The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	内軟骨性骨形成過程におけるプロテインキナーゼYank1の役割の解明
Author(s)	吉川, 浩史
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72257
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

内軟骨性骨形成過程における
プロテインキナーゼ Yank1 の役割の解明

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

顎顔面口腔矯正学教室

（顎口腔分子細胞生物学教室）

吉川　浩史

緒言

脊椎動物の骨格は、膜性骨形成と内軟骨性骨形成の二つの様式により形成される[1–3]。膜性骨形成は未分化間葉系細胞から分化した骨芽細胞によって直接的に骨が形成される過程であり、鎖骨や頭蓋骨、上下顎骨の一部などを形成する[1,2]。一方、内軟骨性骨形成は未分化間葉系細胞が軟骨細胞に分化し、段階的に分化・成熟し、軟骨組織が骨組織へと置換される多段階から成る複雑な過程であり、椎骨や肋骨、四肢の長管骨、脳頭蓋底などを含む大部分の骨格形成を担っている[1–3]。内軟骨性骨形成では、まず未分化間葉系細胞が凝集し、静止軟骨細胞へと分化する[2,3]。そして静止軟骨細胞は、増殖軟骨細胞、さらに肥大軟骨細胞へと分化・成熟し、軟骨基質であるアグリカンや 2 型および 10 型コラーゲンなどを分泌しながら軟骨組織を形成する[3]。その後、軟骨基質の石灰化と分解、軟骨細胞のアポトーシスを経て、軟骨組織に生じた間隙に血管が侵入する[3]。侵入した血管に含まれる未分化間葉系細胞が骨芽細胞へと分化し骨形成を進め、その結果、軟骨組織を骨組織に置換し、内軟骨性骨形成は完了する[1–3]。

内軟骨性骨形成の過程は、様々なサイトカイン、シグナル伝達物質および転写因子により緻密に制御されている。内軟骨性骨形成に関わるサイトカインとしては、骨形成因子（Bone morphogenetic protein : BMP）、線維芽細胞増殖因子（Fibroblast growth factors : FGF）[4,5]、インディアンヘッジホッグ（Indian Hedgehog : Ihh）[6,7]、血管内皮細胞増殖因子（Vascular

endothelial growth factor：VEGF）[8,9]、Wingless-type MMTV integration site family（Wnt）[10,11]、副甲状腺ホルモン関連蛋白（Parathyroid hormone-related protein：PTHrP）[12,13]などが知られている。その中でも、BMP2 は内軟骨性骨形成過程に特に重要な役割を担っていることが示されている。BMP はもともと、脱灰骨基質をウサギの筋組織に埋入することで骨組織が誘導されたことにより発見されたタンパク質である[14]。その発見後、ウシの骨抽出液から BMP1、BMP2、BMP3 が抽出され、その一次構造を解析した結果、BMP1 がメタロプロテアーゼであり、BMP2、BMP3 がトランスフォーミング増殖因子β（Transforming growth factor β：TGF-β）スーパーファミリーに属することが示された[15]。現在に至るまで約 15 種の BMP が存在し、BMP1 以外が TGF-βスーパーファミリーに属していることが報告されている[16,17]。ヒト骨髄由来の未分化間葉系細胞に BMP2 を作用させると、軟骨細胞へと分化が誘導されることが知られている[18]。またマウス筋芽細胞株 C2C12 に BMP2 を作用させると、筋管細胞への分化が阻害され、骨芽細胞へと分化することが明らかになっている[19]。また in vivo において、BMP アンタゴニストである Noggin を強制発現させたトランスジェニックマウスでは、軟骨形成が阻害されることが知られている[20]。さらに、肢芽特異的な BMP2 コンディショナルノックアウト（conditional Knock Out：cKO）マウスは、軟骨細胞の成熟の阻害や、一次骨化中心の形成の遅延などの表現型を呈し、重篤な軟骨異形成症状をきたす[21]。このように BMP2 は、内軟骨性骨形成の初期から後期にかけて重要な役割を果たしている。BMP2 の細胞内シグナル伝達経路は、Smad 経路と、非 Smad 経路に大別される[22]。内

軟骨性骨形成過程における Smad 経路では、BMP2 が、2 型および 1 型の BMP 受容体に結合すると、2 型受容体が 1 型受容体の細胞膜貫通部直下に存在する Glycine/serine-rich domain（GS）ボックスをリン酸化し、1 型受容体のセリンスレオニンキナーゼが活性化される。活性化された 1 型受容体は、Smad1、Smad5 あるいは Smad8 をリン酸化し、共有型 Smad である Smad4 とタンパク質複合体を形成し、その後、細胞核内へ移行し、標的遺伝子の転写を制御する [23]。また、内軟骨性骨形成に関わるシグナル伝達物質としては、前述の Smad や分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ（Mitogen-activated Protein Kinase : MAPK）やホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ（phosphatidylinositol 3-kinase : PI3K）などがあげられる。MAPK は、代謝、増殖、分裂、運動、アポトーシスなど、細胞のさまざまな機能に関与するセリンスレオニンキナーゼであり、これまでのところ細胞外シグナル制御キナーゼ（Extracellular Signal-regulated Kinase : ERK）、c-Jun N 端末キナーゼ（c-Jun N-terminal kinase：JNK）、p38 の 3 種類が同定されている。繊維芽細胞成長因子受容体 3（Fibroblast growth factors receptor 3：FGFR3）は MAPK シグナル伝達経路を介して軟骨細胞の増殖および分化を制御している [24–26]。PI3K の標的である Akt1 をノックアウトしたマウスでは、二次骨化中心の形成が阻害されると報告されている [27]。内軟骨性骨形成に深く関与する転写因子としては、Sex determining region Y（SRY）-box 9（Sox9）、Sox5 および Sox6 は未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化に [28]、Runt-related transcription factor 2（Runx2）は軟骨細胞の肥大化に [6,29]、Sp7 transcription factor（Sp7/Osterix）は Runx2 の下流において

軟骨基質の石灰化と分解に対して必須的役割を担っている[30]。

このような緻密な制御がなされている中で、いずれかのステップに障害が生じると、様々な軟骨疾患を誘発することが知られている。FGFR3 遺伝子の変異により軟骨細胞の増殖が阻害されることにより発症する軟骨無形成症（Achondroplasia : ACH）およびタナトフォリック骨異形成症（Thanatophoric dysplasia : TD）や[31]、2 型コラーゲン遺伝子の変異により軟骨基質の分泌が阻害されることにより発症する Stickler 症候群[32]や Kniest 症候群[33]など、様々な軟骨疾患の原因遺伝子とメカニズムが明らかになっている。これらの疾患に対しては、仮骨延長術や矯正歯科治療を伴う上下顎骨骨切り術などの外科的治療法が行われている。また近年、高コレステロール血症治療薬であるスタチンを TD 患者由来の iPS 細胞実験系および ACH マウスモデルに添加あるいは投与すると、軟骨細胞の増殖能および骨の伸長が生じることが示され[26]、これら疾患への薬剤治療法が模索されている。したがって、内軟骨性骨形成過程に関連する疾患の病因を明らかにすることは、歯科医学、歯科医療および医学の発展に寄与すると期待される。

本研究においては、BMP2 により制御され、内軟骨性骨形成過程に関与する新規遺伝子を同定するために、マウス肢芽細胞を用いて Microarray 解析を行い、機能がほとんど未知であるプロテインキナーゼ Yank1（Yet another novel kinase 1）を同定した。さらに、*Yank1* の発現制御メカニズムの解明とともに、*Yank1* 遺伝子欠損マウスを作製してその機能解析を試みた。

方法

1. マウス肢芽細胞の単離と培養

胎生 13.5 日齢の Slc : ICR マウス（以下 ICR マウス）（日本 SLC、静岡）の肢芽をリン酸緩衝生理的食塩水（Phosphate buffered salts : PBS）（Wako、大阪、日本）中で分離し、0.05%トリプシン含有 0.53 mM エチレンジアミン四酢酸（Ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA）（ナカライテスク、京都、日本）を用いて 37°C の温浴槽で約 10 分間振盪して消化した。消化後、40 μm セルストレーナー（BD Falcon、CA、USA）で細胞液を濾過し、濾過液中の細胞を 230 g で 5 分間遠心して、肢芽細胞を単離した。細胞濃度が 16×10^4 細胞/cm^2 になるよう 10%ウシ胎仔血清（Fetal bovine serum : FBS）（Gibco Laboratory、NY、USA）およびペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液（x100）（Wako）を含むα改変型イーグル最小必須（αMEM）培地（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）で培養した。

