

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26840084

研究課題名(和文)脊椎動物のヒレ・四肢骨格形態差を生み出す糖鎖修飾と発生メカニズム

研究課題名(英文)Glycosylation-mediated morphogenesis in appendage development

研究代表者

矢野 十織 (Yano, Tohru)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10648091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：四肢(肩から指先)を構成する軟骨内化骨は、魚類胸ヒレには根元に少ししか存在せず、代わりにうちわ状の膜性骨が存在するという骨格形態差が両者にはある。魚類特異的な膜性骨を形成する領域(apical fold)の形成過程を明らかにするため、本課題では全身で機能することが予想されていたext遺伝子(exostosin遺伝子、細胞外マトリックスを形成する)の機能を発生学的に解析したところ、ext13遺伝子およびext1c遺伝子がapical foldの形成に必要であり、全身で働く遺伝子が器官の局所の形態形成を支配し、魚類固有の特徴を規定していることを例示する成果を挙げた。

研究成果の概要(英文)：In vertebrates, fins and limbs are thought to be homologous appendages. In fish, however, the fin-specific epithelial structure (apical fold) develops and lepidotrichia (intramembranous bones) are formed within the apical fold region. In order to understand mechanisms of fish-specific structures, we demonstrated molecular and developmental analyses of the pectoral fin development in zebrafish (*Danio rerio*), and found that ext (exostosin) genes, which were ubiquitously expressed in development, were important for the formation of the apical fold. Especially, we showed that ext13 gene in zebrafish played an important role not in regulation of limb-developmental pathways mediated by HSPG, but simply in architectural ECM components.

研究分野：発生生物学

キーワード：糖鎖 発生 四肢 鰭 骨格

1. 研究開始当初の背景

魚類のヒレは水中を泳ぐのに適し、手足(四肢)は陸上や空中を移動するのに適しているといったように、脊椎動物のヒレ・四肢の多様性は生物の運動器官の環境適応を理解する上で重要な研究モデルである。ヒレと四肢は相同器官であるが、両者の形・構造は全く異なる。我々の四肢(肩から指先)を構成する内骨格(軟骨内骨化によって形成される)は、魚類胸ビレには根元に少ししか存在せず、代わりにうちわ状の外骨格(膜性骨化によって形成される)が存在する。つまりヒレの発生には四肢発生と共通な「内骨格形成メカニズム」と、魚類ヒレに特徴的な「外骨格形成メカニズム」の2つが存在することが予想されるが、2種類の骨格が共通の細胞腫(側板中胚葉)からどのようにして生じるのかは分かっていない(Yano et al, 2014)。これまで国内外のヒレ・四肢発生研究では、Fgf や Shh、BMP、HoxA/HoxD タンパク質などが着目され、これら因子の遺伝子発現の違いや調節ゲノム領域の変化によりヒレから四肢への形態進化がおきたと理解されている。したがって、側板中胚葉由来の間充細胞がこれら因子の影響を受けてどのように内骨格・外骨格へと異なる分化をし、最終的にヒレ・四肢の骨格形態差が生じるかを解明することが求められる。しかしFgf や Wnt 単独では骨格形態差を生み出す因子として不十分であることを示しており、複数因子の関与が予想される(Yano et al, 2012)。

<引用文献>

Tohru Yano, Haruka Matsubara, Shiro Egawa, Koun Onodera, Koji Tamura, Chapter 22 Fins and Limbs: Emergence of Morphological Differences, New Principles in Developmental Processes, Hisato Kondoh; Atsushi Kuroiwa Eds, Springer, 2014, 291-302

Tohru Yano, Gembu Abe, Hitoshi Yokoyama, Koichi Kawakami, Koji Tamura K, Mechanism of Pectoral Fin Outgrowth in Zebrafish Development, Development, 2012, 139, 2916-2925

2. 研究の目的

本課題ではFgf や Wnt、Shh、BMP などの分泌因子と結合してシグナル伝達の仲介役を担うヘパラン硫酸型糖タンパク質(HSPG)に着目し、糖鎖修飾と骨形成の関係性の理解と、内骨格(脊椎骨や四肢骨)と外骨格(頭蓋骨・鎖骨)を作り分けるレシピ(発生メカニズム)の解明を目的とした。特にヘパラン硫酸鎖のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基の生合成を担う遺伝子(Ext(Exostosin)遺伝子)のゼブラフィッシュにおける機能解析を通じて胸ビレ・四肢の内骨格と外骨格の形成機構を明らかにすることを目的とした。これは糖鎖修飾による細胞レベルでの骨形成能の制御(発生学的・生化学的観点) 組織・

