

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：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300154

研究課題名(和文) マウスとゼブラフィッシュの異種間ゲノム工学による脊椎形成の分子機構の研究

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of vertebral column formation by a cross-species genome engineering approach between mice and zebrafish

研究代表者

國府 力 (Kokubu, Chikara)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70379238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎形成の必須遺伝子Pax1のゲノム領域の機能を、マウスとゼブラフィッシュの異種間ゲノム工学の手法で解析した。トランスジェニック解析では、マウスの硬節エンハンサーmPf1(0.8 kb)がゼブラフィッシュで活性を持たないことが分かった。一方、ゼブラフィッシュzPf1(0.7kb)はマウスでmPf1より強い活性を示した。陸棲脊椎動物でのみ保存され水棲動物には存在しない硬節エンハンサーmXe1(1.7 kb)は、ゼブラフィッシュでも頑強な活性を示した。mXe1を用いてゼブラフィッシュでPax1を強制発現させると、脊椎の軟骨形成が抑制された。この分子機構についてはニワトリの系でさらに詳細に解析した。

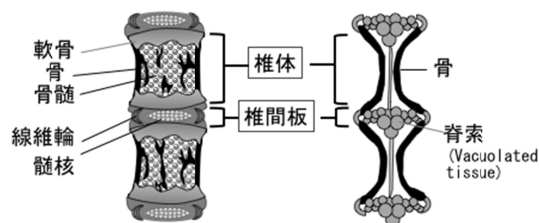
研究成果の概要(英文)：The structure and function of the Pax1 genomic region, which is essential for vertebral column formation, was compared between the mouse and zebrafish by a cross-species genome engineering approach. Transgenic reporter assays revealed that a mouse sclerotome (vertebral anlage)-specific enhancer mPf1 (0.8 kb) did not show enhancer activity in zebrafish embryos, while its zebrafish ortholog zPf1 (0.7 kb) drove stronger sclerotomal expression in mice than the isogenic mPf1. Another sclerotomal enhancer mXe1 (1.7 kb), which is evolutionary conserved in terrestrial vertebrates but not in aquatic vertebrates, drove robust reporter expression in the zebrafish sclerotome. Intriguingly, forced expression of Pax1 driven by the Xe1 enhancer transgene inhibited cartilage formation in zebrafish. The inhibitory role of Pax1 against cartilage formation was further analyzed in detail by forced expression experiments in chicken embryos and primary cultured cells.

研究分野：実験動物学

キーワード：比較ゲノム 軟骨形成 発生・分化 発現制御

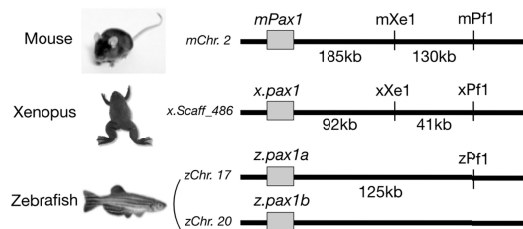
1. 研究開始当初の背景

陸上で生活する哺乳動物の脊椎は重力に抗して体幹を支持する役割のほかに、カルシウム代謝や骨髓造血の場として生命維持に不可欠な機能を果たす。その起源は胎生期の胚に出現する硬節と呼ばれる組織にまで遡ることができる。まず硬節から無血管の軟骨性骨原基が形成され、続いて血管侵入を契機として軟骨が骨・骨髓に置き換わる「内軟骨性骨化」のプロセスを経て、脊椎の形成は完成する。一方、水中に住む魚類の脊椎は軟骨形成を経由しない「膜性骨化」の様式をとるため、骨髓を持たず造血も腎臓で行うことが知られている(図1)。このように進化的には相同と見なされる哺乳類と魚類の脊椎が異なる骨化様式を採用したのはなぜであろうか。両者の違いを生む分子メカニズムをゲノム進化の視点から明らかにし、脊椎動物の祖先が水中から陸に上がるに際して獲得したと考えられる脊椎形成の新機軸に関わる知見が得られるならば、おのずとヒトを含む高等哺乳動物に特有な脊椎形成の分子機構の理解も深まるであろう。以上のような発想から、本研究課題は立案された。

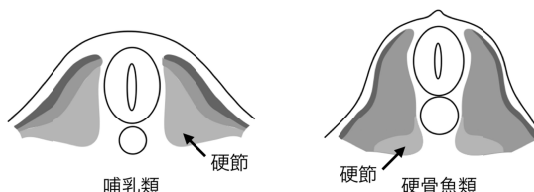


(図1) 哺乳類の脊椎(左)と硬骨魚類の脊椎(右)