2. マウス骨芽細胞の単離と培養

生後 3 日齢の ICR マウス（日本 SLC）の頭蓋冠を採取し、付着軟組織を除去し、4 mM EDTA 含有 PBS を用いて 37°C 温浴槽で約 10 分間振盪して消化した。消化処理および PBS による洗浄を 3 回繰り返した後、0.2%コラゲナーゼ（Fujifilm、東京、日本）含有 PBS 溶液を用いて 37°C 温浴槽で酵素処理を連続して 3 回行った。1 回目の酵素処理は 10 分間行い、

上清をアスピレーターで吸引した。2 回目および 3 回目の酵素処理は 20 分間行い、上清を 40 μm セルストレーナーで濾過、230 g で 5 分間遠心した。濾過液を混合し、細胞濃度が 3 ×10^4 細胞/cm^2 になるように 10% FBS を含むαMEM 培地で培養した。

3.　細胞培養

ヒト胎児腎臓由来細胞株 293、マウス筋芽細胞株 C2C12、マウス未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 は理研細胞バンク（埼玉、日本）より購入した。レンチウイルスパッケージング細胞 LentiX-293T は TAKARA（滋賀、日本）より購入した。肢芽細胞、骨芽細胞、C2C12 細胞、および C3H10T1/2 細胞は 10% FBS を含むαMEM 培地にて、293 細胞は 10% FBS を含むダルベッコ改変イーグル（DMEM）（低グルコース）培地（Sigma-Aldrich）にて、LentiX-293T 細胞は 10% FBS を含む DMEM（高グルコース）培地（Sigma-Aldrich）にて、37°C、5%二酸化炭素気相下で培養した。

4.　リコンビナント BMP2 の作製

BMP2 遺伝子の全長を pcDNA3.1（Invitrogen、CA、USA）を用いてサブクローニングした発現ベクターを X-tremeGene 9 DNA Transfection Reagent（Roche、Basel、Switzerland）を用いて、10% FBS 含有 DMEM（高グルコース）培地にて培養した Renti-X 細胞にトランスフェクションさせた。6 時間後に培地を交換し、3 日後に上清を回収し、リコンビナント

BMP2 として実験に用いた。

リコンビナント BMP2 の効果は、マウス肢芽細胞のアルカリホスファターゼ活性の促進効果により確認した。胎生 13.5 日齢の ICR マウスの肢芽細胞をリコンビナント BMP2 存在下あるいは非存在下のαMEM 培地で 5 日間培養し、PBS にて洗浄後、4%ホルマリン溶液（WAKO）にて 10 分間固定処理を行い、330 ng/ml Nitro blue tetrazolium（NBT）（Sigma）、165 ng/ml Bromochoroindory phosphate（BCIP）（Sigma）、100 mM NaCl および 5 mM $MgCl_2$ を含む 100 mM トリス塩酸緩衝液（pH 9.5）で 37°C にて反応させ、アルカリホスファターゼ染色を行った。

5.　全RNAの精製

培養細胞をPBSで洗浄後、NucleoSpin RNA Plus（Takara）を用いて全RNAを精製した。マウス生体組織は、胎生12.5日齢のICRマウスより、心臓、脳、肝臓、肺、胃、および肢芽組織を採取し、速やかに液体窒素にて凍結させ、組織粉砕専用機Micro Smash（TOMY、東京、日本）を用いて4000 rpmで30秒間粉砕処理後、氷上で1分間冷却し、再度4000 rpmで30秒間粉砕処理を行った。得られた上清からNucleoSpin RNA Plusを用いて全RNAを精製した。

6.　アデノウイルスの作製

改変型緑色蛍光タンパク質 Venus、BMP2、Runx2、Osterix、Msx2、ならびに Smad6 ア

デノウイルスは、Takigawa らが Adenovirus Dual Expression Kit（TAKARA）を用いて作製したもの[34]を使用した。それぞれのアデノウイルスベクターは、293 細胞で増幅後、ウエスタンブロッティングにて発現を確認した後に、実験に供した。

7. Microarray解析

胎生13.5日齢のICRマウスから肢芽細胞を採取し、BMP2アデノウイルス添加群と非添加群に分けて48時間培養した。NucleoSpin RNA Plus Kitを用いて全RNAを精製し、GeneChip 3'IVT Plus Reagent Kit（Thermo Fisher Scientific、Wilmington、USA）を用いてcDNAを合成した。GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array（Thermo Fisher Scientific）上で16時間ハイブリダイズし、洗浄後、Gene Chip Scanner 30007 G（Thermo Fisher Scientific）でスキャンした。その後、Affymetrix Expressiom（Thermo Fisher Scientific）によって定量化した。

8. ウエスタンブロッティング法

細胞を PBS で洗浄後、細胞溶解液｛50 mM トリス塩酸（pH7.4）、150 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、1%ノニデット P40、0.25%デオキシコール酸ナトリウム｝にて溶解し、細胞溶解液を 4°C、20000 g で 5 分間遠心し、上清をメルカプトエタノール含有ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）サンプルバッファー｛197.5 mM Tris-HCl（pH 6.8）、6.0%（v/v）SDS、15.0%（v/v）2-メルカプトエタノール、9.56%（w/v）sucrose、0.040%（w/v）ブロモフェ

ノールブルー｝で熱溶解（95°C、5 分間）し、サンプルとした。サンプルを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法により分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写後、一次抗体として、マウス抗β-Actin 抗体（MBL、名古屋、日本）、マウス抗 Flag 抗体（Sigma-Aldrich）、マウス抗 Runx2 抗体（MBL）あるいはヤギ抗 Myc 抗体（abcam、Cambridge、UK）と反応させ、二次抗体として西洋わさび過酸化酵素を付与した抗マウス IgG 抗体、（Jackson Immuno Research、PA、USA）、あるいは抗ヤギ IgG 抗体（MBL）と反応させた。イムノスターLD（Wako）を用いて発光シグナルを増幅した後、X 線フィルム（Kodak、NY、USA）に現像した。

9. Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction（RT-qPCR）による mRNA の定量

精製した全 RNA を 65°C、5 分間変性させた後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（TOYOBO、大阪、日本）を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。mRNA 発現の定量は、得られた cDNA を鋳型として、Taqman あるいは SYBR Green PCR protocol に従い、StepOnePlus（Applied Biosystems、Branchburg、NJ、USA）を用いて行った。使用した Taqman および SYBR GREEN のプローブおよびプライマーは、表 1 に示す。

10. *Yank1* ノックアウト（KO）マウスの作製

Yank1 遺伝子の第 2 エキソンの開始コドン直下に、終止コドンを含む短い 1 本鎖 DNA（ssODN）が挿入されるように設計し（図 1）、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて *Yank1* 遺伝子欠損マウスを作製した。Technique for Animal Knockout system by Electroporation（TAKE 法）[35] に準じ、Cas9 タンパク質、crRNA、tracrRNA、ssODN をエレクトロポレーションにて C57BL6/J マウスの前核期受精卵に導入し、20 時間培養後、2 細胞期に達したマウス胚を偽妊娠マウスの卵管移植し、*Yank1* 遺伝子欠損ヘテロマウス（F0 系統）を作製した。*Yank1* 遺伝子欠損は、PCR 解析およびその PCR 産物のシークエンス解析｛Macrogen Japan（京都、日本）での受託解析｝にて確認した。使用した PCR プライマーは図 2 に示した。F0 マウスと C57BL6/J を交配させて、PCR 解析にて germ line transmission を確認し、*Yank1* 遺伝子ヘテロ変異マウス（F1 系統）を樹立した。*Yank1* 遺伝子ヘテロ欠損マウス同士の交配により *Yank1* KO マウスを作製した。

11. アルシアンブルー・アリザリンレッド二重染色による骨格標本の作製

マウス新生仔もしくはマウス胎仔を 95%エタノール液中に浸漬固定し、アルシアンブルー溶液（80%エタノール、5%酢酸、0.015%アルシアンブルー）にて 24 時間浸漬し、軟骨組織を染色した。100%エタノールにて脱水し、1%水酸化カリウム溶液にて軟組織を除去した後、1%水酸化カリウムを含む 0.002%アリザリンレッド S 溶液を用いて石灰化組織を染

色した。1%水酸化カリウムを含むグリセリン溶液にて余分に染色されている部分を脱色後、実体顕微鏡下にて観察および写真撮影を行った。

12. ヘマトキシリンエオジン染色

胎生 15.5 日齢マウスより後肢を採取した後、4°C で 4%パラホルムアルデヒドに 1 晩浸漬固定後、通法に従ってパラフィン包埋し、厚さ 5 μm の切片を作成した。非脱灰パラフィン切片を脱パラフィン処理後、流水で洗浄し、ヘマトキシリンにて 15 分間染色した。20 分間流水洗浄した後、エオジンにて 1 分間染色してから脱水した。

