

機関番号：12608

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570199

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

研究課題名 (英文) Production of Wnt4b by floor plate cells is essential for the segmental patterning of the vertebral column in medaka

## 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

## 研究成果の概要 (和文)：

メダカ突然変異体 *fused centrum* (*fsc*) の解析から、メダカ脊椎の分節性の獲得・維持には、フロアプレート (底板) での Wnt ファミリー遺伝子の発現が必須であることを発見した。このことは、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。

## 研究成果の概要 (英文)：

Analysis of a spontaneous medaka mutant, *fused centrum* (*fsc*), which exhibits fused centra and the absence of the intervertebral ligaments, revealed that *fsc* encodes *wnt4b*, which was expressed exclusively in the floor plate. In *fsc* mutants, *wnt4b* expression was completely lost in the floor plate and that abnormal conversion of the intervertebral ligament cells into osteoblasts appeared to cause a defect of the intervertebral ligaments. These findings provide a novel perspective on the mechanism of vertebrate development.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

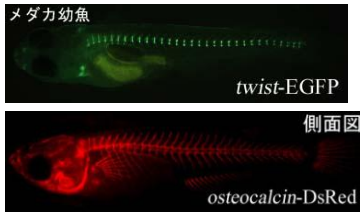
キーワード：器官形成、メダカ、骨形成、脊椎発生、Wnt

1. 研究開始当初の背景 メダカ及びゼブラフィッシュでは実験発生学的な研究 (胚操作、遺伝子産物の過剰発現) や、変異体を用いた遺伝学的な解析が可能である。特にメダカは幼生期まで透明で、顕微鏡下で骨発生の様子を観察することが可能である。またメダカとマウスの骨芽細胞および軟骨細胞の分化機構は分子レベルでよく保存されていること

が研究者らにより明らかとなった (研究者 and Kudo, 2000. *Dev. Genes Evol.* 210, 570-574)。特に研究者らは、硬節 (脊椎をつくる骨芽細胞の前駆細胞) に発現する転写因子である *twist* 遺伝子がメダカ脊椎骨の形成に関与することをモルフォリノオリゴによるノックダウン実験により明らかにした (Yasutake et al., 2004. *Mech. Dev.* 121,

883-894)。以上の成果は、メダカが骨研究のモデル生物として有用であることを示している。

また研究者らは、硬節細胞（骨芽細胞前駆細胞）から成熟骨芽細胞への分化を生きたままの状態でも容易に観察可能なシステム（GFPの緑からDsRedの赤い蛍光への変化）の開発に成功した（研究者ら、2007. *Developmental Dynamics* 236, 3031-3046）。このダブルトランスジェニックメダカシステムは本研究を遂行する上で非常に有用な材料である（下図、参照）。



これらのトランスジェニックメダカと透過型電子顕微鏡による解析より、硬節に由来

する細胞が椎間領域で脊椎形成に関与する骨芽細胞へと分化すること、椎間領域が椎体成長の場になっていることを明らかにし、硬骨魚類の脊椎発生には椎間領域の存在が重要であることを提唱した（研究者ら、2007. *Dev. Dyn.* 236, 3031-3046）。それと同時に研究者らは、点突然変異誘発剤による大規模なメダカ突然変異体のスクリーニングを行ない、脊椎形成に異常を示す変異体も複数単離した（研究者ら、未発表）。また国内ではメダカゲノムプロジェクトが遂行され（Kasahara et al., 2007. *Nature* 447, 714-719）、変異遺伝子の同定（ポジショナルクローニング）のための基盤が整備された。実際に研究者らは複数の変異体についてポジショナルクローニングに成功し、その成果を既に報告している（Sakamoto et al., 2004. *Mech Dev.* 121, 747-752; Sakaguchi et al., 2006. *Dev. Biol.* 293, 426-438.）

さらに研究者らは、突然変異体 *fused centrum (fsc)* の解析を行った結果、メダカ脊椎の分節性の獲得・維持には、フロアープレート（底板）でのWntファミリー遺伝子 (*wnt4b*) の発現が必須であることを発見した（Inohaya et al., 2010. *Development* 137, 1807-1813）。

以上の研究成果から、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的 脊椎の分節性に異常を示す複数の既存メダカ自然発生突然変異体の解析を行い、各原因遺伝子を同定することで、脊椎発生を制御する新たな分子カスケード及び分子機構の解明することを目的としている。

脊椎形成に関する研究はニワトリ・マウス胚を用いて盛んに行われており、体節から派生する硬節の細胞が脊椎骨の雛形とな

る軟骨細胞へと分化、骨へと置き換わる。また脊椎の分節性（椎骨と椎間板の繰り返し構造）は、前後軸に沿った各体節内の極性に依存することが知られている。

硬骨魚類では硬節に由来する細胞が骨芽細胞へと分化し、直接、脊索の周りに骨を形成する。ゼブラフィッシュでは、体節内の極性を失った変異体においても、脊椎の分節構造は正常であると報告されており（van Eeden et al., 1996. *Development* 123: 153-164）、ニワトリやマウスでは報告されていない新たな脊椎の分節形成機構の存在が示唆されていた。

本研究の遂行により、フロアープレート（底板）によるWntシグナルを介した脊椎分節機構の一端が解明できる。本研究は、Wntシグナルを介した新たな脊椎形成モデルを分子レベルで提唱することに最大の特色かつ独創的な点がある。本研究の成果は、従来の発想にない、胚発生期におけるフロアープレートの新たな役割とその分子機構を証明するものであり、本研究の学術的な意義は非常に大きいと考えられる。

