

脊椎骨異常解決を目指した体節分節機構の解明

荒木和男*・岡本裕之*

Study of somite segmentation mechanism to determine abnormal spinal column development

Kazuo ARAKI and Hiroyuki OKAMOTO

Abstract In the nursery production field, the frequent occurrence of abnormal spinal cord development and curved bodies in fishflies is a big problem. In fish, osteoblasts are bone cells from the sclerotome derived from a somite and they form into sclerofragments and attach to the notochord to form the spinal cord. The analysis of the phenotypes of zebrafish and medaka mutants having irregular somite development showed that irregular somite generation and segmentation induces irregular spinal cord development. However, the mechanism underlying somite segmentation has not been clarified. In this paper, we report our recent study about the detection and functional analysis of genes that control somite segmentation.

Key words : Somite, spinal column, segmentation, mutant

種苗生産の現場では、中胚葉由来の脊椎の湾曲による形態異常の発生が大きな問題の1つになっている。頭骨を除く骨や骨格筋は、初期胚期に形成される中胚葉組織の体節から形成される硬節由来の骨形成細胞が脊索の周りに硬骨を貼り付けてゆくことによって脊椎がつくられることが知られている。また、これまでの体節形成異常を示すゼブラフィッシュやメダカの突然変異体の表現型の解析から、体節の形成異常特に分節異常は著し脊椎骨の形成異常を生ずることが知られている。しかし、体節の分節機構についてはすべてが明らかにされている訳ではない。そこで、本報では体節の分節化を制御する新規の遺伝子の同定と機能の解析について、我々の最近の研究を紹介する。

ハタやクエ、ブリをはじめとする種苗生産の現場では1部の脊椎骨の形の異常が原因で体が湾曲する稚魚が多く出現する場合があります、大きな問題になっている。マハタの観察から発生の早い時期から体の湾曲が観察されることから (Nagasaki et.al 2006)、エサの成分やウイルスの感染によるとは考えにくく未だに原因は分かっていない。

魚類では、体節の後半部に形成される硬節で骨形成細胞が生まれ、脊索のまわりに硬骨の断片を貼り付けて行くことによって脊椎骨が作られる (Kii et.al. 2004, Fleming et.al. 2003)。そのため、脊椎骨や脊椎骨から生える神経棘や血管棘の形や配列のパターンは体節の分節のパターンに強く依存している (Fisher et.al.2003)。よって、体節の形成機構を明らかにすることによって、養殖対象種の脊椎骨異常の原因を探る手がかりが得られると考えられる。

魚類初期中期囊胚期の胚で中胚葉の誘導が起こり、体軸が形成された後、頭部と尾部にオルガナイザー領域が形成され、体節は胴尾部オルガナイザー領域から形成される中胚葉組織から一定時間に1個ずつ付け加えられるような形で形成されて行く。体節が一定時間毎に形成されるクロック機構については多くのことが明らかにされつつあるが (Julich et.al. 2000, Horikawa et.al. 2006)、分節の機構についてはすべてが明らかにされているわけではない。そこで、我々は、分節に関連する新たな遺伝子を同定し、機能を解析することを目的に、胴尾部オルガナイザー領域で特異的に発現

する新規の遺伝子（特に *T-box*, *forkhead* 領域を持つ遺伝子）の単離を試み、得られた *tbx24* が体節の分節化を制禦していることを明らかにした (Nikaido et.al. 2002)。

胴尾部オルガナイザー領域で発現する遺伝子の単離

ゼブラフィッシュ及びメダカの胴尾部オルガナイザー領域で発現している *T-box* 遺伝子及び、*forkhead* gene family の遺伝子を単離することを目的に、これまでに報告されている魚類の *T-box*, *forkhead* domain の共通配列をもとにプライマーを設計し、PCRによりこれらの領域のDNA断片の増幅を行った。次に、500個体の胴尾部領域を集めてRNAの抽出を行い、cDNAライブラリーを作成し、得られたDNA断片をプローブに用いて新規の *T-box* 遺伝子及び、*forkhead* gene family の遺伝子のクローニングを試みた。得られた *T-box* 遺伝子の1つは、これまでに報告されている *T-box* 遺伝子とは構造が異なる新規の遺伝子であり、中胚葉誘導後、胚円周辺部で発現し、胴尾部が形成さ

