

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570251

研究課題名(和文) Wntシグナルを介したフロアプレートによる脊椎分節機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of vertebral column segmentation by the floor plate in medaka

研究代表者

猪早 敬二 (Inohaya, Keiji)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：70302958

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)：fu-2は脊椎骨が融合し、脊椎の分節性が失われる自然発生突然変異体である。fu-2の原因遺伝子を同定するためにポジショナルクローニングを行ったところ、fu-2の原因遺伝子は染色体23番の末端に位置しており、メダカゲノムデータベース上に存在しない未知の領域で在ることが判明した。この未知の領域には、Wntシグナル経路に關する遺伝子が2種類あることが分かったが、原因遺伝子の同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The fu-2 is a spontaneous and recessive medaka mutant, which exhibits fused centra and the absence of the intervertebral ligaments. As a result of positional cloning analysis, the fu-2 locus was mapped to chromosome23, but it was not identified in the medaka ensemble database. This result indicates that the fu-2 locus is locating on unknown region of chromosomal end. Finally, two candidate genes for the fu-2 phenotype, which relate to the Wnt signaling pathway, were found in this unknown region.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生・分化 メダカ 骨形成 脊椎発生 分節性 Wnt

1. 研究開始当初の背景

自然発生突然変異体である fused centrum (通称: ダルマメダカ) は脊椎融合の表現型を示す。この変異体における脊椎発生様式を詳細に解析したところ、椎体形成期で既に椎体同士との融合が認められ、椎間板領域の発生に異常が生じていることが分かった。また、ダルマメダカにおいて硬節の発生を調べたところ、予定椎間板領域において、硬節細胞が骨芽細胞へと早期に分化していることが明らかとなった。ポジショナルクローニングおよびレスキュー実験の結果、原因遺伝子は Wnt ファミリーに属する遺伝子、wnt4b であることが明かとなった。wnt4b は胚発生の初期にフロアプレート(底板)で発現する。これらの結果は、メダカ脊椎の分節性の獲得・維持には、フロアプレートでの Wnt ファミリー遺伝子の発現が必須であり、従来知られているフロアプレートの役割(神経管の分化、神経軸索の走向性)に加え、新たな機能の存在を証明するものである。

一方、fu-2 もまた、脊椎骨が融合し、脊椎の分節性が失われる自然発生突然変異体であり、fsc 変異体と全く同様の表現型を示す。興味深いことに、fsc および fu-2 は相補性検定の結果、異なる原因遺伝子を持つ突然変異体であることが分かった。また wnt4b 遺伝子は fu-2 変異体においてフロアプレートで正常に発現していることから、fu-2 の原因遺伝子は wnt4b シグナルの下流に位置する遺伝子であることが強く予想される。

2. 研究の目的

本研究では、fsc 変異体と全く同様の表現型を示す突然変異体 fu-2 の解析を行い、その原因遺伝子を同定することで、新たに発見された脊椎発生を制御する Wnt シグナル分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

ポジショナルクローニングを行い、原因遺伝子を同定する。具体的な方法は以下の通りである。

突然変異体(南日本系メダカ)とは遺伝的に離れた HNI 系統(北日本系メダカ)と交配し、さらにその子孫を南日本系メダカの突然変異体と戻し交配する。

M - marker (各染色体のマーカー)を用いてメダカ染色体地図への変異のマッピングを行う。

突然変異体遺伝座近傍の多型マーカーを検出する。

複数の DNA マーカーを用いて突然変異

との間の組み替え頻度を調べることにより、突然変異の位置を正確に決定する。

既にマッピングされている遺伝子と突然変異の位置の比較から、原因となり得る候補遺伝子の検索を行う。

ポジショナルクローニングにより原因候補遺伝子を絞り込む。

野生型と変異体のゲノムを比較することで変異部位を明らかにし、原因候補遺伝子を特定する。

モルフォリノオリゴを用いて原因遺伝子をノックダウンし、fu-2 の表現型をコピーできるか否かを調べる。

原因遺伝子の mRNA もしくはゲノム DNA を変異体に注入し、レスキュー実験を行う。

原因遺伝子の発現解析を行い、wnt4b のターゲットとなる細胞・組織を特定する。

fu-2 の原因遺伝子で fsc 変異体の表現型がレスキューできるか否かを確認する。

4. 研究成果

fu-2 は脊椎骨が融合し、脊椎の分節性が失われる変異体であり、fsc 変異体と全く同様の表現型を示す。fsc 変異体の原因遺伝子は wnt4b であり、フロアプレートでのその発現が消失することにより、脊椎の分節性に異常をきたす。興味深いことに、fsc および fu-2 は相補性検定の結果、異なる原因遺伝子を持つ突然変異体であることが分かった。また fu-2 において wnt4b はフロアプレートで正常に発現していることから、fu-2 の原因遺伝子は wnt4b シグナルの下流に位置する遺伝子であることが強く予想される。

