

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26506005

研究課題名(和文) 宇宙実験のためのメダカ骨形成分子基盤の解明

研究課題名(英文) Establishment of molecular basis for skeletal development in medaka

研究代表者

猪早 敬二 (Inohaya, Keiji)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：70302958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術を用いて、骨形成に関わる遺伝子のノックアウトメダカを作製した。特に転写因子であるsp7/osterixの変異体では、頭部、胴尾部や鱗などの全身の骨組織で骨形成不全が見られ、マウスと同様にメダカにおいても、sp7/osterix遺伝子が骨形成に必須の遺伝子であることが分かった。また、10型コラーゲンを発現する細胞が未熟な骨芽細胞であること、さらに、それらの細胞の成熟には、sp7/osterix遺伝子の発現が必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：sp7/osterix is a zinc finger transcription factor that is essential for osteoblast differentiation in mammals. To verify the characteristic features of osteoblast-lineage cells in teleosts, medaka sp7 mutants were established using a transcription activator-like effector nuclease (TALEN) genome editing system. These mutants showed severe defects in the formation of skeletal structures, indicating that sp7/osterix gene is essential for skeletal development in medaka. In addition, the present study revealed that type X collagen at a (col10a1a)-positive cells are osteoblast-like cells and sp7/osterix gene expression in osteoblast-lineage cells is required for differentiation into mature osteoblasts to form the skeletal structures.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生・分化 骨形成 骨芽細胞 メダカ

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申請者らにより明らかとなった(研究代表者 and Kudo, 2000. *Dev. Genes Evol.* 210, 570-574)。特に研究代表者らは、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。

また研究代表者らは、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(研究代表者ら、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。

それと同時に研究代表者らは、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(研究代表者ら、未発表)。また研究代表者らは複数の変異体について原因遺伝子の同定に成功し、その成果を報告している(Sakamoto et al., 2004. *Mech. Dev.* 121, 747-752; Sakaguchi et al., 2006. *Dev. Biol.* 293, 426-438.)。

これらの成果のうち、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(研究代表者ら、2010. *Development* 137, 1807-1813)。

研究開始当初、研究代表者らは宇宙開発事業団との共同研究により、メダカ稚魚を宇宙ステーション・きぼう棟で長期飼育(平成24年10月から2か月間)し、無重力が骨形成に与える影響を、骨芽および破骨細胞の両側面から解析中であった。

以上の経緯より、宇宙実験の成果をより深く理解するには、メダカ骨形成の分子基盤を整備することが急務であり、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

宇宙開発事業団 JAXA との共同研究により、宇宙ステーション・きぼう棟において、メダカ稚魚の長期飼育を実施し、研究開始当初、微少重力環境が骨にどのように影響するの

か解析を進めていた。その結果、宇宙空間では骨芽細胞の活性が低下することで、相対的に破骨細胞の活性が上昇するということが明らかとなってきた。本研究ではこの結果を踏まえ、骨芽細胞に焦点を絞り、骨形成に関わる遺伝子のノックアウトメダカを TALEN 法により作製することで、各遺伝子の機能を明らかにすることを急務とし、宇宙環境がもたらす骨芽細胞への影響、延いては破骨細胞への影響の解明を目指した。

3. 研究の方法

[ゲノム編集技術による変異体の作製]

本研究では骨芽細胞の発生に関連する遺伝子のノックアウトメダカを Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 法により作製し、各遺伝子の骨形成における機能解析を行った。TALEN は CRISPR と同様に、標的遺伝子改変法の 1 つであり、メダカでも有効であることが報告されている(Anzai et al., 2013. *Genesis* 193: 739-749; Anzai et al., 2014. *Develop. Growth. Differ.* 56: 98-107 研究代表者共著)。

TALEN は、植物病原細菌 *Xanthomonas* 属由来のエフェクタータンパク質 TAL effector の DNA 結合ドメインと FokI ヌクレアーゼドメインとを融合させて構築した人工制限酵素であり、TAL effector を任意のゲノム配列に結合するようにデザインすることで、標的遺伝子のゲノム配列を改変することが可能となる。この技術は様々な動物種に用いられ、メダカにおいても有効であることが確認されている(Anzai et al., 2013. *Genesis* 193: 739-749; Anzai et al., 2014. *Develop. Growth. Differ.*)。標的遺伝子の変異体は以下の手順で作製した。

標的遺伝子のエクソン・イントロン構造を明らかにし、TALEN の標的となる部位を決定する。

TALEN コンストラクトを作製し、mRNA を合成する。

合成した mRNA をメダカ卵の割球に顕微注入する。

mRNA を注入したメダカ (F0) を野生型メダカと交配し、F1 個体を得る。

F1 個体の標的ゲノム配列付近をシーケンス解析し、ゲノム編集が起きている個体を同定する。

変異がある個体の中から、null 変異体を確定する。

[変異体の表現型解析]

得られた変異体をアリザリンレッド染色することで骨標本を作製する。経時的に骨標本を作製することで、各骨組織の石灰化の様子を観察することが可能である。また、カルセインやアリザリンコンプレキソンなどの蛍光色素で染色すれば、生きた個体での経時的観察も可能である。

