

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700428

研究課題名（和文） 熱ショックプロモーターによる筋分化調節因子の強制発現と再生分化誘導

研究課題名（英文） Overexpression of myogenic regulatory factors driven by heat shock promoters in medaka and its developmental study.

研究代表者

清水 厚志 (SHIMIZU ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30327655

研究成果の概要（和文）：FOP は筋肉や腱、靭帯、関節等が骨化する遺伝病である。本研究では FOP の原因遺伝子である ACVR1 や骨形成因子の BMP4 を任意の時期、組織、細胞で強制発現させることのできるトランスジェニックメダカの作製と性状解析を試みた。内在性熱ショックタンパク質のプロモーターを利用したダブルトランスジェニックメダカ（hsp70b::Cre x DES::lGIBMP4）では熱ショック未処理の個体でも FOP 様の表現型を示した。そこで、申請者が開発したデュアルプロモーター発現ベクターと人工熱ショックプロモーターを組み合わせたと、熱ショック時のみに Cre を発現するトランスジェニックメダカを作製できた。

研究成果の概要（英文）：Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a genetic disorder of dysregulated cellular differentiation which causes fibrous tissue (including muscle, tendon, and ligament) to be ossified when damaged. The mutations were identified in the activin A receptor, type I (ACVR1), a BMP type-1 receptor. This study was purposed to establish the transgenic medaka fish that can induce overexpression of the ACVR1 or BMP4 gene by heat-shock in any target time points, tissues and cells. I established heat-shock inducible Cre recombinase expressing transgenic medaka fish (hsp70b::Cre) using endogenous hsp70 promoter and Cre inducible myogenic cells specific ACVR1 expressing transgenic fish (DES::lGIBMP4). However, both of heat-shock treated and non-treated double transgenic medaka fishes (hsp70b::Cre and DES::lGIBMP4) exhibited FOP like phenotypes, which mean endogenous hsp70 promoter was expressed continuously at a low level without heat induction. Then I combined the dual promoter expressing system and artificial heat-shock promoter and established heat-inducible double transgenic medaka fish (8xHSE::Cre x DES::lGIACVR1).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：受容体、細胞内シグナル伝達、再生分化、ACVR1、ALK2、FOP、熱ショックプロモーター、メダカ

1. 研究開始当初の背景

筋肉は負荷や外傷により損傷を受けた際

に、速やかに再生する能力をもつ組織である。筋損傷から再生のステップにおいては、まず

筋線維と基底膜の間に局在する前駆細胞である筋衛星細胞が、筋損傷のシグナルにより活性化した転写因子群の適切な誘導により増殖分化して筋芽細胞となる。筋芽細胞は自らが分化した筋管細胞、または既存の筋線維と細胞融合することによって成熟筋線維を形成し、筋損傷を修復する。

進行性骨化性線維異形成症 (FOP) は 200 万人に 1 人の割合で見つかる稀な疾患であり、筋肉や腱、靭帯、関節等が骨化する常染色体優性の遺伝病である。乳児期から学童期に最初の骨化が見られ、骨化が進行することにより動作が不自由になり運動障害を生じる。また、外科的治療は外傷部に新たな骨化を引き起こす要因となり、検査のためのバイオプシーや非根治治療ですら極めて困難である。そのため、発症の分子生物学的機構を詳細に調べることが FOP の治療につながる唯一の方法である。

2006 年 4 月に FOP の原因遺伝子が細胞増殖因子 BMP Type I receptor の 1 種である ACVR1 (Activin Receptor Type IA) であることが判明し、患者において ACVR1 の 617 番目の塩基の G から A への変異による 206 番目のアミノ酸のアルギニンからヒスチジンへの置換が発症原因である事が突き止められた (*Nature Genet.*, 38:525, 2006)。以前より隣接する 207 番目のアミノ酸置換 (Gln207Asp) により ACVR1 が恒常的に活性化することが知られており、この活性化型変異体を発現するウィルスを用いたニワトリの肢芽に感染させると、関節部の融合や骨の過形成がみられることが知られていた (*J. Bone Miner. Res.*, 18:1593 2003)。さらに、筋衛星細胞由来と考えられる C2C12 細胞で ACVR1 活性化型変異体を強制発現させ、BMP4 に曝露させると、骨分化マーカーである ALP 活性が上昇することが報告された (*J. Biol. Chem.*, 284:7149 2009)。

また、Cre recombinase (Cre) で組換えする事により CAG プロモーター下で ACVR1 活性化型変異体を発現するトランスジェニックマウスが FOP 様の症状を示す事が明らかとなり (*Nat Med.*, 14:1363 2008)、FOP モデル生物の有用性が示された。

