
Cx39.4_{ins}₂₈₇EGFP と Cx41.8_{del}₂₄₁₋₃₇₀RFP を同時に発現し、ヘテロメリック-ホモティピックギャップジャンクションを形成した N2a 細胞。(E-G) 一方の細胞で Cx39.4_{ins}₂₈₇EGFP、もう一方の細胞で Cx41.8_{del}₂₄₁₋₃₇₀RFP を発現し、ホモメリック-ヘテロティピックギャップジャンクションを形成した N2a 細胞。(B, E) は EGFP、(C, F) は RFP のフィルターで撮影した蛍光写真。(D, G) は EGFP と RFP で撮影した写真をマージした画像。黄矢頭は N2a 細胞対に形成されたギャップジャンクションプラタークを示す。スケールバーは 10μm を示す。

3.3.7 コネキシンのスペルミジン感受性について

3.3.7.1 スペルミジン濃度が減少したゼブラフィッシュの体表模様の観察

スペルミジン合成酵素 (spermidine synthase; *srm*) を欠損した変異体は、生体内のスペルミジン濃度が減少し、体表模様が変化する（図 33A）⁹⁰。本研究では色素細胞に発現するコネキシンのスペルミジンに対する影響を解析するため、スペルミン・スペルミジン分解酵素 (Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase; *ssat*) を黒色素胞あるいは黃色素胞に過剰発現した遺伝子組み換えゼブラフィッシュを作製し、その体表模様を観察した。黒色素胞に *ssat* を過剰発現した野生型バックグランドのゼブラフィッシュ (*Tg(mitfa-ssat)* WT) は体表模様が乱れた（図 33B）⁸⁸。一方、黃色素胞に *ssat* を過剰発現した野生型バックグランドのゼebrafish (Tg(aox5-ssat) WT) はストライプを示し、体表模様が乱れなかった（図 33C）。これにより黃色素胞ではなく、黒色素胞に含まれるスペルミジンが、ゼebrafish の体表模様形成に関わることを示した。

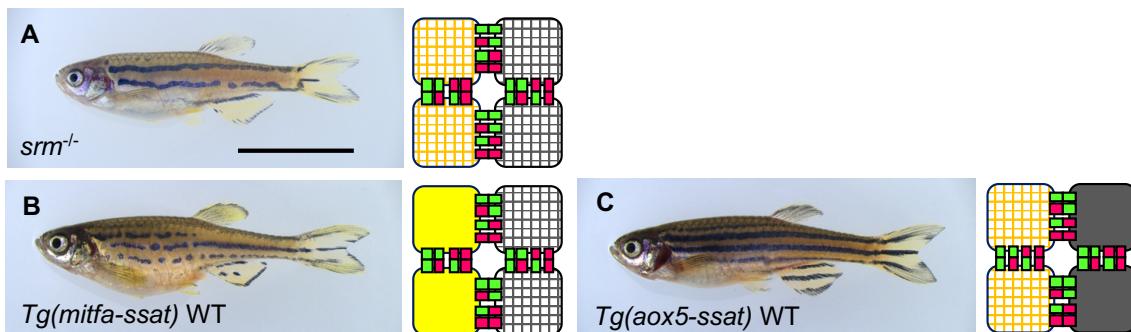


図 33. スペルミジンの濃度が減少したゼebrafish の体表模様

(A) *srm*^{-/-}。(B) 黒色素胞に *ssat* を発現した WT バックグランドの遺伝子組み換えゼebrafish。(C) 黃色素胞に *ssat* を発現した WT バックグランドの遺伝子組み換えゼebrafish。各ゼebrafish の系統で想定されるギャップジャンクションネットワークを全身写真の横に示した。黃色素胞を黄色の四角、黒色素胞を黒の四角、Cx39.4 のコネクソンを緑色の四角、Cx41.8 のコネクソンを赤色の四角、スペルミジン濃度が減少した色素細胞を網掛けで表示した。スケールバーは 10 mm を示す。

3.3.7.2 Cx39.4 ギャップジャンクションの電気生理学解析

ゼブラフィッシュがストライプを形成するために、黒色素胞は *cx39.4* を発現することが必要であり、且つ、黒色素胞はスペルミジン要求性がある。また Cx39.4 は N2a 細胞にギャップジャンクションプラーカーを形成する。そこで、パッチクランプ法を用いて Cx39.4 のスペルミジン感受性について解析した。

パッチクランプ法は *Cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP* を N2a 細胞に発現させ、ギャップジャンクションプラーカーを形成したペア（図 34D）に伝わる電流を、スペルミジン存在下または非存在下において測定した（図 34A）。はじめに電極を刺した N2a 細胞対の保持電圧を -40 mV に固定した。次に一方の細胞側の電圧を 20 mV 間隔で -140 mV から +60 mV まで 10 秒ずつ与え、反対側の細胞に流れた電流 (I_j) を測定した（図 34B 上段）。

その結果、*Cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP* をトランスフェクションしていない N2a のペアは 10 pA 以下の電流が測定され、ほとんど電流が流れなかった（図 34B-2 段目）。次に *Cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP* のギャップジャンクションプラーカーを形成した N2a ペアを計測したところ、内向きと外向きに同量の電流を確認した（図 34B-3 段目）。続いて一方の内部ピペット溶液に 30 mM のスペルミジンを混合して細胞間を伝わる電流を測定した。その結果、スペルミジンを含んだ細胞では内向きの電流量に対して外向きの電流量が小さくなり、整流性を示した（図 34B-下段）。

内部ピペット溶液のスペルミジン濃度を 0 mM、15 mM、30 mM にしてそれぞれパッチクランプを行い、その結果を I-V プロットで示した（図 34C）。15 mM と 30 mM のスペルミジンを内部ピペット溶液に用いた条件では、接合部電圧 (V_j) が +40 mV 以上になると 0 mM スペルミジンの条件に比べて、スペルミジンを含んだ細胞の外向きの電流量が有意に減少した。以上の結果から、Cx39.4 がスペルミジン依存的な整流性を持つことが明らかになった。