れた後、体節の形成が終わるまで尾部末端部で発現する遺伝子であった (Figure 1 参照)。本遺伝子は24番目に発見された *T-box* 遺伝子であるため、*tbx24* と命名された。

tbx24 遺伝子の発現抑制と表現型の解析

tbx24 のアンチセンスモルフォリノオリゴを作成し、受精卵の胚胎にマイクロインジェクションをしてその後の発生を観察したところ、体節の分節化が起こらないことが分かった。体節形成期に未分節中胚葉領域で発現様式の振動を起こす *her1* 遺伝子の発現を見たところ、発現様式の異常を起こしていることが分かった。また、筋節で特異的に発現する *myod* の発現を見たところ、筋節毎のバンド状の発現は見られず、体節形成領域での一様の発現が観察された。これらの表現型は、すでに報告されていたゼブラフィッシュの突然変異体 *fs* に極めて類似するものであった (Figure 2 参照)。

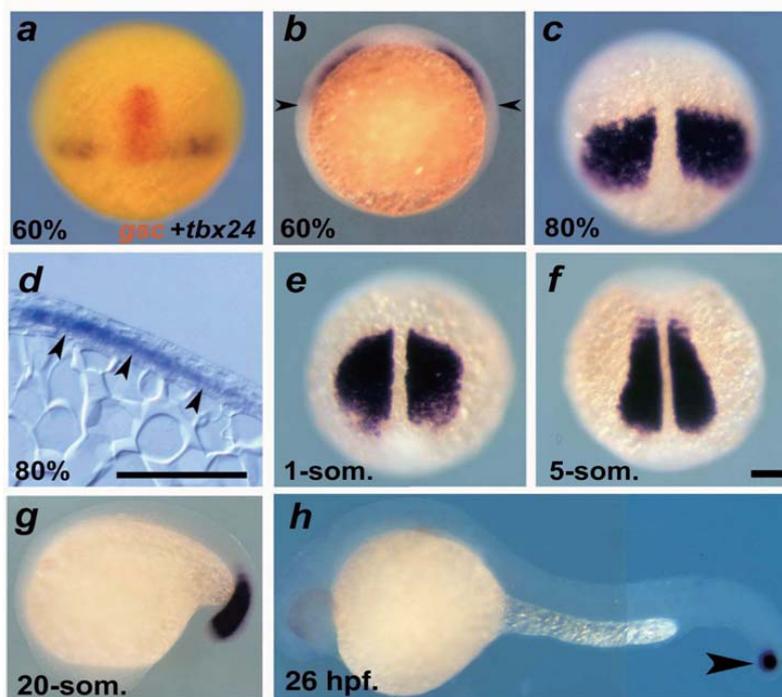


Fig. 1. The gene *tbx24* is expressed in the presomitic mesoderm (PSM). a, b: Dorsal (a) and ventral (b) views of embryos at 60% epiboly stage. No signals are detected in the ventral region (below the arrowheads in b). The red signal indicates the expression of *gsc*. c-f: Dorsal views of the embryos at 80% epiboly stage (c), one-somite stage (e), and five-somite stage (f). A transverse section (d) at 80% epiboly stage shows that transcripts of *tbx24* are localized under below mesodermal cells (arrowheads). g, h, Lateral views of embryos at the 20-somite stage (g) and 26 h postfertilization (hpf, h). The arrowhead in h indicates the residual signal of *tbx24* transcripts. Images in a, c, e, f, anterior to the top; in b, d, dorsal to the top; in g, h, Anterior to the left. Scale bars, 100 μm