2. 研究の目的

先行研究 (科学研究費若手研究 (B) 平成 17, 18 年度) においてヒト ACVR1 活性化型変異

体を強制発現する発現コンストラクトを構築し、メダカ胚にインジェクションしたところ筋組織に異常を示したがトランスジェニックラインを作製することができなかった。

そこで、Cre-loxP と熱ショックプロモーターを組み合わせる事により、目的の時期、組織あるいは細胞で ACVR1 を強制発現させることのできる FOP モデルメダカを作製する。

3. 研究の方法

(1) メダカ内在性熱ショック (hsp) プロモーターをクローニングし、性状解析する。

(2) hsp プロモーター下流に Cre を連結し、熱ショックで組換えを誘導できるトランスジェニックメダカラインを作製する。

(3) 筋前駆細胞で発現する遺伝子のプロモーターをクローニングする。

(4) Cre-loxP により筋前駆細胞での GFP の発現が ACVR1 活性化型変異体 (ACVR1^{CA}) に切り替わるトランスジェニックメダカラインを作製する。

(5) 上記 2 種のトランスジェニックメダカラインを掛け合わせる事で熱ショックにより、任意の時期、組織、細胞で ACVR1^{CA} の発現を誘導できるダブルトランスジェニックラインを構築し、性状解析する。

4. 研究成果

(1) Dual promoter expression システムの構築

インジェクションした個体 (F0) に対象遺伝子が導入されたか判断するために GFP などの蛍光タンパク質がレポーター遺伝子として用いられる。しかし、hsp プロモーターのように特定の時期でしか発現の確認ができない場合がある。そこで申請者はスクリーニングを容易にするため、異なった 2 種類のプロモーターを同一コンストラクト上に持つデュアルプロモーター発現コンストラクトを構築した。

(2) hsp プロモーターのクローニング

全ゲノム in silico 解析により 3 種のメダカ内在性 hsp を同定した。うち 1 つは hsc70.1 と同定できたため、残る 2 つのプロモーター

をクローニングし、2種のデュアルプロモータートランスジェニックメダカ(HBA0::BFP x hsp70a::mCherry、HBA0::BFP x hsp70b::mCherry)ラインを作製した。hsp70aラインは熱誘導前にもわずかに発現が確認された。一方、hsp70bラインでは熱ショック前(28)ではマーカーである血球の青色蛍光のみ確認され、熱ショック後(28)のみCreの赤色蛍光が確認された。



図1：熱誘導前(左)と熱誘導後(右)

(3) 筋前駆細胞発現プロモーターのクローニング

申請者は筋前駆細胞での活性型 ACVR1 の発現が骨細胞への異常な分化誘導を引き起こし、結果として FOP を発症すると考えた。そこで、筋前駆細胞で発現するデスミンのプロモーター領域をクローニングし、Cre 非存在下では GFP を、組換え後には GFP が消失するトランスジェニックメダカ(DES::IGI)ラインを作製した。成熟筋細胞で Cre を発現するトランスジェニックメダカ(myf2::mCherryCre)ラインを作製し、掛け合わせたところ、筋前駆細胞でのみ緑色蛍光を呈すダブルトランスジェニックメダカを得る事ができた。

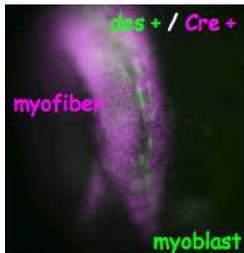


図2：筋前駆細胞での GFP の発現

(4) FOP モデルメダカの作製

Cre 組換え後に強力な骨形成因子である BMP4 を筋前駆細胞で発現するトランスジェニックメダカラインを作製し、hsp70b::Cre ラインと掛け合わせる事で、熱ショック後に BMP4 を発現する FOP モデルメダカの作製を試みた。しかし、熱ショック未処理の個体においても形成異常が確認され、hsp70b ラインの非熱ショック時での微量な Cre のリークが考

えられた。



図3：hsp70b Cre x DES::IGI BMP4 ダブルトランスジェニックメダカ

そこで、ゼブラフィッシュ内在性 hsp70 4 プロモーターをクローニングし、Cre トランスジェニックラインを作製したが、同様な結果であった。

(5) 人工熱ショック Cre メダカの作製

これらの結果から内在性 hsp プロモーターでは Cre の組換えを熱ショックで完全に制御するのは不可能と判断し、人工 hsp プロモーター発現コンストラクト(*Dev Biol.*, 271:416 2004)を開発者の Dr. Thomas Czerny から提供を受け、人工 hsp プロモーター制御下で Cre を発現するための発現コンストラクトを構築した。このコンストラクトを loxP-TagBFP-loxP-GFP トランスジェニックメダカラインにインジェクションし、蛍光を観察したところ、熱ショック処理胚でのみ BFP の青色蛍光から GFP の緑色蛍光への発現変換が観察された。

