

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440121

研究課題名(和文)色素細胞をモデルとした細胞運命選択の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanisms controlling fate choice of pigment cells

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：動物個体内に多様な細胞種が作られる仕組みを理解するため、魚類の色素細胞発生をモデルとして種々の転写因子の細胞運命決定における作用機序を研究してきた。

本研究では、色素細胞発生への関与が示されていたSox10とSox5が相互作用する可能性を、メダカとゼブラフィッシュを材料として検証した。

Sox10は両魚種が共通に持つ3種類の色素細胞の発生に必須であり、Sox5はゼブラフィッシュではSox10の作用をわずかに阻害することが分かった。一方、メダカでSox5は黒色と虹色の発生においてSox10に阻害的であったが、黄色と白色ではSox5とSox10の作用は協調的で、黄色の形成を促進し白色の形成を抑制した。

研究成果の概要(英文)：How individual cell fates become specified from multipotent progenitors is a fundamental question in developmental biology. Pigment cells derive from a multipotent progenitor, but while in zebrafish there are three types of pigment cells (melanocytes, iridophores and xanthophores), in medaka the progenitors form four (as zebrafish, plus leucophores), raising questions about how conserved mechanisms of fate specification of each pigment cell type are in these fish. To address them, we focus on Sox5 and Sox10, which we previously showed were involved in pigment cell development in medaka and zebrafish, respectively. We show that development of all pigment cells, except leucophores, is dependent on Sox10, and that Sox5 modulates Sox10 activity antagonistically in all pigment cells in zebrafish, and melanocytes and iridophores in medaka. In medaka, Sox5 acts cooperatively with Sox10 to promote xanthophore fate and to repress leucophore fate.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：転写因子 分化制御

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。ほ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、メダカには黒、黄、虹、白色の4種類、ゼブラフィッシュには白を除く3種類がある。

色素細胞は神経堤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、メダカやゼブラフィッシュはほ乳類にはない細胞多様性を持つ優れたモデルであると言える。また、体色に異常を示す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のに適した材料となり得る。

本研究の開始当初までに、我々のグループは、メダカの色素細胞発生において、*pax7a* が黄白共通前駆細胞(黄、白のどちらにも分化できる)の分化に必須であること、*sox5* はこの共通前駆細胞から黄色への分化を促進し白色への分化を抑制することを明らかにしていた。一方、ゼブラフィッシュにおいては、*sox10* が黒、虹、黄色すべての色素細胞の運命に必須であることが報告されていた。

2. 研究の目的

幹細胞から多様な細胞種が作られる運命決定メカニズムの理解は発生生物学の興味中心である。上述のように、メダカとゼブラフィッシュでは発生する色素細胞種の数異なる。両魚種において、それぞれの細胞種を作る発生プログラムは保存されているのか、あるいは固有の仕組みがあるのか。この問いに答える糸口として、本研究では、すでに色素細胞発生への関与が知られていた *Sox5* と *Sox10* に着目し、メダカとゼブラフィッシュの各色素細胞系譜におけるこれらの転写因子の作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 変異体の作製と解析

メダカおよびゼブラフィッシュで、*sox10* (メダカでは *sox10a* と *sox10b*) *sox5* の変異体を作製あるいは入手し、さらにこれらを交配して多重変異体を作製した。新規な変異体の作製にあたっては、TILLING、TALEN あるいは CRISPR/Cas9 のいずれかの方法を用いた。

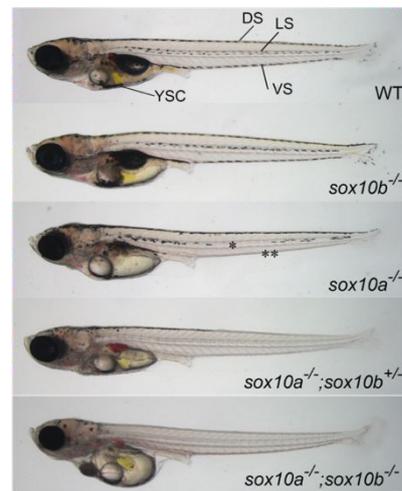
変異体の各色素細胞を、着色した細胞の計数および分化マーカー陽性(インサイチュハイブリダイゼーションによる)細胞の計数により定量した。

2) *sox5* の過剰発現

メダカ黄白共通前駆細胞における *sox5* の過剰発現には、TgBAC(*pax7a:loxp-dsred-loxp-sox5-2A-venus*)と Tg(*hsp70:cre*)を用いた。これらをかけ合わせて得たメダカ胚は、*Sox5* の過剰発現により致死となる発生初期を乗り越え、熱ショック処理によってはじめて *Sox5* を過剰発現する。本研究では、体節期に40、40分の熱ショック処理を行い、黄白色素細胞の運命決定時期における *Sox5* の働きを検討した。