13. von Kossa 染色

非脱灰パラフィン切片を脱パラフィン処理後、脱イオン水で 2 回洗浄し、5%硝酸銀水溶液を加え、30 分間、日光に照射して発光させた。脱イオン水で 2 回洗浄し、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え室温に 2 分間静置し反応を停止した。対比染色はケルンエヒロート液を用いた。

14. 蛍光免疫染色

非脱灰パラフィン切片を 60°C で 1 時間ベーキングし、室温で 15 分放置した。脱パラフィン処理後、脱イオン水で 3 回、PBS で 1 回洗浄した後に、5%ヒアルロニダーゼ/PBS 溶

液にて、37°C、30 分間、抗原賦活を行った。その後、PBS で 3 回洗浄し、1% BSA 含有 0.05%アジ化ナトリウム PBS にて 1 時間、室温でブロッキングを行った。その後一次抗体として抗マウス 2 型コラーゲン抗体（Chondrex、Redmond、WA、US）、抗ウサギ 10 型コラーゲン抗体（LSL、東京）あるいは抗ウサギ MMP13 抗体（abcam、Cambridge、UK）にて 4°C で一晩反応させた。その後 PBS で 3 回洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor 555（Invitrogen、Carlsbad、CA、USA）と結合した抗マウス IgG 抗体もしくは抗ウサギ IgG 抗体を室温で 30 分反応させた。PBS で 3 回洗浄後、VECTA SHIELD Mounting Medium with DAPI（VECTOR LABORATORIES、CA、USA）にてスライドガラスを封入し、蛍光顕微鏡下にて写真撮影を行った。

15. 統計処理

実験結果は、平均値±標準偏差（SD）で表し、P 値が 5%未満のものを有意差ありとした。2 群間比較にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。3 群間以上の比較には 1 要因の場合 Kruskal-Wallis 検定、2 要因の場合 Aligned Rank Transform 後に Two way ANOVA 検定を行い、P 値が 5%未満のものに対して Turkey 検定を用いて多重比較検定を行った。統計学的処理は GraphPad Prism 8（GraphPad Software Inc、San Diego、CA）を用いて行った。

結果

1. BMP2 誘導性新規因子 *Yank1* 遺伝子の同定および発現の検討

内軟骨性骨形成の制御に関与する新規因子を同定するために、軟骨細胞への高い分化能を有する胎生 13.5 日齢の ICR マウスの肢芽細胞を BMP2 アデノウイルス存在下で培養し、BMP2 により発現上昇する遺伝子を Microarray 解析にて網羅的に検索した。その結果、新規プロテインキナーゼ *Yank1* の発現が、BMP2 により誘導されることが見出された（表 2）。また、RT-qPCR 解析によっても、BMP2 刺激により *Yank1* mRNA の発現が誘導されることを確認した（図 3）。

2. 内軟骨性骨形成過程に関連する細胞における Yank1 の発現誘導能の検討

前述のように、内軟骨性骨形成は未分化間葉系細胞が軟骨細胞に分化し、軟骨細胞が分化・成熟し、軟骨組織が骨組織へと置換される生命現象である。このいずれの過程の細胞において Yank1 が関係しているかを探索するために、マウス未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2、マウス筋芽細胞株 C2C12、胎生 13.5 日齢のマウス肢芽細胞、骨組織を形成するマウス頭蓋冠由来骨芽細胞の 4 種の細胞を用いて、BMP2 刺激あるいは非刺激下における *Yank1* の発現を解析した。それぞれの細胞に対してアデノウイルスベクターを用いて BMP2 を過剰発現させ、*Yank1* mRNA の発現を RT-qPCR 法にて解析した結果、BMP2 は、肢芽細胞に加え

て、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞においても、*Yank1* の発現を著明に増加させた。一方、C2C12 細胞および C3H10T1/2 細胞においては、BMP2 刺激あるいは非刺激下のいずれの条件下においても、*Yank1* の発現はほとんど検出できなかった（図 4）。したがって Yank1 は、軟骨細胞および骨芽細胞の分化において機能を発揮していると示唆された。一方、C2C12 細胞や C3H10T1/2 細胞の株化細胞においては、BMP2 存在下でも Yank1 の発現が認められなかったため、*Yank1* の発現誘導には、肢芽細胞および骨芽細胞特異的な因子が存在し、その関与が必要であると考えられた。

3. 肢芽成長過程における Yank1 の発現時期に関する検討

さらに肢芽組織の成長過程における *Yank1* の発現時期を探索するために、軟骨原基が形成され始める胎生 11.5 日齢から、軟骨組織の石灰化が進行する胎生 15.5 日齢までの ICR マウスの肢芽組織より全 RNA を回収し、RT-qPCR 法にて *Yank1* の発現を解析した。その結果、胎生 11.5 から 15.5 日齢までの間、*Yank1* の発現に明確な変動は認めなかった（図 5）。したがって、Yank1 は生体組織において、軟骨原基の形成過程から軟骨組織の石灰化過程、すなわち内軟骨性骨形成の初期から成熟期において、ほぼ一定に発現していることが示された。

4. BMP2 による Yank1 の発現制御機構に関する検討

BMP2 は、Smad シグナル経路を主要なシグナル伝達経路としている。そこで Smad シグナル伝達経路と、*Yank1* の発現制御機構との関係を検討するために、胎生 13.5 日齢の肢芽細胞に対して、BMP2 とともに Smad6 を過剰発現させ、RT-qPCR 解析にて *Yank1* の発現を検索した。その結果、Smad6 の過剰発現により Smad シグナル伝達経路を阻害すると、BMP2 誘導性の *Yank1* の発現上昇が抑制された（図 6）。したがって BMP2 は、Smad シグナル伝達経路を介して *Yank1* を誘導することが示された。

また、BMP2 の下流で機能する転写因子 Runx2、Osterix、および Msx2 と Yank1 の発現制御機構との関係を検討するために、胎生 13.5 日齢の肢芽細胞に、Runx2、Osterix、あるいは Msx2 アデノウイルスを作用させ、RT-qPCR 法にて解析を行った。その結果、これらの転写因子を過剰発現しても、*Yank1* の発現への効果は認められなかった（図 7）。

5. *Yank1* 遺伝子ホモ欠損（KO）マウスの作製

生体における Yank1 の機能解析を行うため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて *Yank1* KO マウスを作製した。TAKE 法に基づいて *Yank1* 遺伝子の第 2 エキソンの開始コドン直下に、終止コドンを含む ssODN を挿入したところ、F0 系統のマウスが 16 匹得られた。PCR 解析および DNA シークエンス解析により、#5 の雌マウスと#15 の雄マウスの 2 匹が *Yank1* 遺伝子変異マウスであると考えられた（図 8）。Germ line transmission を確認するため、F0 系統の#15 の雄マウスと C57BL6/J の雌マウスを交配させ、*Yank1* 遺伝子ヘテロ欠

損マウスの F1 系統を作出した。PCR 解析により、F1 系統への Germ line transmission を確認できたため、F1 系統の *Yank1* 遺伝子ヘテロ欠損マウス同士を交配し、*Yank1* KO マウスを作製した。*Yank1* KO マウスの表現型は、同腹の野生型マウスと比較して解析した。*Yank1* 遺伝子ヘテロ欠損マウスおよび *Yank1* KO マウスは、外見上、正常に成長発育し、生殖能も有していた。

6. *Yank1* KO マウスの骨格の解析

骨格形成への Yank1 の関与を検討するために、胎生 14.5 日齢、胎生 16.5 日齢、および生後 0 日齢の *Yank1* KO マウスおよび同腹の野生型をアリザリンレッド・アルシアンブルー二重染色し、骨格標本を作製、観察した。*Yank1* KO マウスは、いずれの時期においても、全身の骨格の形態および大きさ、四肢骨や手指、肋骨、鎖骨、頭蓋骨の軟骨組織の形成ならびに骨組織の石灰化の程度に関して明確な表現型は認めなかった（図 9、10、11）。さらに詳細に内軟骨性骨形成過程における Yank1 の関与を検討するために、胎生 16.5 日齢の *Yank1* KO マウスの脛骨組織を病理組織学的に検索した。*Yank1* KO マウスの軟骨細胞の分化、成熟、および一次骨化中心の石灰化は、同腹の野生型マウスと違いは認めなかった（図 12）。また、*Yank1* KO マウスにおける 2 型コラーゲン、10 型コラーゲンおよび MMP13 の発現も、同腹の野生型マウスと同程度であった（図 13）。