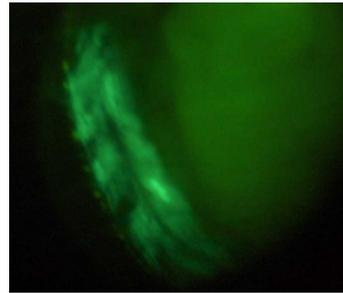


図4：人工 hspCre の確認

そこで、人工熱ショックデュアルトランスジェニックメダカ(Cry::BFP x 8xHSE::Cre)ラインを作製した。作製した Cry::BFP x 8xHSE::Cre ラインと京都大学木下博士から供与を受けた全身で dsRed を発現し、Cre 組換え後に GFP を発現するトランスジェニックメダカ(TG861)と掛け合わせ、熱ショックにより蛍光が変換するメダカラインを作製

した。



図5：熱ショックによる蛍光変換ライン

(6) 次世代シーケンサーによる発現解析
筋前駆細胞で GFP を発現する
DES::IGIACVR1 ラインと ACVR1 を発現する
hsp70b::Cre x DES::IGIACVR1 ダブルトランス
ジェニックラインの骨格筋から RNA を抽出し、
次世代シーケンサーによる RNA-seq を
行った。その結果およそ 400 個の発現変動遺
伝子を抽出する事ができた。

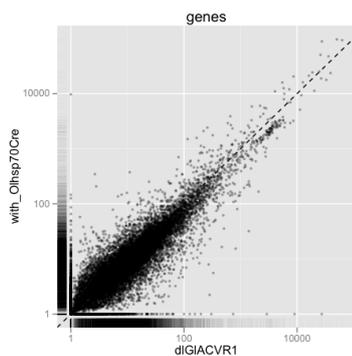


図6：RNA-seqによる発現変動遺伝子の同定

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

Moriyama Y, Kawanishi T, Nakamura R, Tsukahara T, Sumiyama K, Suster ML, Kawakami K, Toyoda A, Fujiyama A, Yasuoka Y, Nagao Y, Sawatari E, Shimizu A, Wakamatsu Y, Hibi M, Taira M, Okabe M, Naruse K, Hashimoto H, Shimada A and Takeda H. The Medaka *zic1/zic4* Mutant Provides Molecular Insights into Teleost Caudal Fin Evolution. *Curr Biol.* 22:601-607 (2012) 査読有
Miyamoto T, Porazinski S, Wang H, Borovina A, Ciruna B, Shimizu A, Kajii T, Kikuchi A, Furutani-Seiki M, and Matsuura S. Insufficiency of BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, causes

impaired ciliogenesis in vertebrates. *Human Molecular Genetics.* 20:2058-2070 (2011) 査読有

清水 厚志; 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析、臨床検査、55:841-846 (2011) 査読無

Hosono K, Noda S, Shimizu A, Nakanishi N, Ohtsubo M, Shimizu N and Minoshima S. YPEL5 protein of the YPEL gene family is involved in the cell cycle progression by interacting with two distinct proteins RanBPM and RanBP10. *Genomics.* 96:102-111. (2010) 査読有

清水 厚志、亀井 保博、清水 信義; メダカを用いたヒト疾患モデル、比較内分泌学、36(139) 286-292 (2010) 査読無
貴田 亨、石川 智子、清水 厚志、亀井 保博、殿山 泰弘、藤堂 剛、三輪 正直、清水 信義; TILLING法による遺伝子変異メダカの作製、比較内分泌学、36(137) 154-158 (2010) 査読無

亀井 保博、清水 厚志、清水 信義; メダカ変異体を使った個体レベルのゲノム研究の展望、比較内分泌学、36(136) 66-68 (2010) 査読無

〔学会発表〕(計1件)

Shimizu, A. and Shimizu, N: Medaka Model for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. The American Society of Human Genetics 60th Annual Meeting, Nov 3, 2010, Washington DC, USA.

〔その他〕

ホームページ等

作製したトランスジェニックラインは「NBRPメダカ」に順次寄託している。

<http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 厚志 (SHIMIZU ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30327655