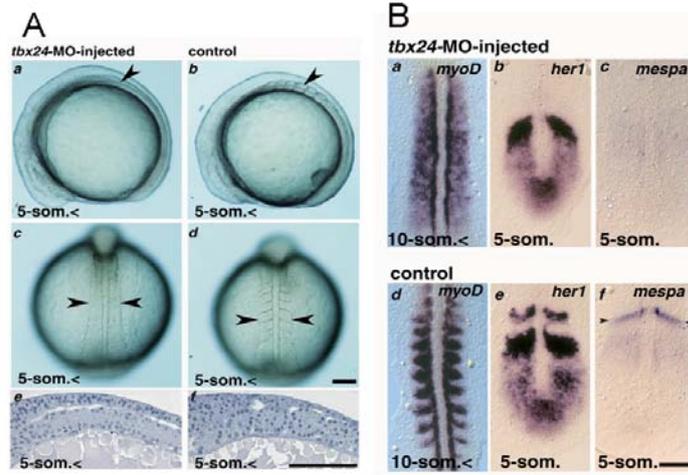


Fig. 2. Abrogation of the *tbx24* function inhibits somite segmentation. A: Injection of *tbx24* morpholino inhibits segmentation of PSM. The external morphology is shown in a–d. All embryos reached at least the five-somite stage. Arrowheads indicate the positions of the unsegmented paraxial mesoderm (a, c) or somites (b, d). Panels a and b show views of the left side. c and d show the dorsal view. The anterior is oriented to the top. e, f, Parasagittal sections, at the paraxial mesoderm level, of embryos injected with *tbx24* morpholino (e) and control embryos (f) at segmentation stage. The anterior is oriented to the left. B; Injection of *tbx24* morpholino caused loss of segmented expression of *myoD* (compare a with d), a premature termination of *her1* expression (b, e) and loss of *mespa* expression in PSM (c, f). Flat-mounted embryos are shown, and the anterior is oriented to the left. Scale bars, 100 μ m.

tbx24 の連鎖解析と *fss* のレスキュー実験

tbx24 が *fss* の変異遺伝子である可能性を探るために、どの遺伝子座にマッピングされるか、連鎖解析を行った。その結果、*tbx24* 遺伝子は *fss* と同じ遺伝子座にマッピングされた。そこで、*fss* の *tbx24* ゲノム遺伝子を単離し、その配列を解析したところ、片方のアレルでは1塩基の欠損が、もう一方のアレルでは2

塩基の置換が起こっており、共に断片的なタンパク質しか作られないことが分かった。そこで、*fss* の受精卵に *tbx24* のゲノム遺伝子を注入してレスキュー実験を行ったところ、体節の分節が起こるようになった。また、*myoD* 及び *fgf8* の発現を見たところ、正常に近い発現が見られた (Figure 3 参照)。以上のことから *tbx24* は *fss* の変異遺伝子にであることが明らかになった。

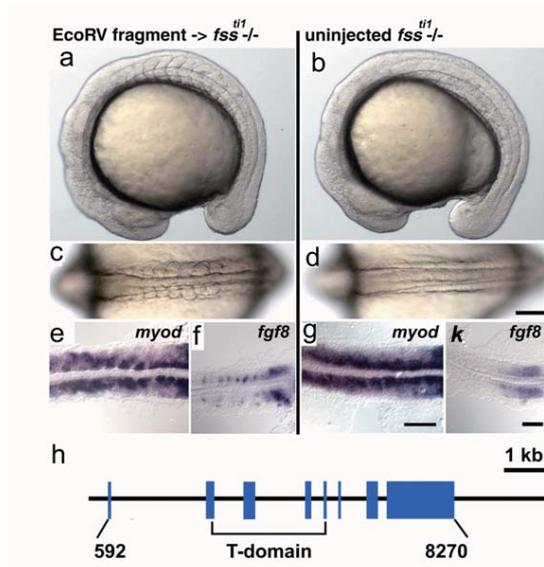


Fig. 3. *tbx24* can rescue *fss* phenotype. The *EcoRV* fragment containing *tbx24* can rescue the *fss* phenotype at the morphological (compare a, c with b, d) and molecular levels (e–k). The segmented expression patterns of *myoD* and *fgf8* are partially rescued (e and f, respectively), but they are lost in the mutant embryos (g and k, respectively). h, Distribution of the open reading frames encoding Tbx24 in the *EcoRV* fragment. Panels a and b show the left-side view, anterior to the left; c and d show the dorsal view, anterior to the left; e–k show flat-mounted embryos, anterior to the left. Scale bars, 100 μ m.

