The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ゼブラフィッシュ骨形成においてConnexin43は、脊椎と鰭骨で異なるメカニズムで関与する
Author(s)	三須, 晃裕
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56103
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

2015 年度　博士論文

タイトル

ゼブラフィッシュ骨形成において Connexin43 は、脊椎と鰭骨で異なるメカニズムで関与する

英語タイトル

Two functionally different mechanisms of connexin43 in the bone growth of vertebrae and fins in zebrafish

所属

大阪大学大学院生命機能研究科　時空生物学講座・パターン形成研究室

氏名

三須　晃裕

修了年月

平成 28 年 3 月 31 日

Abstract

Shape of skeleton is maintained suitably during body growth for supporting body and movement in vertebrate. However, a mechanism which controls bone shape optimally during body growth is still unknown. To elucidate how bone growth is controlled, I focused on a zebrafish mutant *steopsel*^{tl28d} (*stp*).

The *stp* is a dominant mutant and was isolated in the large-scale screen of zebrafish mutants induced by ENU in 1996. *stp*/*stp* is lethal. *stp*/+ fish had no defect at larval stage (~30 day) but showed short spine and short fin ray segments at adult stage. MicroCT scanning revealed that there was no fused vertebrae and decrease of number of vertebrae, but anterior-posterior length of centrum were short. To reveal when centrum malformation occurred, I investigated the time course of centrum growth. It revealed that short centrum appeared at adult stage (2 month) and the centrum phenotype was more intense at old fish than young fish, suggesting that *stp* centrum phenotype was specific in bone growth defect.

I performed positional cloning and identified a critical region of 460 kb in chromosome 20. The region cords *connexin43* (*cx43*) which had an amino acid substitution of 78th tryptophan to leucine.

The Connexin protein is a four-pass transmembrane protein and a component of gap junction and hemichannel. Six Connexins make a hemichannel and two hemichannels on opposite cells dock and form a gap junction.

To confirm that the mutation in *cx43* is responsible for the *stp* phenotype, I knocked out the *stp* allele of *cx43* using TALEN. As *stp* is a dominant mutation, knockout of the *stp* allele in *stp*/+ fish should rescue the phenotype. The *stp* KO fish (*stp*KO/+) did not show any difference in centrum structure compared to wild type siblings. This result confirmed that the mutation in *cx43* is responsible for the *stp* phenotype.

Interestingly, *cx43* is also known as the gene causing *short fin* (*sof*) mutant which shows short fin ray segments, but the vertebrae are normal. Comparison of two mutants showed that those phenotypes were clearly different. I built up a hypothesis that this phenotypic difference was concerned with functions of gap junction and hemichannel

made by Cx43 mutants, Cx43W78L (Cx43^{stp}) and Cx43P191S (Cx43^{sof}).
To find a functional difference between Cx43^{stp} and Cx43^{sof}, I expressed Cx43 exogenously at *Xenopus* oocyte and performed electrophysiological analysis of the mutants. Electrophysiological analysis showed that gap junction coupling induced by both Cx43^{stp} and Cx43^{sof} was reduced compared to Cx43-WT. On the other hand, in hemichannel activity, only Cx43^{stp} indicated very high current (50 × wild type). These data suggested that low gap junction activity caused short fin ray segments: high hemichannel activity caused short vertebrae. Together, my study suggest that Cx43 plays critical and diverse roles in bone growth of zebrafish.

要旨

脊椎動物の骨格は体の成長に伴って大型化するが、その過程でも、体格を支える重要な役割を担うために、適切な形に維持し続ける。これには複雑な制御機構が必要と思われるが、成長に伴って骨の形を適切に維持するメカニズムは知られていない。この疑問を解き明かすために、我々は *stoepsel*^{dtl28d}(*stp*)ゼブラフィッシュ変異体に着目した。
stp 変異体は 1996 年に大規模スクリーニングによって作成されたドミナントな変異体である。*stp*/+変異体は幼生では野生型と見分けがつかないが、成体では脊椎がかなり短くなり、鰭骨（鰭の骨）も若干短縮する。Ｘ線ＣＴ等により骨の形態を観察した結果、*stp* では、椎骨の融合や数の減少は起こっておらず、個々の椎骨の形が頭尾軸方向にのみ短いことで生じていた。また、椎体形状の短縮は魚が成熟してから徐々に顕著になるため、成長時に特異的な変異である。次に *stp*/+個体同士の掛け合わせにより *stp*/*stp* 個体を作成した所、これらは受精後 2 週間で致死となることがわかった。
stp 変異体の掛け戻しによるジェノタイピングにより、原因遺伝領域を 20 番染色体の 460kb 内に絞り込んだところ、その領域内にコードされているコネキシン 43 (*cx43*)遺伝子にトリプトファンがロイシンに変わるアミノ酸変異が起きていることが明らかになった。
cx43 はコネキシンタンパク質の一種で、4 回幕貫通型の膜タンパク質であり、6 量体となりヘミチャネルを形成する他、2 細胞間のヘミチャネルが結合すること

でギャップジャンクションを形成する。

cx43 が *stp* 変異体の原因遺伝子であることを確かめるために、TALEN を用いて *cx43* 遺伝子の *stp* allele をノックアウトする実験を行い、*stp*KO/+個体を作成した。この *stp*KO/+個体は *stp*/+兄弟と異なり、椎体の形状が正常に発生することが確認された。

また、*stp*/*stp* の致死性も、*cx43* を導入した Tg(*cx43*)*stp*/*stp* トランスジェニックフィッシュを作成した所、この個体は成体まで成長することが確認された。

これらの実験から、*cx43* が *stp* 変異体の原因遺伝子であることを確かめた。

cx43 はゼブラフィッシュ変異体 *short fin*(*sof*)の原因遺伝子としても知られるが、不思議なことに、*sof* は短い鰭を示すが椎骨は正常である。そこで 2 つの表現型の違いの原因を突き止めるために電気生理解析により $Cx43^{stp}$ と $Cx43^{sof}$ の機能解析を行った。

その結果、$Cx43^{stp}$ と $Cx43^{sof}$ は共にギャップジャンクション機能の低下を示したが、ヘミチャネル機能は $Cx43^{stp}$ のみで異常な電流上昇が見られた。このことから、ギャップジャンクション機能の低下は鰭骨形状の短縮を、異常に高いヘミチャネル特性は、鰭骨には影響せず、椎骨形状の短縮化の原因となることが示唆された。

椎骨と鰭骨は形成過程に大きな違いがある。椎骨の形状は大部分が骨成長によって形作られるのに対して、鰭骨の形状は鰭の先端に付加される形で骨沈着する際に決まる。このような違いを考慮すると、stp 変異体ではヘミチャネルの亢進が椎体の付加成長を阻害している可能性がある。また、本研究結果は cx43 が複数の経路で骨形成過程に関与しているという新たな知見を示すものである。

目次

Ⅰ章　研究背景

Ⅱ章　材料と方法

1 節　ゼブラフィッシュの系統と管理

2 節　トランスジェニック系統の作成

ｉ．トランスジェニック ***Tg*(*cx43*pro-mCherry)**の作成

ⅱ．トランスジェニック ***Tg*(*cx43*pro-*cx43*; *stp/stp*)**の作成

3 節　透明標本の作製

4 節　**X** 線 **CT** スキャナーによる **3D** 骨格画像の撮影

5 節　ポジショナルクローニングと遺伝子配列の解析

6 節　**TALEN** を用いた ***cx43*** ノックアウト

7 節　アリル間の遺伝子発現量比較

8 節　**Voltage clamp** 法による電気生理解析

ｉ．**cRNA** の準備と **Xenopus** 卵母細胞へのインジェクション

ⅱ．ギャップジャンクション測定

ⅲ．ヘミチャネル測定

Ⅲ章　結果

1 節　***stoepsel*^{tl28d}** ゼブラフィッシュ変異体の表現型の解析

2 節　ポジショナルクローニングによる原因遺伝子の絞り込み

ｉ．**Cx43**^{W78L} 変異体と椎骨における ***cx43*** 遺伝子発現

3 節　**TALEN** による **Cx43**^{W78L} ノックアウト

4 節　***stp*/*stp*** 稚魚の致死性と ***cx43*** 導入による致死性の回復

5 節　***cx43*** のもう一つの変異体 ***short fin***

6 節　**Voltage clamp** 法による **Cx43** 変異体の機能解析

ｉ．ギャップジャンクション測定結果

ⅱ．ヘミチャネル測定結果

Ⅳ章　考察

1 節　結果のまとめと考察

ｉ．***cx43*** のアリル間の表現型の違いと **Voltage clamp** 結果との関連について

ⅱ．骨組織における **Cx43** の働きと ***stp*/+**個体の椎骨短縮の原因について

ⅲ．***stp***、***sof*** の研究はヒト遺伝病 **ODDD** の骨異形成の原因解明に貢献する

2 節　今後の展望と課題

Ⅰ章　研究背景

脊椎動物にとって骨格は生体を支える重要な器官である。種ごとに異なる生態を実現するために骨の形は種特異性が非常に高く、しかも、極めて正確に作られている。そのため骨の形は博物学者にとって種を特定するための重要な証拠となる。また、骨の大きさは、成長時も体の大きさに比例し、体格を支えるために適切に大型化され、維持される。骨の大型化は骨表面や骨端にリン酸カルシウムと共に骨基質が沈着することによって行われるが、一定の形を保ちながら大型化するためには面ごとに正確な沈着量の制御が必要である。もし骨面全体に等量の骨沈着が起こる場合、骨の形は徐々に球形に近づき、機能を失ってしまう。そのため、一定の形を保ちながら骨が成長するためには骨沈着量を正確に制御しながら骨形成が行われる必要がある。

ここ数十年に渡る研究は、骨形成を行う細胞の働きを明らかにしてきた。骨は主に複数の細胞とヒドロキシアパタイト沈着を伴う細胞外マトリクスによって構成される。細胞は骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞の 3 種類が存在し、これらの細胞の相互作用によって骨のリモデリングが起きている。
骨芽細胞は骨表面に多く分布し石灰化により骨を作る細胞である。骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化し、分化には Runx2、Osterix、Msx2(muscle segment homeobox 2)、Dlx5(distal-less homeobox 5)、Dlx6 などの転写因子、転写制御因子が関与していることが知られている (1)。骨芽細胞は成熟してゆくにつれて type1 collagen、fibronectin、alkaline phosphatase、bone sialoprotein、osteocalcin などの骨基質タンパクを生産し骨沈着を行う (2, 3)。
骨細胞は骨のマトリクスに埋没した骨芽細胞が分化した細胞で骨に掛かる圧力を検知していると考えられている。骨細胞は細胞突起が発達しており、多数の突起を骨基質中に伸ばして隣接する骨細胞や骨芽細胞とギャップジャンクション結合で連結している (4, 5)。実際に骨芽細胞・骨細胞にはギャップジャンクションを構成するコネキシン 43 (Cx43)が発現しており、骨細胞における Cx43 の損失は破骨細胞形成を促進することが示唆されている (6)。また、骨細胞はメカニカルストレスに対する応答性能が高く、実際に shear stress 応答では Cx43 のヘミチャネルが関与していることが示されている (7, 8)。また、骨細胞は DMP1

(dentin matrix protein 1)を特異的に発現しており、メカニカルストレスに応じてDMP1 の発現が上昇することが知られている (9)。これらのことから、骨細胞は骨に掛かる圧力を細胞表面で感知して様々な応答を行っていることが解る。
破骨細胞は骨吸収を行う細胞で、骨の不要な部位を削る働きをする。破骨細胞は単球・マクロファージから分化し、M-CSF(macrophage colony stimulating factor)/c-Fms、RANKL/RANK が重要な分化誘導経路であることが知られている。M-CSF は骨芽細胞から産生され、破骨前駆細胞の c-Fms に結合することで分化を促進する。また、骨芽細胞の産生する RANKL も同様に破骨前駆細胞の RANK に結合することで破骨細胞への分化を促進する (10)。To らは RANKL の過剰発現によって破骨細胞が増進し骨粗しょう症様の表現型が現れることを報告している (11)。一方で、骨芽細胞は osteoprotegerin(OPG)も産生している。OPG は RANKL に結合することによって RANKL/RANK 間の結合を阻害し、破骨細胞分化を抑制する。これらのことから、破骨細胞の働きは RANKL と OPG のバランスによって制御されていることがわかる。

このように骨の形成過程に関しては多くの分子とその機能が同定されてきたが、その一方で、骨の独自性の高い形がどのようにして決まるのかに関する情報はこれまで少なかった。骨の形を決めるメカニズムに迫ろうとする研究は、漸く、近年盛んになりつつあり、いくつかの論文が骨の形の特徴を決める遺伝領域や組織的特徴について報告している。
例えば、Schoenebeck らは犬の頭骨形態の多様性がどのように遺伝的に制御されているのかを網羅的手法で調べており、いくつかの量的形質遺伝子座(QTL)が頭蓋の形に関与していることを指摘している (12)。また、Catia らもマウスの頭蓋骨の形態的変化と遺伝子領域の保存性を報告している (13)。Kimberly らは長い脚を持つトビネズミに着目し、軟骨細胞層の肥大化が特徴的な長い大腿骨の形成と関係していることを指摘している (14)。骨の形を決めるメカニズムが未だに発展途上である原因は、形が変化する変異体を用いた研究例が少なかったことが挙げられるが、脊椎動物に属するモデル生物であるゼブラフィッシュを用いた実験により、その空白が埋められると期待されている。
例えば、ゼブラフィッシュを用いた研究では鰭を支える骨 lepidotrichia が連なった構造 (鰭条)の形態研究が盛んであり、Iovine らは *short fin* ゼブラフィッシュ変