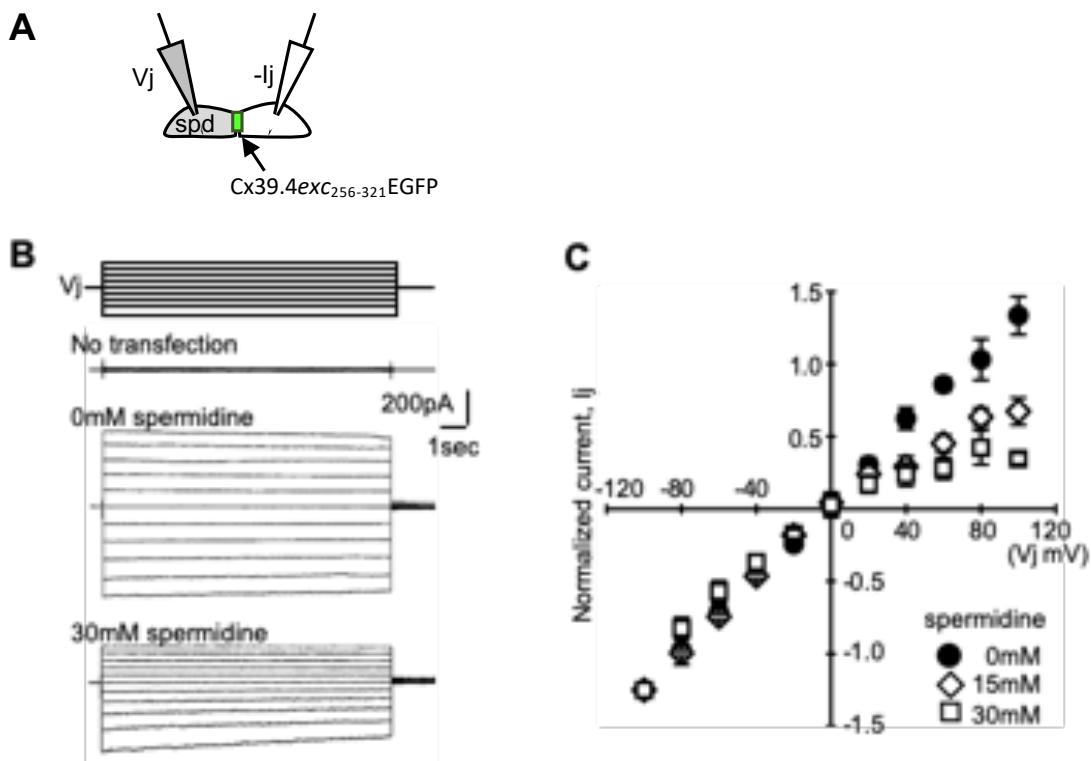


図 34. Cx39.4 の電気生理学的解析

(A) Cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP のスペルミジン (Spd) 感受性を測定したパッチクランプ法の模式図。(B) 上段；一方の細胞の電圧を-140 mV から+60 mV まで 20 mV ずつ変化させ、他方の細胞へ流れる電流 (I_j) を測定した。2段目；Cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP をトランスフェクションしていない N2a 細胞の細胞対で測定した電流を示す。3段目；Cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP のギャップジャンクションプラーカーを形成した N2a の細胞対で測定した電流を示す。下段；30 mM スペルミジンを加えた内部ピペット溶液も用いて、Cx39.4exc₂₅₆₋₃₂₁EGFP のギャップジャンクションプラーカーを形成した N2a 細胞対で測定した電流を示す。(C) 内部ピペット溶液のスペルミジン濃度を 0 mM (●)、15 mM (◇)、30 mM (□) にしてパッチクランプを行なった計測結果を I-V プロットで示す。各スペルミジン濃度において 5 回分の測定結果の平均を求めた。エラーバーは標準偏差を示す。

3.4. 考察

3.4.1 黄色素胞から黒色素胞への活性化シグナル

ゼブラフィッシュの体表模様形成における Cx39.4 と Cx41.8 の機能を理解するため、黒色素胞特異的あるいは黄色素胞特異的に *cx39.4* または *cx41.8* を発現するコネキシン再構成系統を作製した。*cx39.4* と *cx41.8* の二重変異体 (WKO) はほとんど黒色素胞が存在しないが、本研究では、WKO の黒色素胞に *cx39.4*、黄色素胞に *cx41.8* を同時に発現したゼブラフィッシュ (*Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx41.8)* WKO) がストライプを形成すること示した（図 26C）。これにより、色素細胞間のギャップジャンクションネットワークを介した活性化シグナルの存在が示唆された。また、黒色素胞に含まれるスペルミジンが体表模様形成に寄与し、Cx39.4 がスペルミジン依存的な整流性を示すことを明らかにした（図 34B, C）。以上のことから、黒色素胞の Cx39.4 と黄色素胞の Cx41.8 からなるギャップジャンクションが整流性を示し、この方向性を持ったギャップジャンクションは黄色素胞から黒色素胞への活性化シグナルを直接的に仲介している可能性が考えられる。

3.4.2 スペルミジン減少による体表模様変化について

先行研究にて、スペルミジン合成酵素 (spermidine synthetase; *srm*) のノックアウトゼブラフィッシュ (*srm*^{-/-}、図 33A) が体表模様変化を引き起こすことが示され、ゼebraフィッシュの体表模様形成におけるスペルミジンの必要性が示された⁹⁰。さらにこの研究では、*srm*^{-/-}の生体内のスペルミジン濃度が著しく減少していることをキャピラリー電気泳動-質量分析 (CE-MS) による解析から明らかにしている。但し、スペルミジンの減少により模様が乱れる原因にとなった責任細胞の種類を同定できていなかった。本研究では、スペルミジンの減少が黄色素胞ではなく、黒色素胞で生じることによりゼebraフィッシュの体表模様の変化を引き起こすことを示した。

cx41.8 のホモログであるラット Cx40 のギャップジャンクションはスペルミジンやスペルミン依存的な整流性を有している⁸¹。ラット Cx40 の N 末端領域にはグルタミン酸 (E) を含む E₉XXXE₁₃ モチーフが存在する。ExxE モチーフのグルタミン酸をリシン (K) に置換したラット Cx40 E9, 13K はスペルミジンやスペルミン依存的な整流性を失うことから、ExxE モチーフがスペルミジンやスペルミンと相互作用して、ギャップジャンクションの整流性を制御すると考えられている^{80, 81}。ゼebraフィ

ツシュの Cx39.4 と Cx41.8 は N 末端領域に ExxxE モチーフを有しており、スペルミジンやスペルミンによる整流性の制御を受けることが推測されていた（図 35）。本研究では、N2a 細胞を用いたパッチクランプ法により Cx39.4 がスペルミジン依存的な整流性を持つことを示した。Cx39.4 の整流性が ExxxE モチーフにより制御されているのかについては、グルタミン酸をリシン（K）に置換した Cx39.4 E10,14K や Cx39.4 E14,18K についてパッチクランプ実験による接合部電流の測定や等温滴定型カロリメトリーによる E₁₀XXXE₁₄ あるいは E₁₄XXXE₁₈ とスペルミジンの分子間相互作用について詳細に解析する必要がある。

本研究では Cx39.4 のスペルミジン感受性を電気生理学的解析により明らかにした。一方、Cx41.8 が N2a 細胞でギャップジャンクションプラーカーを形成しなかつたため、Cx41.8 のスペルミジン感受性を直接的な方法で検証することができなかった。しかし、先行研究において、Cx41.8 にスペルミジン感受性があることを間接的に示している⁸⁸。そのため、Cx39.4 と Cx41.8 からなるヘテロメリック-ヘテロティピックギャップジャンクションもスペルミジン感受性を有していると考えられる。



図 35. ExxxE モチーフ

ゼブラフィッシュの Cx39.4 は 10、14、15、18 番目のアミノ酸がグルタミン酸になっており、E₁₀XXXE₁₄、E₁₄XXXE₁₈ の 2 つのモチーフを持つ。Cx41.8 は 12、15、16 番目のアミノ酸にグルタミン酸を有しており、E₁₂XXXE₁₆ モチーフを持つ。ラット Cx40 は 9、12、13 番目のアミノ酸にグルタミン酸を有している。

