

研究終了報告書

「膜電位を介した細胞間相互作用による形態形成機構の解明」

研究期間:2020年11月～2024年3月

研究者:荒巻 敏寛

1. 研究のねらい

膜電位の機能については主に神経や筋で研究が進められてきたが、それ以外のあらゆる細胞においても膜電位は存在する。モデル生物での変異体解析などから、膜電位が形態形成において重要な機能を果たしている可能性が示唆されているが、そのメカニズムについてはほとんどわかっていない。その理由として、解析のために生体内で膜電位を人為的に「操作」したり、あるいは膜電位動態を「観測」することが非常に困難であるためだと考えられる。本研究ではゼブラフィッシュのヒレの形態形成をモデルに、非神経細胞の膜電位を操作・観測する技術を確立し、さらにはそれを用いて膜電位が形態を制御するメカニズムを解明することを目指している。本研究は非神経細胞における膜電位の機能解析の草分けとなり、成果は他の細胞種、他の生命現象にも波及してゆくだろう。本研究を契機に生体内の電気シグナルに対する認識が革新的に変わることを期待する。

2. 研究成果

(1) 概要

過去の研究で、骨芽細胞の膜電位とヒレ骨セグメントの長さに関連することが示されていた。そこで本研究ではまず骨芽細胞を標的として、膜電位を操作する手法の確立を試みた。神経科学研究で用いられる光応答性の陽イオンチャネル、チャネルロドプシン2 (ChR2) を骨芽細胞に導入することで、光によって膜電位を人為的に操作できるようにする。この際、 K^+ チャネル (KIR2.1) を同時に発現させることで、内在の膜電位変動を抑制し光刺激に対して鋭敏に応答させることに成功した。この手法を用いて骨芽細胞の膜電位を人為的に上昇させると、分節形成を任意に誘導することができる。また、間欠的に光刺激を与えることで骨の分節パターンを再現できることから、内在の分節パターンも膜電位の変動により制御されている可能性が示唆される。

次に、確立した膜電位操作手法を応用して分節パターンを形成するメカニズムの解明に取り組んだ。膜電位上昇に反応する遺伝子発現をシングルセル RNA シークエンシングにより解析したところ、いくつかのチャネル遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。特に *kcnq5a/ kcnq5b* (K^+ チャネル) や *cx43* (コネクシン) に関しては、チャネル機能としては分節形成に抑制的に作用するにもかかわらず、分節の誘導に伴って発現が上昇する。これらのチャネルが膜電位上昇に対するネガティブフィードバック因子として働き、膜電位の振動を生み出すことで分節パターンの形成に寄与しているのではないかと考えた。

上記の仮説を検証するため、実際に生体内で膜電位動態の観測を試みた。ゼブラフィッシュを生かしたまま長時間イメージングを行うための条件の最適化を行い、現状では30時間以上に渡って観察することが可能である。この系で骨芽細胞の膜電位動態を GCaMP6s により間接的に観測したところ、一過的にシグナルが増強し、その後減弱する様子が観察された。

これは予測される膜電位振動を反映していると考えられ、仮説を強く支持するものである。

(2) 詳細

研究者自身の過去の研究から、ゼブラフィッシュヒレ骨のセグメントの長さ(分節の間隔)が骨芽細胞の膜電位と関連していることが見出されていた。ゼブラフィッシュのヒレの再生において、ヒレ骨セグメントは迅速に形成される(1~2セグメント/日)。時間的アドバンテージから、まずはヒレの骨芽細胞をモデルに膜電位操作技術と観測技術を確立することを試みた。

(2-1) 骨芽細胞の膜電位を操作する実験系を確立する

骨芽細胞の膜電位を人為的に操作するために、神経科学の研究に用いられている光遺伝学の技術を導入することを計画した。トランスジェニック技術により、光に応答し開口する陽イオンチャンネル、チャンネルロドプシン2(ChR2)を標的細胞に発現させる。これにより *in vivo* で非侵襲的に膜電位を操作することが可能になる。予備実験で、ChR2 を骨芽細胞に発現させて光を照射することで分節形成が促進されることが示されていたが、効果が小さく解析には不十分だった。解析への実用化を目指し、本研究ではこの系に以下の3点の改良を加えた。