7. Yank1 を代償する因子の探索

Yank1 KO マウスにおいて骨格形成および四肢骨における石灰化および軟骨細胞の成熟に明確な表現型が観察されなかった理由として、他の分子が Yank1 の機能を代償している可能性が推察される。その候補として、Yank1 と高いホモロジーを有し、同じファミリーメンバーである Yank2 が考えられた。Yank2 は、約 48kDa のセリンスレオニンキナーゼであり、ヒトにおいて 4p16 の遺伝子座に位置している。4p16 の欠失が原因で発症すると報告されている Ellis-van Creveld（EVC）症候群は、多指、四肢と肋骨の短縮、および爪と歯の異形成等を特徴とする常染色体劣性遺伝の症候群である [36–38]。これらの知見を踏まえて、胎生 12.5 日齢マウス組織における *Yank2* の発現を RT-qPCR 法にて検索したところ、肢芽および脳に、*Yank2* の高い発現を認めた（図 14）。したがって、Yank2 は肢芽形成過程に発現し、Yank1 の機能を代償していると推察された。そこでマウス肢芽細胞における Yank2 の発現が、Yank1 と同様に BMP2 により制御を受けているか否かを RT-qPCR 法にて検索した。その結果、BMP2 は Yank2 の発現に影響を与えなかった（図 15）。また Yank1 および Yank2 と同じファミリーメンバーである Yank3 の発現をマウス肢芽細胞およびマウス骨芽細胞にて RT-qPCR 法を用いて検索したが、BMP2 の存在の有無にかかわらずその発現は検出限界以下であった。また胎生 12.5 日齢マウスの肢芽組織における *Yank3* の発現量も検出限界以下であった。

考察

BMP2 は、さまざまなシグナル伝達分子や転写因子を介し、内軟骨性骨形成過程において多様な役割を果たしていることが明らかにされつつあるが[18--30, 39, 40]、内軟骨性骨形成過程における BMP2 の制御機構の全貌は未だ明らかになっていない。BMP2 が複雑な内軟骨性骨形成過程をどのようにして制御しているのか、また BMP2 シグナル伝達経路の異常が軟骨あるいは関節疾患の発症にどのように繋がるのかを解明することは、学術的にも臨床的にも重要な課題である。そこで本研究では、BMP2 シグナルの下流で機能し、内軟骨性骨形成を制御する新規因子の同定と、その機能的役割の解明を目指した。その結果、BMP2 により発現上昇する遺伝子として *Yank1* を同定し、*Yank1* が、肢芽細胞および骨芽細胞特異的において Smad 経路を介して、発現調節されることを明らかにした。また、*Yank1* KO マウスを作製して骨格形成および軟骨細胞の分化・成熟における Yank1 の役割の解明を試みた。しかしながら *Yank1* KO マウスにおいて明確な表現型は確認できなかった。その原因として、Yank1 と同じファミリーに属する Yank2 が代償的に働いている可能性が推察された。

Microarray 解析の結果、肢芽細胞における BMP2 による *Yank1* の発現上昇の程度は、内軟骨性骨形成過程に必須な *Osterix*[39] や *Msx2*[40] と比較しても大きかった（表 2）。Yank1 は、セリンスレオニンキナーゼドメインを有していることから、セリンスレオニンキナーゼとして機能すると予測される。ヒトゲノム遺伝子解析により、約 518 種のプロテインキナー

ゼが同定されており、セリンスレオニンキナーゼは、ヒトと種々の真核生物を比較した進化系統学的解析により 7 つのグループに分類される [41]。Yank1 はその中の AGC グループに属する。AGC グループは 3 つの代表的なファミリー、cAMP 依存性プロテインキナーゼ（cAMP-dependent protein kinase：PKA）、cGMP 依存性プロテインキナーゼ（cGMP-dependent protein kinase：PKG）およびプロテインキナーゼ C（protein kinase C：PKC）にちなんで命名され、Yank ファミリーを含む合計 14 のファミリーに分類される [42]。しかしながら Yank1 の機能的役割については、ほとんど研究がなされていない。胎生 11.5 日齢から 15.5 日齢のマウスにおいて、肢芽は劇的に変化し成長を遂げ、内軟骨性骨形成が進行する [43]。この期間、BMP2 は持続的に発現しており、胎生 11.5 日齢では外胚葉性頂堤（apical ectodermal ridge：AER）および肢芽の後側に、胎生 12.5 日齢では指間組織および後側の手首形成予定領域に、胎生 13.5 日齢では指間組織および指骨形成予定領域の軟骨原基に、胎生 14.5 日齢では指節間関節の形成予定領域周辺に、それぞれ限局して発現している [44]。この時期の肢芽組織において *Yank1* がほぼ一定に発現していたことから（図 5）、Yank1 は BMP2 と関連して軟骨細胞の分化および軟骨組織の形成に関与している可能性が推測された。そこで Yank1 の生体内における機能解析を行うために *Yank1* KO マウスを作製し解析したが、骨格形成や軟骨細胞の分化等に明確な表現型は認められなかった。その原因として Yank1 の機能を代償する他の分子の存在が示唆された。Yank ファミリーには、Yank1 の他に Yank2（Stk32b）と Yank3（Stk32c）が存在しており、Yank2 は約 70%、Yank3 は約 66%と、Yank1 に対し

て高いホモロジーを有しているが、これらの機能もほとんど明らかにされていない。本研究結果より、胎生 12.5 日齢のマウスの肢芽において、*Yank2* の高い発現を認めた（図 14）。一方、肢芽細胞における *Yank3* の発現は、BMP2 の存在の有無に拘らず検出できなかった。以上の結果から、Yank2 が Yank1 の機能を代償し、肢芽の成長ならびに内軟骨性骨形成の制御に関与している可能性が推測された。興味あることに、肢芽細胞における *Yank2* の発現への BMP2 の効果は認められなかったことから（図 15）、Yank2 は BMP2 非依存的に機能していると示唆された。

YANK2 遺伝子は、ヒトでは 4p16 の遺伝子座に位置しており、4p16 の欠失により多指、低身長あるいは歯の形態異常や先天欠如などを主症状とする常染色体劣性遺伝疾患である EVC 症候群を来すと報告されている [36,38]。EVC 症候群は、*EVC1* および *EVC2* 遺伝子の変異によって発症すると報告されており [36]、*EVC1* および *EVC2* 遺伝子に近接する *Yank2* 遺伝子の変異もその発症に関与する可能性が示唆されている [36,37,45]。また EVC 症候群は、軟骨形成不全を呈することも報告されている [36]。これらの遺伝学的研究は、内軟骨性骨形成における Yank2 の関与を示唆している。EVC 症候群は、顎顔面形態の異常により、審美障害、発音障害、咀嚼障害を来すことがあり、その改善のためには歯科矯正学的治療が必要であり [38]、我が国において歯科矯正治療が保険適応となる疾患の一つである。この観点から、内軟骨性骨形成における Yank2 の役割の解明は今後の重要な課題であり、そのためにも *Yank1* と *Yank2* のダブルノックアウトマウスの作製とその解析が必要と考えられる。

Yank1 の発現が、BMP2/Smad 経路を介することを示したが（図 6）、Smad 分子の下流で機能する転写因子については、明確な結果を得ることができなかった。BMP2/Smad シグナルの下流あるいはパートナーとして機能し、内軟骨性骨形成に関与する転写因子として Runx2、Osterix および Msx2 が知られている [29,30,46]。Runx2 は、Ihh の発現を介して軟骨細胞の肥大化に必須的役割を果たしている [29]。Osterix は、Runx2 および Smad シグナルによって発現制御されており、軟骨基質の分解を担う MMP13 の発現を誘導することが明らかになっている [30]。Msx2 は、Ihh と協調して軟骨細胞の石灰化を促進することが報告されている [46]。しかしながら Runx2、Osterix あるいは Msx2 のいずれの過剰発現も Yank1 の発現に効果を示さなかった（図 7）。したがって、*Yank1* の発現誘導には、Runx2、Osterix、あるいは Msx2 のそれぞれ単独では不十分であるか、あるいは BMP2 との関与が知られていない未知の転写因子が関与している可能性が想定される。BMP2 の存在の有無に拘らず、C2C12 細胞あるいは C3H10T1/2 細胞で *Yank1* の発現が認められなかったことから、これらの細胞株と肢芽細胞を比較することによって、この課題を探索できる可能性が高いと見込まれる。また骨芽細胞に BMP2 を作用させた際にも *Yank1* の発現誘導が見られたことから、Yank1 は骨芽細胞および骨形成にも関与している可能性が推察される。しかし、*Yank1* KO マウスで膜性骨化の異常も認められなかったので、この点においても Yank2 による代償的作用の存在が推定できる。

セリアック病患者のゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study：GWAS）

による研究の結果、*YANK1* 遺伝子の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism：SNP）がセリアック病の発症に関連すると報告されている [47–49]。セリアック病は、グルテンにより惹起される小腸粘膜傷害と栄養吸収不良を特徴とする自己免疫疾患である [50]。患者の約 9 割がヒト白血球型抗原 DQ2（Human Leukocyte Antigen DQ2：HLA DQ2）あるいは DQ8 のヘテロ二量体を持つため、HLA DQ2 あるいは DQ8 が原因であると言われているが、セリアック病発症への寄与率は約 30%と報告されており、他の因子の関与が示唆されている [50–52]。本研究において作製した *Yank1* KO マウスは、グルテンを含む小麦フスマを原材料とする固形飼料を与えて飼育しており、本稿執筆時において *Yank1* KO マウスを最長約 7 か月飼育して観察しているが、成長発育や便の性状、急激な体型の変化等に関して、野生型マウスと比較した外見上の違いを認めていないため、今後の解析が必要と思われる。

