

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570077

研究課題名(和文)色素細胞のサブタイプを生み出す分化制御機構の解明

研究課題名(英文)Study on the mechanisms regulating fate specification of pigment cell subtypes

## 研究代表者

橋本 寿史 (Hashimoto, Hisashi)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・助教

研究者番号：30359757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経冠幹細胞の派生物である色素細胞は、メダカでは4種類(黒色および黄色、白色、虹色)存在する。これらは全て共通の幹細胞である色素芽細胞を経て発生する。色素芽細胞における運命決定は細胞の運命選択の分子メカニズムを研究する好適なモデルである。

黄色素胞の欠損と白色素胞の過形成を示すメダカsox5変異体と、黄色素胞と白色素胞の両方が欠損するpax7a変異体を材料に、発生遺伝学的な解析をおこなった。

メダカの色素芽細胞から黄色および白色素胞の系譜では、pax7aを発現する黄白共通前駆細胞のうちsox5を発現する細胞は黄色素胞へ、sox5を発現しない細胞は白色素胞への運命をたどることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The neural crest-derived pigment cells are comprised of four different cell types in medaka. All of these pigment cells develop from the intermediate stem cells chromatoblasts. Fate specification in chromatoblasts is a suitable model to study the mechanisms of fate choice within a multipotent stem cell.

In this study, we conducted a developmental and genetic approach using medaka sox5 mutant, characterized by excessive formation of leucophores (white pigment cell) and absence of xanthophores (yellow pigment cell) as well as pax7a mutant, exhibiting defective formation of leucophores and xanthophores.

Our study suggests that the fate to xanthophores and leucophores requires pax7a within chromatoblasts and that the common progenitors of xanthophore and leucophore positive for pax7a are specified to xanthophores when expressing sox5 and to leucophores when not expressing sox5.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：細胞運命決定

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の多様な体色は、生存戦略や個体間コミュニケーションの手段の一つである。体色の表現方法は種によって様々であるが、なかでも色素細胞が担う役割は大きい。哺乳類の皮膚に存在する色素細胞は黒色素細胞の一種のみであるが、魚類には6種類の色素細胞の存在が確認されており、メダカは黒色、白色、虹色および黄色素胞の4種類の色素細胞を持つ。

色素細胞は神経冠幹細胞の派生物の一つで、すべての色素細胞種を作る中間的な幹細胞である色素芽細胞を経て発生する。メダカにおいては、色素芽細胞から4種類の色素細胞が分化するため、この過程で4通りの選択肢から運命を決定する仕組みがあると想像される。したがって、幹細胞の運命決定のメカニズムを研究するにあたって、メダカの神経冠幹細胞はほ乳類のそれにはない優れた特徴を持ったモデルであると言える。また、体色に異常を示すメダカ突然変異体は色素細胞の運命決定の仕組みを分子レベルで理解するための好適な材料となり得る。

メダカ ml-3 (many leucophores-3) 変異体は白色素胞の過形成と黄色素胞の欠損を示す。本研究の開始当初までに、我々のグループは、ml-3 変異体の原因遺伝子が *sox5* であることを見出していた。また、共同研究者である成瀬清らの研究によって、白色素胞と黄色素胞の両方を欠損するメダカ変異体 lf-2 (leucophore free-2) の原因遺伝子が *pax7a* であることが明らかになっていた。

## 2. 研究の目的

メダカにおける色素細胞の発生は、神経冠幹細胞から色素芽細胞を経て4種類の色素細胞を作る運命選択をとともなう。上記のように、これまでの研究結果から、黄色素胞と白色素胞は細胞系譜において近縁な関係にあることが想像される。つまり、色素芽細胞の一部が黄色素胞あるいは白色素胞に分化する前に、そのどちらにも分化しうる（どちらかにしか分化しない）黄白共通前駆細胞になる可能性がある。メダカ ml-3 変異体および lf-2 変異体の原因遺伝子 *sox5* および *pax7a* はこの過程で運命選択にかかわっていると考えられる。

色素細胞に限らず、生物の様々な器官では、近縁の細胞種が発生する過程でどの系譜をたどるかの運命選択は主として遺伝的にコントロールされている。このような運命決定の分子メカニズムの理解を目指して、本研究では、メダカの色素細胞、特に黄色素胞と白色素胞、の細胞運命決定において、*sox5* と *pax7a* が果たす役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 変異体の表現型解析