・骨芽細胞での発現を高める。

骨芽細胞特異的に ChR2 を発現させるために *osterix(sp7)* 遺伝子のプロモーター配列を用いている。この *osterix* プロモーター中のエンハンサー領域をタンデムに連結させることにより、特異性を保持しつつ発現量を飛躍的に高めることに成功した。

・活性の高い ChR2 バリエーションを用いる。

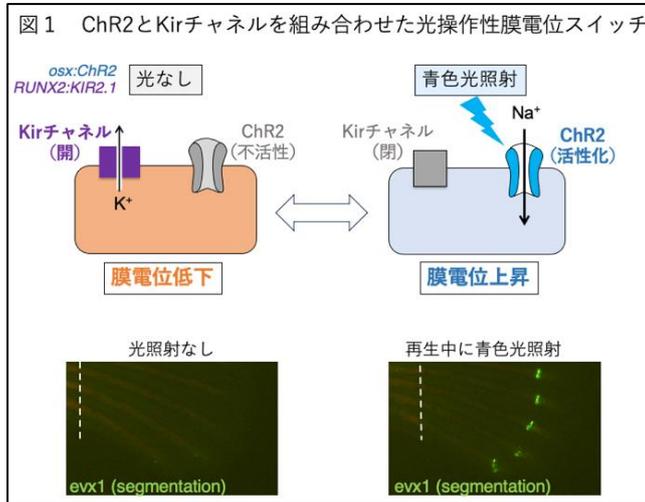
ChR2 には電流量や開口時間の異なる様々なバリエーションが報告されている。本研究では光照射に対する応答性を高めるために、特に電流量が大きく開口時間の長い ChR2 バリエーション(D156C)を用いた。

・K⁺チャンネルと組み合わせて発現させる。

人為的な膜電位操作の効果が小さい理由として、内在の膜電位状態が影響している可能性が考えられる。そこで、ChR2 と同時に K⁺チャンネルを発現させることで内在の膜電位変動を低く抑え、光刺激に対する応答性を高める方法を考案した。またこの際、電位感受性を持つ kir チャンネル(KIR2.1)を用いることで ChR2 が活性化した際には閉口し効率よく膜電位を上昇させることができるようになる。

これら3点の改良により、光照射に応答し効率的に骨の分節形成を誘導する実験手法を確立した(図1)。骨芽細胞に ChR2 と KIR2.1 両方を発現するトランスジェニックフィッシュを用いて、ヒレの再生中に光照射を行なった。光照射がない場合には分節は形成されないが、青色光照射を行なった場合にはヒレ骨の先端部に分節(*evx1* の発現)が誘導される。この結果より、ヒレ骨先端部において骨芽細胞の膜電位が上昇すると、分節への分化が誘導されることが示された。

本手法の大きな利点は、光条件を変更することで即座に刺激のオン/オフが可能であることである。ヒレ再生中のトランスジェニックフィッシュに一定間隔で光を照射すると、照射間隔、回数に対応した分節パターンが生じた(図2)。この結果は、ヒレ骨先端部の骨芽細胞の膜電位変動のみで分節パターンが形成されることを示している。



(2-2) 膜電位変動が分節パターンを形成するメカニズムを明らかにする

上で開発した手法を用いて、膜電位上昇に対する骨芽細胞の遺伝子発現の変化をシングルセル RNA シークエンシングにより解析し、膜電位によって発現が制御される遺伝子を多数同定した(図3)。この中には *evx1* や *scxa* など分節(関節)に発現することが報告されている遺伝子に加え、興味深いことに、いくつかのチャンネル遺伝子が含まれていた。このうち膜電位による分節パターン形成メカニズムを探るうえで重要だと推測されるいくつかの遺伝子に関して機能解析を行なった。

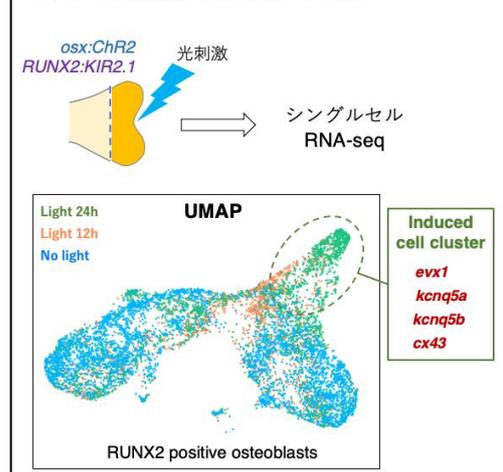
• *evx1*

evx1 は分節(関節)に発現し、分節の形成に必須であることが報告されている。本研究においても骨芽細胞の膜電位上昇に伴って発現が誘導された。*evx1* ノックアウトフィッシュでは、人為的な膜電位上昇によって *evx1* の転写活性は一時的に誘導されるものの、維持されずに消失する。つまり、分節での *evx1* の発現維持のためには転写因子としての *evx1* 自身の機能が必要であり、おそらくは自己の発現を活性化するポジティブフィードバック機構が存在することが示唆される。