研究代表者は前研究課題でトランスポゾンを用いて長距離のゲノム領域を操作する新しいゲノム工学技術を開発し、これを用いて脊椎形成に必須な転写因子 Pax1 の遺伝子を脊椎の原基である「硬節」で特異的に発現させるエンハンサー・エレメントをマウスゲノム上に同定した(Kokubu et al., Nature Genetics, 2009)。とくに、両生類以上の陸棲脊椎動物で進化的に保存されている Xe1 エレメント(陸棲型硬節エンハンサー、1.7kb)と水棲魚類まで保存されている Pf1 エレメント(水棲型硬節エンハンサー、0.8kb)が重要(図2)であり、Xe1 はマウス硬節の全体、Pf1 は硬節の腹側のみでエンハンサー活性を示す。興味深いことに、これら Xe1 / Pf1 エンハンサーの発現パターンは、それぞれ哺乳類/魚類の発生途上に現れる硬節の本来の形状(図3)に一致していた。そこで我々は、「水棲型脊椎から陸棲型脊椎への転換には、魚類には存在しない Xe1 エレメントを獲得したことがゲノム進化上の重要なイベントであった」という仮説を立て、ゼブラフィッシュの実験系をもつ研究分担者との共同研究として、本プロジェクトを開始した。



(図2) Pax1 硬節エンハンサーのゲノム配置と異種間保存



(図3) 発生中期の体節(横断面)

2. 研究の目的

本研究は、脊椎形成の必須遺伝子である Pax1 とその周辺のシス調節エレメントを含むゲノム領域に注目し、ゲノム進化および進化発生学(evo-devo)の視点を導入することにより、種間におけるゲノム配列の違いと表現型との関連を最新のゲノム工学の手法を用いて実験的に解析し、最終的にはヒトを含む高等哺乳動物の脊椎形成の分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

脊椎動物全般のゲノム参照配列データベースからマウス Pax1 ゲノム領域とオーソログ的な関係にあるゲノム領域を抽出し、配列情報の比較を行う。とくに主たる実験系の1つであるゼブラフィッシュに関しては、オーソログ領域の決定と種間の表現型の比較のため、Whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析を行う。

次に、マウス Pax1 ゲノム領域のエンハンサー候補 DNA 配列を断片化し、GFP レポーター遺伝子に接続して Tol2 トランスポゾンベクターによりゼブラフィッシュ胚に導入し、*in vivo* のトランスジェニック・レポーターアッセイを行う。各エンハンサー配列はさまざまな断片長に分割あるいは統合することにより、コアエレメントの探索を行う。より広範囲のゲノム領域を探索する目的では、約 200 kb のゲノム断片を有する BAC クローンを直接トランスポゾン化してゼブラフィッシュ胚に導入する BAC トランスジェニック解析の手法も併用する。マウス以外の種に由来するゲノム断片も Tol2 トランスポゾンベクターに組み込むことにより、ゼブラフィッシュ系でのエンハンサー・アッセイを行う。一方、ゼブラフィッシュで興味深い活性を示した候補 DNA 断片については、さらにマウスの系でトランスジェニックアッセイを行い、高等哺乳動物での機能を評価する。エンハンサー

配列に結合する上流因子を探索するためには、マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 やヒト胎児腎細胞株 HEK293T を用いた *in vitro* のデュアルルシフェラーゼアッセイも並行して実施する。

水棲硬骨魚類が陸棲型硬節エンハンサー Xe1 を獲得したことの進化的意義を検証する目的では、ゼブラフィッシュ胚において Xe1 エlementに接続した Pax1 発現ベクターを強制発現させ、表現型への影響を評価する。

4. 研究成果

(1)ゼブラフィッシュゲノムにおけるPax1オースログ領域の同定

マウスゲノムにおいては、脊椎形成に必須な転写因子Pax1の遺伝子座が、発生学的に重要な転写因子Foxa2の遺伝子座と隣接して2番染色体上に位置している。この2つの遺伝子座の並び方(=シンテニー)は脊椎動物のゲノム全般で保存されており、我々が同定したXe1、Pf1エンハンサーもこの領域の中に存在する。また、Pax1のパラログ遺伝子であるPax9、Foxa2のパラログ遺伝子であるFoxa1もやはり隣接してマウス12番染色体上に存在し、そのシンテニーが進化的に保存されている。以上のゲノム情報から、Pax1-Foxa2シンテニー保存領域(マウスでは約670kbに相当)のゲノム機能を種間で比較することが、脊椎形成過程の理解に重要と考えられた。そこでまずゼブラフィッシュに対してホモロジー検索を行ったところ、Pax1のオースログ候補として17番染色体と20番染色体の2箇所に2つの遺伝子(それぞれpax1a、pax1bと表記)が見つかった。Pax9のオースログ遺伝子も別に2箇所見つかっていることから、この結果は進化過程で硬骨魚類が哺乳類よりも一回多く全ゲノム重複のイベントを経験したという定説に合致しているものと考えられる。次にゼブラフィッシュ pax1a、pax1b の発現を RNA *in situ* hybridization法で解析した結果、発生過程における両者の発現領域は異なり、硬節での発現はpax1aの方で明瞭であった。さらにマウス硬節エンハンサーpf1と相同性の高いElementがpax1aの近傍にのみ存在したことから、ゼブラフィッシュの脊椎形成を担うゲノム領域として、まず17番染色体pax1aゲノム領域に注目して以下の解析を進めた。