内軟骨性骨形成過程の異常は、全身の骨格のみならず顎顔面の成長および発育にも影響を及ぼし、審美性、咬合、発音および嚥下などの機能が障害されることがある。したがって、内軟骨性骨形成の制御機構の解明は、顎顔面形態異常を伴う遺伝子疾患あるいは顎変形症に対する診断や治療方針の決定にも貢献する。今後、骨・軟骨性疾患の原因解明や新規治療法の開発への寄与を目的として、Yank ファミリーの生物学的機能を明らかにし、骨形成過程の制御機構に対する理解を深めていきたいと考えている。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、始終御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室、西村理行教授ならびに同口腔分化発育情報学講座 顎顔面口腔矯正学教室 山城隆教授に深甚なる謝意を表します。そして、本研究にあたり終始御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室、高畑佳史助教授に心より感謝申し上げます。さらに本研究を行うに際し、多大な御援助、御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室、波多賢二准教授ならびに村上智彦講師に深く感謝します。最後にこの研究に対して多大なる御協力と御助言を戴いた大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室ならびに口腔分化発育情報学講座 顎顔面口腔矯正学教室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

引用文献

1. Erlebacher, A., Filvaroff, E. H., Gitelman, S. E., & Derynck, R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* **80**, 371–378 (1995).

2. Zelzer, E., & Olsen, B. R. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* **423**, 343–348 (2003).

3. Egawa, S., Miura, S., Yokoyama, H., Endo, T., & Tamura, K. Growth and differentiation of a long bone in limb development, repair and regeneration. *Dev. Growth Differ.* **56**, 410–424 (2014).

4. Ornitz, D. M., & Marie, P. J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* **16**, 1446–1465 (2002).

5. Coffin, J. D., Florkiewicz, R. Z., Neumann, J., Mort-Hopkins, T., Dorn, G. W., Lightfoot, P., German, R., Howles, P. N., Kier, A., & O'Toole, B. A. Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1861–1873 (1995).

6. Kim, E. J., Cho, S. W., Shin, J. O., Lee, M. J., Kim, K. S., & Jung, H. S. Ihh and Runx2/Runx3 Signaling Interact to Coordinate Early Chondrogenesis: A Mouse Model.

PLoS ONE **8**, e55296, 1-11 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0055296

7. Koziel, L., Kunath, M., Kelly, O. G., & Vortkamp, A. Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev. Cell* **6**, 801–813 (2004).

8. Dai, J., & Rabie, A. B. M. VEGF: an Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification. *J. Dent. Res.* **86**, 937–950 (2007).

9. Zelzer, E., McLean, W., Ng, Y.-S., Fukai, N., Reginato, A. M., Lovejoy, S., D'Amore, P. A., & Olsen, B. R. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* **129**, 1893–1904 (2002).

10. Shin, H.-R., Islam, R., Yoon, W.-J., Lee, T., Cho, Y.-D., Bae, H., Kim, B.-S., Woo, K.-M., Baek, J.-H., & Ryoo, H.-M. Pin1-mediated Modification Prolongs the Nuclear Retention of β-Catenin in Wnt3a-induced Osteoblast Differentiation. *J. Biol. Chem.* **291**, 5555–5565 (2016).

11. Glass, D. A., & Karsenty, G. Minireview: In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* **148**, 2630–2634 (2007).

12. Kozhemyakina, E., Lassar, A. B., & Zelzer, E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development* **142**, 817–831 (2015).

13. Kronenberg, H. M. PTHrP and skeletal development. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1068**, 1–13 (2006).

14. Urist, M. R., Rosen, V., Celeste, A., Mitsock, L., Whitters, M., Kriz, R., Hewick, R., & Wang, E. Bone: Formation by Autoinduction. *Science.* **150**, 893–899 (1965).

15. Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., & Wang, E. A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* **242**, 1528–1534 (1988).

16. Sebald, W., Nickel, O., Seher, A., & Müller, T. D. Bone Morphogenetic Proteins. in *Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation* **3**, 19–33 (2008).

17. Gomez-Puerto, M. C., Iyengar, P. V., García de Vinuesa, A., ten Dijke, P., & Sanchez-Duffhues, G. Bone morphogenetic protein receptor signal transduction in human disease. *J. Pathol.* **247**, 9–20 (2019).

18. Steinert, A. F., Proffen, B., Kunz, M., Hendrich, C., Ghivizzani, S. C., Nöth, U., Rethwilm, A., Eulert, J., & Evans, C. H. Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R148 1-15 (2009). doi: 10.1186/ar2822

19. Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A., & Suda, T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* **127**, 1755–1766 (1994).

20. Tsumaki, N., Nakase, T., Miyaji, T., Kakiuchi, M., Kimura, T., Ochi, T., & Yoshikawa, H. Bone Morphogenetic Protein Signals Are Required for Cartilage Formation and Differently Regulate Joint Development During Skeletogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 898–906 (2002).

21. Shu, B., Zhang, M., Xie, R., Wang, M., Jin, H., Hou, W., Tang, D., Harris, S. E., Mishina, Y., O'Keefe, R. J., Hilton, M. J., Wang, Y., & Chen, D. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *J. Cell Sci.* **124**, 3428–3440 (2011).

22. Wu, M., Chen, G., & Li, Y. P. TGF-β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Research* **4**, (2016). doi: 10.1038/boneres.2016.9

23. Dutko, J. A., & Mullins, M. C. SnapShot: BMP signaling in development. *Cell* **145**, 636–636.e2 (2011). doi: 10.1016/j.cell.2011.05.00124. Matsushita, T., Wilcox, W. R., Chan, Y. Y., Kawanami, A., Bukulmez, H., Balmes, G., Krejci, P., Mekikian, P. B., Otani, K.,

Yamaura, I., Warman, M. L., Givol, D., & Murakami, S. FGFR3 promotes synchondrosis closure and fusion of ossification centers through the MAPK pathway. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 227–240 (2008).

25. Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A., & Leder, P. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is a Negative Regulator of Bone Growth. *Cell* **84**, 911–921 (1996).

26. Yamashita, A., Morioka, M., Kishi, H., Kimura, T., Yahara, Y., Okada, M., Fujita, K., Sawai, H., Ikegawa, S., & Tsumaki, N. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* **513**, 507–511 (2014).

27. Ulici, V., Hoenselaar, K. D., Agoston, H., McErlain, D. D., Umoh, J., Chakrabarti, S., Holdsworth, D. W., & Beier, F. The role of Akt1 in terminal stages of endochondral bone formation: Angiogenesis and ossification. *Bone* **45**, 1133–1145 (2009).

28. Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S., & Chung, U. The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.* **50**, 3561–3573 (2004).

29. Yoshida, C. A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K. I., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y., & Komori, T. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian

hedgehog. *Genes Dev.* **18**, 952–963 (2004).

30. Nishimura, R., Wakabayashi, M., Hata, K., Matsubara, T., Honma, S., Wakisaka, S., Kiyonari, H., Shioi, G., Yamaguchi, A., Tsumaki, N., Akiyama, H., & Yoneda, T. Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* **287**, 33179–33190 (2012).

31. Briner, J., Giedion, A., & Spycher, M. A. Variation of Quantitative and Qualitative Changes of Enchondral Ossification in Heterozygous Achondroplasia. *Pathol. Res. Pract.* **187**, 271–278 (1991).

32. Acke, F. R. E., Dhooge, I. J. M., Malfait, F., & De Leenheer, E. M. R. Hearing impairment in Stickler syndrome: A systematic review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **7**, 84–93 (2012).

33. Lachman, R. S., Rimoin, D. L., Hollister, D. W., Dorst, J. P., Siggers, D. C., McAlister, W., Kaufman, R. L., & Langer, L. O. The Kniest Syndrome. *Am. J. Roentgenol.* **123**, 805–814 (1975).

34. Takigawa, Y., Hata, K., Muramatsu, S., Amano, K., Ono, K., Wakabayashi, M., Matsuda, A., Takada, K., Nishimura, R., & Yoneda, T. The transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling a transcription factory with Sox9. *J. Cell Sci.*

123, 3780–3788 (2010).