器官レベルでの骨格形態差の創出(形態学的観点) ヒレから四肢への進化メカニズム(ゲノム進化学的観点)といった視点から骨格パターン形成機構の統合理解を目指す研究課題であり、国民の健康増進を目指した医学的な糖鎖・骨研究への波及の可能性も意識して研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) 小型の熱帯魚類であるゼブラフィッシュ(Danio rerio)の受精卵・胚を用いて、ext 遺伝子群(ext1b, ext1c, ext2, ext13)の遺伝子ノックアウト胚をCRISPR/Cas9法により作製し、これら変異胚の表現型ならびに遺伝子発現解析を行った。また既報の ext13 遺伝子変異個体(boxer)の胚も用いて比較解析を行った。

(2) 哺乳類のモデル生物であるマウス(mus musculus)を用いて、Ext13 遺伝子のノックアウト個体を作製し、表現型解析を行った。Ext13 遺伝子は胚発生期において全身に発現する遺伝子のため、単純なノックアウト個体は発生致死になる。したがって、Prrx1-Cre マウス(Prrx1 遺伝子の四肢特異的エンハンサーの機能によって四肢のみでCre タンパク質を誘導できる遺伝子組み換えマウス)とExt13 flox マウスを交配させることにより、四肢特異的にExt13 遺伝子を欠損させる実験系を構築し解析を行った。

4. 研究成果

(1) 既報の ext 遺伝子変異個体として、boxer/ext13 変異個体が知られている。この変異胚では胸ビレ発生が異常となり、正常胚に比べて全体的に近位-遠位方向へ短い組織構造となる(Lee et al, 2002)。同一の変異個体を用いて再解析したところ、ホモ変異胚の内骨格を将来構成する領域はある程度の短小化がおこるものの、軟骨・筋組織は分化し遊泳運動に支障をきたさなかった。一方で外骨格を将来形成する領域は短小化あるいは全欠損することが分かった。これは個体間でのバリエーションが存在し、また同一個体内でも左右差がしばしば観察された。胸ビレの間充細胞を標識できる Prrx1:EGFP コンストラクトを用いて受精後120時間のホモ変異個体の内骨格・外骨格領域の細胞動態を観察したところ、細胞の配置状態は受精後40時間の野生型胚に等しく、胸ビレの後期発生が進行していない様子が観察された。魚類特異的な外骨格領域を特徴づける構造として、上皮シートの扁平化(apical foldの形成)があるため、抗 laminin5 抗体を用いて apical fold の構造を観察したところ、間充細胞が侵入可能な上皮シート間隙が存在せず、これによって外骨格領域の欠損がおきていることが明らかとなった。ext13 遺伝子は全身の細胞において発現することによって、HSPGの糖鎖修飾とこれに起因する様々なシグナル経路に影響を及ぼし得るが、胸ビレ

において ext13 遺伝子は特に外骨格領域の発生に重要な役割を果たしており、器官内の特定の構造を作る・作らないの二者択一を決定しうる機能を有することが明らかとなった。

(2) ext13 遺伝子は HSPG の糖鎖修飾過程において初期の糖付加に関わる酵素であり、ext13 遺伝子以外の他 ext 遺伝子群によってさらなる糖付加がおきる。ext13 遺伝子の下流カスケードを明らかにするため、胸ビレ発生において関与が予想される他の ext 遺伝子群について検討を行った。ext2 遺伝子は既報にて胸ビレ発生初期で機能していることが分かっており、ext2 変異体胚は胸ビレが形成されない。抗 ext2 抗体を用いて野生型胚における ext2 タンパク質の局在を調べたところ、内骨格領域にのみ ext2 は観察され、一方で ext13 タンパク質は胸ビレ全体に分布が見られた。したがって、内骨格領域から外骨格領域へと順序だった発生がおこる胸ビレ形成において、魚類特異的な外骨格領域は ext2 酵素による糖鎖修飾あるいはこれに関連するシグナリングの影響を受けずに発生することが示唆された。次に ext1b、ext1c 遺伝子の機能を明らかにするため、CRISPR/Cas9 法による F0 解析(ノックダウン解析)を行った。本課題で扱う ext 遺伝子の変異胚はいずれも受精後 5 日以降に摂餌不良となり成育不可能であった。軟骨分化状態を解析可能な受精後 5 日胚までにおいて、ext1b 遺伝子変異胚では正常な胸ビレ形成が観察されたが、ext1c 変異胚はヒレ全体が短小化し、また ext1b と ext1c 遺伝子を両欠損した胚においては apical fold が消失した。さらに野生型胚における ext1 遺伝子の発現を whole mount in situ hybridization 法により解析したところ、ext1b 遺伝子は胸ビレ全体に発現がある一方で、ext1c 遺伝子は apical fold に発現が観察された。以上の結果より、ext1、ext2、ext13 のいずれの遺伝子も胸ビレ内骨格領域の形成には必要である一方で、ext13 遺伝子ならびに下流の ext1c 遺伝子は魚類特異的な apical fold の形成において中心的な役割を果たしており、これによって内骨格・外骨格の差異が生じている可能性が示唆された。逆を言えば ext2 タンパク質によって付加される糖の有るか無いかの差異によって、シグナル経路が異なるものとなっている可能性が生じた。

