

## ゼブラフィッシュで細胞の社会性を理解する

別所 康全

## はじめに

多細胞生物のからだは、受精卵から生物種固有のかたちを作り出される。このことは、生物のかたちは遺伝情報に依存して作り出されることを示している。遺伝情報はゲノムDNAに蓄えられており、すべての細胞が同じゲノムDNAを持っている。いふならば遺伝情報は多細胞生物のからだの“設計図”であり、細胞はからだの“材料”でありながら、設計図に基づいてかたち作りを行う主体でもある。つまり、細胞は外部の環境情報と内部の遺伝情報に基づいて自律的に行動し、細胞同士が協調して生物個体としてのからだを作り出していると考えられる。この巧妙なしくみ、すなわち細胞の社会性は是非とも解き明かしたい深遠な謎であると思う。

## ゼブラフィッシュは優秀なモデル生物

20世紀半ばに、遺伝情報はゲノムDNAの中に、遺伝子として存在することが明らかになって以来、遺伝子を理解しようとする研究が盛んに行われた。その一つがショウジョウバエを用いた突然変異体の大規模スクリーニングであり、1980年代に大成功をおさめた<sup>1)</sup>。化学薬品などでショウジョウバエの生殖細胞のDNA（つまり遺伝子）に変異を誘発し、形態異常を示す個体を同定して、形態異常の原因となる遺伝子を突き止める手法である。1990年代には2匹目のドジョウ?を期待して、ゼブラフィッシュをモデル系として、突然変異体の大規模スクリーニングが行われた<sup>2,3)</sup>。結果的に、この研究により大きな成果をもたらされた。多くのゼブラフィッシュの遺伝子、特に発生過程を制御する遺伝子の機能が明らかになったが、それだけではなく、数多くの変異体ゼブラフィッシュ系統が樹立され、それらをツールとすることでゼブラフィッシュのモデル生物としての利便性が圧倒的に向上した。そのために1990年代後半以降、ゼブラフィッシュはポピュラーなモデル生物の一つとなった。

ゼブラフィッシュにはモデル生物としてのさまざまな利点がある。一つめはサイズについてである。からだの

サイズがほどほどに小さいので、小さい飼育スペースでも飼育が可能である。成魚は体長2-3 cm程度であり(図1)、これより大きいと水槽も大きくなるだろうし、これよりも小さいと扱いがむずかしいだろう。成魚のシマ模様は私には横ジマに思えるのだが縦ジマが正しいらしい(頭尾方向が縦という定義)。また、受精卵は1 mm程度で、肉眼でも十分に見える大きさであり、かつ発生過程では大きくならず、そのままの大きさで発生が進む(図2)。顕微鏡観察に適したサイズである。

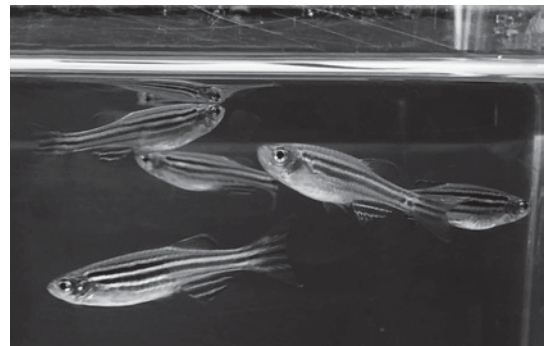


図1. ゼブラフィッシュ成魚、通常2-3 cmだが、1日3回給餌し、よく食べるので油断すると際限なく大きくなる。

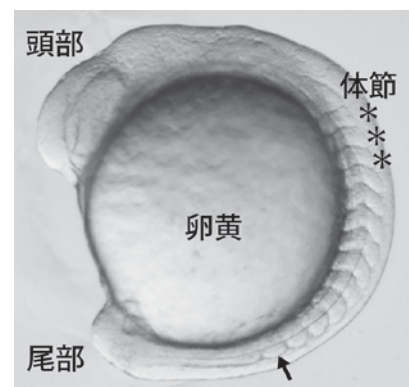


図2. 受精後16時間のゼブラフィッシュ胚を左側方から見た図。受精卵とほぼ同じ大きさである。頭部では大きな眼が形成されつつある。図の右側には形成されつつある体節がならんでいる。体節は頭側から形成される。最初の三つの体節をアスタリスクで示している。この胚では13個の体節が形成されているが、もっとも新しく形成された13番目の体節を矢印で示す。30分後にはこの体節の尾側(図では左側)に次の体節が形成される。