35. Kaneko, T. Genome Editing in Mouse and Rat by Electroporation. *Methods Mol Biol.* **1630**, 81–89 (2017).

36. Polymeropoulos, M. H., Ide, S. E., Wright, M., Goodship, J., Weissenbach, J., Pyeritz, R. E., Da Silva, E. O., Ortiz De Luna, R. I., & Francomano, C. A. The gene for the Ellis-van Creveld syndrome is located on chromosome 4p16. *Genomics* **35**, 1–5 (1996).

37. Ingersoll, R. G., Hetmanski, J., Park, J. W., Fallin, M. D., McIntosh, I., Wu-Chou, Y. H., Chen, P. K., Yeow, V., Chong, S. S., Cheah, F., Sull, J. W., Jee, S. H., Wang, H., Wu, T., Murray, T., Huang, S., Ye, X., Jabs, E. W., Redett, R., Raymond, G., Scott, A. F., & Beaty, T. H. Association between genes on chromosome 4p16 and non-syndromic oral clefts in four populations. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 726–732 (2010).

38. Tuna, E. B., Koruyucu, M., Kürklü, E., Çifter, M., Gençay, K., Seymen, F., & Tüysüz, B. Oral and craniofacial manifestations of Ellis–van Creveld syndrome: Case series. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **44**, 919–924 (2016).

39. Nishimura, R., Hata, K., Matsubara, T., Wakabayashi, M., & Yoneda, T. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J. Biochem.* **151**, 247–254 (2012).

40. Amano, K., Ichida, F., Sugita, A., Hata, K., Wada, M., Takigawa, Y., Nakanishi, M.,

Kogo, M., Nishimura, R., & Yoneda, T. Msx2 stimulates chondrocyte maturation by controlling Ihh expression. *J. Biol. Chem.* **283**, 29513–29521 (2008).

41. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–1934 (2002).

42. Arencibia, J. M., Pastor-Flores, D., Bauer, A. F., Schulze, J. O., & Biondi, R. M. AGC protein kinases: From structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1834**, 1302–1321 (2013).

43. Zuniga, A. Next generation limb development and evolution: old questions, new perspectives. *Development* **142**, 3810–3820 (2015).

44. Tina, V., Joachim, N., & Thomas, D. Missense Mutations in GDF-5 Signaling: Molecular Mechanisms Behind Skeletal Malformation. *Mutations in Human Genetic Disease* 11–54 (2012).

45. Ruiz-Perez, V. L., Blair, H. J., Rodriguez-Andres, M. E., Blanco, M. J., Wilson, A., Liu, Y.-N., Miles, C., Peters, H., & Goodship, J. A. Evc is a positive mediator of Ihh-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia. *Development* **134**, 2903–2912 (2007).

46. Ota, S., Zhou, Z.-Q., Keene, D. R., Knoepfler, P., & Hurlin, P. J. Activities of N-Myc in the

developing limb link control of skeletal size with digit separation. *Development* **134**, 1583–1592 (2007).

47. Koskinen, L. L. E., Einarsdottir, E., Korponay-Szabo, I. R., Kurppa, K., Kaukinen, K., Sistonen, P., Pocsai, Z., Széles, G., Ádány, R., Mäki, M., Kere, J., & Saavalainen, P. Fine mapping of the CELIAC2 locus on chromosome 5q31-q33 in the Finnish and Hungarian populations. *Tissue Antigens* **74**, 408–416 (2009).

48. Amundsen, S. S., Adamovic, S., Hellqvist, Å., Nilsson, S., Gudjónsdóttir, A. H., Ascher, H., Ek, J., Larsson, K., Wahlström, J., Lie, B. A., Sollid, L. M., & Naluai, Å. T. A comprehensive screen for SNP associations on chromosome region 5q31-33 in Swedish/Norwegian celiac disease families. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 980–987 (2007).

49. Adamovic, S., Amundsen, S. S., Lie, B. A., Hellqvist, Å., Gudjónsdóttir, A. H., Ek, J., Nilsson, S., Wahlström, J., Ascher, H., Sollid, L. M., & Naluai, Å. T. Fine mapping study in Scandinavian families suggests association between coeliac disease and haplotypes in chromosome region 5q32. *Tissue Antigens* **71**, 27–34 (2007).

50. Valli, D. R., Raffaella, M., & Renato, C. New Insights into the Pathogenesis of Celiac Disease. *Front. Med.* **4**, Ariticle137 1-11 (2017). doi: 10.3389/fmed.2017.00137

51. Petronzelli, F., Bonamico, M., Ferrante, P., Grillo, R., Mora, B., Mariani, P., Apollonio, I., Gemme, G., & Mazzilli MC. Genetic contribution of the HLA region to the familial

clustering of coeliac disease. *Ann. Hum. Genet.* **61**, 307–317 (1997).

52. Bevan, S., Popat, S., Braegger, CP., Busch, A., O'Donoghue, D., Falth-Magnusson, K., Ferguson, A., Godkin, A., Hogberg, L., & Holmes, G., *et al.* Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. *J. Med. Genet.* **36**, 687–690 (1999).

表 **1. RT-qPCR** に用いた **Taqman** プローブと **SYBR Green** プライマー

Taqman プローブ	
β-Actin	
Sense primer	5' -TTAATTTCTGAATGGCCCAGGTCT- 3'
Anti-sense primer	5' -ATTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGG- 3'
Probe	5' -CCTGGCTGCCTCAACACCTCAACCC- 3'
Yank1	
Sense primer	5' -TGGACTCCAAAATCATTTCTTCCAG- 3'
Anti-sense primer	5' -TTCCGACCAAAGGCAGGCTCAATTGTGA- 3'
Probe	5' -GGCAGAAGAGGCTCATTCCAGG-3'
Runx2	
Sense primer	5' - CTCCTTCCAGGATGGTCCCA - 3'
Anti-sense primer	5' -CTTCCGTCAGCGTCAACACC- 3'
Probe	5' -CACCACCTCGAATGGCAGCACGCT- 3'
Osterix	
Sense primer	5' -AGCGACCACTTGAGCAAACAT- 3'
Anti-sense primer	5' -GCGGCTGATTGGCTTCTTCT- 3'
Probe	5' -CCCGACGCTGCGACCCTCCC- 3'
Msx2	
Sense primer	5' - CCATATACGGCGCATCCTACC - 3'
Anti-sense primer	5' -CAACCGGCGTGGCATAGAG- 3'
Probe	5' -AGACCTGTGCTCCCCATCCCGCC- 3'

SYBR Green プライマー	
Yank1	
Sense primer	5' -CCCAAGGAGACCCGGATCA- 3'
Anti-sense primer	5' -CTCAGCAGTTCGTAAGCCGT- 3'
Yank2	
Sense primer	5' -ATCGCCACGGTCCTGAAAG- 3'
Anti-sense primer	5' -CCAGTCCACGGGGTATGAGTA- 3'
Yank3	
Sense primer	5' -TATGTCGTCCATATCGTCAGGC- 3'
Anti-sense primer	5' -TGCTCGATTTCCTGTAGGATCTC- 3'

表 2. マウス肢芽細胞における遺伝子プロファイリング

胎生 13.5 日齢の ICR マウスより肢芽細胞を採取し、24 時間培養後に BMP2 アデノウイルス添加および非添加（Control）の上、12 時間後にアデノウイルス非含有培地に交換した。その 36 時間後に全 RNA を回収、cDNA を合成し、Microarray 解析により発現上昇する遺伝子を網羅的に探索した。

略称	遺伝子名	倍率変化 (log_2)
Yank1	Yet another novel kinase 1	4.2
Sp7	Sp7 transcription factor 7 (Osterix)	4.0
Ifi202b	Interferon activated gene 202B	3.6
Alpl	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	3.6
Ifi44	Interferon-induced protein 44	3.5
Dkk1	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	3.0
Msx2	Msh homeobox 2	2.8