### 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。具体的な方法を以下に記す。

(1) 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。

(2) M-a-r-k-e-r（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。

(3) 突然変異体遺伝座近傍の多型マーカーを検出する。

(4) 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で、突然変異の位置を正確に決定する。

(5) 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。

(6) 野生型と突然変異体間で同定した候補遺伝子の塩基配列を比較し、突然変異の有無を調べる。

(7) 原因遺伝子の野生型mRNA（またはゲノムDNA）を突然変異体に注入し、表現型が回復することを確認する。

(8) 原因遺伝子に対するモルフォリノアンチセンスオリゴを野生型に注入し、突然変異体と同様の表現型が得られることを確認する。

4. 研究成果 脊椎骨の融合が見られ、脊椎の分節性が失われる突然変異体、*fused centrum (fsc)* 変異体の解析を行った結果、責任遺伝子がWntファミリー遺伝子に属する*wnt4b*であることを明らかにした。*wnt4b*は

胚発生期にフロアプレートで主に発現しているが、fsc 変異体ではその発現が欠失していた。また原因遺伝子の野生型ゲノム DNA 断片を fsc 変異体にインジェクションし、トランスジェニックレスキュー個体の作製を行った結果、外来ゲノム DNA 断片を持つトランスジェニック個体でのみ、fsc 変異体の表現型が回復した。さらに野生型メダカ胚の細胞を変異体に移植し、野生型細胞由来のフロアプレートが fsc 変異体の表現型を回復しうることを確認した。これにより Wnt ファミリー遺伝子が fsc 変異体の責任遺伝子であることが証明された。本研究により、フロアプレート（底板）による Wnt シグナルを介した新たな脊椎分節機構の一端が分子レベルで解明できた。本研究の成果は、従来の発現にない、胚発生期におけるフロアプレートの新たな役割とその分子機構を証明するものであり、本研究の学術的な意義は非常に大きいと考えられる。

また本研究では fu-2、fu-4、ki69 変異体の解析を行った。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。fu-4 および ki69 は、体節の分節性に異常を示し、左右非対称の体節が形成されることが分かった。このことは、体節の分節性が脊椎の分節性に依存していることを強く示唆している。現在までのところ、ゲノムマッピングにより、fu-2 の原因遺伝子は染色体 23 番に位置していることが判明しており、原因遺伝子のある領域を 500kb 以内にまで絞り込んでいる。また fu-4 と ki69 では体節の分節性に関与すると考えられる既知の遺伝子にそれぞれ変異が見つかった。

#### 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 7 件)

① Inohaya K, Takano Y, Kudo A. Production of Wnt4b by floor plate cells is essential for the segmental patterning of the vertebral column in medaka. *Development*. 137, 1807-1813. (2010). 査読有り

② Moriyama A, Inohaya K, Maruyama K, Kudo A. Bef medaka mutant reveals the essential role of c-myb in both primitive and definitive hematopoiesis. *Developmental Biology*. 345, 133-143. (2010). 査読有り

③ Ohisa S, Inohaya K, Takano Y, Kudo A. sec24d encoding a component of COPII is essential for vertebra formation, revealed by the analysis of the medaka mutant, vbi. *Developmental Biology*. 342, 85-95. (2010). 査読有り

④ Sano K, Inohaya K, Kawaguchi M, Yoshizaki N, Iuchi I, Yasumasu S. Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme: An evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *FEBS J*. 275, 5934-5946. (2008). 査読有り

⑤ Takashima S, Kage T, Yasuda T, Inohaya K, Maruyama K, Araki K, Takeda H, Ishikawa Y. Phenotypic analyses of a medaka mutant reveal the importance of bilaterally synchronized expression of isthmic fgf8 for bilaterally symmetric formation of the optic tectum. *Genesis*. 46, 537-545. (2008). 査読有り

⑥ Mise T, Iijima M, Inohaya K, Kudo A, Wada H. Function of Pax1 and Pax9 in the sclerotome of medaka fish. *Genesis*. 46, 185-192. (2008). 査読有り

⑦ Itakura T, Chandra A, Yang Z, Xue X, Wang B, Kimura W, Hikosaka K, Inohaya K, Kudo A, Uezato T, Miura N. The medaka FoxP2, a homologue of human language gene FOXP2, has a diverged structure and function. *J. Biochem*. 143, 407-416. (2008). 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

① 猪早敬二、高野吉郎、工藤明、フロアプレート細胞における wnt4b の発現は脊椎の分節機構に必須である、日本動物学会第 80 回大会、2009 年 9 月 17 日、静岡

② 猪早敬二、高野吉郎、工藤明、Production of wnt4b by floor plate cells is essential for the segmental pattern of vertebral column、日本発生物学会第 42 回大会、2009 年 5 月 28 日、新潟

③ 猪早敬二、高野吉郎、工藤明、脊椎骨融合を示すダルマメダカ変異体の原因遺伝子の

解明、日本動物学会第79回大会、2008年9月5日、福岡

④ 猪早敬二、高野吉郎、工藤明、Analysis of the Dharma-medaka mutant, which shows a defect in formation and/or maintenance of intervertebral region、日本発生生物学会第41回大会、2008年5月28日、徳島

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：