野生型個体の骨標本と比較することで、変異体の表現型を精査する。

〔TALEN 標的遺伝子の表現型の確定〕

レスキュー実験

TALEN 標的遺伝子の野生型 mRNA (またはゲノム DNA) を各変異体に注入し、表現型が回復することを確認する。

ノックダウン実験

TALEN 標的遺伝子に対するモルフォリノンチセンスオリゴを野生型に注入することで遺伝子の機能をノックダウンし、各変異体と同様の表現型が得られることを確認する。

〔変異体における骨芽細胞の解析〕

変異体とトランスジェニックメダカ系統を交配することによって、各変異体における骨芽細胞の分化・発生状態を、生きたままの個体で経時観察を行う。

研究代表者らは、骨形成に関わる遺伝子のトランスジェニック系統を開発・維持してきた(申請者ら、2007. *Developmental Dynamics* 236, 3031-3046、研究代表者ら、2010. *Development* 137, 1807-1813)。これらのトランスジェニック系統を用いることで、メダカの骨芽細胞は4つの分化段階に大別することができる。すなわち、骨芽細胞前駆細胞 (twist または pax1 陽性細胞)、前骨芽細胞 (col10 陽性細胞)、骨芽細胞 (osx/terix 陽性細胞)、成熟骨芽細胞 (osteocalcin 陽性細胞) の4段階である。変異体とこれらのトランスジェニック系統とを交配し、4つの分化段階の骨芽細胞を観察することで、変異体骨芽細胞がどの分化段階で異常を起こしているのかを明らかにすることができる。

4. 研究成果

本研究ではTALEN法を用いて、マウスにおいて骨芽細胞の分化に必須とされている転写因子、ostrix と runx2、細胞外基質タンパクである X 型コラーゲン (col10a1)、骨芽細胞の前駆細胞で発現する転写因子、pax1、pax9 および bapx1 の6種類の遺伝子のノックアウトメダカの作製・系統化に成功した。これらのメダカ変異体の表現型を精査したところ、骨形成に異常があることが分かった。

ostrix 変異体では、フレームシフト変異が生じることで osteirx 遺伝子の機能不全が期待されるメダカ変異体の系統化に成功することができた。このメダカ osteirx 変異体の表現型の精査を行ったところ、頭部、胴尾部や鱗などの全身の骨組織で骨形成不全が見られ、osterix 遺伝子が骨形成に必須の遺伝子であることが明らかとなった。特に脊椎では、椎体は形成されるものの、神経棘と血管棘の形成が見られず、osterix 遺伝子がこれらの骨組織の形成に関与していることが示唆された。次に、osterix 変異体における骨芽細胞の発生を、トランスジェニックメダカを用いて詳細に調べた。その結果、osteirx

変異体の椎体においては、X 型コラーゲン (col10a1) 陽性細胞が正常に発生してくることが分かった。またこれらの col10a1 陽性細胞はアルカリファスファターゼ活性を有し、椎体の石灰化に関与していることが示唆された。さらに、col10a1 遺伝子のプロモーター下で osterix 全長 cDNA を発現するトランスジェニックレスキューメダカ系統を作製したところ、osterix 遺伝子のプロモーターを用いたレスキュー実験と同様に、神経棘と血管棘および他の骨組織の回復が変異体で認められた。以上の結果から、col10a1 陽性細胞は未熟な骨芽細胞であることが強く示唆され、骨芽細胞の成熟には osterix 遺伝子の発現が必須であることが明らかとなった。この成果は、科学専門雑誌、*Developmental Biology* (2017) に発表した。

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8件)

Azetsu Y, Inohaya K (ダブル筆頭著者), Takano Y, Kinoshita M, Tasaki M, Kudo A. (2017). The sp7 gene is required for maturation of osteoblast-lineage cells in medaka (*Oryzias latipes*) vertebral column development. *Developmental Biology*. 431, 252-262. 査読有り

Okada K, Inohaya K, Mise T, Kudo A, Takada S, Wada H. (2016). Reiterative expression of pax1 directs pharyngeal pouch segmentation in medaka (*Oryzias latipes*). *Development*. 143, 1800-1810. 査読有り

Takeyama K, Chatani M, Inohaya K, Kudo A. (2016). TGFβ-2 signaling is essential for osteoblast migration and differentiation during fracture healing in medaka fish. *Bone*. 86, 68-78. 査読有り

Mantoku A, Chatani M., Aono K, Inohaya K, Kudo A. (2016). Osteoblast and osteoclast behaviors in the turnover of attachment bones during medaka tooth replacement. *Developmental Biology*. 409, 370-381. 査読有り

Ishikawa Y, Inohaya K, Yamamoto N, Maruyama K, Yoshimoto M, Iigo M, Oishi T, Kudo A, Ito H. (2015). The Parapineal Is Incorporated into the Habenula during Ontogenesis in the Medaka Fish. *Brain, Behavior and Evolution*. 85, 257-270. 査読有り

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

Iida Y, Hibiya K, Inohaya K, Kudo A. (2014). 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. 査読有り

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

〔学会発表〕(計8件)

猪早敬二、メダカ脊椎形成における体節および硬節細胞の役割、日本動物学会第88回富山大会、2017年9月21日、富山県民会館

猪早敬二、工藤明、メダカ脊椎形成に硬節細胞は関与するか?、日本動物学会関東支部第69回大会、2017年3月20日、筑波大学・東京キャンパス文京校舎

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68回大会、2016年3月12日、神奈川県横浜キャンパス

猪早敬二、メダカ脊椎形成における体節の役割、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

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

山崎隆弘、猪早敬二、工藤明、メダカにおけ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

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

〔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：
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)
東京工業大学生命理工学院・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：

(4) 研究協力者 ()