(2)マウスおよびゼブラフィッシュの硬節特異的エンハンサーの*in vivo*比較解析

硬節特異的エンハンサーの活性を規定するコアElementを同定するために、マウス Pax1あるいはゼブラフィッシュpax1のゲノム領域から抽出したエンハンサー候補配列を複数の短いサブドメインに分割し、GFPレポーター遺伝子を有するToI2トランスポゾンベクターに組み込み込んだ後、トランスポゼースをコードするmRNAとともにゼブラフィッシュ胚に注入する *in vivo*トランスジェニックアッセイを行った。その結果、Xe1 Elementは分

割によってエンハンサー活性を消失し、またDNA配列上の相同性があっても種によって活性の異なるElement等が同定された。なかでもマウスで硬節特異的エンハンサー活性を示す0.8kbのpf1 Element(mPf1)は、ゼブラフィッシュでは活性を示さなかった。ところが、ゼブラフィッシュのpf1 Element(1.2kb, zPf1)では、mPf1との相同性が高い約700bpの領域から硬節特異的なエンハンサー活性が検出された。トランスジェニックアッセイで機能評価を行ったエンハンサーの中から、重要なものについてはライン化を行い、安定的な発現領域を示すトランスジェニック・ラインを確立した。

次に、ゼブラフィッシュのzpf1を含む配列をマウス胚に移入するトランスジェニック・レポーターアッセイを行うと、マウス硬節領域に特異的なエンハンサー活性が検出された。しかもこの活性は同一条件で解析したmPf1よりも強いという興味深い結果が得られた。従来、マウスmPf1 Elementのエンハンサー活性が弱いことが、哺乳類における水棲型硬節エンハンサーの機能解析に際して阻害要因となっていた。そこでゼブラフィッシュのzPf1 Elementを用いてトランスジェニックマウスを作製し、哺乳類の発生過程における水棲型硬節エンハンサーPf1の特性評価を行った。

一方、Pax1近傍ゲノム領域のシスElement探索の範囲をさらに広げるため、トランスポゾン化したBACクローンによるトランスジェニックアッセイを行った。その結果、硬節に加えて咽頭嚢での発現を制御するエンハンサー活性が新たに検出された。

なお、本研究で活用したトランスポゾン技術に加え、本研究期間中に普及したCRISPR/Casシステムを応用して大欠失変異の導入操作を試み、広範囲にわたるシス調節ゲノム領域の機能喪失アレルを作製するうえで有効であることを示唆する結果が得られた。このことは、宿主に依存しないCRISPR/Casシステムとの融合により、今後、異種間ゲノム工学実験の適用範囲をさらに拡大できる可能性を示唆する。

(3)硬節特異的エンハンサーの*in vitro*解析

硬節特異的エンハンサーに結合する転写因子を探索するため、Xe1あるいはPf1を最小プロモーターに接続したルシフェラーゼ・レポーターベクターを30種類の候補転写因子発現ベクターとともにマウス前駆軟骨細胞株 ATDC5やヒト胎児腎細胞株HEK293Tに導入し、*in vitro*での発現強度解析を行った。共発現させる転写因子としては、Xe1やPf1内部のコンセンサス配列や硬節での発現が報告されている転写因子の中から30種類を選別した。その結果、Xe1はPax1によって、zPf1はGli1によって活性が上昇することが示された。