(3) ext13 遺伝子がゼブラフィッシュ胸ビレ発生において特に apical fold の形成、ひいては外骨格形成に寄与することを示すためには、ext13 変異体の成魚における骨格形態解析が必要であったが、ext13 変異胚は胚性致死のため観察ができなかった。そこでマイクロマニピレーターを用いた細胞移植実験を行った。ext13 ホモ変異体の受精卵に蛍光色素を注入し、受精後約 6 時間の胚の一部を野生型胚に移植をすることで、胸ビレを形成しうる側板中胚葉の細胞のみが ext13 遺伝子変異をおこしたモザイク個体が作製さ

れることが期待された。しかし側板中胚葉は胸ビレだけでなく心臓形成にも寄与する少数の細胞集団であり、側板中胚葉のみを移植することが困難であった。得られた個体は血管や筋といった沿軸中胚葉由来の組織においても蛍光標識が観察され、またモザイク胚を成魚にまで成育させることは研究期間内に達成することはできなかった。マイクロマニピレーターは所属機関の設備備品としてセットアップされたため、今後も引き続き実験の検討を行う予定である。

(4) ext13 遺伝子がゼブラフィッシュ胸ビレにおいて外骨格領域の形成に寄与していることが示唆されたが、外骨格領域をもたないマウス等の四肢動物ゲノムにおいても Ext13 遺伝子は存在する。また Ext13 遺伝子はマウス胚において全身で発現しており、四肢形成における機能はこれまで明らかにされてこなかった。マウスにおいて Ext1 遺伝子は長骨や関節の形成に関与し、またヒトやマウスにおいて Ext1 および Ext2 遺伝子に変異が導入されると内軟骨腫として骨・軟骨形成異常がおこることが知られている。そこでマウス四肢における Ext13 遺伝子の機能を明らかにするために、Prrx1-Cre;Ext13 flox/flox マウスを作製することで四肢特異的に Ext13 遺伝子をノックアウトした個体の解析を行った。出生直前の胚においてアルシアンブルー・アリザリンレッド染色を行い、軟骨・骨のパターンを観察したところ個体によって様々な骨格バリエーションが観察された。見かけ正常な胚において橈骨形成異常が観察されたり、外見上異常のある胚において手部は正常にもかかわらず上腕・前腕領域にパターンが見られなくなったりした。四肢形成における進行帯モデル(progress zone model)において、四肢骨格は近位から遠位に向かって順序だった発生がおきるが、ext13 変異体胚ではこれに合致せず、既報ではアザラシ肢症や X 線照射実験で示された近位骨格異常に相当するものであった(Galloway et al, 2009)。Ext13 遺伝子は HSPG 糖鎖修飾の最も初期に働く因子であることを考えると、上腕ならびに前腕部の骨格形成に関与することは予想に反しない結果であり、ext13 遺伝子変異ゼブラフィッシュの内骨格領域が短小化する表現型と一致すると考えることができる。一方で、Ext13 遺伝子変異マウスの手部が正常に形成されたことは、同じ遠位構造であるゼブラフィッシュ胸ビレの外骨格領域の形成機構と照らし合わせると明らかな差異として提示することができた。

(6) ゼブラフィッシュの胸ビレ発生を特徴づける apical fold の形成に ext 遺伝子の関与があることは示されたが、この HSPG が仲介するシグナル経路が何であるかは不明であった。そこで近年 apical fold の形成に寄与すると報告のある因子について主に蛍光 in situ hybridization 法による遺伝子発