• *kcnq5a/kcnq5b*

kcnq5a, *kcnq5b* はいずれも電位依存性の K^+ チャンネルをコードしている。 K^+ チャンネルは膜電位を低下させ分節形成に抑制的に作用すると考えられるが、興味深いことにこれらの遺伝子は膜電位の上昇に応答して発現が誘導される。CRISPR-Cas9 を用いて *kcnq5a/kcnq5b* 両遺伝子をノックアウトすると、骨セグメントが短縮する(分節の形成が促進される)ことが観察さ

図3 膜電位応答遺伝子の同定



れた。この結果は *kcnq5a/kcnq5b* が膜電位の上昇に対するネガティブフィードバック因子として働いていることを示している。

•*cx43*

cx43 はギャップジャンクションチャンネルを構成するコネクシンをコードする。ゼブラフィッシュでは *short-fin* 変異体の原因遺伝子として報告されており、機能低下によりヒレ骨セグメントの短縮を引き起こすことが報告されている。本研究でコネクシン機能と骨セグメントの長さとの関係性を詳細に調べたところ、コネクシンの機能が低いほど骨セグメントの長さ(分節の間隔)が長くなることが判明した。メカニズムに関しては不明な点が多いが、*cx43* が分節形成を抑制する因子であることが確かめられた。

上記の解析結果をまとめ、右図に示すようなモデルを考案した(図4)。転写因子 *evx1* は膜電位の上昇に応答して発現が誘導されると、自己の発現を活性化する「局所的な」ポジティブフィードバックにより分節細胞での発現が固定される。一方、*kcnq5a/kcnq5b* も膜電位上昇によって発現が誘導されるが、 K^+ チャネルの膜電位低下作用によりネガティブフィードバックとして働くことで、骨芽細胞の膜電位の振動を生み出す。またその際、*cx43* が細胞同士を電気的に連結することで細胞集団内での周期を同調させていると想定する。

(2-3) 分節形成における膜電位の動態を観測する

上記の仮説(図4)を検証するためには、実際に骨芽細胞の膜電位を計測する必要がある。膜電位は生きた細胞にしか存在しないこと、また生体内組織での動態を対象としていることからライブイメージングによる観測が適していると考えた。ヒレの再生時、分節形成の間隔は20-24時間程度であることが観察されており、それを踏まえて24時間以上連続した観測を目標にイメージング系の最適化を行なった。成体ゼブラフィッシュの動きをほぼ完全に抑制しつつ長時間の観測を可能にする実験条件の検討には非常に難航したが、現状では30時間以上の連続観察が可能となった。この条件にて、再生中のヒレでの骨芽細胞の電気的活動を *GCaMP6s* により間接的に観測したところ、ヒレ骨先端部でシグナルが一時的に上昇したのち、低下する様子が観察された(図5)。これは仮説におけるヒレ骨先端部での膜電位の振動を反映したものであると考えている。今後も引き続きイメージング条件を改良し観測時間の更なる延長を試みるとともに、より高感度の Ca^{2+} プローブや、膜電位プローブなどを用いて観察を重ねていく予定である。