異体を用いて、*cx43* の異常によって鰭条の長さが短くなることを報告している (15)。また、Simon らは *another longfin* ゼブラフィッシュ変異体を用いて *kcnk5b* の異常が長い鰭条を引き起こすことを示している (16)。また、Tyler らは、*indian hedgehog a* の変異によってゼブラフィッシュの主鰓蓋骨の形成異常が生じており、主鰓蓋骨の淵の骨成長が特異的に変化していたことを報告している (17)。このように魚類を使った研究では骨の形が変化する変異体を扱っている例が増えつつある。また、ゼブラフィッシュは幼生期から青年期にかけて体の透明度が高いこと、生体のまま骨染色が可能であることから骨観察が容易で、多くの変異体が作成されているためライブラリも豊富 (18)であるなど、骨の形を研究するのに極めて適していると言える。しかしながら、一方で、研究の多くが主鰓蓋骨や鰭条など、陸上の脊椎動物には存在しないものであることに若干の不満がある。そこで私はゼブラフィッシュ変異体の中でも脊椎動物に共通する骨が変形する個体を調べることで、骨の形に関与するより中枢的かつ普遍的な因子を特定できるのではないかと考えた。

ゼブラフィッシュでは、骨に異常のある変異体が多数分離されているが、今回の研究で解析する変異体を選定するにあたり、幼体において骨沈着が始まるまでの発生が正常であることを条件とした。幼生において異常が見られる場合は骨沈着前の前駆組織の異常と区別することができないためである。例えばメダカ変異体の *fused centrum* では脊索の形成異常が脊椎の変形・融合という形で現れる (19)。この点を踏まえてゼブラフィッシュの変異体を探し、*steopsel*^{tl28d} (*stp*) 変異体に着目した。*stp* 変異体は 1996 年に ENU による変異体の大規模スクリーニング実験によって得られた変異体であり、成体においてのみ脊椎に異常を示すことが報告されている (20)。*stp* 変異体では、幼生では野生型と区別がつかず、受精後約 2 か月以上の個体において短い椎骨を示すので、骨の成長に伴い形態を維持する機構に変異があると推定できる。そこで、*stp* 変異体の原因遺伝子の特定から研究を開始した。
本研究は、骨の形状が変化する *stp* 変異体の原因遺伝子が *cx43* であることを証明し、同一遺伝子による別変異体(*sof* 変異体) との表現型の比較と、それぞれの Cx43 変異体の機能解析から、*cx43* が骨の形成過程・成長過程において複数の異なる働きを持つという新たな知見を示唆するものである。

Ⅱ章　材料と方法

１　ゼブラフィッシュの系統と管理

本研究における実験は大阪大学動物実験規定(認可番号：FBS-14-002-1)に則り行われた。ゼブラフィッシュは野生型として Tu と AB を使用した。*stoepsel*^{tl28d} (*stp*) 変異体は Max Planck Institute の Hans Georg Frohnhöefer 教授から供与を受けた。*stp* は TE バックグラウンドの変異体である。TE は Tu と TL の交雑によって作られた系統である。そこで本研究では *stp* 系統の維持に TE の代わりに遺伝的に近い Tu を使用した。*short fin*^{b123} (*sof*) 変異体は Lehigh University の Iovine 教授から供与を受けた。*sof* は AB バックグラウンドの変異体である。ゼブラフィッシュは 14 時間の明状態と 10 時間の暗状態の 24 時間サイクルで飼育した。

２　トランスジェニック系統の作成

Tol2 トランスポゾンを用いた遺伝子組み換え法を用いてトランスジェニックの作成を行った。プラスミド pT2AL200R150G (30)を使用し、Tol2 認識配列に挟まれるように以下に述べる導入配列をそれぞれ組み込んだ。導入配列は Tol2 トランポザーゼの働きによってゲノム中に転移する。導入配列のゲノム中への転移は F1 系統において導入配列特異的に増幅されるプライマーセットを用いて確認した。

ｉ．トランスジェニック *Tg*(*cx43*pro-mCherry)の作成

椎骨における *cx43* の発現部位を確かめるために、*cx43* プロモーター下で発現する mCherry レポートトランスジェニック系統の作成を行った。*cx43* プロモーター配列は BAC クローン(DKEY-261A18)からフォワードプライマー 5’-CCGGCTCGAGGCTTAAAGGGTCACGAAACACC-3’ とリバースプライマー 5’-GGCCGGATCCTTGAGGGAGTTCTAGCTGAAAATA-3’ を用いて *cx43* コーディング領域の上流 6390bp を増幅することで得た。次に *cx43* プロモーター配列の下流に蛍光タンパク質 mCherry のコーディング領域を挿入して導入配列とした(図１)。

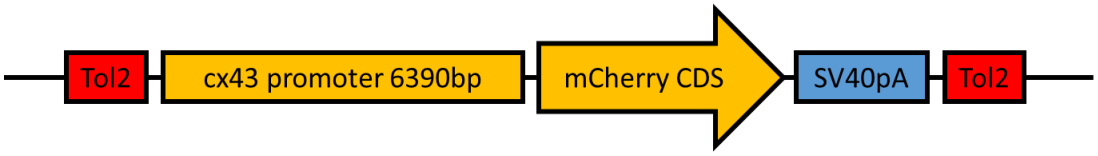

図１. ***Tg*(*cx43*pro-mCherry)**作成に使用した **Tol2** プラスミドの設計

ⅱ. トランスジェニック ***Tg*(*cx43*pro-*cx43*) *stp*/*stp*** の作成

stp ホモ結合体(*stp*/*stp*)における致死性のレスキュー実験を行うため、外因性 *cx43* 遺伝子を導入した *stp*/*stp* トランスジェニック系統の作成を行った。*cx43*CDS とその上流 7632bp を BAC クローン(DKEY-261A18)からフォワードプライマー5'-GCTCGAGTCTATGAATGGGATGAG-3' とリバースプライマー 5'-GGGCGGCCGCTAGACGTCCAGGTCATCAG-3'を用いて増幅して導入配列とした(図２)。

図２. ***Tg*(*cx43*pro-*cx43*)*stp*/*stp*** 作成に使用した **Tol2** プラスミドの設計

３　透明標本の作製

透明標本の作製は特に明記の無い限り室温で行った。まず、サンプルは皮膚と内臓を取り除き固定液 (3.7%ホルムアルデヒド, PBS) で 1 日固定する。その後脱脂のため徐々に濃度を上げながらエタノール溶液に置換する (25%EtOH, PBS 1 日 ->50%EtOH, PBS 1 日->75%EtOH, PBS 1 日->100%EtOH 1 日) 。次に脱脂と逆の手順で PBS 溶液へ置換する (75%EtOH, PBS 1 日->50%EtOH, PBS 1 日->25%EtOH, PBS 1 日->PBS 1 日) 。次に四ホウ酸ナトリウム飽和水溶液に 1 日浸透させた後、組織透明化のためにトリプシン溶液 (30%四ホウ酸ナトリウム飽和水溶液, 3mg/ml トリプシン, PBS) に漬け 48℃で一晩インキュベートする。次に骨染色を行うため、アリザリンレッド染色溶液 (90mM KOH, 50ug/ml アリザリンレッド S, PBS) で 1 日染色する。その後 90mM KOH, PBS 溶液に 1 日漬けたのち、徐々に濃度を上げながらグリセロール溶液に置換し保存した (25%グリセロール, PBS 1 日; 50%グリセロール, PBS 1 日; 75%グリセロール, PBS 1 日;

100%グリセロールで保存) 。

４　X 線 CT スキャナーによる 3D 骨格画像の撮影

サンプルは皮膚と内臓を取り除き固定液 (3.7%ホルムアルデヒド, PBS) で 1 日固定した。その後 PBS で一度洗浄した後 PBS 中で保存した。撮影時はサンプルを撮影用ホルダーに乗せ、空気中で撮影した。CT 画像の撮影は大阪バイオサイエンス研究所の LaTheta LCT-100、島津製作所の inspeXio SMX-100CT をお借りして行った。

５　ポジショナルクローニングと遺伝子配列の解析

stp は TE バックグラウンドの変異体である。そこで TE と遺伝的に離れた AB 系統と *stp* の間で DNA 配列を比較することによりポジショナルクローニングを行った。まず、*stp* 個体 (F0) と AB 個体 (F0) を掛け合わせ、得られた *stp* 個体 (F1) を AB 個体 (F0) に掛け戻した。こうして得られた *stp* 個体 (F2) は減数分裂時の遺伝子座の組み換えによりある確率で２つの遺伝子座が AB 個体 (F0)由来となる。しかし原因遺伝子を含む領域は常に *stp* 個体 (F0)由来を含む。

そこで *stp* 個体 (F2)の DNA 配列を *stp* 個体 (F0) と AB 個体 (F0) と比較し、どちらの親の遺伝子領域が受け継がれているか特定した。まず表 1 に示す SSLP マーカーを用いて *stp* 由来の確率が高い染色体を調べたところ、20 番染色体に高い確率で *stp* 由来となる遺伝領域があることを突き止めた。次に、一塩基多型(SNP)をシーケンサー (3130xl Genetic Analyzer)を用いて比較し、染色体 20 番の 40.55Mb～41.01Mb 間に絞り込んだ。最終的な原因遺伝領域の特定に使用した SNP マーカーの一覧を表 2 に示す。遺伝子予測は Sanger Institute の Ensembl を使用した。

1番染色体	2番染色体	3番染色体	4番染色体	5番染色体	6番染色体	7番染色体	8番染色体	9番染色体	10番染色体	11番染色体	12番染色体	13番染色体
Z4593	Z4278	Z3929	Z10983	Z3314	Z15448	Z191	Z20106	Z20860	Z6427	Z3952	Z7576	Z5643
Z3705	Z22747	Z1185	Z1525	Z11496	Z1701	Z10785	Z8770	Z10130	Z9208	Z3362	Z4568	Z9951
Z5508	Z13620	Z3439	Z20533	Z8921	Z880	Z8252	Z4956	Z6268	Z7262	Z13411	Z6920	Z6104
Z6974	Z13475	Z9257	Z9920	Z6614	Z10914	Z10441	Z11001	Z4673	Z8146	Z6909	Z1473	Z6259
Z1351	Z13521	Z10934	Z6908	Z20915	Z11919	Z1059	Z22270	Z4168	Z3835	Z13395	Z22103	Z17223
Z9704	Z7358	Z17222	Z11250	Z5538	Z13614	Z8156	Z6867	Z10789	Z11911	Z4353	Z8450	Z6657
Z6802	Z6818	Z7486	Z20450	Z22250	Z9230	Z1239	Z1052	Z7564	Z13219	Z8032	Z10225	Z4252
Z6283	Z15410	Z20317	Z3275	Z4299	gof2	Z13880	Z8703	Z13221	Z14193	Z10727	Z1400	
Z22347		Z3100		Z1454		Z8218			Z6754	Z11160	Z1312	
Z13296				Z1813								
14番染色体	**15番染色体**	**16番染色体**	**17番染色体**	**18番染色体**	**19番染色体**	**20番染色体**	**21番染色体**	**22番染色体**	**23番染色体**	**24番染色体**	**25番染色体**	
Z1523	Z9041	Z1642	Z6010	Z11685	Z1625	Z6804	Z13719	Z11752	Z5683	Z7627	Z11092	
Z5436	gof18	Z13202	Z6454	Z7654	Z4374	Z9708	Z7405	Z9516	Z6376	Z5075	Z6924	
Z3259	Z21982	Z9881	Z22674	Z11944	Z4825	Z9334	Z7925	Z3093	Z4003	Z5413	Z13232	
Z5435	Z6895	Z6921	Z3165	Z8488	Z3782	Z10056	Z6089	Z13223	Z20039	Z23011	Z8224	
Z1257	Z21165	Z3104	Z21703	Z20605	Z3816	Z3824	Z10432	Z10321	Z5141	Z13229	Z3528	
Z9366	Z13230	Z8731	Z9692	Z8343	Z7686	Z3211	Z4425	Z9084	Z6017	Z9325	Z1213	
Z6666	Z7381	Z6984	Z381	Z9941	Z9384	Z20046	gof16	Z3286	Z10949	Z20051	Z8780	
Z11837	Z7216	Z15453	Z1928	Z6572	Z5183	Z7171	Z1497	Z4682	Z20133	Z11862	Z1431	
	Z5223	Z3126			Z1651	Z8554	Z10508					
						Z22144						

表 **1.** ポジショナルクローニングに使用した **SSLP** マーカー

遺伝領域	PCRとシーケンスに使用したプライマー	SNP		
		AB	*stp*	PCR産物におけるSNPの位置
20: 40.54	F- TCGCTATTTCCGATTTTTGG	AAAAGAC	AAACGAC	約190bp
	R- GCTCCGCTGGATGTAGAGAC	TTGAAGA	TTGGAGA	約270bp
20: 40.55	F- GTTGGTAGGTGGTCGCAGAT R- TCGGCTTCGATGACTTTCTT	TGCATTT	TGCCTTT	約438bp
20: 40.75	F- GCATGAACTTGAAGGGGAAC R- CGTTTGAAGAGCACGTAGAAG	TCTGGGT	TCTTGGT	約439bp
20: 41.01	F- CACCAAAACGACACAATTCG	GCGCCGC	GCGTCGC	約393bp
	R- ATCTGACACACCGTCAACCA	CTCCATG	CTCTATG	約409bp
20: 41.25	F- CAGAACACTGCTGCCACATT R- AGGTCAGGTGACCCATCTTG	AATGCAC	AATACAC	約144bp