二つめは時間的観点について、受精後48時間で魚のかたちになるので、発生過程全体をライブイメージングで観察することも可能である。性成熟には2-3か月を要するので、ライフサイクルはマウスと大差はない。ただ、性成熟に約1年かかるアフリカツメガエルに比べると十分に短く、遺伝学が可能なライフサイクルの長さであるといえる。三つめは、遺伝学のツールが整備されていることである。前述の突然変異体の大規模スクリーニングで、多数樹立された変異体系統が利用できる。また、モルフォリノオリゴという分解されにくいオリゴヌクレオチドを受精卵に注入すると、特定の遺伝子の発現を阻害することができる。また、Tol2トランスポゾンを利用して、効率的に外来遺伝子を個体に導入してトランスジェニックフィッシュを作る方法も確立されている<sup>4)</sup>。ES細胞が存在しないために、特定の遺伝子を破壊すること、つまりノックアウトができないことが唯一の欠点であったが、CRISPR/Cas9システムの出現でノックアウトフィッシュを作ることができるようになったので、遺伝学的ツールは万全の体制になった。

4つめの利点にあげたいのは、ヒトとの類似性である。生物学者は、究極的にはヒト、すなわち自分自身のしくみを知りたいと思っている。またヒトのからだのことが理解できれば、病気のこともわかるだろうし、薬や治療の開発につながる。ショウジョウバエやゼブラフィッシュの大規模スクリーニングや遺伝学を中心とする研究から、ショウジョウバエからヒトまで、類似の遺伝子が使われることがわかってきた。たとえば幹細胞を神経細胞に分化させる遺伝子、分化を抑制する遺伝子は、それぞれショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウス、ヒトでほぼ共通している。特にせきつい動物内では、遺伝子ネットワークはよく保存されている。また、ゼブラフィッシュは神経系、血管系、消化器系、骨格や筋肉など、ヒトが持つ臓器・器官をほぼすべて持っており、それぞれは基本的に同じ構造だがずっと単純なので、モデルとしてはまことに結構なように思われる。しかし、ヒトの生命のしくみや疾患を知るためのモデルとしてすべての場合で適切とはいえないと思う。たとえば、ゼブラフィッシュの心臓の一部をハサミで切り取ると完全に再生することが知られている<sup>5)</sup>。だからといってゼブラフィッシュはヒト心臓再生のモデルであるというのは、抵抗がある(そうは言っても、研究費の申請書には私自身もそのように書きます)。当然のことながら、モデル系を適切に選ぶことは重要だと思う。

最後にあげる利点は、観察しやすいことである。前述の縦ジマがあらわれるまで胚は透明で、からだの内部ま

で観察することができる。たとえば、発生後期には血管の中を流れる赤血球が観察できるほどである。マウス胚の組織を顕微鏡で観察しても、多数の細胞が密集し積み重なっているので、染色を行わないかぎり、一つひとつの細胞を観察することはむずかしい。一方ゼブラフィッシュ胚では、それぞれの器官・組織を構成する細胞の数がたいへん少ないために、細胞一つのレベルまで容易に観察できる。そのうえ、GFPなどの蛍光タンパク質を特定の細胞に発現させれば、生きたままで特定の細胞を容易に同定し、動きを追跡することができる。また、胎生のマウス胚よりも卵生のゼブラフィッシュ胚は観察が容易である。さらにニワトリ胚は、鶏卵に窓を開けて上から観察することができるが、ゼブラフィッシュ胚は球状なので、寒天などで卵の方向を工夫すればどの方向からでも観察できる。すなわち、ゼブラフィッシュはライブイメージングにおあつらえむけの、すばらしいモデル生物なのである。

### 細胞の社会性を明らかにする

細胞は周囲環境から得た情報を遺伝情報に照らし合わせて、自律的に行動し、細胞同士が協調して個体としてのからだを作り出す。多くの場合、全体を指揮する“リーダー細胞”は存在しないと考えられている。つまり、一つの細胞はどのような細胞に分化するか、どこに移動するか、どの細胞とグループを作るかなどのふるまいを自身が判断し、全体として調和され、しかも再現性が保たれた組織、器官、臓器、さらに個体としてのかたちを作り出される。細胞を社員に、個体を会社に例えるなら、それぞれの社員は状況を見ながら、どういう役割を果たす社員になるか、どこに部署で働くか、誰とグループを組むかを自らの価値観で決め、会社全体としては滞りなく業務が進行しているということになる。それぞれの社員がよほど思慮深いか、またはしくみ自体がすばしいか、ともかく、ほとんど奇跡のようなことが発生過程では起こっている。

つまり、細胞は社会的にふるまい、個体内では細胞の社会性に依存して自律的に発生が進むととらえられる。その全貌を明らかにするためには、一つひとつの細胞の動きを追跡し、他の細胞との相互作用や細胞の集団行動を記録し、ダイナミクスを明らかにすることが必要だと考えられる。その目的において、細胞の観察が容易で、特定の細胞を標識できるゼブラフィッシュは最適のモデル生物である。また、MAPキナーゼやカルシウムなどの細胞内シグナル活性をモニターできるプローブタンパク質が開発されているので、それらを発現させて、特定