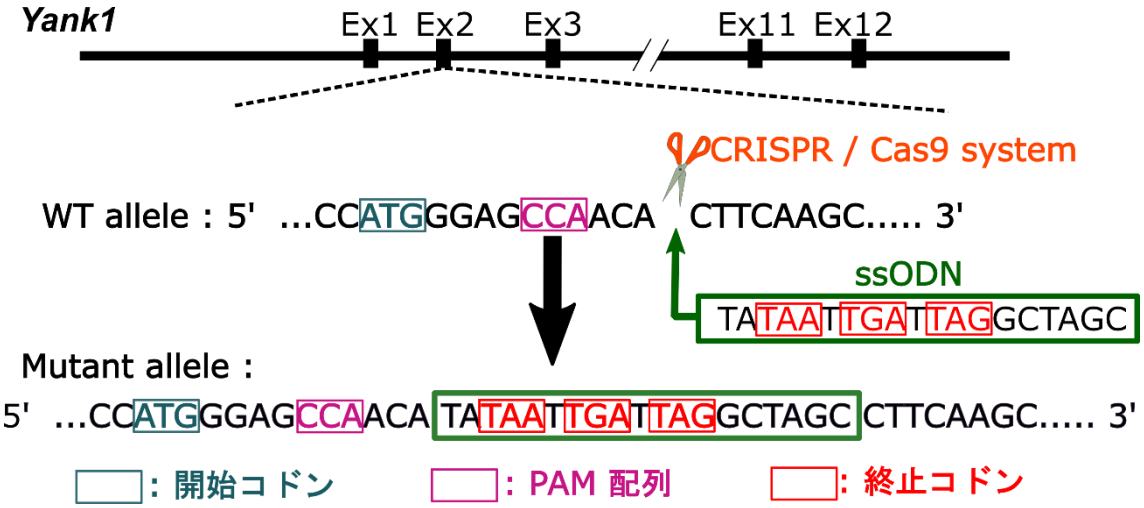


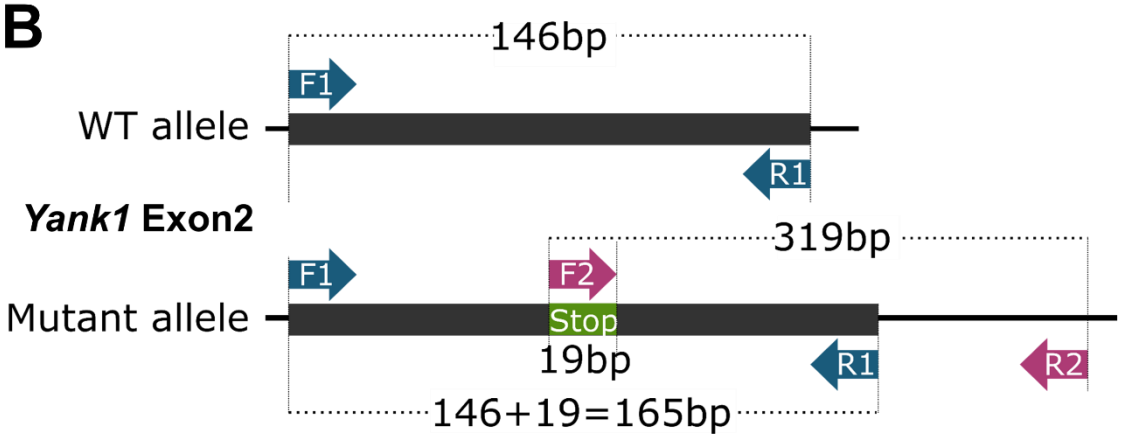
図 1. *Yank1* KO マウスの設計

Yank1 遺伝子の第 2 エキソンに存在する開始コドンの直下にある PAM 配列の 3 塩基下流を CRISPR/Cas9 システムを用いて切断し、ssODN を挿入できるように設計した。ssODN は、いずれの読み取りフレームにおいても終止コドンが翻訳されるよう、3 つの終止コドンを 4 塩基ごとに組み込んだ。Ex：エキソン、ssODN：一本鎖 DNA、WT：野生型。

A

***Yank1* F1**	**5' - TGGGGGTCTACATTGAACGA - 3'**
***Yank1* R1**	**5' - GGCCCATTTCTTACCGTCTT - 3'**
***Yank1* F2**	**5' - TATAATTGATTAGGCTAGC - 3'**
***Yank1* R2**	**5' - CACTCTTTGGAGCAGGGAAG - 3'**

B



C

		WT	Het	KO
F1	R1	146bp	146bp + 165bp	165bp
F2	R2	-	319bp	319bp

図 2. Yank1 KO マウスの遺伝子型の確認に用いた PCR プライマーの設計

(A) 各プライマーの塩基配列。

(B) プライマーF1 および R1 は Yank1 の第 2 エキソンの両端に設定した。プライマーF2 は挿入した ssODN と同じ塩基配列に、プライマーR2 はプライマーF2 の約 300 塩基下流に設定した。

(C) プライマーF1 および R1、あるいはプライマーF2 および R2 を用いて PCR を行うことにより、図に示すサイズの PCR 産物が得られる。WT：野生型マウス、Het：遺伝子ヘテロ欠損型マウス、KO：遺伝子ホモ欠損型マウス。

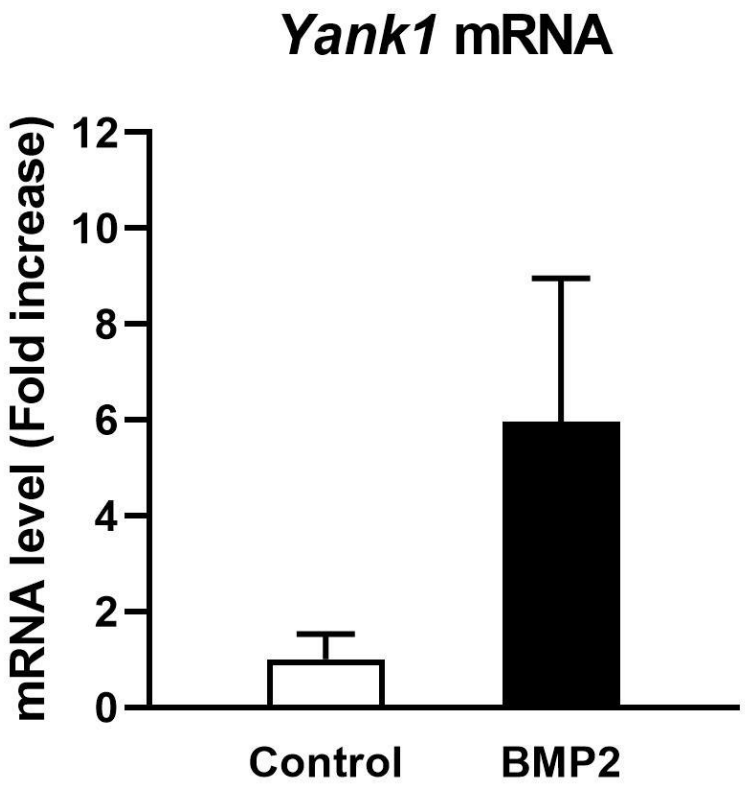


図 3. マウス肢芽細胞における *Yank1* mRNA の発現に対する BMP2 の効果

胎生 13.5 日齢の ICR マウスより肢芽細胞を採取し、24 時間培養後、リコンビナント BMP2 存在あるいは非存在下（Control）にてさらに 48 時間培養後に全 RNA を回収した。全 RNA を用いて cDNA を合成し、*Yank1* mRNA の発現を RT-qPCR 法にて解析した。*Yank1* mRNA 発現量は、*β-actin* mRNA 発現量で補正し、非添加群における *Yank1* mRNA の発現量の倍数で示した （平均および標準偏差を示す。n=6）。