tbx24 による分節制御機構

未分節中胚葉領域で幅広く発現する *tbx24* が、どの様に体節の分節を制御しているかは極めて興味を持たれるところである。*tbx24* と未分節中胚葉で発現移動を起こす *her1* 及び、分節を制御する核タンパク質の *mespa* の発現様式の比較を行った。その結果、*her1* と *mespa* の最も前方の発現は、*tbx24* の未分節中胚葉領域における発現の前方領域に一致していた (Figure 4 参照)。このことによって、*tbx24* が *her1* と *mespa* の前方領域における発現を制御することによって、分節を制御している可能性が考えられた。次に、*tbx24* の発現領域の近くで *fgf8* が発現していること、*fgf8* によっても体節の分節が制御されていることから、*tbx24* が *fgf8* による発現制御を受けている可能性が考えられる。そこで、*fgf8* を浸透させたビーズを *tbx24* の前方

発現限界領域に移植したところ、*tbx24* の発現が前方まで発現するようになることを観察した。次に、*fgf8* の化学アンタゴニストである SU-5402 で処理したところ、*fgf8* 及び *tbx24* の発現共に発現抑制されていることが観察された (Figure 5 参照)。このことは、*fgf8* によって *tbx24* の発現が制御されていることを示唆する。そこで、*fgf8* の突然変異体である *ace* における *tbx24* の発現を見た。その結果、8 体節期までは *tbx24* の発現はみられたが、その後は *tbx24* の発現が見られなくなった (Figure 6)。これまでの研究から、8 体節期までの初期胚では、胴尾部オルガナイザー領域で *fgf8* と同時に *fgf24* も発現していることが知られている。そのため、*ace* の初期胚においては *tbx24* は *fgf24* によって発現が誘導され、その後は *fgf8* によって発現が誘導される可能性が示唆される。