スペルミジンはコネキシンの他に、内向き整流性カリウムチャネル（Kir）ファミリーの整流性を制御する⁹¹。ゼブラフィッシュの黒色素胞には Kir7.1 が発現している。Kir7.1 は黒色素胞と黄色素胞の反発シグナルを担う体表模様形成に極めて重要な分子である。Kir7.1 のスペルミジン感受性を電気生理学的な手法を用いて解析した

研究は行われていないが、*Tg(mitfa-ssat)* WT の表現型は Kir7.1 の整流性の喪失も、体表模様が変化した原因になっていると考えられる。

哺乳類の細胞は 1—数 mM のスペルミジンを含有しているが、そのほとんどは RNA と結合している。ラットの肝細胞の遊離スペルミジンの濃度については、20 μM で、細胞内の全スペルミジン濃度の 2%程度である⁹²。これまでに哺乳類の Kir2.1 では、0.1-50 μM のスペルミジンにより外向き電流を抑制することが報告されている⁹³⁻⁹⁵。本実験では、15 mM と 30 mM のスペルミジンを用いて、Cx39.4 の整流性を示した(図 34C)。先行研究のラット Cx40 でスペルミジン感受性を示した実験も、5-15mM のスペルミジンを使用している⁸¹。ゼブラフィッシュの黒色素胞に含まれるスペルミジンの濃度を測定した研究はないため、黒色素胞の中のスペルミジン濃度は不明である。しかし、黒色素胞は Cx39.4 と Kir7.1 といったスペルミジンの制御を受ける体表模様形成に関わるタンパク質を発現していることや、スペルミジンの濃度減少により、黒色素胞にのみ顕著な影響が出る表現型を持つことから、遊離スペルミジンの濃度が他の細胞に比べて高い可能性が考えられる。もしくは、遊離スペルミジンが局所的に高濃度に存在することで Cx39.4 のギャップジャンクションや Kir7.1 に作用している可能性も考えられる。

また、スペルミジンを含むポリアミン濃度はがん細胞で高く、細胞増殖因子として機能すると考えられている⁹⁶。スペルミジンの減少は活性化 eIF5A (eIF5A Hypusination) を抑制し翻訳効率が低下する⁹⁷。これらの生理活性作用の低下も *Tg(mitfa-ssat)* WT において黒色素胞が減少した要因の一つと考えられる。

3.4.3 Cx39.4 と Cx41.8 が行う細胞集団サイズの制御について

黒色素胞特異的に *cx39.4* を発現した WKO バックグランドのゼブラフィッシュ (*Tg(mitfa-cx39.4)* WKO) は斑点模様を示した(図 19C)。一方、黒色素胞特異的に *cx41.8* を発現した WKO バックグランドのゼebrafish (zebrafish) (*Tg(mitfa-cx41.8)* WKO) では、WKO と比較すると黒色素胞がわずかに増加しただけだった(図 19D、図 20A)。先行研究にて、オーサイトクランプ実験は Cx41.8 のギャップジャンクションが Cx39.4 のギャップジャンクションに比べて強い電位依存性を示し、Cx41.8 と Cx39.4 はゲーティングの性質が異なることを明らかにした⁵⁹。このことから、(*Tg(mitfa-cx39.4)* WKO)

と (*Tg(mitfa-cx41.8)* WKO) が示す体表模様の違い、すなわち黒色素胞の集団サイズを維持する機構の違いは、黒色素胞の間に形成されるギャップジャンクションのゲーティングの性質の影響を受けている可能性がある。

黃色素胞特異的に *cx39.4* または *cx41.8* を発現した WKO バックグラウンドのゼブラフィッシュ (*Tg(aox5-cx39.4)* WKO, *Tg(aox5-cx41.8)* WKO) は、WKO と比較して、明領域の黃色素胞密度が大きくなった (図 19E, F, 図 20B)。明領域の黃色素胞密度は、黃色素胞に *cx43* を発現したゼブラフィッシュ (*Tg(aox5-cx43)* WKO) でも増加した (図 12A, B)。さらに黃色素胞が *cx39.4* と *cx41.8* の両方を発現し、かつ黒色素胞に *cx39.4* を発現したゼebraフィッシュ (*Tg(aox5-cx41.8) cx41.8^{-/-}*) は明領域の黃色素胞密度が野生型と同程度まで回復した (図 24C, 25B)。一方、黃色素胞が *cx39.4* と *cx41.8* の両方を発現し、かつ黒色素胞に *cx41.8* を発現したゼebraフィッシュ (*Tg(aox5-cx39.4) cx39.4^{-/-}*) は明領域の黃色素胞密度が *cx39.4^{-/-}* と同程度で、野生型の半分ほどだった (図 22C, 23B)。このことから、黃色素胞の密度はコネキシンの発現だけでも大きくなるが、黒色素胞に *cx39.4*、黃色素胞に *cx41.8* の発現がないと完全には回復しないことが考えられる。先行研究において、黒色素胞が分化しない *mitfa^{w2}* (*nacre*) 変異体 (図 36A)⁴⁷ の黃色素胞密度は野生型のそれと有意差がなく、黃色素胞密度は黒色素胞非依存的に制御されていることを示しており、本研究とは異なる結果となった⁹⁸。

Tg(aox5-cx41.8) cx41.8^{-/-} と *Tg(mitfa-cx39.4) cx39.4^{-/-}* は黒色素胞に *cx39.4*、黃色素胞に *cx41.8* を同時に発現しており、体表面積あたりの黒色素胞の数が著しく増加している (図 23A、図 25A)。*Tg(aox5-cx41.8) cx41.8^{-/-}* は部分的に途切れた黒ストライプや歪んだ黒ストライプを呈しているのに対し、*Tg(mitfa-cx39.4) cx39.4^{-/-}* は整ったストライプを示した (図 24C、図 22B)。このことから、黒色素胞に発現する Cx41.8 はストライプの安定性に関与することが考えられる。

黒色素胞間のみに Cx39.4 のギャップジャンクションを形成する *Tg(mitfa-cx39.4)* WKO はおよそ 15 個の黒色素胞が集合した斑点模様を示した (図 19D、図 28D)。同じく斑点模様を示した *Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx39.4)* WKO でもスポットを構成する黒色素胞の数はおよそ 15 個と変わらなかった (図 17A、図 19D)。このことから黒色素胞が細胞集団を形成するためには黒色素胞間に Cx39.4 のギャップジャンクションが形成されている必要があると考えられる。しかし、黃色素胞が分化しない *csfIra^{j4e1}* (*Panther/Pfeffer*) 変異体⁴⁸ と *cx41.8^{-/-}* からなる二重変異体 (*cx41.8^{-/-}; csfIra^{j4e1}*) は斑点

模様にならない（図 36B-D）。そのため、黒色素胞のクラスター形成には黒色素胞間の Cx39.4-Cx39.4 ギャップジャンクションに加えて、黄色素胞と黒色素胞の相互作用も必要であると考えられる。