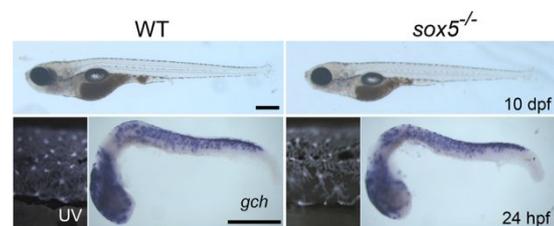
4. 研究成果

1)メダカ *sox10a;sox10b* 二重変異体は、ゼブラフィッシュ *sox10* 変異体同様、黒、虹、黄色の色素細胞をほぼ完全に欠損した。



メダカ*sox10*変異体

2)ゼブラフィッシュ *sox5* 変異体は、メダカ *sox5* 変異体とは異なり、黄色を欠損しなかった。



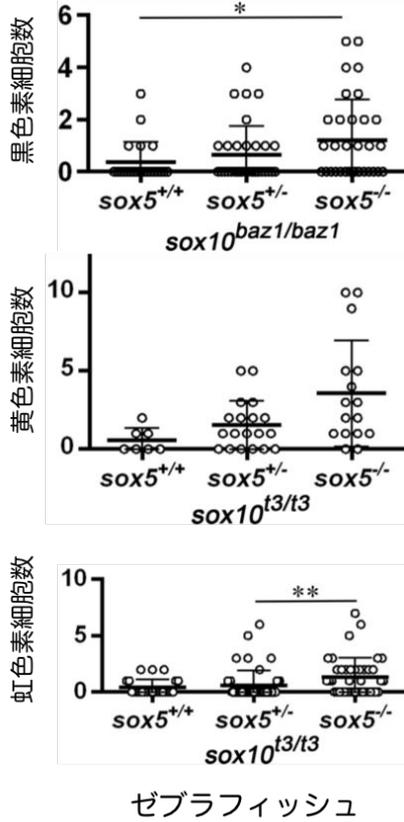
ゼブラフィッシュ*sox5*変異体

3)ゼブラフィッシュでは、*sox10* 変異体でほとんど形成されない黒および虹、黄色の色素細胞は、*sox5;sox10* 二重変異体でわずかながら回復が見られた。

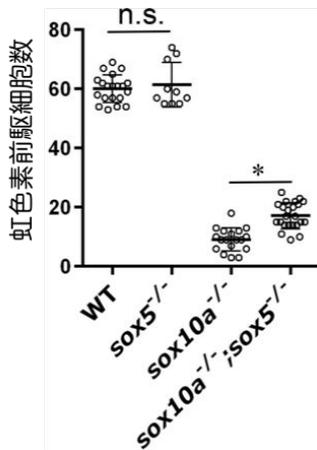
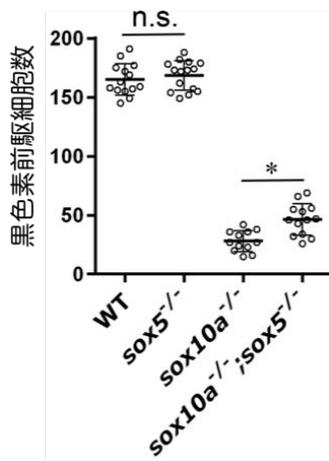
4)メダカ *sox10a* あるいは *sox10a;sox10b* 二重変異体で著しく減少した黒および虹色素細胞は、*sox10;sox5* 二重あるいは三重変異体ではレスキューされた。

5)メダカ *sox10a* (ヘテロ);*sox10b* (ホモ) 二重変異体で黄色素細胞の数が減少したが、*sox5* (ヘテロ);*sox10a* (ヘテロ);*sox10b* (ホ