表 **2.** 原因遺伝領域周辺の **SNP** マーカー

6 TALEN を用いた *cx43* ノックアウト

Cx43 を目標とした TALEN の設計は TALEN Targeter (https://tale-nt.cac.cornell.edu/) を用いて行った。TAL の繰り返し配列の作成は Golden Gate TALEN と TAL Effector Kit 2.0 (31)を用いて行い、プラスミドベクターpCS2TAL3DD または pCS2TAL3RR (32)に挿入した。これらのプラスミドは NotI 制限酵素によって環状から直線状にした後、mMESSAGE mMACHINE SP6 Transcription Kit (Ambion) を用いて mRNA に転写した。こうして合成された TALEN mRNA100pg を 1 細胞

期の受精卵にインジェクションした。設計した TALEN の変異導入効率を確かめるために、インジェクションした翌日の受精卵を回収し DNA を採取した。TALEN 目標配列をフォワードプライマー5’- TTCAAGTGTCACCAAAGTGTCT-3’とリバースプライマー5’- CTGCTGGGTATTGCACTTGA-3’によって PCR 増幅し、変異が導入されたかシーケンスによって確かめた。目標配列の異なる TALEN3 種について導入効率チェックを行い、最も成績の良かった TALEN を *cx43* ノックアウト実験に使用した。使用した TALEN の目標配列は 5’-TCTGGCTCTCTGTGCTCTtcatcttccggatccTTGTTCTGGGAACAGCA-3’(大文字は TALEN 目標配列)で、Cx43 タンパク質の第一細胞外ループに相当する。

７　アリル間の遺伝子発現量比較

stp/+6 匹と *stp*/*sof* 5 匹の尾鰭から RNeasy Protect mini kit (Qiagen)を用いて mRNA を採取し、SuperScript III Reverse Transcriptase (invitrogen)を用いて cDNA に逆転写した。*cx43* CDS 上の *stp* 変異を含む配列をフォワードプライマー 5’-GCGCCTCGAGTTGGTGACTGAACTTCAGAG-3’ とリバースプライマー 5’-GCGCATCGATCGTTTGAAGAGCACGTAGAAG-3’を用いて PCR 増幅し Tol2 プラスミドベクター(pT2AL200R150G)に挿入した。このプラスミドを *E. coli* に形質転換し、アンピシリン耐性のアガープレートに蒔いた。翌日コロニーをピックアップしプライマー5’-GCGCATCGATCGTTTGAAGAGCACGTAGAAG-3’を用いてシークエンスした。シークエンス結果から *stp* 変異の有無を確認し、mRNA の由来となるアリルを確かめた。例えば、*stp*/+個体から得た mRNA では、*stp* 変異があればその *cx43* mRNA は *stp* アリル由来となり、*stp* 変異が無ければ野生型アリル由来となる。また、*stp*/*sof* 変異体から得た mRNA では *stp* 変異があれば *stp* アリル由来であり、なければ *sof* アリル由来である。一匹の魚から得た mRNA 当たり 28～48 コロニーについて由来となるアリルを確認し、平均をとることで野生型アリルに対する *stp* アリルと *sof* アリルの *cx43* mRNA 転写効率を計算した。

８　Voltage clamp 法による電気生理解析

コネキシンが形成するギャップジャンクションやヘミチャネルは細胞膜上で小分子化合物やイオンを通過させる穴として機能する。これらの物質は電荷をもっているため、チャネルを通過する際には電流が流れることになる。この電流の通しやすさはチャネルによって異なり、膜電位や時間経過に従って電流がどのように変化するかを測定することで、そのチャネルの特性を調べることができる。細胞に接続されたピペット電極によって電圧を固定して電流を測定する Voltage clamp 法はチャネルの特性を調べる主流の測定法である。本実験では Cx43 変異体のギャップジャンクションとヘミチャネルの特性を調べるために、Hoptak-Solga らの実験手法 (34)を参考に *Xenopus laevis* の卵母細胞を用いた Voltage clamp を行った。

i. cRNA の準備と Xenopus 卵母細胞へのインジェクション

野生型 Cx43、*stp* 変異型 ($Cx43^{W78L}$) と *sof* 変異型 ($Cx43^{P191S}$) の 3 種類のコネキシンタンパク質をコードした cDNA を用意し、PCR 後に pGEM-HeFx プラスミド(33)に挿入した。プラスミドは制限酵素によって環状から直線状にした後、mRNA 転写キット T7 mMessage mMachine (Ambion) を用いて cRNA (complementary RNA) に転写した。*Xenopus laevis* の雌は MS-222 を用いて麻酔し、メスとピンセットを用いて卵巣を取り出した。回収した卵母細胞はコラゲナーゼ溶液(20 mg/ml collagenase I (Sigma) と 20 mg/ml hyaluronidase (Sigma) を OR2 buffer (82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, and 5 mM HEPES. pH 7.5 adjusted with NaOH)に添加したもの)に入れ、18℃で 2 時間処理した。ステージ 5～6 の卵母細胞を回収し、Xenopus Cx38 に対する antisense-oligo DNA 10ng と共に *cx43* cRNA (ギャップジャンクション測定では 0.05ng; ヘミチャネル測定では 5ng)を microinjection により導入した。このとき、ネガティブコントロールとして、*cx43* cRNA の代わりに H_2O を導入したものを用意した。インジェクションした卵母細胞は 2mM CaCl2 を添加し HEPES で 1/2 に希釈した L15 培地(Sigma) (pH7.5) に入れ 18℃で overnight した。

ii. ギャップジャンクション測定

高張液(200 mM アスパラギン酸, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, 20 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.5)) 中で cRNA をインジェクションした卵母細胞からピンセットを用いて Vitelline membrane を除去した。その後卵母細胞を ND96(+)溶液(93.5mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES) 中に移し、2 つの卵母細胞を植物極同士が向かい合う様に接触させペアを作って 18℃で 12 時間インキュベートした。ペア形成から 12 時間後には Cx43 によるギャップジャンクションが形成されていることが期待できる。ギャップジャンクションを流れる細胞間電流は dual whole-cell voltage clamp 技術により測定した。微小電極は 0.5～1.0MΩ の抵抗を持つように micropipet puller P 1000 (Stuffer) を用いてガラス管を加工し作成し、電極溶液(3 M KCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 7.4))で満たした。ボルテージクランプは 2 台の Multi Electrode Clamp Amplifiers iTEV90 (HEKA) を用いて行った。測定においては、まず両方の卵母細胞を-40 mV にクランプし、片方の電圧を-160 mV～+80 mV まで 20 mV 間隔で変えてギャップジャンクションを流れるイオン電流を測定した。イオン電流は電圧を変えた直後は変動が大きいが次第に安定化する。この安定した電流値をそれぞれ記録した。その後、コンダクタンス Gj を(式 1) によって計算し、正規化した Gj を比較した。ここで、Ij は測定したイオン電流、V_0 は片方の卵母細胞に印加した電圧(すなわち-40 mV)、V_1 はもう片方の卵母細胞に印加した電圧(すなわち-160 mV～+80 mV)である。

$$Gj = Ij / (V_1 - V_0) \qquad \text{…(式 1)}$$

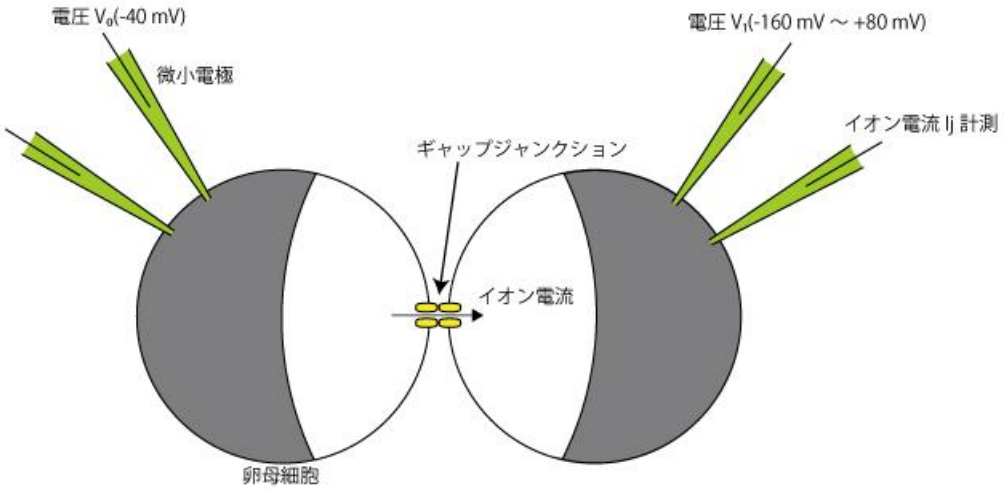

図３. Voltage clamp によるギャップジャンクション測定

iii. ヘミチャンネル測定

ヘミチャンネルはカルシウムイオン濃度が高いと閉状態になり、低いと開状態になることが知られている。そこで閉状態と開状態をそれぞれ測定するために、CaCl2 の濃度を 1.8mM から 2mM に増やした ND96 (+)溶液 (ND96 (+) +Ca^{2+}溶液)と、$CaCl_2$ 無添加の溶液 (ND96 (+) -Ca^{2+}溶液)を用意した。卵母細胞は ND96 (+)溶液に移してペアを作らず単独で 18℃で 12 時間インキュベートした後、ND96 (+) -Ca^{+2} 溶液若しくは ND96 (+) +Ca^{+2} 溶液に移し測定を行った。ヘミチャンネル測定は 1 台の Multi Electrode Clamp Amplifiers iTEV90 (HEKA) を用いて行った。卵母細胞はまず-40 mV にクランプされ、5 秒ごとに電圧を-30 mV～+60 mV まで 10 mV 間隔で変えながらヘミチャネルを流れるイオン電流を測定した。測定したイオン電流から電流変動の少ない安定した電流値を取り出し記録した。

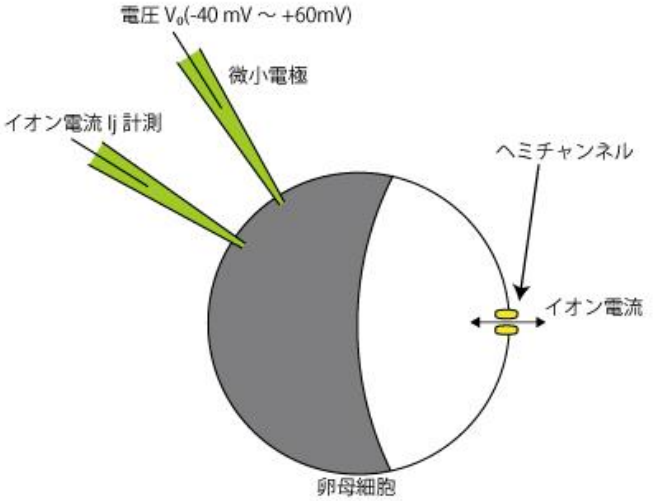

図４．Voltage clamp によるヘミチャネル測定

Ⅲ章　結果

１節　*stoepsel*^{tl28d} ゼブラフィッシュ変異体の表現型の解析

stp 変異体は 1996 年の ENU による変異体の大規模スクリーニング実験の論文中で報告されている (20)。この論文には、*stp* 変異体は成体において脊椎に異常を示すことは述べられているが、詳しい解析はなされていない。
そこでまず、*stp* 表現型について詳細な解析を行った。成体の *stp*/+個体は兄弟の野生型に対して少し短い体格をしている (図５C)。成体の CT を撮って骨の形を比較すると、*stp*/+個体は成体において脊椎が前後軸方向に短くなっているように見える (図５D)。その一方で、椎骨の数は兄弟の野生型と比べて変化は見られなかった。

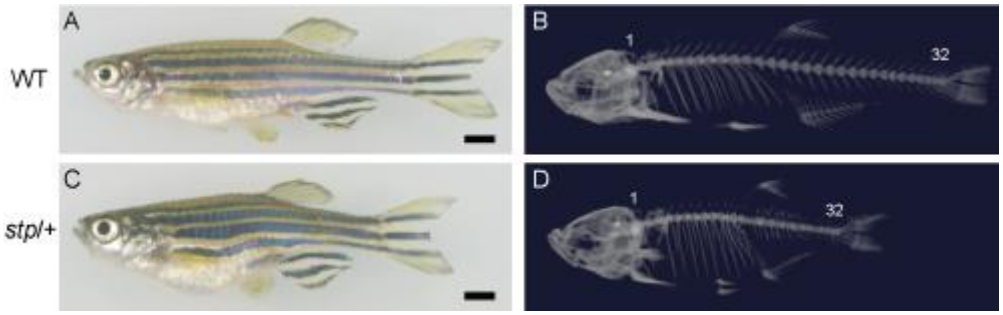

図５．*stp*/+変異体の表現型
(A, C) 可視光 (B, D) CT スキャン画像 スケールバー：1000μm

ゼブラフィッシュでは脊椎の数は完全には決まっておらず、本論文で使用したゼブラフィッシュの椎骨の数は約 29～33 本である。頸椎、前尾椎、尾鰭椎の数は形態学的に決まっているので、尾椎の数が変化しているものとして扱う。それぞれ、頸椎 4 本、前尾椎 10 本、尾椎 12～16 本、尾鰭椎 3 本(第 3 尾鰭椎は尾部棒状骨の一部を形成)存在する (図６)。
stp/+個体の椎骨の形状を詳しく調べるため、透明標本を作製した。椎骨の数が同じ個体(椎骨数 33 本のもの)を選択し、頸椎と第 3 尾鰭椎を除く椎骨の長さと高さを測定した(図７)。すると、測定したほとんどの椎骨が野生型の兄弟よりも短くなっており、とくに体格の中央に位置する前尾椎後部と尾椎前部が特に短くなっていた(図７.A, C)。一方で、椎骨の高さに差は見られなかった(図７