の細胞のシグナル活性動態のライブイメージングを行うこともできる<sup>6,7)</sup>。もちろん、細胞分裂、細胞死も観察でき、さらに分化マーカーを使えば細胞分化もリアルタイムに追うことができる。これらを組み合わせ、移動だけではなく、包括的な細胞の“ふるまい”を定量的に記述することが可能である。定量データを利用すれば、数理モデルの構築ができるので、注目する生命現象のロジックの一端を明らかにできると考えている。

### 体節のサイズが決まるふしぎ

せきつい動物であるゼブラフィッシュは、マウスやヒトと同じように背骨や肋骨があり、頭尾軸に沿った美しい繰り返し構造を示している。この繰り返し構造は、発生中期の体節とよばれる一過的な構造物に由来している。体節は均等な大きさの細胞の集まりである。胚の頭側から一定時間（ゼブラフィッシュは30分、マウスは2時間）ごとに、正中の両側に一对の体節が形成され、均等な大きさの細胞塊である体節が整列するので、これが繰り返し構造のプレパターンになる<sup>8)</sup>。つまり、美しい繰り返し構造は、体節の均等な大きさに依存している。

一对の体節が形成される時間は、胚が内在している分節時計によって規定されており、時間的な周期性が空間的周期性に変換されるために、均等な大きさの体節が形成される。詳しく述べないが、分節時計の分子メカニズムはすでに、我々を含むいくつかの研究グループの研究によって明らかにされている<sup>9)</sup>。つまり、体節の大きさは分節時計の周期に依存して決められるのだが、そう単純ではないことが最近わかってきた。この理論では、分節時計を止めると体節は形成されないはずだが、実際には、ふぞろいで左右非対称な体節が形成される。体節の大きさを計測すると、極端に大きな体節や、極端に小さな体節は見られず、大きさはある範囲におさまっているように見える。ようするに、体節になるべき細胞は自律的に集まって体節になるが、集まる細胞の数はだいたい決まっているということらしい。

人間社会でも、それぞれのメンバーが心地よいグループサイズがあるのではないだろうか。たとえば、仲良し中学生のグループは、3人か多くても5人ぐらいかもしれないが、2人ではつまらないし、かといって6人だとめんどくさい。6人グループが何かのきっかけで3人+3人にわかれたときに、元の6人に戻ろうというモチベーションがなければそのまま3人ずつになると想像する。また、職場では働きやすいサイズ、あるいは話し合いやすいサイズがあると思われる。サイズは先生や社長に指示されるのではなく、それぞれのメンバーが心地よいと

感じるサイズに自然と収束していくように思われるが、このことは、それぞれの細胞が環境要因（つまり心地よさ）によって、自律的にふるまいを決めるという多細胞生物の基本的なしくみに酷似していると考えている。

ふしぎに思えることは、体節を構成するそれぞれの細胞は、その体節にどれだけの細胞が含まれるかは知る術もない（と思われる）が、それを決めているのは細胞自身に他ならないということである。ゼブラフィッシュの体節一つに含まれる細胞数は300個程度と見積もっているが、マウスの体節はその数十倍の細胞を含んでいる。300個程度の細胞数であれば、それぞれの細胞のふるまいやシグナル活性動態をライブイメージングで定量化することは十分に可能であり、必要であれば300個全部を追跡することも可能と思われる。ゼブラフィッシュの体節をモデル系として使えば、一定数の細胞がグループを作るロジックを明らかにできるのではないだろうか。

### 側線器官の発生過程のふしぎ

魚は、ヒトにはない側線器官という水流を感知する感覚器を持っている。側線器官は音の感覚器である内耳に似た構造をしており、感覚毛を持つ有毛細胞が水流の刺激を細胞の電位変化に変換して、中枢神経に情報を伝えている。側線器官はゼブラフィッシュの体表に多数存在し、特に頭部に多いのだが、からだの側面にならんでいる側線器官はダイナミックな発生様式をとるのでモデル系として興味深い。一群の側線器官の原基は頭部にあり、そこから前駆細胞が一つのかたまりとなって尾側に向かって遊走する<sup>10)</sup>。このような細胞移動はコレクティブマイグレーションとよばれ、発生過程の興味深い現象の一つと認識されている。