胚の体幹部の色素細胞を計数し、黒色素胞、

黄色素胞、白色素胞、虹色素胞それぞれにつき、ml-3 変異体と野生型で比較した。

### 2) 遺伝子マーカーによる発現解析

胚における各種遺伝子の発現は、通常のホールマウントインサイチュハイブリダイゼーション法によって調べた。二つの遺伝子を同時に染色する際（二重染色）には、チラミドを利用した蛍光法を用いた。

### 3) 移植実験

ドナーおよびレシピエントには、ともに胚を使用した。ドナー胚には、白色素胞と黄色素胞が GFP を発現する組換え体 Tg(*slc2a15b*:GFP) を用い、ドナー由来の白色素胞と黄色素胞を判別した。

### 4) *sox5* の過剰発現

組換えメダカ Tg(*hsp promoter*:*sox5*-2A-*venus*) を用いて、熱ショックを与えることで *sox5* の発現を人為的に誘導した。*hsp promoter* は、*hsp70.1* のプロモーター領域約 3kb か、*heat shock element* を人工合成して8個連結した 8xHSE を開発者から譲り受けた。

## 4. 研究成果

1) 成熟（着色）した色素細胞を計数したところ、ml-3 ホモ接合体胚では、黒色素胞と虹色素胞の発生に異常は見られなかったが、白色素胞は2-3倍に増加し、黄色素胞は完全に欠損していた。また、ml-3 ヘテロ接合体胚は、野生型と ml-3 ホモ接合体胚の中間的な値を示した。これらのことから、*sox5* は量依存的に、黄色素胞の形成を促進し、白色素胞の形成を抑制していると考えられた。

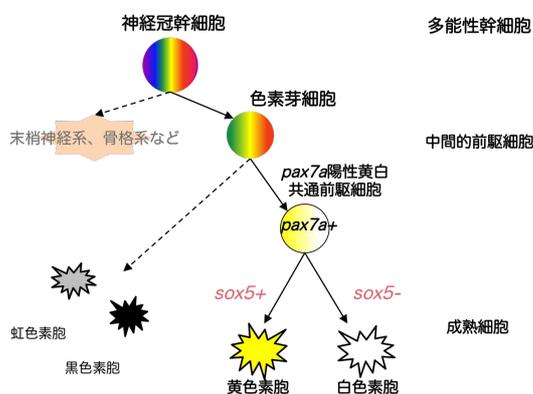
2) メダカ胚において GTP cyclohydrolase 1 (*gch*) は黄色素胞と白色素胞に特異的に発現する遺伝子マーカーであるが、これらの前駆細胞は異なる遊走経路をとるため、染色陽性細胞はその位置によって黄色素胞と白色素胞のいずれの前駆細胞であるかを判別することができる。*sox5* と *gch* の二重染色によって、*sox5* は一部の *gch* 陽性細胞に発現しており、その分布位置から、*sox5* の発現は黄色素胞前駆細胞特異的であることが分かった。

一方、*pax7a* は黄色素胞と白色素胞の両方の前駆細胞で発現していた。

3) 野生型ドナー細胞を ml-3 レシピエント胚に移植したところ、体表の一部で黄色素胞が形成された。これらの黄色素胞はすべて GFP 陽性の野生型由来であった。反対に、ml-3 ドナー細胞を野生型胚に移植した場合には、GFP 陽性の黄色素胞は全く形成されなかった。これらの結果から、*sox5* は黄色素胞系譜の細胞で細胞自律的に機能することが明らかとなった。

4) 上記の結果から、sox5 は、1) pax7a 陽性の黄白共通前駆細胞の一部に発現し、2) 細胞自律的に、3) 黄色素胞への運命を促進し、白色素胞への運命を抑制する、機能を持つと想像された。そこで、sox5 を過剰に発現させた胚で、黄色素胞が過形成され、白色素胞が形成不全になるか確かめるため、組換えメダカ Tg(hsp promoter:sox5-2A-venus) を作製し、熱ショックにより sox5 を人為的に発現誘導できる実験系を構築した。既報の熱ショックプロモーター (hsp promoter) 2 種類を用いてそれぞれ組換えメダカを樹立した。しかしながら、いずれのプロモーターによっても、熱ショックで sox5 の発現誘導はみられるものの、色素細胞における表現型は観察されなかった。