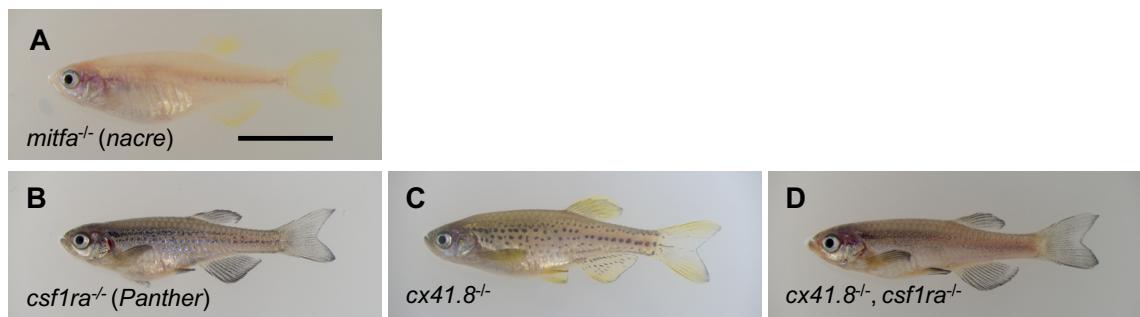


図 36. 色素細胞変異体の体表模様

(A) *mitfa* 変異体。黒色素胞が分化しない。(B) *csf1ra* 変異体。黄色素胞が分化しない。(C) *cx41.8*^{-/-}。(D) *cx41.8*; *csf1ra* 二重変異体。スケールバーは 10 mm を示す。

3.4.4 コネキシンの C 末端について

コネキシンの C 末端領域は、いくつかのタンパク質と結合することが知られている。例えば Cx43 の C 末端領域は Zo-1、v-Src、c-Src、Tubulin などと結合する。本研究では、Cx39.4^{exc256-321}EGFP を黒色素胞で発現した *cx39.4*^{-/-}バックグラウンドのゼブラフィッシュが体表模様を相補した（図 22B-D）。さらに、このコンストラクトを N2a 細胞に発現させたところ、遺伝子導入された細胞ペアのおよそ 4 割がギャップジャンクションプラタークを形成した。Cx39.4 の C 末端の 4 アミノ酸残基は PDZ ドメイン結合モチーフになっており、PDZ ドメインを持つタンパク質と結合する。先行研究は、Cx39.4 の C 末端領域がゼブラフィッシュの Zo-1a と結合することを Yeast-two-hybrid により示している⁹⁹。そのため、Cx39.4 は C 末端領域、特に末端 4 アミノ酸がギャップジャンクションの局在、維持に重要な役割を果たしていることが考えられる。哺乳類のコネキシンでは少なくとも Cx43、Cx45、Cx46、Cx50、Cx31.9、Cx36 が、Zo-1 と結合する報告がある⁶⁹。ところが、ゼブラフィッシュの黒色素胞と黄色素胞は Zo-1a を発現していない⁹⁹。本研究で行なったトランск립トーム解析の結果から、黒色素胞と黄色素胞では Zo-1b を発現していることが推測された。そのため、黒色素胞

と黃色素胞に発現する Cx39.4 は Zo-1b と結合している可能性が考えられる。

Cx41.8~~241-370~~EGFP や Cx41.8~~241-370~~RFP を N2a 細胞に発現させたところ、ギャップジャンクションプラーカーを形成した細胞対は 1%以下だった（図 31D）。しかし、Cx41.8~~241-370~~EGFP を cx41.8 プロモーターで発現した cx41.8^{-/-}バックグラウンドのゼブラフィッシュは、ストライプを示した。このことから Cx41.8 の C 末端領域は Cx41.8 のギャップジャンクション形成には必ずしも必要でないことが示唆された。しかし、cx41.8^{-/-}の黒色素胞と黃色素胞は cx39.4 を発現しており、Cx39.4 と Cx41.8 はヘテロメリックコネクソンを形成する（図 32B-D）。そのため Cx41.8~~241-370~~EGFP は Cx39.4 と複合体を形成し、ギャップジャンクションネットワークを形成することで体表模様がレスキューされた可能性がある。Cx41.8~~241-370~~EGFP が単独で体表模様形成を行うかについては、WKO を用いて体表模様を検証する必要がある。

ギャップジャンクションは 2 種類のゲーティング機構、fast gating と slow gating によりチャネルの開閉状態を制御する。fast gating とは大きな電流が流れた直後に、急速に電流を抑制する機構であり、slow gating とはチャネルの完全閉塞状態を形成するゆっくりとした遷移である。チャネルの開閉は N 末端領域が主に制御しているが、C 末端領域もチャネルの開閉を制御に関わっている。その例として、Cx43 の全長配列に EGFP を融合したタンパク質 Cx43EGFP は fast gating が失われる¹⁰⁰。このことから、EGFP タグを付加した Cx39.4 や Cx41.8 は、蛍光タンパク質を付加していない Cx39.4 や Cx41.8 とゲーティングの性質が異なる可能性が考えられる。cx41.8 変異体は恐怖様行動を示し水槽の低層を泳ぐことや、発生初期に血管新生が促進することが報告されている^{101,102}。本研究において Cx41.8~~241-370~~EGFP は体表模様を回復したが、他の異常を回復できるかは検証出来ていない。

3.4.5 黒一黃色素胞間のギャップジャンクションについて

先行研究にて黒色素胞は細胞仮足を伸長して黃色素胞に接触していることが報告されている（図 12）²¹。このことから、黒色素胞と黃色素胞間の Cx39.4-Cx41.8 のギャップジャンクションは、黒色素胞の細胞仮足の先端と黃色素胞の間に形成することが考えられる。コネキシンの可視化系統を用いて、黒色素胞の細胞仮足の先端と黃色素胞の間のギャップジャンクションを検出することは今後の課題である。

3.5 結論

本研究では、体表模様形成における黒色素胞と黄色素胞それぞれに対する Cx39.4 と Cx41.8 の機能解析を行い、黒色素胞に *cx39.4*、黄色素胞に *cx41.8* が発現するとストライプを形成することを示した。また体表模様形成において、スペルミジンは黒色素胞に必要であり、Cx39.4 はスペルミジン感受性を持つことが示された。

これらの結果を踏まえて、以下に体表模様形成に関わる色素細胞間のギャップジャンクションネットワークのモデルを提案する（図 37）。ゼブラフィッシュがストライプを形成するために必要な最小ギャップジャンクションネットワークとして、黒-黒色素胞間に Cx39.4-Cx39.4、黄-黄色素胞間に Cx41.8-Cx41.8、黒-黄色素胞の間に Cx39.4-Cx41.8 のギャップジャンクションが構築される。そして、黒-黄色素胞間に形成された Cx39.4-Cx41.8 のギャップジャンクションが、黒色素胞に含まれるスペルミジンにより、整流性を持つ。この整流性を利用して黒色素胞から黄色素胞への活性化シグナルが伝達される。このシグナルは黒-黒色素胞間に Cx39.4-Cx39.4 を介して隣接する黒色素胞に伝播する。