以上、(1)-(3)の結果をまとめ、論文として発表する準備を進めている。

(4) Pax1強制発現実験

陸棲型硬節エンハンサーXe1の獲得が陸棲脊椎動物の中軸骨格における内軟骨性骨化様式の獲得につながったという仮説を検証する目的で、マウスPax1遺伝子(mPax1)をXe1エンハンサーによりゼブラフィッシュ胚で強制発現させる実験を行った。その結果、この条件下では軟骨形成が促進するのではなく、むしろ遅延するという観察結果が得られた。一方、従来の知見では、Pax1は下流転写因子Nkx3.2の発現誘導を介して軟骨細胞分化の初期過程を促進することが知られていた。そこで脊椎形成におけるPax1遺伝子の役割をより詳細に明らかにするため、軟骨形成の評価に適したニワトリ胚、及び培養ニワトリ軟骨細胞の実験系を用いて、マウスPax1遺伝子の機能解析を行った。まずニワトリ胚前肢でPax1をエレクトロポレーションによって強制発現させたところ、間充織凝集にはじまる軟骨形成・分化の初期過程には影響を与えず、つづく軟骨細胞の成熟と血管侵入を契機とする骨への置換が阻害された。また、ニワトリ培養軟骨細胞でレトロウイルスを用いてPax1を強制発現すると、Aggrecan(Agc1)の発現が著明に低下し、細胞形態が線維芽細胞様に変化するとともに軟骨に特徴的なプロテオグリカンの蓄積が減少した。さらに、ここで見られるプロテオグリカンの蓄積減少はSox9の強制発現によって部分的に抑制された。以上の結果から、Pax1が従来のNkx3.2を介する経路とは独立した形で、軟骨細胞の分化・成熟を抑制する活性を持つことが明らかになった。これらの結果は、Experimental Cell Research誌において論文発表を行った(Takimoto et al., 2013)。

[附記]本研究期間の終わりになって、ヒトPAX1 遺伝子ゲノム領域が特発性側弯症の発症に関わっているという興味深い報告(Sharma et al., Nature Communications 2015)が他グループから発表された。ヒト疾患との関連が報告されたことでこのゲノム領域の重要性がますます高まるとともに、我々のグループが注目したゲノム領域と重なる部分、異なる部分がそれぞれ存在するため、それらを厳密に切り分けることで、この進化的に保存されたゲノム領域の中軸骨格形成における役割の解明がさらに進むものと期待される。

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 2 件)

1. 國府 力. CRISPR/Cas がゲノムワイド遺伝子スクリーニングにもたらした革命. 医学のあゆみ. 査読無, 252(2)巻, 2015, 14574-14578.

2. Takimoto A, Mohri H, Kokubu C, Hiraki Y, Shukunami C. Pax1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Exp Cell Res*. 査読有, 319 巻, 2013, 3128-3139. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.09.015.

[学会発表](計 7 件)

1. 國府 力. マウス ES 細胞のミュータジェネシス: 点変異からゲノム再構成変異まで. 京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」公開シンポジウム(招待講演), 2014年5月13日, 京都大学芝蘭会館稲盛ホール
2. Kokubu C., Yamanishi A., Yamagata K., Sese J. and Takeda J. Whole-genome sequencing analysis of radiation-induced genomic rearrangements in BLM-suppressed mouse embryonic stem cells. FASEB Science Research Conferences “Dynamic DNA Structures in Biology”. July 20-25, 2014, Itasca, Illinois, USA.
3. 滝本 晶, 開 祐司, 宿南 知佐. 椎間板形成における Pax1 の役割. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会, 平成 26 年 7 月 24-26 日, 大阪
4. 宿南 知佐. 筋骨格系を連結する腱・靭帯形成の分子機構. 第 27 回骨代謝セミナー, 平成 26 年 6 月 6 日, 東京.
5. 宿南 知佐. 腱と骨を連結する分子機構: 宿南知佐: 第 32 回日本骨代謝学会カレントコンセプト, 平成 26 年 7 月 26 日, 東京.
6. Chisa Shukunami. Molecular mechanisms regulating tendon and ligament formation. The 11th Bone Biology Forum Lecture VI (招待講演), 平成 26 年 8 月 23 日, Susono
7. 滝本 晶, 國府 力, 開 祐司, 宿南 知佐. 椎間板形成過程における Pax1 の役割. 第 14 回運動器科学研究会, 平成 25 年 9 月 13-14 日, 東京.

[図書](計 1 件)

1. 堀江 恭二, 國府 力, 竹田 潤二. 実験医学別冊 ES・iPS 細胞実験スタンダード. 再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識. 「トランスポゾンによるゲノム改変」2014年, 316-323.

[その他]

ホームページ等

研究代表者の研究室のホームページ
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/mr-envi/www/index.html>

研究分担者の研究室のホームページ
<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te01/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國府 力 (KOKUBU CHIKARA)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70379238

(2) 研究分担者

宿南 知佐 (SHUKUNAMI CHISA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授
研究者番号：60303905

関 祐司 (HIRAKI YUJI)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：40144498
(平成25年8月より研究分担者)

(3) 連携研究者

該当なし