これまでに、神経冠由来の細胞においては熱ショックプロモーターが機能しないことを示唆する報告がなされており、今回の実験でも色素芽細胞で sox5 が過剰発現されなかった可能性が考えられる。今後、先述の仮説を検証するためには、神経冠における過剰発現を再検討する必要がある。



以上の結果から、sox5 は色素細胞の発生系譜で細胞運命の選択を担っていると考えられる。Sox5 は Sry-related transcription factor の一つであるが、DNA 結合ドメインを持つものの、転写活性化ドメインあるいは抑制ドメインを持たないという特徴がある。したがって、一般的に、Sox5 の機能発現には、他の転写因子との相互作用が必須であるとされている。例えば、軟骨細胞の発生には、Sox5 は Sox9 と協調して働くとの報告がある。マウスの黒色素細胞の発生には、Sox5 は Sox10 と競合的に働くとの知見がある。今後は、メダカの色素細胞の発生において、Sox5 と相互作用する転写因子、特に SoxE (Sox9 や Sox10 など) を見つけ、その相互作用が 4 種類の色素細胞種を産み出す役割を調べることが課題となる。Sox ファミリー遺伝子は多くの幹細胞・前駆細胞に発現しており、本研究は将来、色素細胞の分化メカニズムを明らかにするのみならず、器官発生全般に通じる発生分化の普遍的な原理を導くと期待できる。

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 4 件)

Goda M, Kelsh RN, Hashimoto H. Taking striping up a notch. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 27, 688-689 (2014). DOI: 10.1111/pcmr.12288

Kimura T, Nagao Y, Hashimoto H, Yamamoto-Shiraishi Y, Yabe T, Takada S, Kinoshita M, Kuroiwa A, Naruse K. Positional cloning of three leucophore mutants indicates a close relation of leucophore and xanthophore in medaka. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111, 7343-7348 (2014). DOI: 10.1073/pnas.1311254111

Nagao Y, Suzuki T, Shimizu A, Kimura T, Seki R, Adachi T, Inoue C, Omae Y, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Wakamatsu Y, Kelsh RN, Hibi M, Hashimoto H. Sox5 functions as a fate switch in medaka pigment cell development. *PLoS genetics*, 10(4), e1004246 (2014). DOI: 10.1371/journal.pgen.1004246

Kottler VA, Koch I, Flötenmeyer M, Hashimoto H, Weigel D, Dreyer C. Multiple pigment cell types contribute to the black, blue, and orange ornaments of male guppies (*Poecilia reticulata*). *PLoS ONE*, 9(1), e85647 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0085647

[学会発表](計 16 件)

Nagao Y, Takada H, Seki R, Kamei Y, Hara I, Kimura T, Taniguchi Y, Naruse K, Kelsh RN, Hibi M, Hashimoto H. Roles of sox10 and its genetic interaction with sox5 in pigment cell development. 第 20 回小型魚類研究会、2014.9.20-21、東京

Nagao Y, Adachi T, Shimizu A, Seki R, Inoue C, Kamei Y, Hara I, Kimura T, Taniguchi Y, Naruse K, Kelsh RN, Wakamatsu Y, Hibi M, Hashimoto H. Sox5 controls a fate choice during pigment cell development in medaka. 第 47 回日本発生生物学会年会、2014.5.27-30、名古屋

Hashimoto H. Sox5 functions as a fate switch in medaka pigment cell development. 2<sup>nd</sup> Strategical Meeting for Medaka Research. 2014.4.10-12., Seville, Spain.