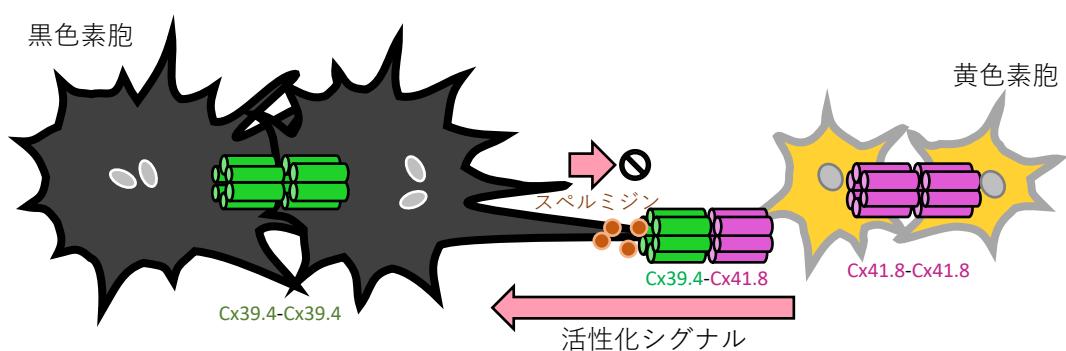


図 37. 色素細胞間のギャップジャンクションネットワークモデルとギャップジャンクションを介した黄色素胞から黒色素胞への活性化シグナルの模式図

4 今後の課題、展望

4.1 黒色素胞の多核化と体表模様形成との関係について

本研究では成体ゼブラフィッシュについて多核化した黒色素胞の割合を計測したが、今後は、体表模様形成途中における多核化黒色素胞の割合を計測し、比較検証したいと考えている。ゼブラフィッシュの体表模様形成の初期は、黃色素胞と黒色素胞が入り混じって存在している。その後、黒色領域と黃色領域の境界を形成するために、黃色素胞に隣接する黒色素胞は移動または消失（細胞死）を引き起こす。模様形成時に、黒色素胞が移動と消失のどちらの経路を選択するのか、そのトリガーは明らかになっていない。しかし、1核の黒色素胞が多核化した黒色素胞よりも細胞死を起こしやすいことから、黃色素胞に囲まれた1核の黒色素胞は速やかに消失している可能性が考えられる。そこで体表模様形成時の1核と多核黒色素胞の挙動を継時的に観察し、多核化と体表模様形成の関係性を明らかにしたい。

4.2 体表模様変異体と色素細胞の多核化の関係について

野生型の成体ゼブラフィッシュは1核黒色素胞と多核化した黒色素胞がおよそ1:1の比率で存在していた。黒色素胞の多核化については、甲状腺ホルモンの分泌が減少したゼブラフィッシュにおいて、1核黒色素胞の割合が増加することが報告されている。これ以外の変異体において、色素細胞の多核化についての解析は行なわれていない。さらに、ゼブラフィッシュの体表模様形成に関連する遺伝子ファミリーと細胞融合に関連する遺伝子ファミリーに一部重複があることや、体表模様形成に関連する遺伝子ファミリーと老化に関連する遺伝子ファミリーに重複がある。そこで、黒色素胞の核を標識することができる *mitfa-H2B-RFP*を持つトランスジェニクゼブラフィッシュを様々な体表模様変異体バックグラウンドで作製し、黒色素胞の多核化の割合を比較することにより、黒色素胞の多核化と体表模様形成における新規の接点を模索したい。

4.3 1核の黒色素胞と多核化した黒色素胞の遺伝子発現の違いについて

本研究では、1核の黒色素胞と多核化した黒色素胞の性質の違いの一端を明らかにした。これまで体表に存在する黒色素胞を均一な集団として扱ってきたが、

本研究の結果は黒色素胞がヘテロな集団であることを示唆している。このことから、1核と多核化黒色素胞の遺伝子発現の比較解析を行いたい。この解析を通して、色素細胞の核分裂あるいは細胞融合に必要な分子や、多核化した黒色素胞の細胞寿命が延長するメカニズムについて検証し、成体の野生型ゼブラフィッシュにおいて、1核と多核黒色素胞の比がおよそ1:1に別れている理由を明らかにしたい。

4.4 色素細胞間のギャップジャンクションネットワークの完全可視化

本研究では、Cx39.4とCx41.8のC末端領域に蛍光タンパク質を挿入したコンストラクトをしようして、*cx39.4*変異体あるいは*cx41.8*変異体の黒色素胞間にギャップジャンクションの形成を示すプラーカーを観察した。しかし、黒色素胞と黄色素胞の間に形成されるギャップジャンクションや、黄色素胞間に形成されるギャップジャンクション観察はしていない。そのため、色素細胞間に形成されるギャップジャンクションネットワークの完全可視化には至っていない。現在のところ、ギャップジャンクションネットワークの完全可視化が困難な理由について、黄色素胞の強い自家蛍光が挙げられる。この問題の解決するために、遠赤光を発するmPlumやmNeptune、NirFPといった長波長に蛍光極大を持つタンパク質を利用して、ギャップジャンクションの可視化コンストラクトを作製することを計画している。

4.5 ギャップジャンクションは体表模様の形成と維持のどちらに必要か

本研究では、ストライプ形成に必要な黒色素胞と黄色素胞で必要なコネキシンの発現条件を明らかにした。しかし、色素細胞間に形成されるギャップジャンクションが、体表模様の形成過程に重要なのか、それとも長期間安定して体表模様を維持するために重要なのかという点については明らかになっていない。本研究で使用した $aox5$ プロモーターを搭載したTol2ベクターはTet-offシステムを搭載している。そのため、ドキシサイクリン(Dox)の添加により、 $aox5$ プロモーターによりドライブされる標的遺伝子の発現を抑制することができる。そこでストライプ形成に必要なコネキシンの発現条件を満たす二重トランスジェニックゼブラフィッシュ $Tg(mitfa-cx39.4, aox5-cx41.8)$ WKOを用いて、体表模様形成初期、形成途中、形成後にDox処理を行い、体表模様の変化を観察する。

4.6 ギャップジャンクションを通過する物質の同定

本研究はストライプ形成に必要なコネキシンの発現条件を明らかにし、ギャップジャンクションを介して、黄色素胞から黒色素胞へ活性化シグナルを伝達するモデルを提示した。しかし、ギャップジャンクションを介して伝達される分子や活性化シグナルの実体を明らかにできていない。今後は色素細胞間に形成されるギャップジャンクションを通過する低分子化合物の同定にも挑戦したい。

4.7 コネキシンースペルミジンによる体表模様制御機構の解明

RatCx40 でスペルミジン感受性を示した先行研究において、RatCx40 の N 末端領域の ExxxE モチーフ、すなわち 9 と 13 番目のグルタミン酸 (E) をリシン (K) に置換した RatCx40 E9,13K においてスペルミジンの感受性を失っていることを示している。本研究では Cx39.4 のスペルミジン感受性があることを電気生理学的解析から明らかにした。しかし、Cx39.4 は RatCx40 と同様に N 末端領域の ExxxE モチーフがスペルミジン感受性に関わっているのかについては検証できていない。また Cx39.4 は N 末端領域に ExxxE モチーフを 2箇所有している。そこで、のグルタミン酸をリシンに置換した Cx39.4 についてパッチクランプ実験を行い、また体表模様形成への影響を観察し、Cx39.4 とスペルミジンの相互作用を厳密に証明したい。