前駆細胞の集団は尾側に移動していく過程で、ところどころで前駆細胞の集団の中から約30個の細胞を置き去りにし、置き去りにされた細胞群は定着して一つの側線器官を形成する(図3)。置き去りにする細胞の数はほぼ決まっており、また位置も個体間であまり差がない。人間社会で例えるならば、満員の路線バスがバス停で10人の乗客を降ろし、次のバス停でも10人と、バス停ごとに10人ずつの乗客を降ろすようなイメージである。この中にはさまざまな問題が含まれている。行動を共にする10人というサイズはどのように決まるのだろうか？また、例え話ではバス停としているが、ゼブラフィッシュ胚には側線器官の発生前には、バス停にあたる目印は存在しない。前駆細胞の集団は距離を測っているのだろうか、それとも時間を計っているのだろうか？さまざまな謎があり、想像をかきたてられる。私自身は、人間

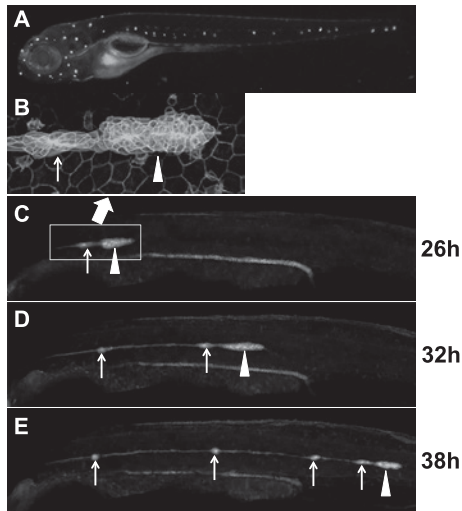


図3. A:受精後5日胚. 側線器官が白色の点として見えている. 頭部に多く, 尾側では直線上に側線器官がならんでいる. B: Cの四角で囲った部位の拡大図. 側線器官の前駆細胞の集団(矢頭)は右方向に移動しているが, 一番後ろの一部の細胞(矢印)が置き去りにされつつある. 置き去りにされた細胞群はこの位置で一つの側線器官に分化する. C: 受精後26時間胚. D: 受精後32時間胚. 前駆細胞の集団(矢頭)は右に移動を続け, 二つの側線器官(矢印)ができつつある. E: 受精後38時間胚. 前駆細胞の集団(矢頭)はさらに右に移動し, 四つの側線器官(矢印)ができつつある.

社会の例え話が, 発生メカニズムのヒントになると考えている. 前述のように, 細胞も人間も周囲から情報を得て自分で判断するという点では同じだからである. 細胞の気持ちがわかるようになりたい.

側線器官の有毛細胞は特異的に転写因子 *Atoh1* を発現するので, *Atoh1* プロモーター制御下でGFPを発現させれば, 側線器官が光るゼブラフィッシュ胚ができる. これを使えば, 側線器官の形成過程をはじめから終わりまでライブイメージングできる. 前駆細胞集団から一定細胞数が置き去りにされて一つの側線器官が形成される様子も観察することができる. さらにシグナル活性動態を観察する, 細胞接着分子の発現をモニターする, レー

ザー照射で前駆細胞の一部を死滅させて取り除く, ほかの胚のほかの場所から細胞をとってきて移植するなど, あの手この手で攻めていけば, 側線器官形成過程での細胞の社会的ふるまいとそのロジックが解明されることだろう.

### おわりに

生物のすべての遺伝情報はゲノムに含まれているが, それにしてはゲノムが解読された現在でもわからないことが多すぎる. 発生過程のような動的な現象では, 必要な遺伝子はわかってきたが, それ以上のロジックはさっぱりわからない. それは, 細胞がゲノム情報によって行動し, その細胞が集まって多細胞生物を構成しているという多重構造が存在しているからだと思われる. 謎を解き明かす第一歩は, 一つひとつの細胞のふるまいをよく観察し, 細胞の社会性を理解することだと思う. そのツールとしてゼブラフィッシュは最適のモデル生物である. 観察すればするほど, 不思議なこと, おもしろいことはどんどん見つかるが, すべてを明らかにできるはずもなく, どれにフォーカスするかを決めることが自分自身の課題かも知れない.

### 文 献

- 1) Wieschaus, E. and Nüsslein-Volhard, C.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **32**, 1 (2016).
- 2) Haffter, P. *et al.*: *Development*, **123**, 1 (1996).
- 3) Driever, W. *et al.*: *Development*, **123**, 37 (1996).
- 4) Kawakami, K.: *Dev. Dyn.*, **234**, 244 (2005).
- 5) Poss, K. D. *et al.*: *Science*, **298**, 2188 (2002).
- 6) Nakai, J. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 137 (2001).
- 7) Mochizuki, N. *et al.*: *Nature*, **411**, 1065 (2001).
- 8) Pourqie, O.: *J. Anat.*, **199**, 169 (2001).
- 9) Bessho, Y. *et al.*: *Genes Dev.*, **17**, 1451 (2003).
- 10) Ma, E. Y. and Raible, D. W.: *Curr. Biol.*, **19**, R381 (2009).