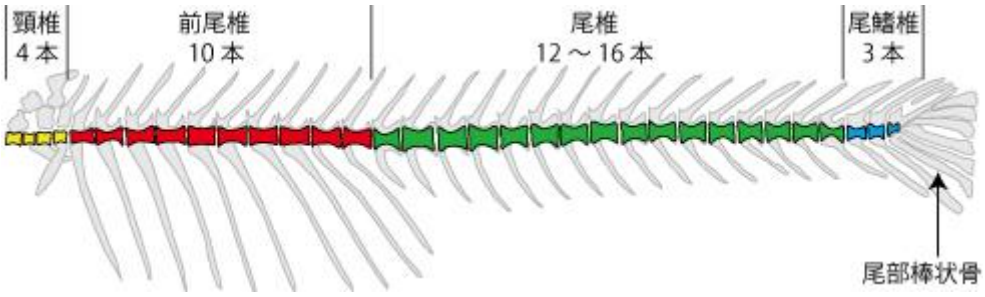

図６．脊椎を構成する椎骨の名称と数

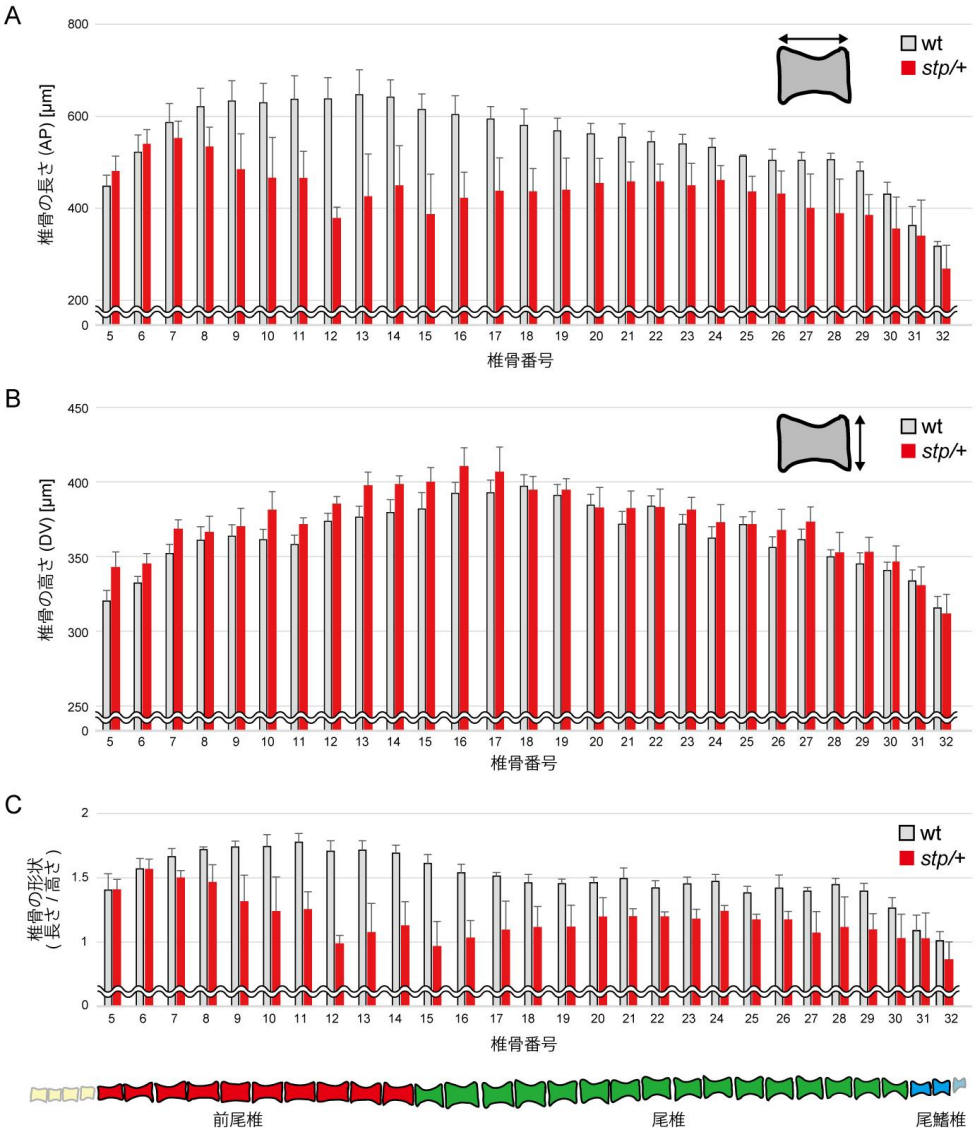

図７. ***stp*/+**の各椎骨の形状

(A) 椎骨の椎体の長さ **(B)** 椎体の高さ **(C)** 椎体の形状(長さを高さで割った値) **, n=6,** エラーバーは **S.E.M**

B)。このことから、*stp*/+変異体の短い脊椎は椎骨が Anterior-Posterior axis (AP 軸方向)に短く形成されるために生じることがわかった。

stp 特異的な椎骨の形状をより詳しく調べるために、中央部分の脊椎の高解像度 CT スキャンを行った (図８)。図８は野生型と *stp*/+の尾椎の CT イメージであり、図８.A では第 1 尾椎から第 3 尾椎、図８.B では第 1 尾椎から第 4 尾椎が写っている。赤枠で示された第三尾椎に注目してみると、椎骨の基本形状は失われていないことが解る。椎骨は中央の椎体と、上下の神経弓(赤矢頭)、血管弓(緑矢頭)、そして左右に突き出た梁構造(青矢頭)によって構成されている。図８. B を見ると、神経弓、血管弓、梁構造は細くなっているが正常な形に形成されている。また、図８.C, D は第三尾椎の正面を示すが、神経弓と血管弓の神経と血管が通る腔は正常に形成されている。しかしながら、図８.E, F が示す椎体内部を見比べると、*stp*/+の椎体内部には異常な骨沈着が度々みられた。また、図８.G, H は椎骨上部を示すが、椎骨の太さは変わらない。これらのことから、*stp*/+変異体が示す椎骨の表現型は椎体の長さが短くなることと、椎体内部にしばしば現れる異常沈着であることがわかった。

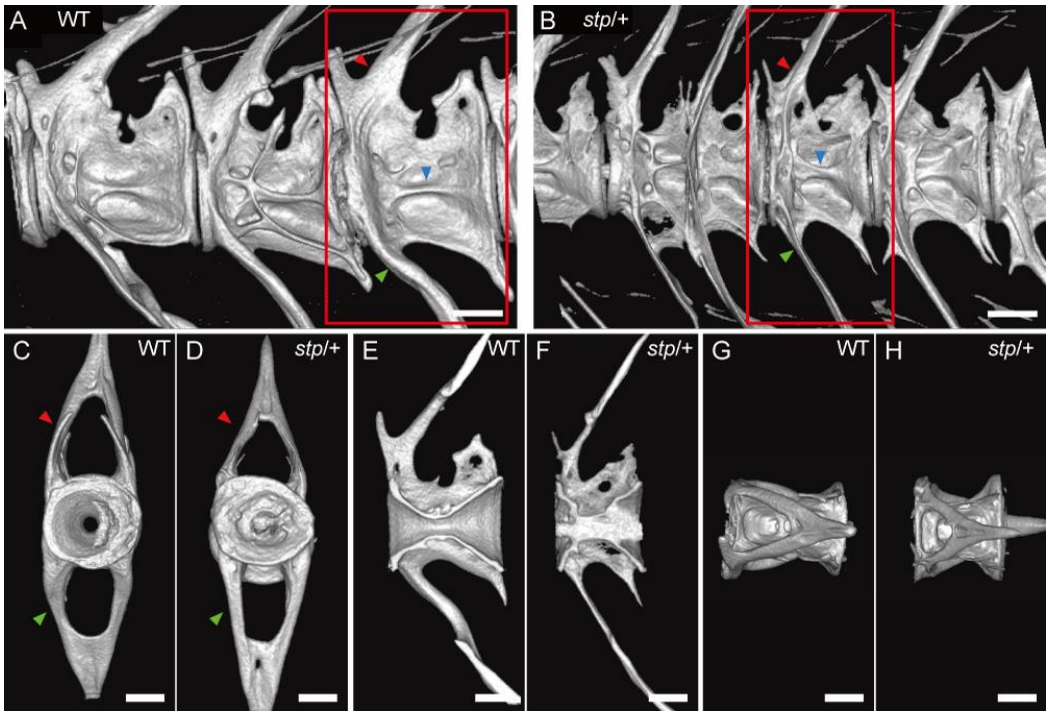

図８. 椎骨の高解像度 CT スキャン画像
(A, B) 脊椎左側面 (C, D) 第三尾椎の正面 (E, F) 椎体内部 (G, H) 背側視点 スケールバーは 250μm

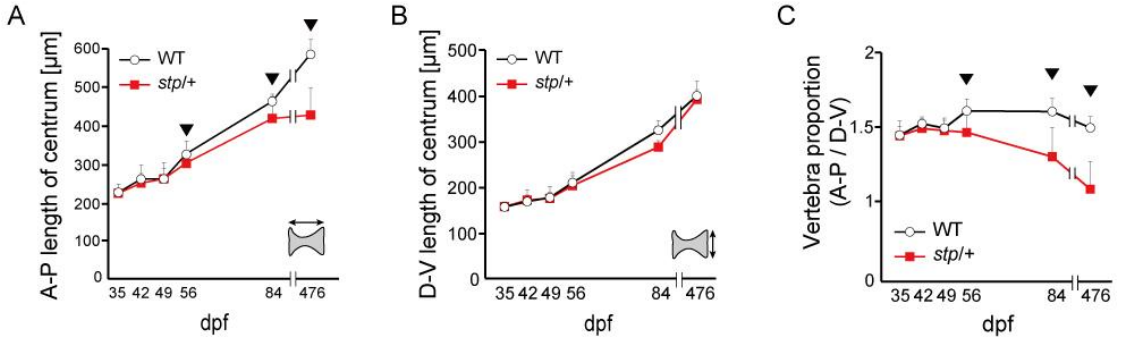

図９．成長に伴う *stp*/+個体の椎骨形状の変化
(A) 椎体の長さ（B）椎体の高さ（C）椎体の長さを高さで割った値，n=6, エラーバーは S.E.M.

そこで次に、この短い椎骨がどのステージで現れるのかを調べた。図９はステージごとに椎骨の長さと高さの測定結果を示す。図８A と C の矢頭は野生型に比べて *stp*/+の椎骨が短くなっている時期を示す。その結果受精後約 2 カ月で表現型がはっきりと表れてくることがわかった。一方で、2 カ月未満の個体では表現型は全く現れず、野生型と区別はつかない。これらのことから、*stp*/+変異体は幼生では正常でありながら、成体になる過程で椎骨の長さに異常を示す変異体であることが示された。

2 節　ポジショナルクローニングによる原因遺伝子の絞り込み

stp 変異体は原因遺伝子が特定されていない。そこで原因遺伝子の遺伝領域を絞り込むためにポジショナルクローニング法を用いた。まず SSLP マーカー (表１) で大まかな領域を絞り込んだ。*stp* 変異体は tu 系統で維持されているので、AB 系統と交配を繰り返し、F2 以降における電気泳動のバンドパターンを調べることで遺伝子領域の由来を調べた。その結果、染色体２０番が最も *stp* 由来である可能性が高いことが高かったため、次に SNP を調べることで、さらに領域を絞り込んだ結果、20 番染色体 39.80～41.80Mb 内の領域に原因遺伝子が潜んでいることが解った (図１０. A)。この領域には６つのコネキシンをコードするコネキシンクラスターとみられる領域が存在した。また、このほかにも２つの遺伝子がコードされている。これら８つの遺伝子の CDS 配列をシーケンスによって特定した所、*cx43* のみに *stp* 特異的にアミノ酸置換を伴う変異が存在し、７８番目のトリプトファンがロイシンに置き換わっていた（G233T: W78L）(図１０. B)。