Cx41.8 は間接的にスペルミジン感受性を有していることが先行研究において示されている。しかし、Cx41.8₂₄₁₋₃₇₀EGFP は哺乳類培養細胞 N2a や HeLa において細胞膜へ移行しなかったため、本研究ではパッチクランプ法による解析を行うことができなかった。そこで蛍光タンパク質の挿入場所を最適化し、哺乳類培養細胞で細胞膜に移行する条件を検討する必要がある。また、内向き整流性カリウムチャネル (Kir) ファミリーの整流性を制御する⁹¹。体表模様変異体 *jaguar* の原因遺伝子の Kir7.1 は黒色素胞に発現し、黒色素胞と黃色素胞の反発シグナルに関わっているが、Kir7.1 スペルミジン感受性についても直接的な証明は行われていないため、検証する必要がある。そして、今後の継続的な研究により、体表模様形成に関わるコネキシンやスペルミジンの制御機構を解明することにより、色素細胞の細胞間相互作用の分子メカニズムを詳細に記述できることが期待される。

引用文献

- 1 Turing, A. M. The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **237** (1952).
- 2 Meinhardt, H. & Gierer, A. Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *Bioessays* **22**, 753-760, doi:10.1002/1521-1878(200008)22:8<753::AID-BIES9>3.0.CO;2-Z (2000).
- 3 Meinhardt, H. & Gierer, A. Applications of a theory of biological pattern formation based on lateral inhibition. *J Cell Sci* **15**, 321-346 (1974).
- 4 Kondo, S. & Asai, R. A reaction-diffusion wave on the skin of the marine angelfish Pomacanthus. *Nature* **376**, 765-768 (1995).
- 5 Meinhardt, H. in *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* (2009).
- 6 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, doi:10.1002/dvdy.20513 (2005).
- 7 Hirata, M., Nakamura, K., Kanemaru, T., Shibata, Y. & Kondo, S. Pigment cell organization in the hypodermis of zebrafish. *Dev Dyn* **227**, 497-503, doi:10.1002/dvdy.10334 (2003).
- 8 Lewis, V. M. *et al.* Fate plasticity and reprogramming in genetically distinct populations of Danio leucophores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi:10.1073/pnas.1901021116 (2019).
- 9 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, doi:10.1111/j.1755-148X.2008.00504.x (2008).
- 10 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, doi:10.1073/pnas.0808622106 (2009).
- 11 Kondo, S. & Miura, T. Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation. *Science* **329**, 1616-1620, doi:10.1126/science.1179047 (2010).
- 12 Irion, U., Singh, A. P. & Nusslein-Volhard, C. The Developmental Genetics of Vertebrate Color Pattern Formation: Lessons from Zebrafish. *Curr Top Dev Biol* **117**, 141-169, doi:10.1016/bs.ctdb.2015.12.012 (2016).
- 13 Singh, A. P. *et al.* Pigment Cell Progenitors in Zebrafish Remain Multipotent through Metamorphosis. *Dev Cell* **38**, 316-330, doi:10.1016/j.devcel.2016.06.020 (2016).
- 14 Singh, A. P., Schach, U. & Nusslein-Volhard, C. Proliferation, dispersal and patterned aggregation of iridophores in the skin prefigure striped colouration of zebrafish. *Nat Cell Biol* **16**, 607-614, doi:10.1038/ncb2955 (2014).

- 15 Watanabe, M. *et al.* Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene. *EMBO Rep* **7**, 893-897, doi:10.1038/sj.embo.7400757 (2006).
- 16 Iwashita, M. *et al.* Pigment pattern in jaguar/obelix zebrafish is caused by a Kir7.1 mutation: implications for the regulation of melanosome movement. *PLoS Genet* **2**, e197, doi:10.1371/journal.pgen.0020197 (2006).
- 17 Irion, U. *et al.* Gap junctions composed of connexins 41.8 and 39.4 are essential for colour pattern formation in zebrafish. *eLife* **3**, e05125, doi:10.7554/eLife.05125 (2014).
- 18 Inoue, S., Kondo, S., Parichy, D. M. & Watanabe, M. Tetraspanin 3c requirement for pigment cell interactions and boundary formation in zebrafish adult pigment stripes. *Pigment Cell Melanoma Res* **27**, 190-200 (2014).
- 19 Zhang, Y. M. *et al.* Distant Insulin Signaling Regulates Vertebrate Pigmentation through the Sheddase Bace2. *Dev Cell* **45**, 580-594 e587, doi:10.1016/j.devcel.2018.04.025 (2018).
- 20 Eom, D. S. *et al.* Melanophore migration and survival during zebrafish adult pigment stripe development require the immunoglobulin superfamily adhesion molecule Igfsl1. *PLoS Genet* **8**, e1002899, doi:10.1371/journal.pgen.1002899 (2012).
- 21 Hamada, H. *et al.* Involvement of Delta/Notch signaling in zebrafish adult pigment stripe patterning. *Development* **141**, 318-324, doi:10.1242/dev.099804 (2014).
- 22 Inaba, M., Yamanaka, H. & Kondo, S. Pigment pattern formation by contact-dependent depolarization. *Science* **335**, 677, doi:10.1126/science.1212821 (2012).
- 23 Haffter, P. *et al.* Mutations affecting pigmentation and shape of the adult zebrafish. *Dev Genes Evol* **206**, 260-276, doi:10.1007/s004270050051 (1996).
- 24 Orr-Weaver, T. L. When bigger is better: the role of polyploidy in organogenesis. *Trends Genet* **31**, 307-315, doi:10.1016/j.tig.2015.03.011 (2015).
- 25 Ikenishi, A. *et al.* Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages. *Dev Growth Differ* **54**, 731-738, doi:10.1111/j.1440-169X.2012.01373.x (2012).
- 26 Senyo, S. E. *et al.* Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* **493**, 433-436, doi:10.1038/nature11682 (2013).
- 27 Boll, I. T. Origin of the early megakaryopoietic progenitor cell and further polyploidization in the thrombopoietic cell series. Phase-contrast observations of human bone marrow. *Acta Haematol* **66**, 187-194, doi:10.1159/000207118 (1981).
- 28 Klisch, K., Pfarrer, C., Schuler, G., Hoffmann, B. & Leiser, R. Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. *Anat Embryol (Berl)* **200**, 229-237 (1999).