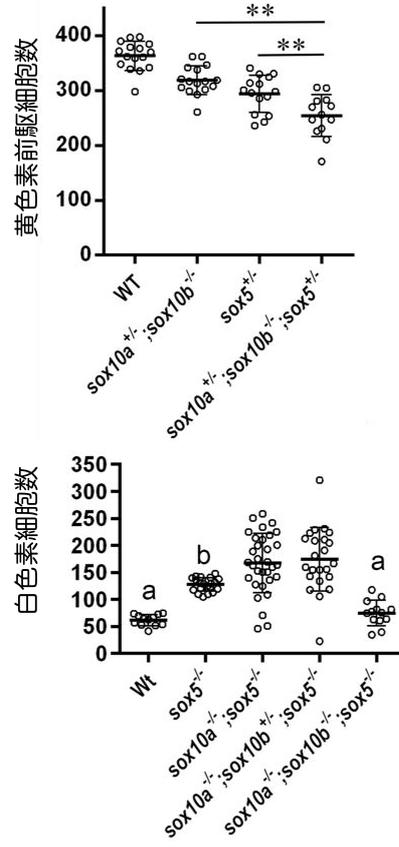
モ) 三重変異体ではさらなる減少が認められた。



ゼブラフィッシュ



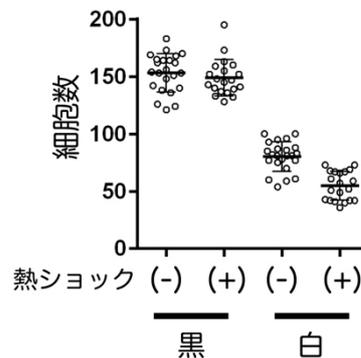
メダカ



メダカ

6) メダカ *sox10* 変異体において、白色素細胞の数は *sox10a* あるいは *sox10b* の遺伝子型によらずほぼ一定の値を示した。 *sox5* (ホモ) 変異体では、白色素細胞の数の増加が見られたが、 *sox5* (ホモ); *sox10a* (ホモ) 二重変異体および *sox5* (ホモ); *sox10a* (ホモ); *sox10b* (ヘテロ) 三重変異体では、さらなる増加が認められた。

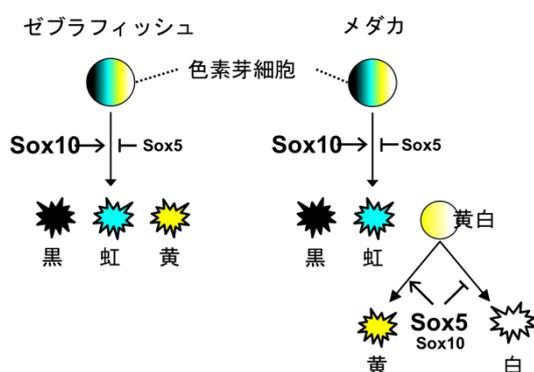
7) メダカ黄白共通前駆細胞に *sox5* を過剰発現すると、黄色の細胞数が増加し、白色は減少した。



8) 以上の結果から、Sox10 は両魚種が共通に持つ3種類の色素細胞の発生に必須であり、Sox5 はゼブラフィッシュでは Sox10 の作用をわずかに阻害することが分かった。一方、メ

ダカでは、Sox5 は黒色と虹色の発生において Sox10 に阻害的であったが、黄色と白色では Sox5 と Sox10 の作用は協調的で、黄色の形成を促進し白色の形成を抑制した。

メダカにおいて Sox5 と Sox10 は系譜によって異なる作用を示すことが明らかになった。メダカの黄・白色素胞系譜に特有の Sox の機能は、ゼブラフィッシュと異なりメダカでは黄色の前駆細胞からさらに系譜を分岐させて白色を作ることと深く関係していると想像される。色素細胞発生に中心的な役割を果たす Sox5 と Sox10 の作用を少し変更することで、メダカは新奇的な細胞種（白色）を進化的に獲得するに至ったのではないだろうか。



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)