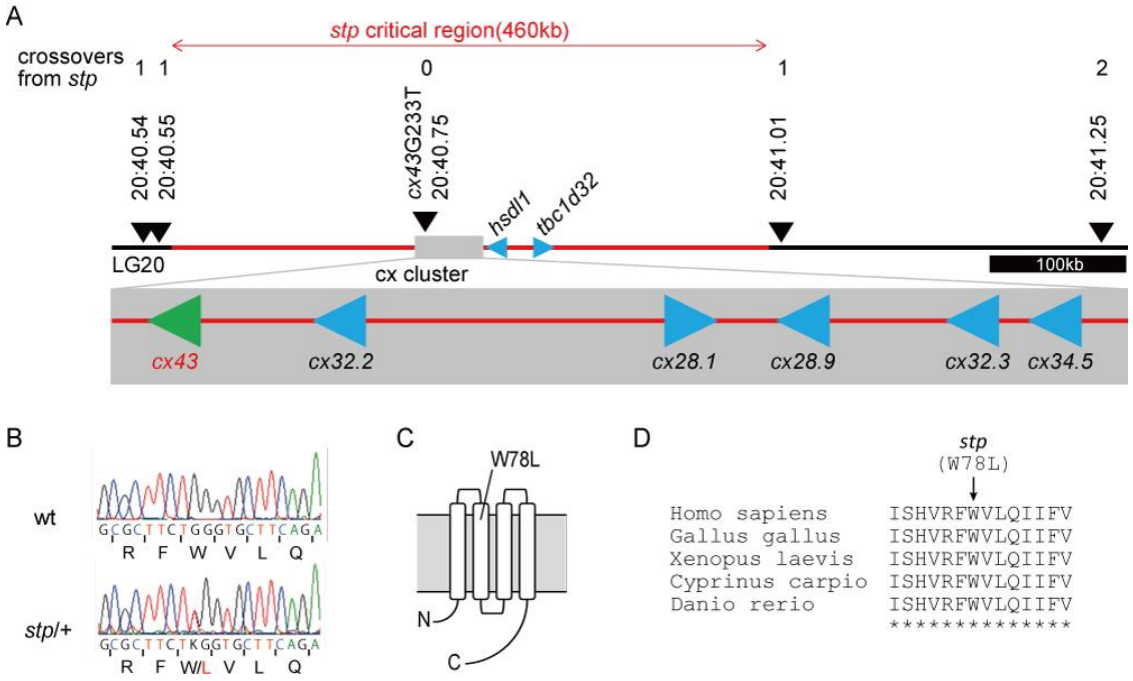

図１０．ポジショナルクローニング結果と Cx43 におけるアミノ酸変異 (A) ポジショナルクローニングによるマッピング結果 (B) *stp* アリルに見られたアミノ酸変異を伴う変異 (C) Cx43 タンパク質の模式図とアミノ酸変異部位 (D) アミノ酸変異前後の BLAST サーチ結果

ｉ．Cx43^{W78L} 変異体と椎骨における *cx43* 遺伝子発現

stp における Cx43 のアミノ酸変異 W78L は Cx43 タンパク質の第二幕貫通部位で起きており(図１０.C)、この部分のアミノ酸配列はヒトを含む複数の種間で高度に保存されていた(図１０.D)。ほかに、この領域にアミノ酸変異を起こす遺伝子は無い。このことから、*cx43* が *stp* である可能性が高いと考えた。

cx43 遺伝子の椎骨における発現部位を調べるため、*cx43* プロモーター下で蛍光タンパク質 mCherry を発現するトランスジェニックフィッシュを作成した。（コンストラクトは材料と方法 : 2 節ｉを参照）すると図１１のように椎骨の両末端で強い蛍光が見られた。椎骨の末端は椎体の主な成長部位であることから、*stp* 変異体では Cx43^{W78L} が椎体の骨成長を阻害していることが強く示唆された。

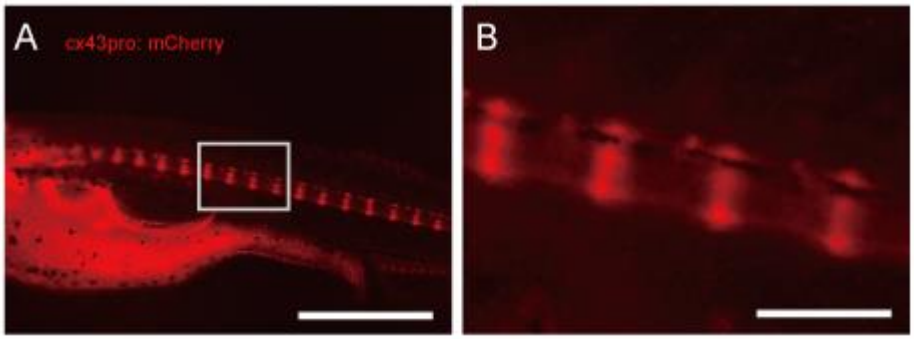

図１１．*Tg*(*cx43*pro-mCherry)トランスジェニックフィッシュの椎骨における mCherry 蛍光。椎体の両末端に強い蛍光が見られる。

3 節　TALEN による Cx43^{W78L} ノックアウト

cx43 が原因遺伝子かどうかを調べるために、TALEN によって選択的に *stp* アリルの *cx43* 遺伝子をノックアウトする実験を行った。TALEN のターゲットサイトは図１２.A で示すように第一細胞外ループに相当する CDS 領域に設定した。TALEN が働くことにより第一細胞外ループ以降の配列にフレームシフトを起こし、アリルをノックアウトすることが期待される。TALEN は *stp*/+にインジェクションされ、F1 からは図１２．B のように *stp*/+由来アリルにデリーションを起こした系統が複数得られた。

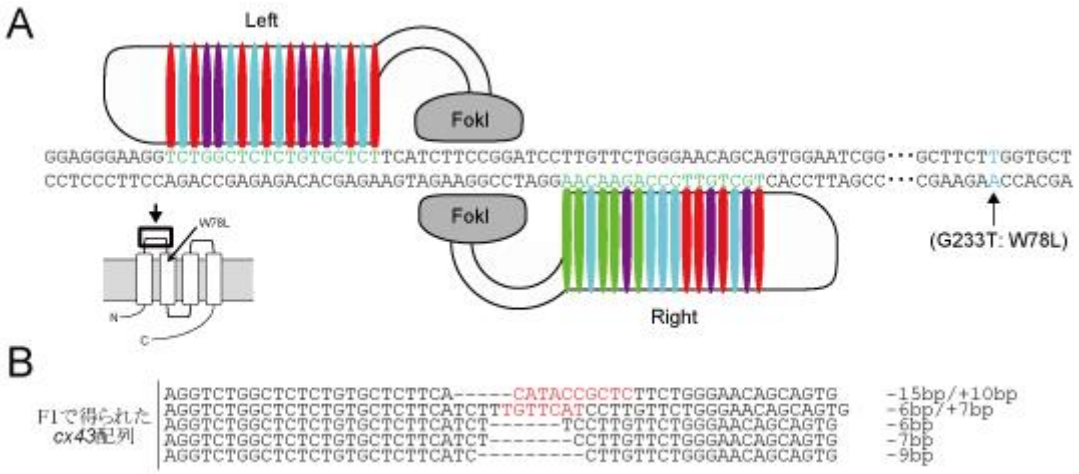

図１２.TALEN ターゲットサイトとデリーション結果

これらうちフレームシフトが起きている(-15bp/+10bp)の系統を用いて椎骨表現型が回復するか観察した。表現型の明確に表れる 3 か月の個体において $Cx43^{W78L}$ がノックアウトした個体の椎骨を調べたところ、いずれも正常な椎骨の形をしていた(図１３.A)。また、椎骨の長さと高さを測定しても *stp* 変異体特有の椎骨の短縮は見られなかった(図１３. B)。これらのことから、*stp* のドミナントネガティブな椎骨表現型が $Cx43^{W78L}$ のノックアウトによって回復したとみなし、*stp* 変異体の原因遺伝子は *cx43* であると結論付けた。

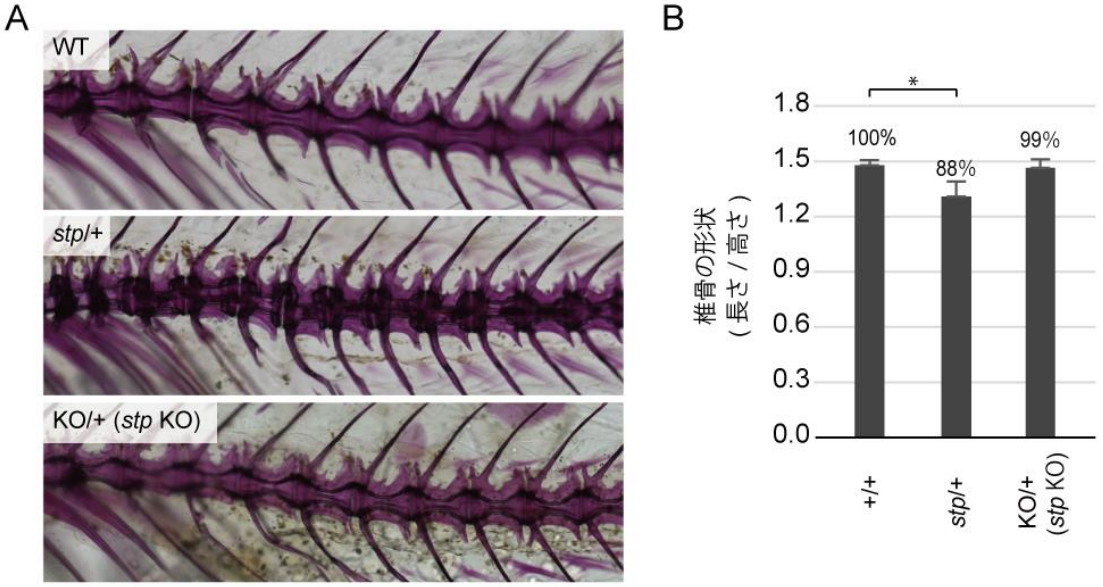

図１３. *stp* アリルをノックアウトした *stp*/+変異体の椎骨形態
(A) 透明標本の椎骨拡大写真 (B) 椎骨の椎体の長さを高さで割った値, n=6, エラーバーは S.E.M. *は Student's t-test 結果 p<0.01 を示す

4 節　*stp*/*stp* 稚魚の致死性と *cx43* 導入による致死性の回復

stp 変異体の観察では成体の *stp*/*stp* 個体は見つからなかったことから、*stp*/*stp* の個体は致死であると考えられる。そこで *stp*/*stp* が死亡する発生時期を調べるために幼生期における *stp*/*stp* 個体の生存率を調べた(図１４.A)。すると、*stp*/*stp* 個体の孵化は正常に起きるが、受精後 9 日以降で生存数が急激に低下するのが解った。そこで受精後 9 日前後の稚魚を観察したところ、稚魚の中に眼部と腹部に大きな水腫を示す個体が現れることを発見した(図１４.B)。これらの水腫を持った個体はいずれも *stp*/*stp* 個体で、水腫を確認した翌日には死亡した。

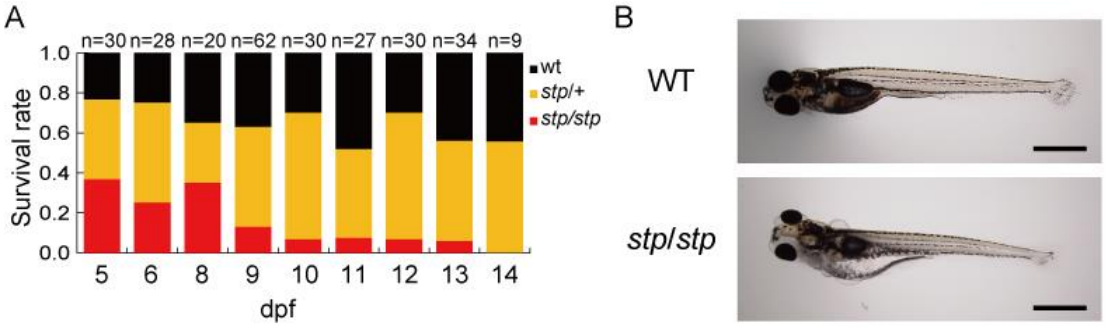

図１４. ***stp/stp*** の生存率と致死前に示す表現型
(A) dpf ごとに含まれる ***stp/stp*** 変異体の割合 (B) ***stp/stp*** 変異体の致死前に頻繁にみられる表現型。目と腹部に水腫がみられる。スケールバーは 1000μm

この *stp/stp* の致死性は、正常な Cx43 タンパク質が存在しないことが原因と予想される。そこで、正常な *cx43* 遺伝子の導入によって *stp/stp* の致死性を回復する実験を行った。*cx43* 配列が導入された *stp/stp* 変異体 *Tg*(*cx43*pro-*cx43*)*stp/stp* は *stp/stp* 変異体と異なり、3 か月以上生存した (図１５)。このことから、*stp/stp* の致死性も、*stp/+*の椎骨表現型と同様 *cx43* が原因となっていることが示された。