- 29 Malone, J. D., Teitelbaum, S. L., Griffin, G. L., Senior, R. M. & Kahn, A. J. Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *J Cell Biol* **92**, 227-230, doi:10.1083/jcb.92.1.227 (1982).
- 30 Maslow, D. E. Cell specificity in the formation of multinucleated striated muscle. *Exp Cell Res* **54**, 381-390 (1969).
- 31 Dudas, J., Saile, B., El-Armouche, H., Aprigliano, I. & Ramadori, G. Endoreplication and polyploidy in primary culture of rat hepatic stellate cells. *Cell Tissue Res* **313**, 301-311, doi:10.1007/s00441-003-0768-3 (2003).
- 32 Hayashi, S. *et al.* Characterization of multinuclear hepatocytes induced in rats by mitemcinal (GM-611), an erythromycin derivative. *Toxicol Pathol* **36**, 858-865, doi:10.1177/0192623308322307 (2008).
- 33 Al-Maawi, S., Orlowska, A., Sader, R., James Kirkpatrick, C. & Ghanaati, S. In vivo cellular reactions to different biomaterials-Physiological and pathological aspects and their consequences. *Semin Immunol* **29**, 49-61, doi:10.1016/j.smim.2017.06.001 (2017).
- 34 Kondakova, E. A. & Efremov, V. I. Morphofunctional transformations of the yolk syncytial layer during zebrafish development. *J Morphol* **275**, 206-216, doi:10.1002/jmor.20209 (2014).
- 35 Leikam, C., Hufnagel, A., Schartl, M. & Meierjohann, S. Oncogene activation in melanocytes links reactive oxygen to multinucleated phenotype and senescence. *Oncogene* **27**, 7070-7082, doi:10.1038/onc.2008.323 (2008).
- 36 Leikam, C. *et al.* In vitro evidence for senescent multinucleated melanocytes as a source for tumor-initiating cells. *Cell Death Dis* **6**, e1711, doi:10.1038/cddis.2015.71 (2015).
- 37 Braig, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660-665, doi:10.1038/nature03841 (2005).
- 38 Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-730, doi:10.1038/nature03918 (2005).
- 39 Collado, M. *et al.* Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**, 642, doi:10.1038/436642a (2005).
- 40 Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720-724, doi:10.1038/nature03890 (2005).
- 41 Regneri, J. *et al.* Analysis of the putative tumor suppressor gene cdkn2ab in pigment cells and melanoma of Xiphophorus and medaka. *Pigment Cell Melanoma Res* **32**, 248-258, doi:10.1111/pcmr.12729 (2019).
- 42 Wakamatsu, Y. Establishment of a cell line from the platyfish-swordtail hybrid melanoma. *Cancer Res* **41**, 679-680 (1981).

- 43 Westerfield, M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5th Edition., (2007).
- 44 Kawakami, K., Koga, A., Hori, H. & Shima, A. Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, Oryzias latipes, in zebrafish, Danio rerio. *Gene* **225**, 17-22 (1998).
- 45 Kawakami, K., Shima, A. & Kawakami, N. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11403-11408, doi:10.1073/pnas.97.21.11403 (2000).
- 46 Kawakami, K. & Shima, A. Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish Oryzias latipes that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish Danio rerio. *Gene* **240**, 239-244 (1999).
- 47 Lister, J. A., Robertson, C. P., Lepage, T., Johnson, S. L. & Raible, D. W. nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development* **126**, 3757-3767 (1999).
- 48 Parichy, D. M., Ransom, D. G., Paw, B., Zon, L. I. & Johnson, S. L. 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 (2000).
- 49 Yamanaka, H. & Kondo, S. In vitro analysis suggests that difference in cell movement during direct interaction can generate various pigment patterns in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 1867-1872, doi:10.1073/pnas.1315416111 (2014).
- 50 Yamanaka, H. & Kondo, S. Rotating pigment cells exhibit an intrinsic chirality. *Genes Cells* **20**, 29-35, doi:10.1111/gtc.12194 (2015).
- 51 Hultman, K. A. *et al.* Defects in ErbB-dependent establishment of adult melanocyte stem cells reveal independent origins for embryonic and regeneration melanocytes. *PLoS Genet* **5**, e1000544, doi:10.1371/journal.pgen.1000544 (2009).
- 52 Dooley, C. M., Mongera, A., Walderich, B. & Nusslein-Volhard, C. On the embryonic origin of adult melanophores: the role of ErbB and Kit signalling in establishing melanophore stem cells in zebrafish. *Development* **140**, 1003-1013, doi:10.1242/dev.087007 (2013).
- 53 Saunders, L. M. *et al.* Thyroid hormone regulates distinct paths to maturation in pigment cell lineages. *eLife* **8**, doi:10.7554/eLife.45181 (2019).
- 54 Walderich, B., Singh, A. P., Mahalwar, P. & Nusslein-Volhard, C. Homotypic cell competition regulates proliferation and tiling of zebrafish pigment cells during colour pattern formation. *Nat Commun* **7**, 11462, doi:10.1038/ncomms11462 (2016).

- 55 Sawada, R., Aramaki, T. & Kondo, S. Flexibility of pigment cell behavior permits the robustness of skin pattern formation. *Genes Cells* **23**, 537-545, doi:10.1111/gtc.12596 (2018).
- 56 McMenamin, S. K. *et al.* Thyroid hormone-dependent adult pigment cell lineage and pattern in zebrafish. *Science* **345**, 1358-1361, doi:10.1126/science.1256251 (2014).
- 57 Bastida-Ruiz, D., Van Hoesen, K. & Cohen, M. The Dark Side of Cell Fusion. *Int J Mol Sci* **17**, doi:10.3390/ijms17050638 (2016).
- 58 Julich, D. *et al.* beamter/deltaC and the role of Notch ligands in the zebrafish somite segmentation, hindbrain neurogenesis and hypochord differentiation. *Dev Biol* **286**, 391-404, doi:10.1016/j.ydbio.2005.06.040 (2005).
- 59 Watanabe, M., Sawada, R., Aramaki, T., Skerrett, I. M. & Kondo, S. The Physiological Characterization of Connexin41.8 and Connexin39.4, Which Are Involved in the Striped Pattern Formation of Zebrafish. *J Biol Chem* **291**, 1053-1063, doi:10.1074/jbc.M115.673129 (2016).
- 60 Watanabe, M. & Kondo, S. Changing clothes easily: connexin41.8 regulates skin pattern variation. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**, 326-330, doi:10.1111/j.1755-148X.2012.00984.x (2012).
- 61 Maderspacher, F. & Nusslein-Volhard, C. Formation of the adult pigment pattern in zebrafish requires leopard and obelix dependent cell interactions. *Development* **130**, 3447-3457 (2003).
- 62 Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D. & Beyer, E. C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* **83**, 1359-1400, doi:10.1152/physrev.00007.2003 (2003).
- 63 Bruzzone, R., White, T. W. & Paul, D. L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* **238**, 1-27 (1996).
- 64 Kumar, N. M. & Gilula, N. B. The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-388 (1996).
- 65 Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B. & Yeager, M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* **283**, 1176-1180 (1999).
- 66 Willecke, K. *et al.* Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* **383**, 725-737, doi:10.1515/BC.2002.076 (2002).
- 67 Gonzalez, D., Gomez-Hernandez, J. M. & Barrio, L. C. Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal. *Prog Biophys Mol Biol* **94**, 66-106, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.007 (2007).
- 68 Verselis, V. K., Ginter, C. S. & Bargiello, T. A. Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature* **368**, 348-351, doi:10.1038/368348a0 (1994).