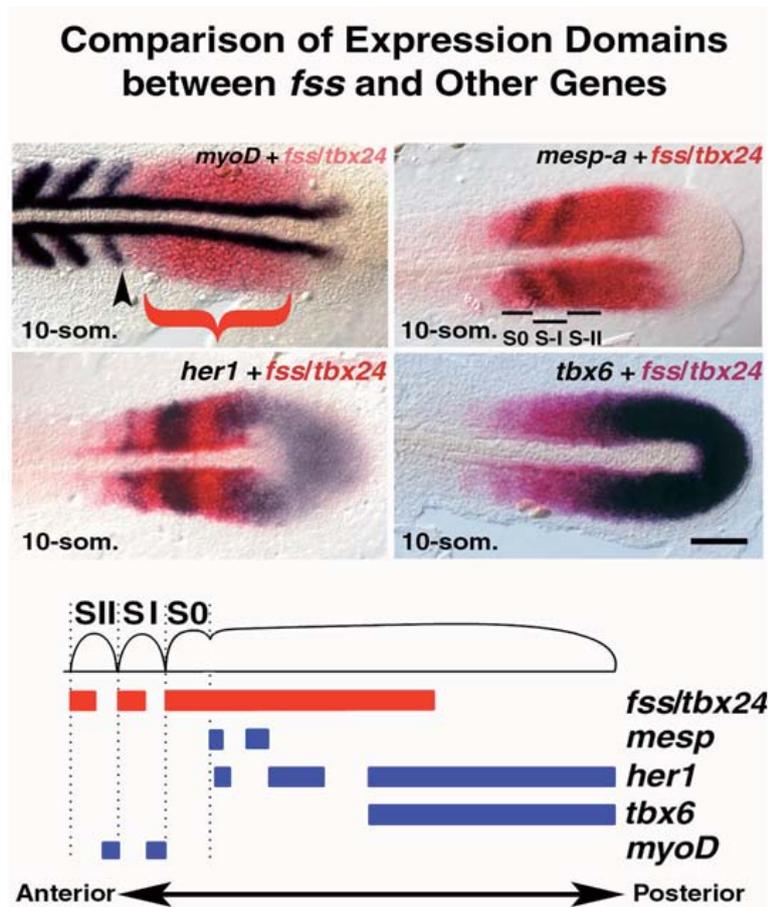


Fig. 4. Comparison of expression pattern between *tbx24* and other genes expressed on PSM. The gene *tbx24* is expressed in maturing PSM cells (a-d). Comparison of the expression domain of *tbx24* (red) with those of *myoD* (a), *mespa* (b), *her1* (c), and *tbx6* (d). The expression domains of *mespa* (b) and anterior stripes of *her1* expression (c), which are depend on *Fss* function, reside within the *tbx24* expression domain. Flat-mounted samples (a-e) are shown; the anterior is oriented to the left. 5 represents the forming somite. e, Schematic illustration showing the expression pattern of genes examined above. Scale bars, 100 μ m

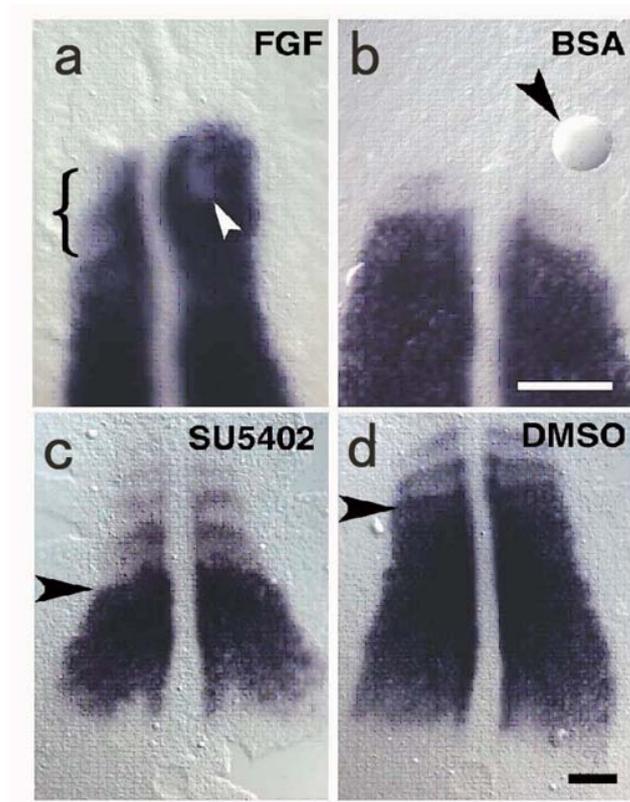


Fig. 5. *tbx24* is positively regulated by FGF signaling. The bases, incubated with FGF8 and BSA, were buried in the PSM of a zebrafish embryo at the one-somite stage. These embryos reached the five-somite stage and their *tbx24* expressions were analyzed. **a**, the expression domain of *tbx24* extended in an anterior orientation with respect to FGF. The white arrow head indicates the buried base incubated with FGF. **b**, BSA did not have an effect on the expression domain of *tbx24*. Arrow head shows the buried base incubated with BSA. **c**, **d**: Pre-somitogenic stage zebrafish embryos were treated with SU5402, an FGF signal inhibitor, or DMSO, and developed to the five-somite stage. **c**, SU5402 inhibited *tbx24* expression. **d**, DMSO did not affect the expression domain of *tbx24*. The arrow head shows the anteriormost expression of *tbx24* in PSM. The anterior is oriented to the top. Scale bar, 50 μ m