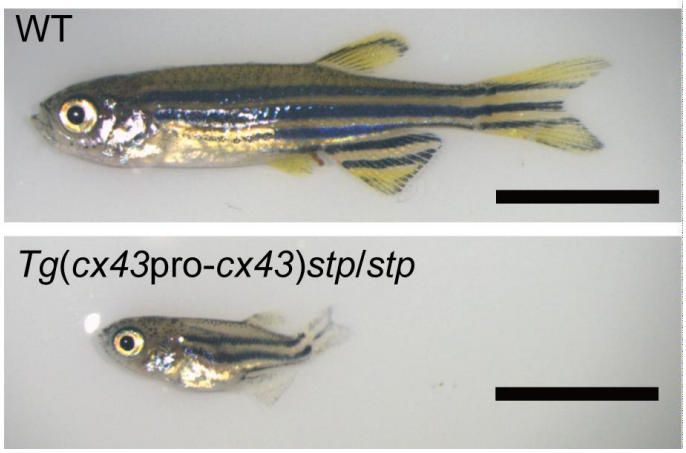

図１５. ***cx43*** を導入した ***stp/stp*** 変異体 **(56dpf)**。スケールバーは **5000μm**

コネキシンは N 末端、C 末端が細胞質内にあり、4 つの幕貫通領域、2 つの細胞外ループ、1 つの細胞内ループを持つタンパク質 (図１６) で、細胞膜上で 6 量体となってヘミチャネルを形成する。ヘミチャネルは細胞内と細胞外をつなぐ小分子の通路として機能し、イオンや cAMP、ATP など分子量が約 1000Da(ダル

トン)以下の分子が通過することが知られている。また、2 細胞間のヘミチャネル同士が結合することでギャップジャンクションを形成する。ギャップジャンクションは異なる細胞間の小分子を交換する通路として機能し、通過できる小分子はヘミチャネルと同様 1000D 以下である。ヘミチャネル・ギャップジャンクションが通す分子の大きさやその通しやすさは構成するコネキシンの種類によって異なる。

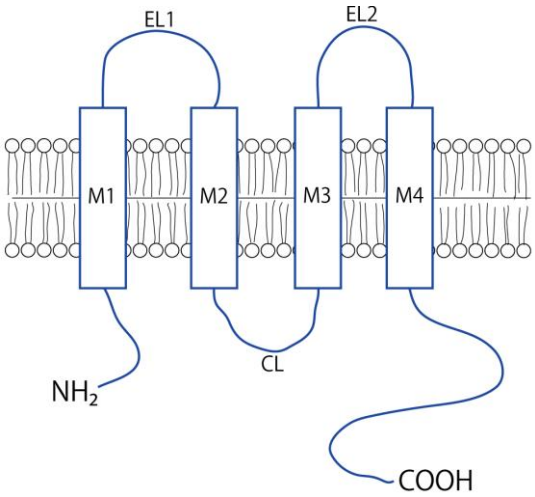

図１６．コネキシンタンパク質の模式図

また、図１７のように 2 つ以上の異なる種類のコネキシンが 1 つのヘミチャネルを構成する heterotypic ヘミチャネルや、構成の異なるヘミチャネル同士がギャップジャンクションを形成する heteromeric ギャップジャンクションも存在し、構成によって特性が変化する。このように異なるコネキシン同士でも結合しあうため、ヘミチャネル・ギャップジャンクションの特性はバリエーションに富む。Cx43 もこのような特徴を持ったコネキシンの 1 種であり、神経、心臓、膀胱、骨など様々な組織で重要な働きを担っていることが知られている。例えば、神経系ではアストロサイトに Cx30 と共に発現し、ギャップジャンクションを通してグルコースやグルコースの代謝物を末梢のニューロンへ供給している (21)。また、心臓の心筋では拍動を伝達する働きがあり、*cx43* の遺伝子数を減らした $Cx43^{+/-}$マウスでは不整脈が起きやすくなることが示されている (22, 23)。膀胱に発現する Cx43 は膀胱に尿が溜まったことを示すシグナルを周囲の細胞に伝達する働きを持っており、$Cx43^{+/-}$マウスでは尿回数が減り、1 回あたりの排出量が増

える (24)。また、骨では骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞など骨形成に関与する複数の細胞で発現しており(25 – 28)、Cx43 変異体マウス (Cx43$^{Jrt/+}$マウス) では骨量が低下する (29) 。このように Cx43 は様々な組織で欠かせない重要なコネキシンであることが知られている。

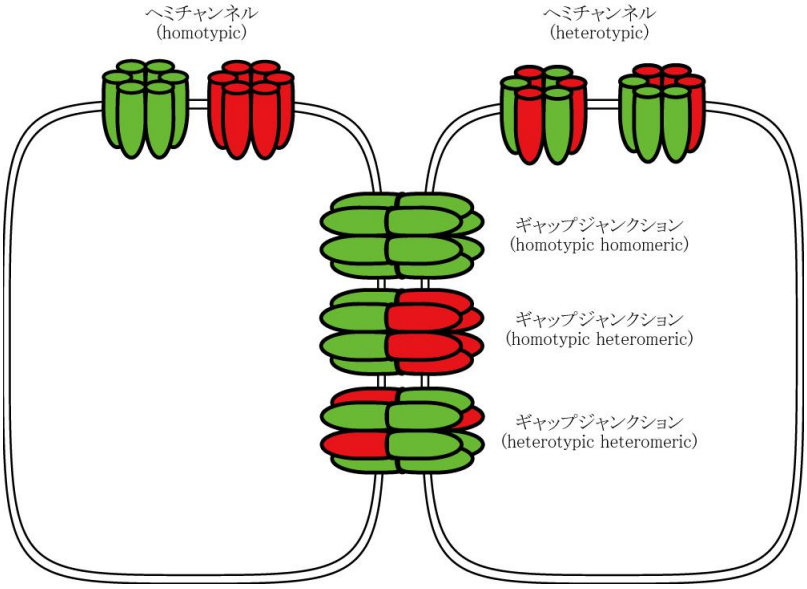

図１７．ギャップジャンクション・ヘミチャネルの形成様式

5 節　*cx43* のもう一つの変異体 *short fin*

非常に興味深いことに、*cx43* が原因となるゼブラフィッシュ変異体は他にも存在する。それが *short fin* (*sof*)という変異体である。*sof* は成体において鰭が短い特徴を持ち(図１８．B)。個々の鰭条（鰭の骨）の長さが短くなっている。*sof* は４系統存在し、Cx43 のアミノ酸置換が生じているものが 3 系統、*cx43* の mRNA 発現量低下によるものが 1 系統である (15)。これらのうち、mRNA 発現量低下を示す系統 *sof*^{b123} 系統を Iovine 教授から譲り受け椎骨形状を調べてみたところ、椎骨は正常に形成されていた(図１８．B’)。このことから、*stp* と *sof* は全く異なる変異体であることがわかる。次に *stp*/+と *sof*/*sof* を交配して *stp*/*sof* を作成した所、*stp*/*sof* は非常に短い体格をしていた(図１８．C)。そこで、*stp, sof,* そして *stp*/*sof* の３つについて椎骨の形と鰭条の長さを調べた(図１８．D, E)。椎骨の形を示した図１８．D を見てみると、*stp*/*sof* は *stp*/+よりも短い椎骨形状をしていることが

わかる。次に鰭条の長さについて図１８.E の矢頭を比較すると、*stp*/+は WT よりも若干短く(矢頭 1)、*stp*/*sof* も *sof*/+より若干短い(矢頭 2)。このことから、*stp* アリルは*sof*アリルほどではないが鰭条を短くする効果を持っていることが示された。

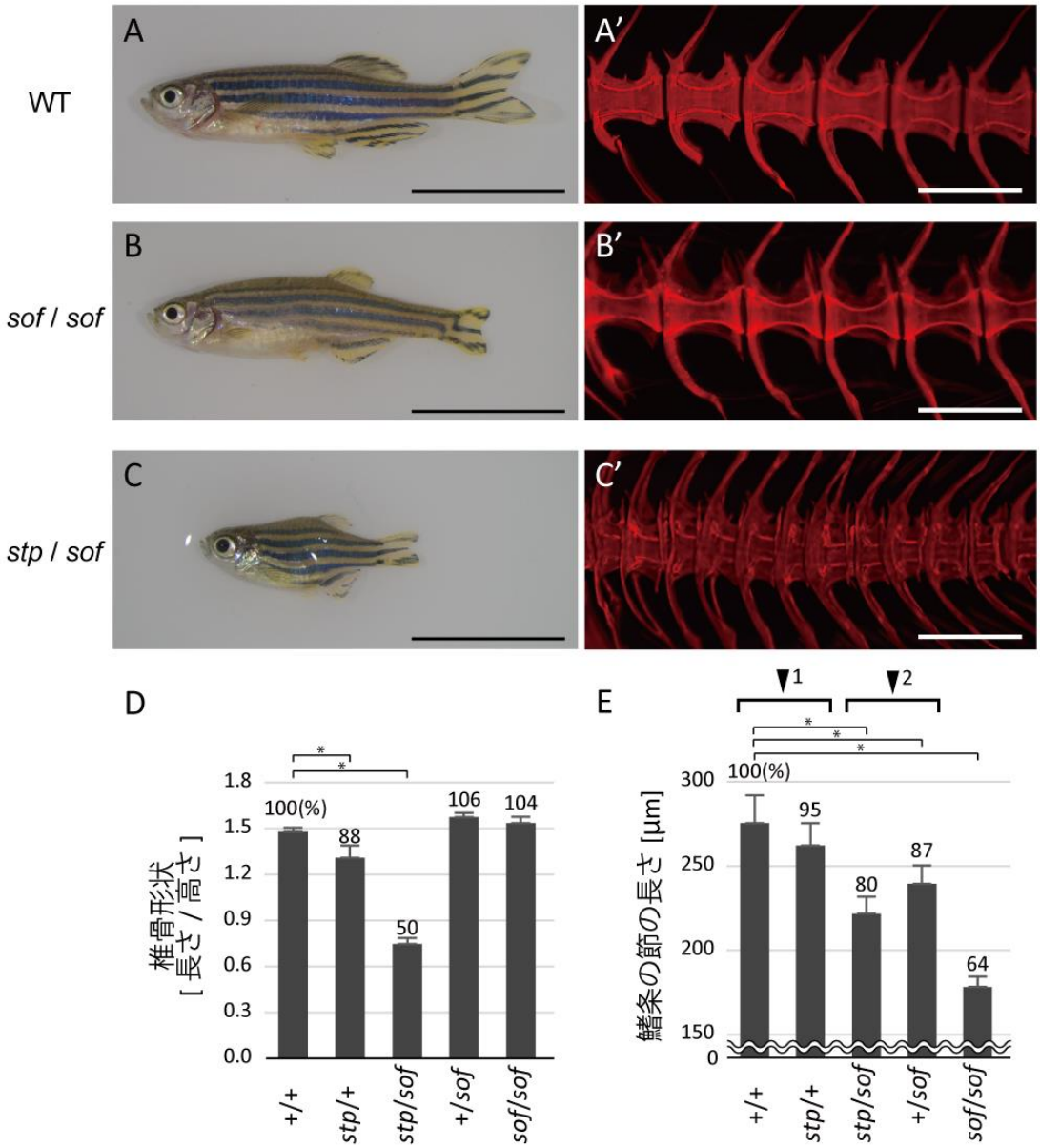

図１８. ***sof*/*sof*** 変異体と ***stp*/*sof*** 変異体の表現型
(A, B, C) 各個体の可視光写真 (A', B', C') 透明標本の Alizarin Red 蛍光写真 (D) 椎骨の椎体の形状 (E) 鰭骨の長さ。矢頭は ***stp*** アリルを持つ個体と持たない個体のペアを示す (D, E) n=6 エラーバーは S.E.M. *は Student's t-test 結果 p<0.01 を示す

stp/*sof*変異体の椎骨が*stp*/+変異体と比べて大幅に短くなった原因は*sof*アリルのmRNA 発現量に由来すると考えられる。しかし *sof* アリルの mRNA 発現量はこれまで調べられていない。そこで *stp*/+変異体と *stp*/*sof* 変異体における *cx43* mRNA の由来となるアリルを調べることで存在比を推定した（方法は材料と方法：7 節を参照）。すると、*stp*/+個体では *cx43* mRNA は *stp* アリル由来が WT アリル由来よりも若干少ない傾向にあったが、大きな差は見られなかった（図１９．A）。対して、*stp*/*sof* 変異体では *stp* アリルに比べて *sof* アリル由来の mRNA は 10 分の 1 以下であった（図１９.B）。これらの結果から、*sof* アリルの mRNA 発現量は WT アリルに比べて 10%以下であることが解った。正常な *cx43* mRNA が減少することで *stp* の椎骨表現型が顕著になることから、正常な *cx43* は *stp* の機能を補償すると考えられる。

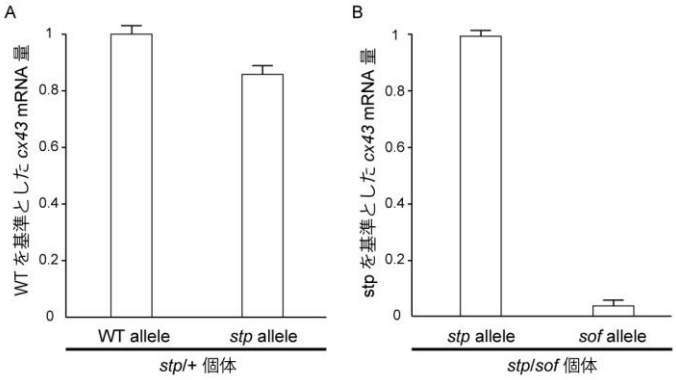

図１９. *cx43* mRNA の由来アリル
(A) *stp*/+変異体における *cx43* mRNA の由来アリル n=6 (B) *stp*/*sof*変異体における *cx43* mRNA の由来アリル n=5 エラーバーは S.E.M.