図4 Positive/Negative feedbackによる分節パターン形成モデル

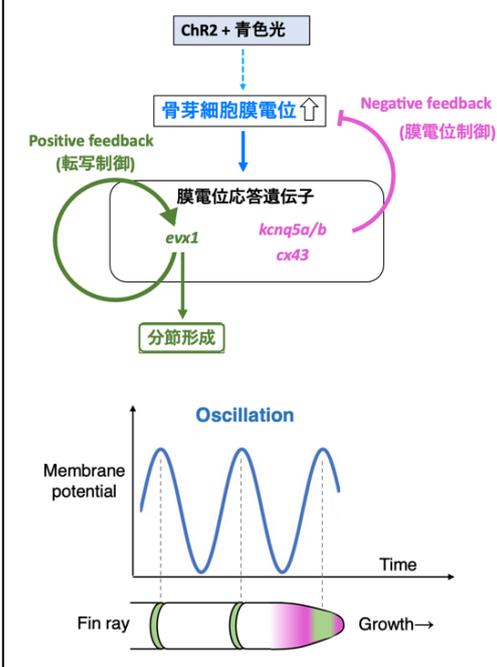
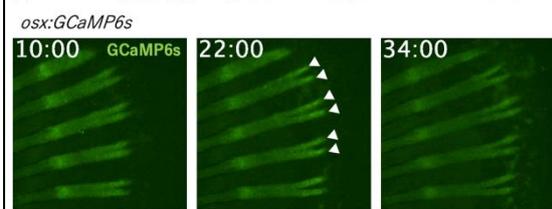


図5 ヒレ骨先端部で見られる一過性のGCaMPシグナル



3. 今後の展開

本研究の成果により、膜電位による骨の分節パターンニング機構の全容が徐々に明らかになりつつある。しかしながら非常に新規性の高い内容であるため、本成果が科学界に受け入れられるためには更なる検証が必要である。第一に、骨芽細胞における実際の膜電位動態を明確に検出する必要があり、ライブイメージングによる膜電位の直接検出を目指して現在も実験系の改良に努めている。第二に、膜電位変化が遺伝子発現を制御するメカニズムを明らかにする必要がある。本研究で確立した膜電位の操作手法は非常に効果的であるが、外来のチャンネル分子によって構成されているためアーティファクトの可能性が否定しきれない。作用機序が明らかになれば、膜電位による遺伝子発現制御機構の存在証明となるとともに、本手法が実験系として信用に足るものであることの保証となるだろう。

本研究成果が社会的に実装される見込みが高いのは再生医療分野だと推測する。膜電位上昇による分節(関節)への分化誘導機構が哺乳類でも保存されているならば、イオンチャンネルを標的とする薬剤などを用いて膜電位を操作することで骨芽細胞などから関節の細胞を作り出すことも可能だろう。高齢化が進み、関節に問題を抱える人の数は益々増加すると予想されるが、*in vivo*あるいは *in vitro* で人工的に関節の細胞を誘導できるようになれば障害の治療に大いに役立つことが期待される。しかし、この治療法の実現のためにはまずマウス等の哺乳類モデル生物でゼブラフィッシュ同様のメカニズムが保存されていることを確かめる必要があり、その上で治療法の安全性が確認されなければならない。実際にヒトでの治療に用いられるのは早くても数年から10年ほど先になるだろうと予測する。

4. 自己評価

<研究目的の達成状況、研究の進め方>

目的とする「膜電位による骨の分節パターンニング機構の解明」に関しては、70%ほどは達成できたと考える。効率的な膜電位操作法を確立し、それを用いて分節のパターン形成メカニズムの解明にかなり迫ることができた。一方で膜電位動態の観測については、長時間でのライブイメージング実験系の確立に予想以上に難航した。現状の系においても、サンプルの状態の維持に問題があるなど本格的な解析に用いるには不十分な点も残されている。より長時間にわたる観測、より感度の高い観測を目指して今後も系の改良が必要である。

<研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果>

本研究で確立した膜電位操作手法は、遺伝子導入が可能であれば他の生物種、細胞においても容易に使用可能である。本手法が様々な生物種、細胞で広く利用されれば膜電位が関与する生命現象が次々と解明されるだろう。本研究の成果は、生物における電氣的活動に対する理解と認識を革新的に変える契機になると期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数： 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表： 5件

1. Toshihiro Aramaki

Bioelectrical signal regulates the segmentation pattern of zebrafish fin bones
The 29th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2023)

2. Toshihiro Aramaki

Bioelectrical signal regulates the segmentation pattern of zebrafish fin bones
The 56th Annual Meeting of JSDB (2023)

3. 荒巻 敏寛

魚類ヒレ骨の分節パターンを制御する生体電気シグナル
第 45 回 日本分子生物学会年会 (2022)

4. Toshihiro Aramaki

Bioelectrical size regulation of bones and appendages in zebrafish
The 28th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2022)

5. Toshihiro Aramaki

Bioelectrical size regulation of bones and appendages in zebrafish
The 54th Annual Meeting of JSDB (2021)