ポジショナルクローニングの結果、fu-2 の原因遺伝子は染色体 2 3 番に位置していることが判明した。さらに詳細なゲノムマッピングを行った結果、原因遺伝子があると予想される領域は染色体 2 3 番の末端であり、メダカゲノムデータベース上に存在しない未知の領域であることが分かった。また、この未知の領域にマップされる複数の DNA マーカーを用いて BAC クローンライブラリーのスクリーニングを行ったところ、2 種類の BAC クローンを単離することに成功した。しかしながら、染色体 2 3 番の末端とこれらの BAC クローンは結合しておらず、染色体 2 3 番の末端構造の解明には至っていない。

上記 2 種類の BAC クローンの全塩基配列を決定して得られた情報を基に、メダカゲノムデータベースを再検索したところ、染色体 2 3 番末端部の物理地図の更新を行うことができた。更新された物理地図によると、未結

合領域は1 Mbp 以上にのぼることが明らかとなった。さらに、これらの未結合ゲノム断片に含まれる遺伝子を調べたところ、Wnt シグナル経路に関与する遺伝子が2種類存在することが分かった。これらの遺伝子は fu-2 変異体の原因遺伝子の最有力候補ではあるが、変異箇所の同定には至らなかった。

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5件)

Ito K, Morioka M, Kimura S, Tasaki M, Inohaya K, Kudo A. Differential reparative phenotypes between zebrafish and medaka after cardiac injury. *Developmental Dynamics*. 243, 1106-1115. (2014). 査読有り

Iida Y, Hibiya K, Inohaya K, Kudo A. Eda/Edar signaling guides fin ray formation with preceding osteoblast differentiation, as revealed by analyses of the medaka all-fin less mutant afl. *Developmental Dynamics*. 243, 765-777. (2014). 査読有り

Ogino Y, Hirakawa I, Inohaya K, Sumiya E, Miyagawa S, Denslow N, Yamada G, Tatarazako N, Iguchi T. Bmp7 and Lef1 are the downstream effectors of androgen signaling in androgen-induced sex characteristics development in medaka. *Endocrinology*. 155, 449-462. (2014). 査読有り

Ansai S, Inohaya K, Yoshiura Y, Schartl M, Uemura N, Takahashi R, Kinoshita M. Design, evaluation, and screening methods for efficient targeted mutagenesis with transcription activator-like effector nucleases in medaka. *Develop. Growth. Differ.* 56, 98-107. (2013). 査読有り

Shimada A, Inohaya K, Takano Y, Kudo A. Trunk exoskeleton in teleost is mesodermal in origin. *Nature Communications*. 27, 1639. (2013). 査読有り

[学会発表](計11件)

猪早敬二、高野吉郎、工藤明、Wnt シグナルを介したフロアプレートによる脊椎分節機構の解析、日本動物学会関東支部 第67回大会、2015年3月14日、早稲田大学先端生命医科学センター

畔津佑季、猪早敬二、木下政人、工藤明、

TALEN 法によるメダカ骨形成変異体の作製とその解析、日本動物学会関東支部 第67回大会、2015年3月14日、早稲田大学先端生命医科学センター

山中淳市、猪早敬二、工藤明、メダカ脊椎の分節性は体節の分節性に依存するか?、日本動物学会関東支部 第67回大会、2015年3月14日、早稲田大学先端生命医科学センター

山崎隆弘、猪早敬二、工藤明、メダカにおける脊椎骨分節機構の解析、日本動物学会関東支部 第67回大会、2015年3月14日、早稲田大学先端生命医科学センター

福島慶子、猪早敬二、工藤明、脊椎の分節パターンニングに異常を示すメダカ変異体の解析、日本分子生物学会第37回年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜

田崎舞、猪早敬二、工藤明、Raldh2により産生されるレチノイン酸(RA)はメダカの脊椎形成における骨芽細胞分化に重要である、日本動物学会第84回大会、2013年9月26日、岡山大学

富澤志帆、猪早敬二、工藤明、メダカ her7 変異体を用いた脊椎分節メカニズムの解析、日本動物学会第84回大会、2013年9月26日、岡山大学

中川悠、猪早敬二、工藤明、メダカ notch1 変異体は脊椎骨形成に異常を示す、日本動物学会第84回大会、2013年9月26日、岡山大学

田崎舞、猪早敬二、工藤明、レチノイン酸合成酵素: raldh2 はメダカの骨形成に重要である、日本動物学会第83回大会、2012年9月13日、大阪

田崎舞、猪早敬二、工藤明、脊椎骨形成に異常を示すメダカ raldh2 変異体の解析、日本動物学会第82回大会、2011年9月21日、旭川

富澤志帆、猪早敬二、工藤明、脊椎骨融合メダカ変異体 fu-4 の解析、日本動物学会第82回大会、2011年9月21日、旭川

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪早 敬二 (Keiji Inohaya)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助
教

研究者番号：70302958

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：