6 節　Voltage clamp 法による Cx43 変異体の機能解析

これまでの結果をまとめると、*stp* アリルは椎骨に強く影響し、鰭骨には弱く影響する。一方で *sof* アリルは椎骨に変化を起こさないが鰭骨には強く影響する。このことから、骨における Cx43 の機能は 1 つではないことが予想される。コネキシンはギャップジャンクションとヘミチャネルの 2 つの構造体を作ることが知られている。そこで、ギャップジャンクションとヘミチャネルの機能が *stp* と

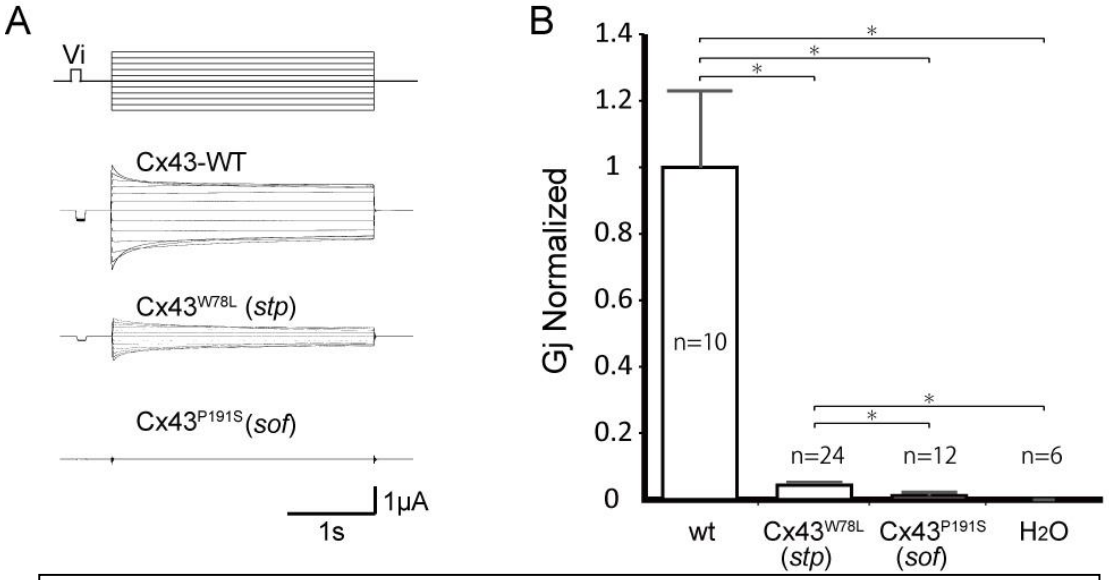

図２０．ギャップジャンクション測定結果
(A) Cx43-WT と各 Cx43 変異体の Junctional Current の波形 (B) Cx43-WT を基準とした Junctional Current の平均値 エラーバーは S.E.M *は Student's t-test 結果 p<0.01 を示す

sof の表現型の違いと関連していると考え、電気生理による機能解析を行った。Cx43 の *sof* 変異体は３つ存在し、それぞれ $Cx43^{F30V}$、$Cx43^{P191S}$、$Cx43^{F209I}$ である。これらの *sof* 変異体は Hoptak-Solga らによって機能解析されており、ギャップジャンクション、ヘミチャネルを形成する能力があること、アリル間での違いは少ないことが示されている (34)。そこで我々は $Cx43^{P191S}$ を *sof* 変異体の代表として選択した。機能解析には *Xenopus laevis* の卵母細胞を用いた Voltage clamp current recording 法を使用した。

ｉ．ギャップジャンクション測定結果

まずギャップジャンクション機能の測定を行った(図２０)。0.05ng の *cx43* mRNA をインジェクションした２つの卵母細胞を接触させ、卵母細胞間に形成されたギャップジャンクションに流れる電流量を調べた。図２０．A に野生型 Cx43(Cx43-WT)とそれぞれの Cx43 変異体の Junctional Current 波形を示す。ここでは 2 つの卵母細胞間の電圧を-140mV から 60mV まで 20mV 間隔で変化させたときの電流波形をトレースしている。$Cx43^{P191S}$ は Cx43-WT に比べて非常に電流量が低下しており、野生型のような波形は見られないが、Hoptak-Solga らの報

告によると Cx43^{P191S} はギャップジャンクション形成能を持つことが示されている (34)。図２０．B は図２０．A の最終測定時刻の電流値の平均を計算し、Cx43-WT を基準にしたグラフである。このグラフを見ると、Cx43-WT に比べて Cx43^{W78L} と Cx43^{P191S} は共に Junctional Current が低下している。これらのことから、Cx43^{W78L} と Cx43^{P191S} は共にギャップジャンクション機能が低下していることが示された。

ⅱ．ヘミチャネル測定結果

次にヘミチャネル特性を測定した (図２１)。5ng の *cx43* mRNA をインジェクションした卵母細胞に形成されたヘミチャネルの特性を測定した。図２１.A, B に Cx43-WT と Cx43^{W78L} の電流波形を示す。Cx43^{W78L} のヘミチャネルは Cx43-WT に比べて非常に高い電流を通すことがわかる。

図２１.C から G は各電圧を加えたときの電流値の平均をグラフ化したものである。電流の測定値はギャップジャンクションの実験と同様トレース最後の安定化した値を元に計算した。Cx43-WT と H2O を比較すると、あまり差はなく、Cx43 のヘミチャネルはあまり電流を通さないことが解るが、Cx43^{P191S} も同様にほとんど電流量がない。その一方で Cx43^{W78L} だけが Cx43-WT に比べて 50 倍以上の高い電流を通している (図２１.D)。そこで、より *stp*/+ゼブラフィッシュ個体に近い状態で測定するため、Cx43-WT と Cx43^{W78L} の mRNA を 1:1 で混合した (各 2.5ng)場合を測定した (図２１．F)。この場合でも電流は非常に高く計測された。このことから、*stp*/+ゼブラフィッシュ生体内における Cx43-WT と Cx43^{W78L} の Heteromeric Hemichannel でも高い電流が流れることが示唆される。以上の事から、Cx43^{P191S} は Cx43-WT に近いヘミチャネル特性を持つが、Cx43^{W78L} は非常に高いヘミチャネル特性を持つことが示された。骨の形態異常と照らし合わせると、ギャップジャンクションが鰭骨の形態に、ヘミチャンネルの機能が脊椎の形態に関与していると推測できる。

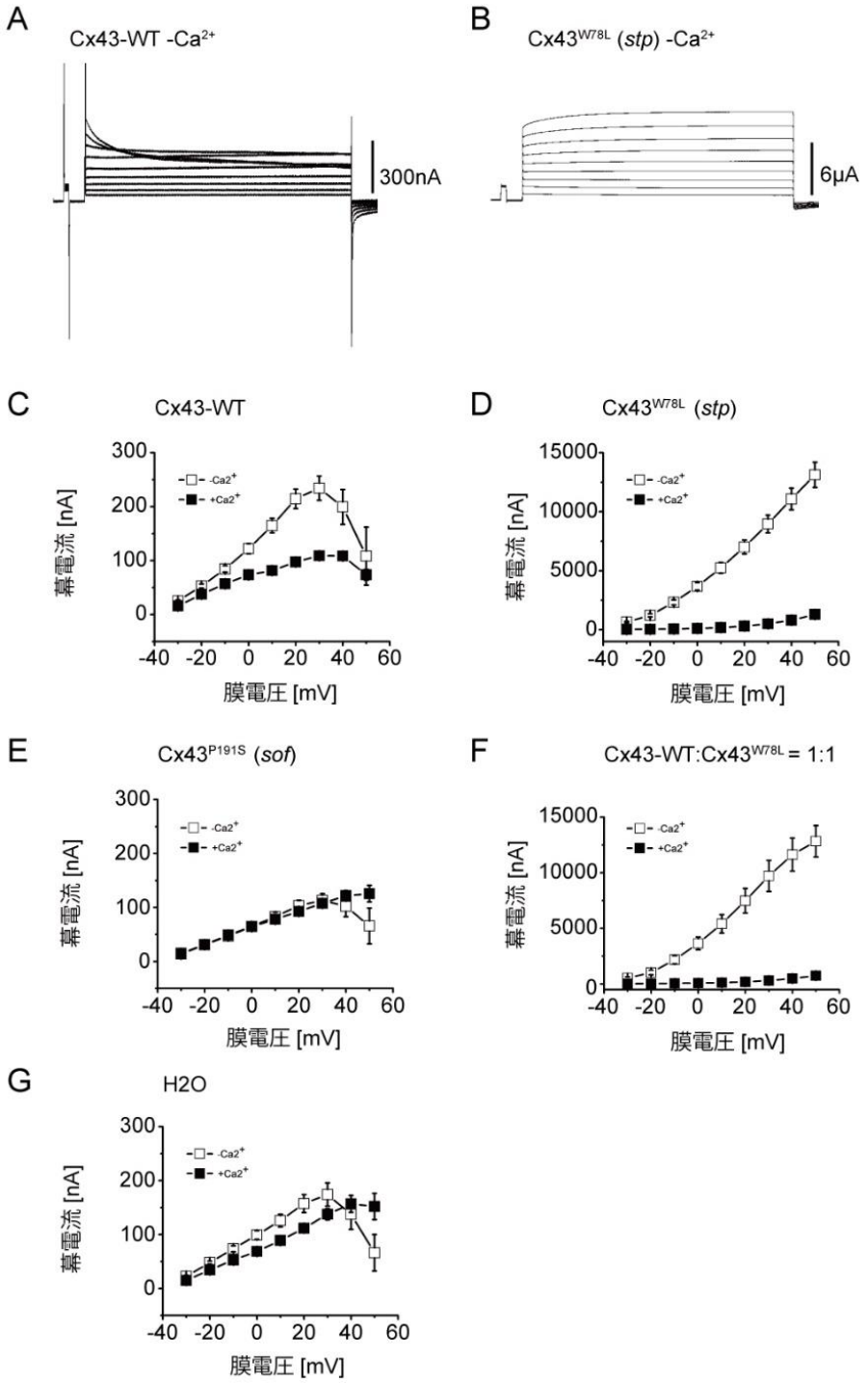

図２１．ヘミチャネル測定結果

(A, B) Cx43-WT と Cx43^{W78L} の電流値の波形 (C – G) 電圧ごとに流れる電流値の値 (F) Cx43-WT と Cx43^{W78L} の mRNA を等量ずつ (各 2.5ng)導入し *stp*/+個体の生体内に近い状況を再現した エラーバーは S.E.M. ■はカルシウムイオン添加時、□はカルシウムイオン無添加時を示す

Ⅳ章　考察

1 節　結果のまとめと考察

本論文中で我々は椎骨形成に異常を示すゼブラフィッシュ変異体を解析してきた。*stp* ホモ結合体は致死性を示し、*stp* ヘテロ結合体は成体に成長することはできるが、成長するにつれて短い椎骨になる。この椎骨における表現型は若い時期(~35 dpf)には表れないが、成体になるにつれて(~60 dpf)明確に表れる。これは骨成長の制御が欠損しているためと予想し、原因遺伝子を特定するためにポジショナルクローニングと TALEN による遺伝子ノックアウトを行った結果、*cx43* 変異体が *stp* 表現型の原因となっていることが解った。

ｉ．*cx43* のアリル間の表現型の違いと Voltage clamp 結果との関連について

興味深いことに、*cx43* 変異体によって生じる *short fin* (*sof*)ゼブラフィッシュ変異体は短い鰭を示すが正常な椎骨形成を行う。なぜ同じ *cx43* 遺伝子のアリル間で異なった影響がでるのか。この問題に答えるため、Cx43 のギャップジャンクションとヘミチャネル機能を電気生理実験で測定した。その結果、$Cx43^{W78L}$ と $Cx43^{P191S}$ は共にギャップジャンクション機能が低下していることが示された。このギャップジャンクション機能の低下は鰭骨が短く形成されることと関連していると考えられる。この結論は、以前 *sof* 変異体の機能解析を行った Hoptak-Solga らの論文中での結論と同じである (34)。一方、ヘミチャネル機能は $Cx43^{W78L}$ のみで異常な活性が見られた。このヘミチャネル機能の異常活性は *stp*/+ゼブラフィッシュ変異体の椎骨の表現型と関連していると考えられる。
これらの考察が正しいとすれば、ギャップジャンクションとヘミチャネルで影響を受ける骨が異なることになる。何故そんなことが起きるのだろうか。この疑問に答えるためにはさらなる研究が必須だが、1 つの仮説を提示したい。それはギャップジャンクションとヘミチャネルがそれぞれ異なるタイミングで骨形成に関与しているのではないかというものである。椎骨と鰭骨には明確な骨形成過程の違いがある。椎骨は受精後約 2 週間で初期形成が起こるが、体の成長と共に、付加成長により大きくなっていく。言い換えると、脊椎は拡大成長し続ける骨である。一方鰭骨は鰭の伸長に伴い鰭条の先端で継ぎ足されるように

作られ、その後はほぼ伸長しない。鰭の成長は鰭骨の成長では無く、鰭骨の数が増えることで起きる。つまり、椎骨の長さは付加成長で制御され、鰭骨の長さは初期形成で決定する。Cx43 ヘミチャネルは骨の付加成長メカニズムに関与し、Cx43 ギャップジャンクションは骨の初期形成メカニズムに関与していると仮定すれば、現象をうまく説明できると考える。