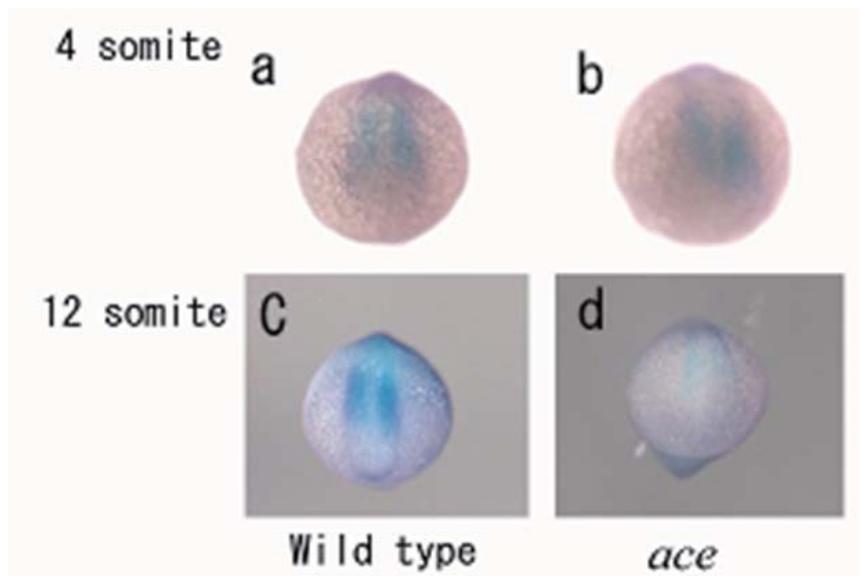


Fig. 6. Expression of *tbx24* in *ace* mutant embryos. **a**, **c**; *tbx24* expression domain in wildtype embryos at four-somite stage (**a**) and 12-somite stage (**c**). **b**, **d**; *tbx24* expression domain in *ace* mutant embryos at four-somite stage (**b**) and 12-somite stage (**d**). *ace* mutant embryos produced only anterior eight somites. After the eight-somite stage, *ace* mutant embryos expressed *tbx24* very weakly. The anterior is oriented to the top

tbx24 の下流にくる遺伝子の同定

tbx24 の遺伝子の下流に来る遺伝子を同定するため、*fs* と AB ラインのゼブラフィッシュの体節形成期の胚よりタンパク質の抽出を行い、2次元電気泳動により発現に差が見られるタンパク質の同定を試みた (Figure 7) 。その結果、発現に差が見られるいくつかのタンパク質が同定された。その一つのタンパク質の断片化を行いイオン化質量分析計を用いて、アミノ酸配列の解析を行った。そのアミノ酸配列を基に DNA 配列を想定し、これらの配列をゼブラフィッシュのゲノム配列上に貼り付けてゆくことによって、1カ所に貼り付けられる可能性を検討した。その結果、第12連鎖群上の1カ所に多くの配列が張り付くことが分かった。そこで、その配列をもとにプライマーを設計

し、体節形成期の胚の mRNA から合成した cDNA をもとに PCR 反応を行い、尾部末端で発現する2つの遺伝子を得ることが出来た。その配列から1つはニワトリの IL4 と最も相同性のある遺伝子であった。そこで、RT-PCR により発現している時期及び発現している組織の同定を行った。その結果、この遺伝子は初期においては体節形成期に作られた直後の体節の後方部で発現すること、*tbx24* の突然変異体である *fs* の胚では発現しないこと、また、成魚においては筋肉で発現していることが明らかになった (Figure 8 参照)。IL4 に配列が似ているにも関わらず、脾臓などリンパ球が分化する組織での発現が見られなかったため LPS をゼブラフィッシュの成魚に注射し、一定時間毎に脾臓を取り出して発現を調べたが、発現が誘導されることはなかった。