橋本寿史 色素細胞をモデルとした細胞運命決定機構の解析 . 基礎生物学研究

所重点共同利用研究シンポジウム「メダカを使った解析パイプライン～ヒト疾患モデルとしてのメダカ：コンディショナルKOなどを使った多面的解析系の確立～」. 2014.3.8、岡崎

長尾勇佑、橋本寿史 メダカ色素細胞分化における Sox5 の役割 . 第 8 4 回日本動物学会年会、第 9 回色素細胞シンポジウム「お魚大会」. 2013.9.26-28、岡山  
Nagao Y, Adachi T, Shimizu A, Seki R, Inoue C, Kamei Y, Hara I, Kimura T, Taniguchi Y, Naruse K, Kelsh RN, Wakamatsu Y, Hibi M, Hashimoto H. Sox5 is involved in fate specification of pigment cells in medaka. 第 1 9 回小型魚類研究会、2013.9.20-21、仙台  
長尾勇佑、足立朋子、清水厚志、関良子、井上慎子、亀井保博、原郁代、木村哲晃、谷口善仁、成瀬清、ロバート・ケルシュ、若松佑子、日比正彦、橋本寿史 メダカ色素細胞分化における Sox5 の役割 . 第 4 6 回日本発生生物学会年会、2013.5.28-31、島根

長尾勇佑、足立朋子、清水厚志、関良子、井上慎子、亀井保博、原郁代、木村哲晃、谷口善仁、成瀬清、ロバート・ケルシュ、若松佑子、日比正彦、橋本寿史 メダカ Sox5 は色素細胞の運命決定に参与する . 第 3 5 回日本分子生物学会年会、2012.12.11-14、福岡

Nagao Y, Adachi T, Shimizu A, Seki R, Inoue C, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Kelsh RN, Wakamatsu Y, Hibi M, Hashimoto H. Sox5 is involved in fate specification of pigment cells in medaka. 第 1 8 回小型魚類研究会、2012.9.22-23、京都

Adachi T, Nagao Y, Chau V, Hibi M, Kelsh RN, Hashimoto H. Sox5 regulates the development of neural crest-derived pigment cells in medaka and zebrafish. The 17th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research. 2012.9.11-13., Geneva, Switzerland.

Nagao Y, Adachi T, Shimizu A, Seki R, Inoue C, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Kelsh RN, Wakamatsu Y, Hibi M, Hashimoto H. Sox5 is involved in fate specification of pigment cell in medaka. 10th International Conference on Zebrafish Development and Genetics. 2012.6., Madison, WI USA.

Nagao Y, Adachi T, Shimizu A, Seki R, Inoue C, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Kelsh RN, Wakamatsu Y, Hibi M, Hashimoto H. Sox5 is involved in fate specification of pigment cells in medaka. 第 4 5 回日本発生生物学

会・第 6 4 回日本細胞生物学会合同大会、2012.5.28-31、神戸

Adachi T, Nagao Y, Chau V, Hibi M, Kelsh RN, Hashimoto H. Sox5 controls pigment cell development from the neural crest. British Society for Developmental Biology, British Society for Cell Biology and Japanese Society of Developmental Biologists Joint Spring Meeting. 2012.4.15-18., Warwick, UK.

Nagao Y, Adachi T, Shimizu A, Seki R, Inoue C, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Kelsh RN, Wakamatsu Y, Hibi M, Hashimoto H. Sox5 is involved in fate specification of pigment cell in medaka. 第 3 4 回日本分子生物学会年会、2011.12.13-16、横浜

長尾勇佑、足立朋子、清水厚志、関良子、井上慎子、亀井保博、原郁代、谷口善仁、成瀬清、ロバート・ケルシュ、若松佑子、日比正彦、橋本寿史 白色素細胞を異所的に過形成するメダカ変異体 ml-3 . 第 8 2 回日本動物学会、2011.9、旭川

Nagao Y, Adachi T, Shimizu A, Seki R, Inoue C, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Kelsh RN, Wakamatsu Y, Hibi M, Hashimoto H. Roles of a Sox5 gene sox5 and its genetic interaction with Sox5 genes in pigment cell development. 第 1 7 回小型魚類研究会、2011.9、三島

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

橋本 寿史 (HASHIMOTO, Hisashi)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・助教  
研究者番号：3 0 3 5 9 7 5 7

### (3)連携研究者

木下 政人 (KINOSHITA, Masato)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：6 0 2 6 3 1 2 5

亀井 保博 (KAMEI, Yasuhiro)  
基礎生物学研究所・生物機能解析センター・特任准教授  
研究者番号：7 0 3 7 2 5 6 3