ⅱ．骨組織における Cx43 の働きと *stp*/+個体の椎骨短縮の原因について

これまで Cx43 ヘミチャネルは骨芽細胞/骨細胞においてメカニカルストレスへの反応経路で働いていることが示されている。また、骨芽細胞/骨細胞が fluid flow shear stress を受けたとき、prostaglandin E2 (PGE2)がヘミチャネルを通して放出されることが報告されている (8)。PGE2 が細胞外に放出されると OPG の転写が抑制されるため (35)、破骨細胞分化が誘導されやすくなる（図２３）。ゼブラフィッシュの椎骨では椎体の成長末端で最も強い *cx43* 発現が見られた (図１１)ことから、*stp*/+個体では $Cx43^{W78L}$ の異常活性したヘミチャネルによりメカニカルストレスに反応する経路が活性化し、椎体の成長末端付近で破骨細胞分化が上昇していることが考えられる。

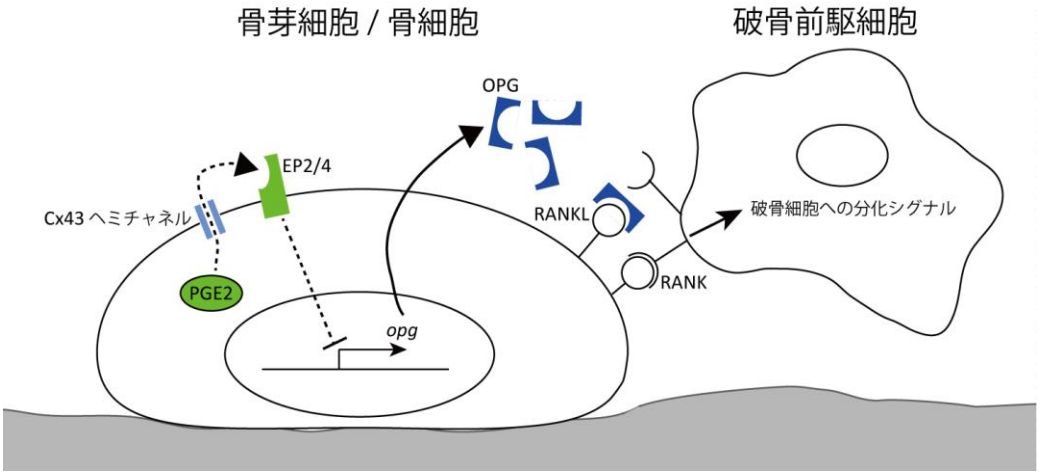

図２３．先行研究により予想される、骨芽細胞 / 骨細胞における Cx43 ヘミチャネルが関与する破骨細胞分化誘導経路

ⅲ．*stp*、*sof* の研究はヒト遺伝病 ODDD の骨異形成の原因解明に貢献する

Cx43 の欠損はゼブラフィッシュのみならず、マウスやヒトでも発生異常を示すことが知られている。特にヒトにおける Cx43 の変異は Oculodentodigital dysplasia

(ODDD)と呼ばれる遺伝病の原因となる。ODDD の症状は骨形成異常だけでなく、眼球が小さく形成される、歯が発達不十分となるなどの顔面の発生異常、さらには指が正常に形成されないなど四肢の発生異常を示す (36, 37)。ODDD の症状が様々な器官で現れるのはCx43が様々な種類の細胞で発現していることが原因と考えられる。ODDD 患者は世界中で広く見つかっており、患者ごとに Cx43 の変異と症状が大きく異なることから、症状ごとに影響を受ける細胞や細胞内経路は異なることが示唆されている。

ODDD の研究は盛んにおこなわれており、マウスにおける Cx43 のノックアウトは心臓の異常により出生後致死となることが知られている (38)。ゼブラフィッシュにおいても *stp*/*stp* 変異体は幼生致死となることから、*cx43* は生存に重要な遺伝子であることを示している。また、ニワトリを用いた Cx43 のノックダウン実験では、初期胚の顔面異形成と四肢の形成異常が報告されている (39, 40)。マウスにおいて骨芽細胞における Cx43 のコンディショナルノックアウトを行った実験では骨量の低下が見られている(41, 42)。このように ODDD に関連するさまざまな研究結果が報告されている一方で、Cx43 の変異が実際にどのような経路で症状を誘発しているのかについては解っていない。

stp 変異体と *sof* 変異体の原因遺伝子が Cx43 であることから、これら２つの変異体はゼブラフィッシュの ODDD モデルである。今回行った変異体間の表現型の違いとギャップジャンクションおよびヘミチャネルの機能測定結果は、ODDD において Cx43 変異体が骨異形成を引き起こす原因が複数存在することを示唆している。これらの Cx43 変異体の下流で何が起きているのかを解明することは、ODDD の骨異形成の原因の解明につながると期待される。

2 節　今後の展望と課題

本研究は骨形成において Cx43 変異体のギャップジャンクション、ヘミチャネルの機能の違いが骨の形成と成長にそれぞれ働いている可能性を示唆した。しかしながら、本研究ではその決定的な証拠は示せていない。この予想を確かめるためには、*stp*/+個体の骨の付加成長経路で異常が起きていることを確かめることが不可欠である。具体的には破骨細胞の数を測定し増減が無いかを調べるほか、骨芽細胞/骨細胞における PGE2 の細胞外への放出量の測定や、OPG の mRNA 転写量が変化しているかを測定する。また、*in vitro* で骨芽細胞と破骨前駆細胞

の共培養を行い、Cx43^{W78L} を導入した骨芽細胞が破骨細胞分化を誘導しやすくなっていないか確かめる。また、ヘミチャネルはイオンのチャネルとして機能し細胞内膜電位の変動に影響を与えることを考慮すると、*stp* 変異体において亢進したヘミチャネル特性により膜電位の変動に異常が起きていないかを確かめる必要がある。さらに、ヘミチャネル活性のみが増進する Cx43 変異体を導入したトランスジェニックゼブラフィッシュを作成し、*stp*/+ゼブラフィッシュ以外でもヘミチャネルの異常活性によって椎骨短縮が生じることを確かめる必要がある。それらの結果を得られれば、初期形成と成長の２つの骨形成モードの存在がさらに明らかにされると思われる。今後の研究の進展に期待する。

参考文献

1. Komori T (2006) Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99(5):1233-1239.
2. Harada S, Rodan GA (2003) Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423(6937):349-355.
3. Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D (2007) Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem Cells* 25(3):544-552.
4. Doty SB (1981) Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 33(5):509-512.
5. Palumbo C, Palazzini S, Marotti G (1990) Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone* 11(6):401-406.
6. Bivi N et al. (2012) Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. *J Bone Miner Res* 27(2):374-389.
7. Klein-Nulend J et al. (1995) Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J* 9(5):441-5.
8. Cherian PP et al. (2005) Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 16(7):3100-3106.
9. Gluhak-Heinrich J et al. (2003) Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res* 18(5):807-817.

10. Khosla S (2001) Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142(12):5050-5055.
11. To TT et al. (2012) Rankl-induced osteoclastogenesis leads to loss of mineralization in a medaka osteoporosis model. *Development* 139(1):141-150.
12. Schoenebeck JJ et al. (2012) Variation of BMP3 contributes to dog breed skull diversity. *PLoS Genet* 8(8):e1002849.
13. Attanasio C et al. (2013) Fine tuning of craniofacial morphology by distant-acting enhancers. *Science* 342(6157):1241006.
14. Cooper KL et al. (2013) Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. *Nature* 495(7441):375-378.
15. Iovine MK, Higgins EP, Hindes A, Coblitz B, Johnson SL (2005) Mutations in connexin43 (GJA1) perturb bone growth in zebrafish fins. *Dev Biol* 278(1):208-219.
16. Perathoner S et al. (2014) Bioelectric signaling regulates size in zebrafish fins. *PLoS Genet* 10(1):e1004080.
17. Huycke TR, Eames BF, Kimmel CB (2012) Hedgehog-dependent proliferation drives modular growth during morphogenesis of a dermal bone. *Development* 139(13):2371-2380.
18. Haffter P et al. (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio. *Development* 123:1-36.
19. Inohaya K, Takano Y, Kudo A (2010) Production of Wnt4b by floor plate cells is essential for the segmental patterning of the vertebral column in medaka. *Development* 137(11):1807-1813.
20. Haffter P et al. (1996) Mutations affecting pigmentation and shape of the adult zebrafish. *Dev Genes Evol* 206(4):260-276.
21. Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C (2008) Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322(5907):1551-1555.
22. Guerrero PA et al. (1997) Slow ventricular conduction in mice heterozygous for a connexin43 null mutation. *J Clin Invest* 99(8):1991-1998.
23. Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE (2000) Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Circulation* 101(5):547-552.
24. Negoro H et al. (2012) Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. *Nat Commun* 3():809.

25. Schiller PC, Mehta PP, Roos BA, Howard GA (1992) Hormonal regulation of intercellular communication: parathyroid hormone increases connexin 43 gene expression and gap-junctional communication in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 6(9):1433-1440.
26. Schirrmacher K et al. (1992) Characterization of gap junctions between osteoblast-like cells in culture. *Calcif Tissue Int* 51(4):285-290.
27. Donahue HJ et al. (1995) Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. *J Bone Miner Res* 10(6):881-889.
28. Ilvesaro J, Vaananen K, Tuukkanen J (2000) Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Miner Res* 15(5):919-926.
29. Flenniken AM et al. (2005) A Gja1 missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Development* 132(19):4375-4386.
30. Urasaki A, Morvan G, Kawakami K (2006) Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* 174(2):639-649.
31. Cermak T et al. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 39(12):e82.
32. Dahlem TJ et al. (2012) Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genet* 8(8):e1002861.
33. Furutani K, Ohno Y, Inanobe A, Hibino H, Kurachi Y (2009) Mutational and in silico analyses for antidepressant block of astroglial inward-rectifier Kir4.1 channel. *Mol Pharmacol* 75(6):1287-1295.
34. Hoptak-Solga AD, Klein KA, DeRosa AM, White TW, Iovine MK (2007) Zebrafish short fin mutations in connexin43 lead to aberrant gap junctional intercellular communication. *FEBS Lett* 581(17):3297-3302.
35. Suda K et al. (2004) Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J Immunol* 172(4):2504-2510.
36. Pizzuti A et al. (2004) A homozygous GJA1 gene mutation causes a Hallermann-Streiff/ODDD spectrum phenotype. *Hum Mutat* 23(3):286.
37. Laird DW (2014) Syndromic and non-syndromic disease-linked Cx43 mutations. *FEBS Lett* 588(8):1339-1348.

38. Reaume AG et al. (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267(5205):1831-1834.
39. Makarenkova H, Patel K (1999) Gap junction signalling mediated through connexin-43 is required for chick limb development. *Dev Biol* 207(2):380-392.
40. McGonnell IM, Green CR, Tickle C, Becker DL (2001) Connexin43 gap junction protein plays an essential role in morphogenesis of the embryonic chick face. *Dev Dyn* 222(3):420-438.
41. Bivi N et al. (2012) Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. *J Bone Miner Res* 27(2):374-389.
42. Chung DJ et al. (2006) Low peak bone mass and attenuated anabolic response to parathyroid hormone in mice with an osteoblast-specific deletion of connexin43. *J Cell Sci* 119(Pt 20):4187-4198.

謝辞

本研究は大阪大学大学院生命機能研究科パターン形成研究室において行った。研究に際しては、近藤滋教授、渡邉正勝准教授、山中洋昭研究員、城田研究員を始めパターン形成研究室の方々に、快適な実験環境、実験方法の指導、そして研究における有意義な示唆等、多大なご支援を頂いた。*stp* ゼブラフィッシュ変異体は Max Planc 研究所の Hans Georg Frohnhöefer 教授から分与を受けた。*sof*^{b123} ゼブラフィッシュ変異体は Lehgh University の M. Kathryn Iovine 教授から分与を受けた。CT スキャンについては大阪バイオサイエンス研究所と島津製作所のご支援を頂き、それぞれ CT スキャナーLaTheta LCT-100 と CT スキャナー inspeXio SMX-100CT を使用しデータの所得と解析を行った。トランスジェニックの作製に用いた Tol2 ベクターは国立遺伝学研究所の川上浩一教授から分与を受けた。電気生理実験については渡邉正勝准教授に多大なご協力をいただき、データの所得と解析を行った。電気生理実験に使用した pGEM-HeFx ベクターは大阪大学の倉智嘉久教授から分与を受けた。研究を支えてくださったこれら多くの方々、研究所様、企業様にこの場を借りて、感謝を述べさせていただきます。

業績

学会発表

BMB2015（第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会）（口頭発表）2015/12/2

ゼブラフィッシュ骨形成におけるギャップジャンクションの機能

三須晃裕，渡邉正勝，山中洋昭，荒巻敏寛，I. Martha Skerrett，近藤滋

International Gap Junction Conference（ポスター発表）2015/3/29

Post embryotic malformation of vertebrae in zebrafish caused by the mutation in Cx43.

Akihiro Misu, Masakatsu Watanabe, Hiroaki Yamanaka, I. Martha Skerrett, Shigeru Kondo

11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics（ポスター発表）2014/6/26

Post embryotic malformation of vertebrae in zebrafish is caused by mutation of c x43.

Akihiro Misu, Hiroaki Yamanaka, Shigeru Kondo

主著論文

Akihiro Misu, Hiroaki Yamanaka, Toshihiro Aramaki, Shigeru Kondo, I. Martha Sker rett, M. Kathryn Iovine and Masakatsu Watanabe, Two different functions of Conne xin43 in zebrafish bone formation（投稿中）