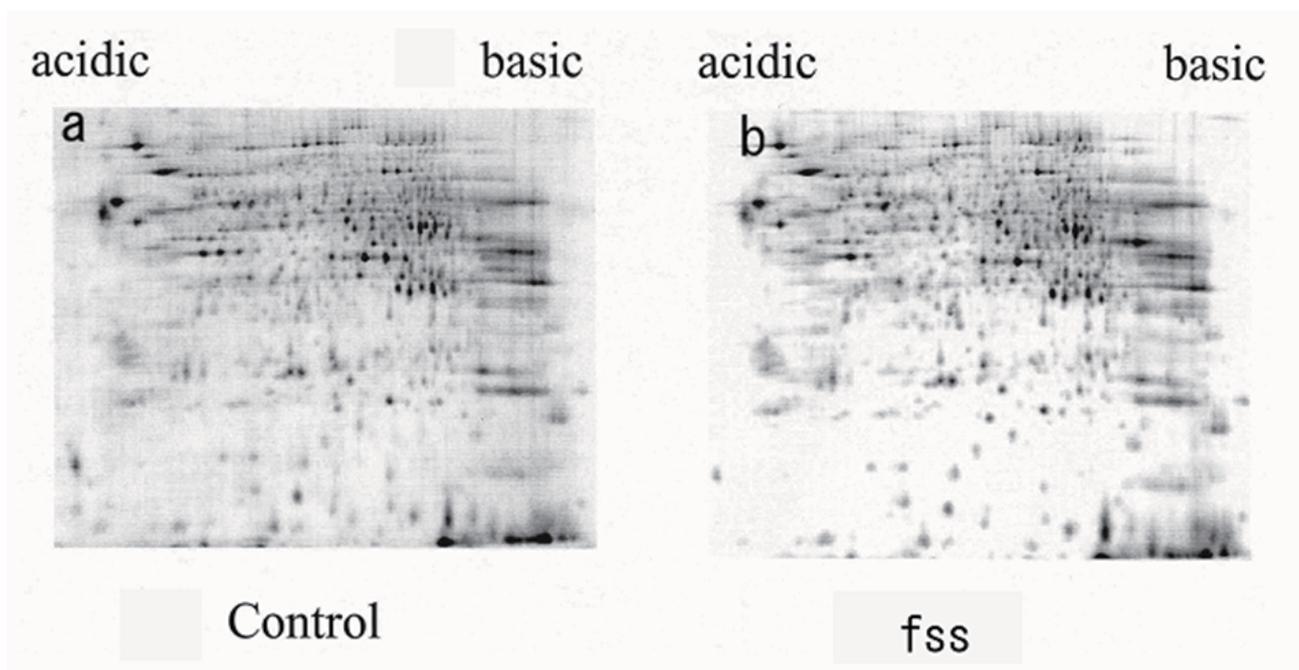


Fig. 7. Two-dimensional electrophoresis of extracts of somite-stage embryos. We examined the extracts of control (a) and *fs* mutant (b) embryos at the somite generation stage by two-dimensional electrophoresis.

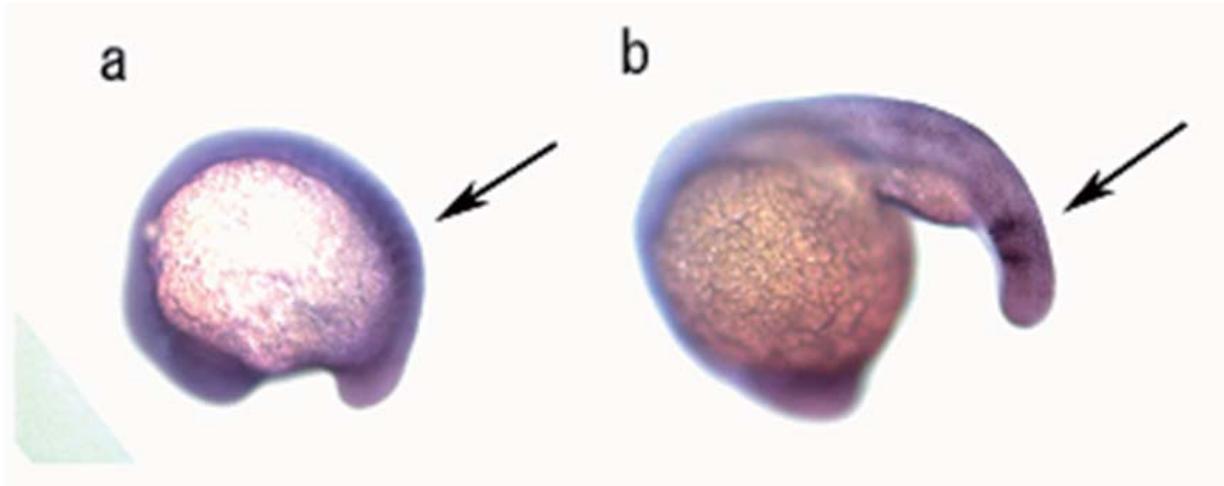


Fig. 8. Expression pattern of IL4-like protein 6. The IL4-like protein 6 gene was expressed in the anterior region of each somite before the eight-somite stage (a). After that, the IL4-like protein 6 gene was expressed in two posteriormost somites (b). The arrows indicate the expression of the IL4-like protein 6 gene.