- 69 Giepmans, B. N. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* **62**,
233-245, doi:10.1016/j.cardiores.2003.12.009 (2004).
- 70 Giepmans, B. N., Verlaan, I. & Moolenaar, W. H. Connexin-43 interactions with ZO-1
and alpha- and beta-tubulin. *Cell Commun Adhes* **8**, 219-223 (2001).
- 71 Smyth, J. W. *et al.* Actin cytoskeleton rest stops regulate anterograde traffic of connexin
43 vesicles to the plasma membrane. *Circ Res* **110**, 978-989,
doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.257964 (2012).
- 72 Toyofuku, T. *et al.* Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1
in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **273**, 12725-12731 (1998).
- 73 Wang, X. G. & Peracchia, C. Positive charges of the initial C-terminus domain of Cx32
inhibit gap junction gating sensitivity to CO₂. *Biophys J* **73**, 798-806,
doi:10.1016/S0006-3495(97)78112-8 (1997).
- 74 Kosakovsky Pond, S. L., Mannino, F. V., Gravenor, M. B., Muse, S. V. & Frost, S. D.
Evolutionary model selection with a genetic algorithm: a case study using stem RNA.
Mol Biol Evol **24**, 159-170, doi:10.1093/molbev/msl144 (2007).
- 75 Eastman, S. D., Chen, T. H., Falk, M. M., Mendelson, T. C. & Iovine, M. K.
Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-
specific duplications and highly supported gene classes. *Genomics* **87**, 265-274,
doi:10.1016/j.ygeno.2005.10.005 (2006).
- 76 Laird, D. W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* **394**, 527-543,
doi:10.1042/BJ20051922 (2006).
- 77 Theis, M., Sohl, G., Eiberger, J. & Willecke, K. Emerging complexities in identity and
function of glial connexins. *Trends Neurosci* **28**, 188-195,
doi:10.1016/j.tins.2005.02.006 (2005).
- 78 Suchyna, T. M. *et al.* Different ionic selectivities for connexins 26 and 32 produce
rectifying gap junction channels. *Biophys J* **77**, 2968-2987, doi:10.1016/S0006-
3495(99)77129-8 (1999).
- 79 Lin, X., Fenn, E. & Veenstra, R. D. An amino-terminal lysine residue of rat connexin40
that is required for spermine block. *J Physiol* **570**, 251-269,
doi:10.1113/jphysiol.2005.097188 (2006).
- 80 Musa, H. *et al.* Amino terminal glutamate residues confer spermine sensitivity and affect
voltage gating and channel conductance of rat connexin40 gap junctions. *J Physiol* **557**,
863-878, doi:10.1113/jphysiol.2003.059386 (2004).
- 81 Musa, H. & Veenstra, R. D. Voltage-dependent blockade of connexin40 gap junctions by
spermine. *Biophys J* **84**, 205-219, doi:10.1016/S0006-3495(03)74843-7 (2003).

- 82 Plotkin, L. I., Laird, D. W. & Amedee, J. Role of connexins and pannexins during ontogeny, regeneration, and pathologies of bone. *BMC Cell Biol* **17 Suppl 1**, 19, doi:10.1186/s12860-016-0088-6 (2016).
- 83 Hoptak-Solga, A. D., Klein, K. A., DeRosa, A. M., White, T. W. & Iovine, M. K. Zebrafish short fin mutations in connexin43 lead to aberrant gap junctional intercellular communication. *FEBS Lett* **581**, 3297-3302, doi:10.1016/j.febslet.2007.06.030 (2007).
- 84 Misu, A. *et al.* Two Different Functions of Connexin43 Confer Two Different Bone Phenotypes in Zebrafish. *J Biol Chem* **291**, 12601-12611, doi:10.1074/jbc.M116.720110 (2016).
- 85 Mathews, J. & Levin, M. Gap junctional signaling in pattern regulation: Physiological network connectivity instructs growth and form. *Dev Neurobiol* **77**, 643-673, doi:10.1002/dneu.22405 (2017).
- 86 Levin, M. & Mercola, M. Gap junction-mediated transfer of left-right patterning signals in the early chick blastoderm is upstream of Shh asymmetry in the node. *Development* **126**, 4703-4714 (1999).
- 87 Urasaki, A., Morvan, G. & Kawakami, K. 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**, 639-649, doi:10.1534/genetics.106.060244 (2006).
- 88 Watanabe, M., Watanabe, D. & Kondo, S. Polyamine sensitivity of gap junctions is required for skin pattern formation in zebrafish. *Sci Rep* **2**, 473, doi:10.1038/srep00473 (2012).
- 89 Klebe RJ, R. F. Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J Cell Biol* **43** (1969).
- 90 Frohnhofer, H. G. *et al.* Spermidine, but not spermine, is essential for pigment pattern formation in zebrafish. *Biol Open* **5**, 736-744, doi:10.1242/bio.018721 (2016).
- 91 Hibino, H. *et al.* Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* **90**, 291-366, doi:10.1152/physrev.00021.2009 (2010).
- 92 Watanabe, S., Kusama-Eguchi, K., Kobayashi, H. & Igarashi, K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem* **266**, 20803-20809 (1991).
- 93 Ficker, E., Taglialatela, M., Wible, B. A., Henley, C. M. & Brown, A. M. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* **266**, 1068-1072 (1994).

- 94 Lopatin, A. N., Makhina, E. N. & Nichols, C. G. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **372**, 366-369, doi:10.1038/372366a0 (1994).
- 95 Igarashi, K. & Kashiwagi, K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 39-51, doi:10.1016/j.biocel.2009.07.009 (2010).
- 96 Upp, J. R., Jr. *et al.* Polyamine levels and gastrin receptors in colon cancers. *Ann Surg* **207**, 662-669, doi:10.1097/00000658-198806000-00004 (1988).
- 97 Nishimura, K., Lee, S. B., Park, J. H. & Park, M. H. Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. *Amino Acids* **42**, 703-710, doi:10.1007/s00726-011-0986-z (2012).
- 98 Mahalwar, P., Singh, A. P., Fadeev, A., Nusslein-Volhard, C. & Irion, U. Heterotypic interactions regulate cell shape and density during color pattern formation in zebrafish. *Biol Open* **5**, 1680-1690, doi:10.1242/bio.022251 (2016).
- 99 Fadeev, A., Krauss, J., Frohnhofer, H. G., Irion, U. & Nusslein-Volhard, C. Tight Junction Protein 1a regulates pigment cell organisation during zebrafish colour patterning. *eLife* **4**, doi:10.7554/eLife.06545 (2015).
- 100 Bukauskas, F. F., Bukauskiene, A., Bennett, M. V. & Verselis, V. K. Gating properties of gap junction channels assembled from connexin43 and connexin43 fused with green fluorescent protein. *Biophys J* **81**, 137-152, doi:10.1016/S0006-3495(01)75687-1 (2001).
- 101 Canzian, J., Fontana, B. D., Quadros, V. A. & Rosemberg, D. B. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. *Behav Brain Res* **320**, 255-263, doi:10.1016/j.bbr.2016.12.018 (2017).
- 102 Denis, J. F. *et al.* KLF4-Induced Connexin40 Expression Contributes to Arterial Endothelial Quiescence. *Front Physiol* **10**, 80, doi:10.3389/fphys.2019.00080 (2019).

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。研究を遂行するに当たり、近藤滋教授、渡邊正勝准教授、荒巻敏寛助教には厳しくも温かい御指導、御助言を賜りましたこと、心よりお礼申し上げます。また、研究室配属後より大変お世話になったパターン形成研究室の皆さんに厚く深謝申し上げると共に、本実験で使用したゼブラフィッシュに感謝の意を表します。

臼居 優

業績

主著論文

1. Reconstruction of minimal gap-junction network required for stripe-pattern formation in zebrafish
Yuu Usui, Toshihiro Aramaki, Shigeru Kondo, Masakatsu Watanabe.
Submitted (2019/5/24-)
Revise (2019/7/4-)

2. Melanophore multinucleation pathways in zebrafish
Yuu Usui, Shigeru Kondo S, Masakatsu Watanabe.
Development, growth and differentiation, **60**(7), pp454-459, (2018).