現・共局在解析と免疫組織化学染色法によって詳細に検討した。まず apical fold の形成に関与すると報告 (Masselink et al, 2016) のある col11a1a の局在を野生型胚で解析したが、既報のものと同じデータを得ることができなかった。また hoxa13a、hoxd13 遺伝子は外骨格領域の形成に必要であることが報告されたため (Nakamura et al, 2016)、野生型胚ならびに ext13 遺伝子変異胚で hoxa13a 遺伝子の発現を解析したところ、apical fold における発現状態に変化は観察されなかった。したがって、ext13 遺伝子による apical fold の形成は間充織細胞の領域・区画化とは関係なく、HSPG が仲介するシグナル経路に関与する可能性が考えられた。HSPG が仲介する多種多様なシグナル経路のなかでも、rspo2 遺伝子は Wnt シグナル経路におけるシグナル増幅の機能を有しており、rspo2 ノックアウトゼブラフィッシュでは外骨格領域が欠損し (Tatsumi et al, 2014)、Wnt シグナルの下流因子である tcf7 遺伝子変異胚は apical fold の形成不全となる (Yano et al, 2012)。そこで rspo2 遺伝子とさらに ext1b、ext1c、gpc1b、ext2、ext13、prrx1a、fgf10、tcf7、mkp3 遺伝子といった遺伝子のプローブを用いて Wnt シグナルならびに他シグナルの関与を調べたが、外骨格領域に特徴的な局在を示す遺伝子は見られず、また ext13 ホモ変異胚において発現状態の変化する遺伝子も上記には無かった。以上の結果より、ext 遺伝子ならびにコードされた糖付加酵素の機能によって成熟した HSPG は分泌タンパク質のリガンド・レセプターの関係性を仲介することが知られているが、既報のヒレ外骨格形態形成因子の発現の消長を変化させる存在ではない可能性が浮上した。逆を言えば既知のヒレ外骨格形成シグナルが正常に機能したとしても、ext13 遺伝子を欠いた場合は apical fold の立体構築が不可能である可能性を示唆する成果が得られたこととなる。実際に HSPG はシグナル経路の仲介としてだけでなく、細胞外マトリックスの構成因子として細胞構造・細胞間構造・組織構築の物理的な支柱として重要である。Apical fold は上皮シートが扁平に引き伸ばされた構造であること (Yano et al, 2012)、四肢発生にあるような形態形成因子を抑圧する機能があると仮説可能であること (Yano and Tamura, 2013) を加味すれば、HSPG の初期糖付加に関わる ext13 遺伝子とその実働因子を担っている可能性は十分にあると考えられる。細胞外マトリックスが主体的に関与する胸ビレ外骨格形成機構については laminin5a 変異体胚による apical fold の欠損 (Webb et al, 2007) から明らかであり、今後は本成果を基にして細胞外マトリックスによる組織の硬さが形態形成に及ぼすメカニズムについても検討していく必要があると考えられる。

<引用文献>

Jeong-Soo Lee, Sophia von der Hardt、

Melissa A. Rusch, Sally E. Stringer, Heather L. Stickney, William S. Talbot, Robert Geisler, Christiane Nüsslein-Volhard, Scott B. Selleck, Chi-Bin Chien, Henry Roeh, Axon Sorting in the Optic Tract Requires HSPG Synthesis by ext2 (dackel) and ext13 (boxer), Neuron, 2004, 44, 6, 947-960

Jenna L. Galloway, Irene Delgado, Maria A. Ros, Clifford J. Tabin, A Reevaluation of X-Irradiation Induced Phocomelia and Proximodistal Limb Patterning, Nature, 2009, 460(7253), 400-404

Wouter Masselink, Nicholas J. Cole, Fruzsina Fenyves, Silke Berger, Carmen Sonntag, Alasdair Wood, Phong D. Nguyen, Naomi Cohen, Franziska Knopf, Gilbert Weidinger, Thomas E. Hall, Peter D. Currie, A somitic contribution to the apical ectodermal ridge is essential for fin formation, Nature, 2016, 535, 542-546

Tetsuya Nakamura, Andrew R. Gehrke, Justin Lemberg, Julie Szymaszek, Neil H. Shubin, Digits and fin rays share common developmental histories, Nature, 2016, 537, 225-228

Yoshiaki Tatsumi, Moe Takeda, Masaru Matsuda, Tohru Suzuki, Hayato Yokoi, TALEN mediated mutagenesis in zebrafish reveals a role for r spondin 2 in fin ray and vertebral development, FEBS Letters, 2014, 588, 24, 4543-4550

Tohru Yano, Koji Tamura, The Making of differences between fins and limbs, Journal of Anatomy, 2013, 222, 1, 100-113

Ashley E. Webb, Justyn Sanderford, Diane Frank, William S. Talbot, Wolfgang Driever, David Kimelman, Laminin 5 is essential for the formation of the zebrafish fins, Developmental Biology, 2007, 31, 2, 369-382

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

Tohru Yano 他、Glycosylation-mediated skeletogenesis in zebrafish pectoral fins、第23回小型魚類研究会、2017年

矢野十織 他、HSPG の糖鎖修飾がゼブラフィッシュ骨発生様式の選択に関与する、第121回日本解剖学会総会全国学術集会、2016年

〔その他〕

ホームページ等

<http://tohruurhot.webnode.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 十織 (YANO Tohru)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10648091