おわりに

我々は、尾部特異的に発現する遺伝子の単離から新規の *T-box* 遺伝子である *tbx24* を得た。本遺伝子は中胚葉誘導後に胚田周部で発現を開始し、体節形成が終わるまで尾部末端で発現する遺伝子で、体節の分節を起こさないゼブラフィッシュの突然変異体 *fs* の変異遺伝子であった。*tbx24* の発現を抑制すると *her1* や *myod* の発現様式が影響を受け、*mespa* の未分節中胚葉領域の前方部での発現が抑制されることから、これらの遺伝子の発現制御を通じて体節の分節化に関与すると考えられる。また、*fgf8* 遺伝子の異所的発現や発現抑制によって *tbx24* の発現がそれに応じて異所的発現を行ったり、発現抑制されること、*fgf8* の突然変異体である *ace* では8体節形成後に *tbx24* が発現していないことから *tbx24* は *fgf8* によって発現誘導すると考えられる。また、タンパク質の発現解析から *tbx24* の下流に IL4 様遺伝子が発現することを同定した。

今後、*tbx24* の下流に来ると考えられる IL4 様遺伝子と体節形成との関係を調べる必要がある。また、*tbx24* の下流に来るより多くの遺伝子の同定を行い、どのような分子機構で *tbx24* が体節の分節を誘導するのかを解明してゆく予定である。

文 献

- Fisher S., Jagadeeswaran, P. and Halpern M.E. 2003: Radiographic analysis of zebrafish skeletal defect. *Dev. Biol.*, **264**, 64-76.
- Fleming A., Keynes R. and Tannahill D. 2003: A central role for the notochord in vertebral patterning. *Development*, **131**, 873-880.
- Horikawa K, Ishimatsu K, Yoshimoto E, Kondo S, and Takeda H. 2006: Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature*, **8**, 441, 719-723.
- Julich D, Hwee Lim C., Round J., Nicolaije C., Schroeder J., Davies A., Geisler R., Lewis J., Jiang Y.J. and Holley S.A., 2005: Tubingen 2000 Screen Consortium Beamter/deltaC and the role of Notch ligands in the zebrafish somite segmentation, hindbrain neurogenesis and hypochord differentiation. *Dev Biol*, **15**, **286**, 391-404.
- Kii I., Amizuka N., Shimomura J., Saga Y. and Kudo A., 2004: Cell-cell interaction by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cell into the cells of the osteo-lineage and the chondro-leanage. *J. Bone Miner Res.* **19**, 1840-1849.
- Mattey D.L., Dawes P.T., Nixon N.B. and Slater H., 1997: Transforming growth factor beta 1 and interleukin 4 induced alpha smooth muscle actin expression and myofibroblast-like differentiation in human synovial fibroblasts in vitro: modulation by basic fibroblast growth factor. *Ann Rheum Dis.* **56**, 426-31 (1997).
- Nagano, N., Hozawa A., Fujii W., Yamada T., Miyake K., Sakakura Y. and Hagiwara A., 2007: Sketal development and deformities in cultured laval and juvenile seven-bond grouper, *Epinephelus*

septemfasciatus (Thunberg) . *Aquac. Re.*, **38**, 121-13.

Nikaido, M., Kawakami, A., Sawada, A., Furutani-Seiki, M., Takeda H. and Araki K., 2002: Tbx24, encoding a T-box protein, is mutated in the zebrafish somite-segmentation mutant fused somites. *Nat. Genet.*, **31**, 1995-199.