- 1) Nagao Y, Takada H, Miyadai M, Adachi T, Seki R, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Hibi M, Kelsh RN, Hashimoto H. Distinct interactions of Sox5 and Sox10 in fate specification of pigment cells in medaka and zebrafish. *PLoS Genetics* 14(4), e1007260 (2018). 査読有
 - 2) Schartl M, Schories S, Wakamatsu Y, Nagao Y, Hashimoto H, Bertin C, Mourot B, Schmidt C, Wilhelm D, Centanin L, Guiguen Y, Herpin A. Sox5 is involved in germ-cell regulation and sex determination in medaka following co-option of nested transposable elements. *BMC Biology* 16, 16 (2018). 査読有
 - 3) Watakabe I, Hashimoto H, Kimura Y, Yokoi S, Naruse K, Higashijima S. Highly efficient generation of knock-in transgenic medaka by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Zoological Letters* 4, 3 (2018). 査読有
 - 4) Takeuchi M, Inoue C, Goshima A, Nagao Y, Shimizu K, Miyamoto H, Shimizu T, Hashimoto H, Yonemura S, Kawahara A, Hirata Y, Yoshida M, Hibi M. Medaka and zebrafish contactin1 mutants as a model for understanding neural circuits for motor coordination. *Genes to Cells* 22, 723-741 (2017). 査読有
 - 5) Schartl M, Larue L, Goda M, Bosenberg MW, Hashimoto H, Kelsh RN. What is a vertebrate pigment cell? *Pigment Cell and Melanoma Research* 29, 8-14 (2016). 査読有
- [学会発表](計 13 件)
- 1) 宮台元裕、高田広之、木村哲晃、成瀬 清、ロバートケルシュ、日比正彦、橋本寿史 . Pax3 と Pax7 は色素細胞の運命決定を制御する . 第 88 回日本動物学会年会、2017.9.21-23、富山
 - 2) Nagao Y, Takada H, Miyadai M, Seki R, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Hibi M, Kelsh RN, Hashimoto H. Sox5 modulates Sox10-mediated pigment cell fate specification in medaka and zebrafish. Neural Crest and Cranial Placodes, Gordon Research Conference, 2017.2.5-10., Ventura, USA.
 - 3) Goda M, Shizuka T, Inoue C, Nishikawa K, Miki C, Kimura T, Villareal MO, Isoda H, Naruse K, Hibi M, Wakamatsu Y, Hashimoto H. A variegated medaka mutant Va: a model of human Carney complex. 第 87 回日本動物学会年会、2016.11.14-19、沖縄
 - 4) Nagao Y, Takada H, Miyadai M, Seki R, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Hibi M, Kelsh RN, Hashimoto H. Sox5 modulates Sox10-mediated pigment cell fate specification in medaka and zebrafish. European Society for Pigment Cell Research, 2016.9.12-15., Milan, Italy.
 - 5) Goda M, Shizuka T, Inoue C, Nishikawa K, Miki C, Kimura T, Villareal MO, Isoda H, Naruse K, Hibi M, Wakamatsu Y, Hashimoto H. A variegated medaka mutant Va: a model of human Carney complex. European Society for Pigment Cell Research, 2016.9.12-15., Milan, Italy.
 - 6) Nagao Y, Takada H, Miyadai M, Seki R, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Hibi M, Kelsh RN, Hashimoto H. Sox5 modulates Sox10-mediated pigment cell fate specification in medaka and zebrafish. 第 22 回小型魚類研究会 2016.8.20-21、岡崎
 - 7) Takada H, Nagao Y, Adachi T, Hibi M, Kelsh RN, Hashimoto H. Generation of zebrafish sox5 mutant by CRISPR for understanding the mechanism of fate

- specification of pigment cells in teleost. 第21回小型魚類研究会、2015.9.19-20、大阪
- 8) Nagao Y, Takada H, Seki R, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Hibi M, Kelsh RN, Hashimoto H. Roles of *sox10* and its possible interaction with *sox5* in pigment cell development. European Society for Pigment Cell Research, 2015.9.15-18., Edinburgh, UK.
- 9) Takada H, Nagao Y, Adachi T, Hibi M, Kelsh RN, Hashimoto H. Generation of zebrafish *sox5* mutant by CRISPR for understanding the mechanism of fate specification of pigment cells in teleost. 7th European Zebrafish Meeting. 2015. 6.28-7.2., Oslo, Norway.
- 10) Nagao Y, Takada H, Seki R, Kamei Y, Hara I, Taniguchi Y, Naruse K, Hibi M, Kelsh RN, Hashimoto H. Roles of *Sox10* and its possible interaction with *Sox5* in pigment cell development. 7th European Zebrafish Meeting. 2015. 6.28-7.2., Oslo, Norway.
- 11) 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
- 12) 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
- 13) Hashimoto H. *Sox5* functions as a fate switch in medaka pigment cell development. 2nd Strategical Meeting for Medaka Research. 2014.4.10-12., Seville, Spain.

〔図書〕(計 2件)

- 1) 成瀬 清、橋本寿史 . メダカのデザイン 基本のルール . 『月刊アクアライフ』, 466, 18-21 (2018).
- 2) 橋本寿史 . 第II部 メダカ研究の最近 第2章 メダカの色について考える (p111-133) . 『めだかの学校 山本時男博士と日本のメダカ研究』(宗宮弘明、足立 守、野崎ますみ、成瀬 清 編) あるむ (2018).

〔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：
 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

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

(3) 連携研究者

成瀬 清 (NARUSE, Kiyoshi)
 基礎生物学研究所・進化多様性生物学領域・特任教授

研究者番号：50208089

(4) 研究協力者

長尾 勇佑 (NAGAO Yusuke)
高田 広之 (TAKADA Hiroyuki)
宮台 元裕 (MYADAI Motohiro)