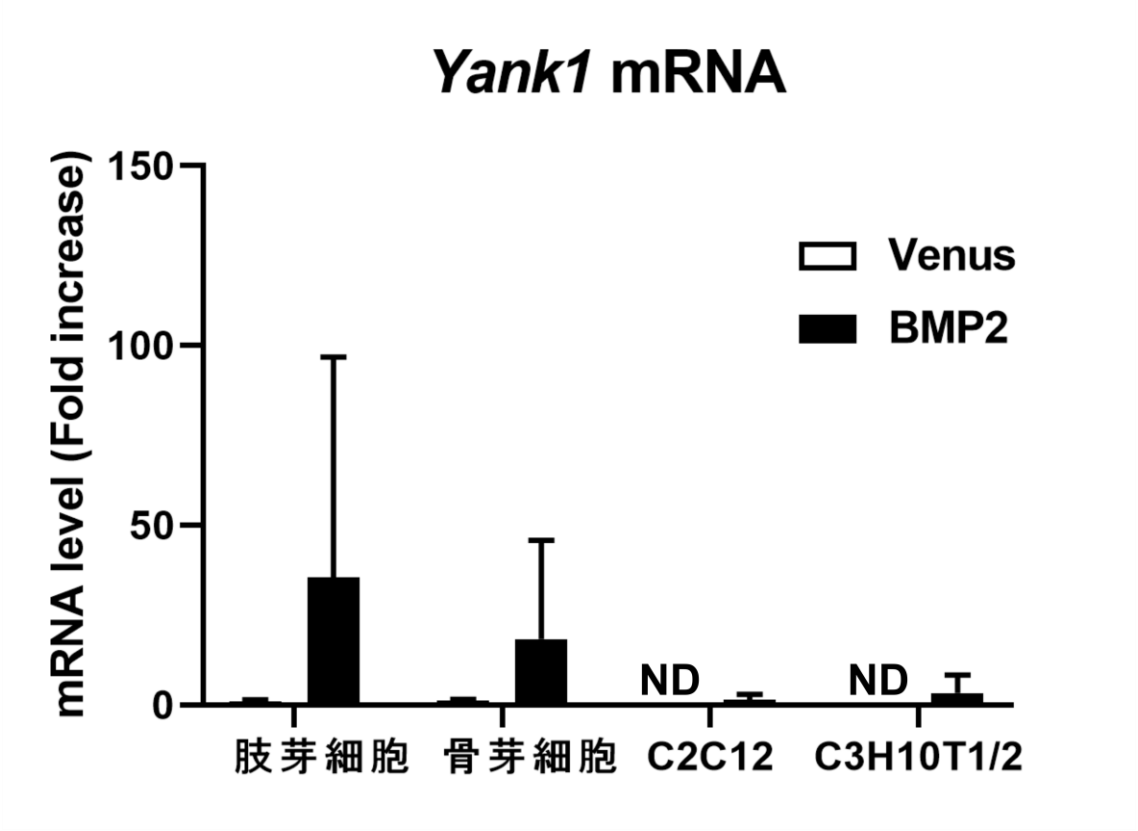


図 4. 肢芽細胞、骨芽細胞、C2C12 細胞および C3H10T1/2 細胞における *Yank1* mRNA の発現に対する BMP2 の効果

マウス肢芽細胞、マウス骨芽細胞、マウス筋芽細胞株 C2C12、およびマウス未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 を 24 時間培養後、Venus（コントロール）あるいは BMP2 アデノウイルスを添加し、12 時間培養しアデノウイルス非含有培地に交換した。さらに 36 時間培養後に全 RNA を回収した。全 RNA を用いて cDNA を合成し、*Yank1* mRNA の発現を RT-qPCR 法にて解析した。*Yank1* mRNA 発現量は、同じサンプルの*β-actin* mRNA 発現量で補正し、肢芽細胞の Venus アデノウイルス添加群における *Yank1* mRNA の発現量の倍数で示した（平均および標準偏差を示す。n=3）。ND：不検出。

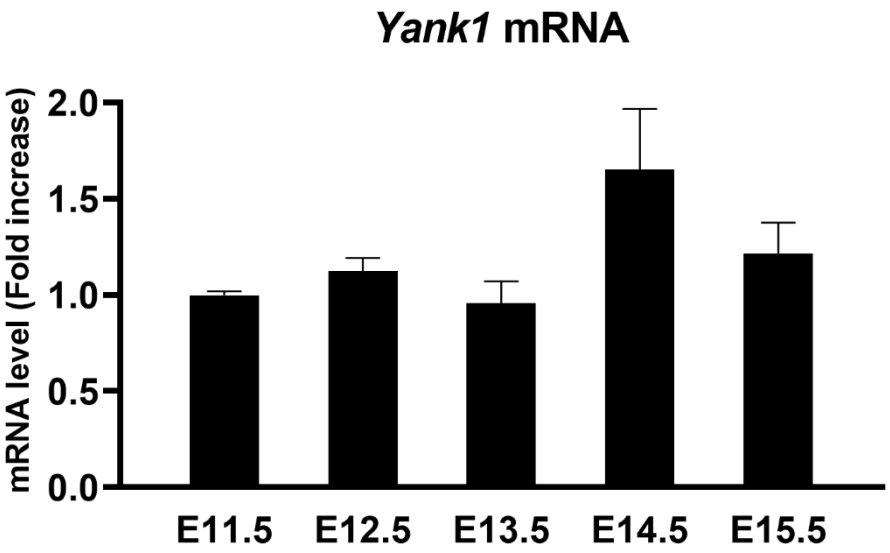


図 5. マウス胎生期における *Yank1* mRNA の発現

胎生 11.5 日齢から 15.5 日齢（E11.5 から E15.5）の ICR マウスより肢芽組織を採取し、凍結破砕後に全 RNA を回収した。全 RNA を用いて cDNA を合成し、*Yank1* mRNA の発現を RT-qPCR 法にて解析した。*Yank1* mRNA 発現量は、*β-actin* mRNA 発現量で補正し、胎生 11.5 日齢の肢芽組織における *Yank1* mRNA の発現量の倍数で示した（予備的な実験において同様の傾向を示すことを確認したうえで、n=1 のサンプルをトリプリケイトで解析した際の平均および標準偏差を示す）。

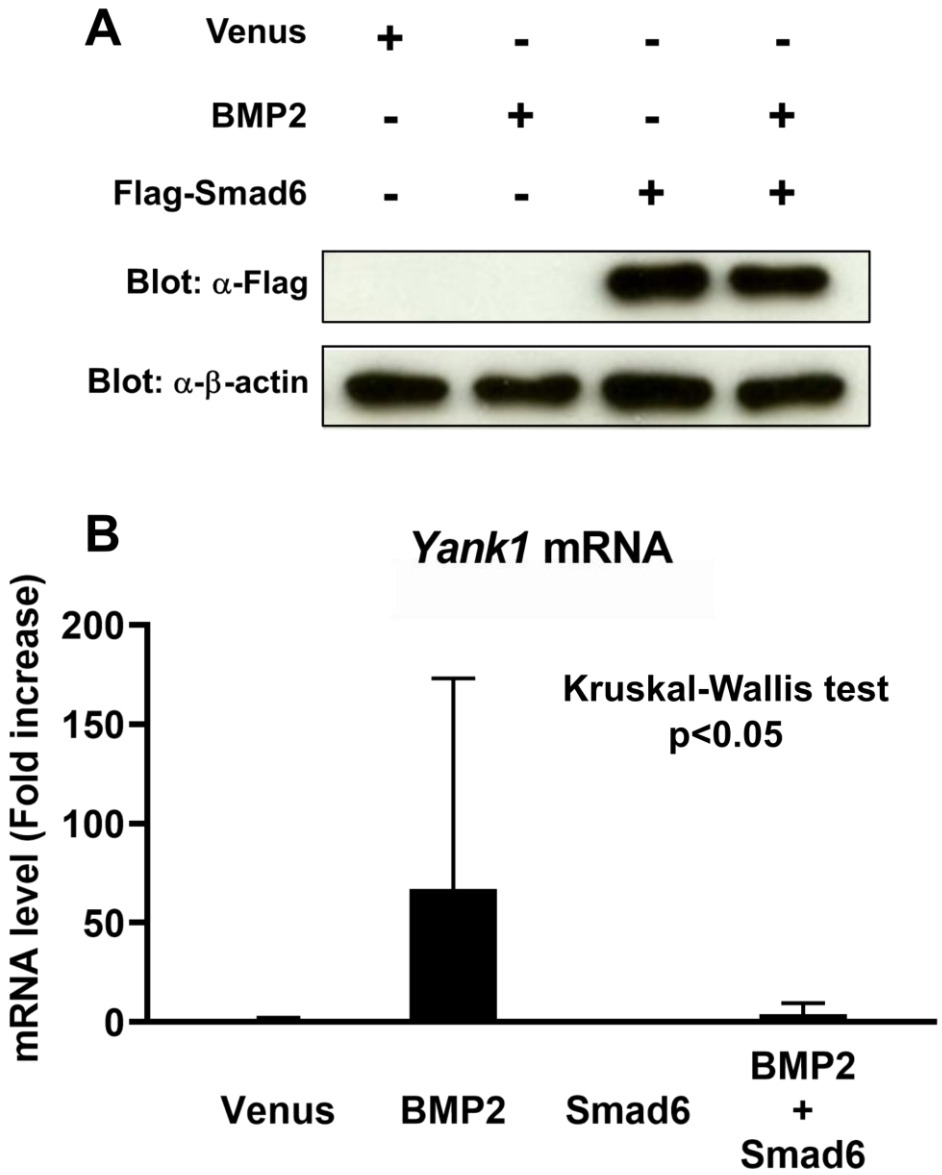


図 6. 肢芽細胞における BMP2 誘導性 *Yank1* mRNA 発現に対する Smad6 過剰発現の効果

胎生 13.5 日齢の ICR マウスの肢芽細胞を採取し、24 時間培養後、図で示したように Venus（コントロール）、BMP2、Flag-Smad6 アデノウイルスを添加し、12 時間培養後にアデノウイルス非含有培地に交換した。さらに 36 時間培養後にタンパク質および全 RNA を回収した。

(A) 得られたタンパク質を抗 Flag 抗体および抗β-actin 抗体にてウエスタンブロッティング法にて解析し、Flag-Smad6 およびβ-actin の発現を確認した。

(B) 得られた全 RNA から cDNA を合成し、*Yank1* mRNA の発現を RT-qPCR 法にて解析した。*Yank1* mRNA の発現量は*β-actin* mRNA 発現量で補正し、コントロール群の *Yank1* mRNA 発現量の倍数で示した（平均および標準偏差を示す。n=3）。Kruskal-Wallis 検定の結果、4 群間に有意差を認めた（P<0.05）。

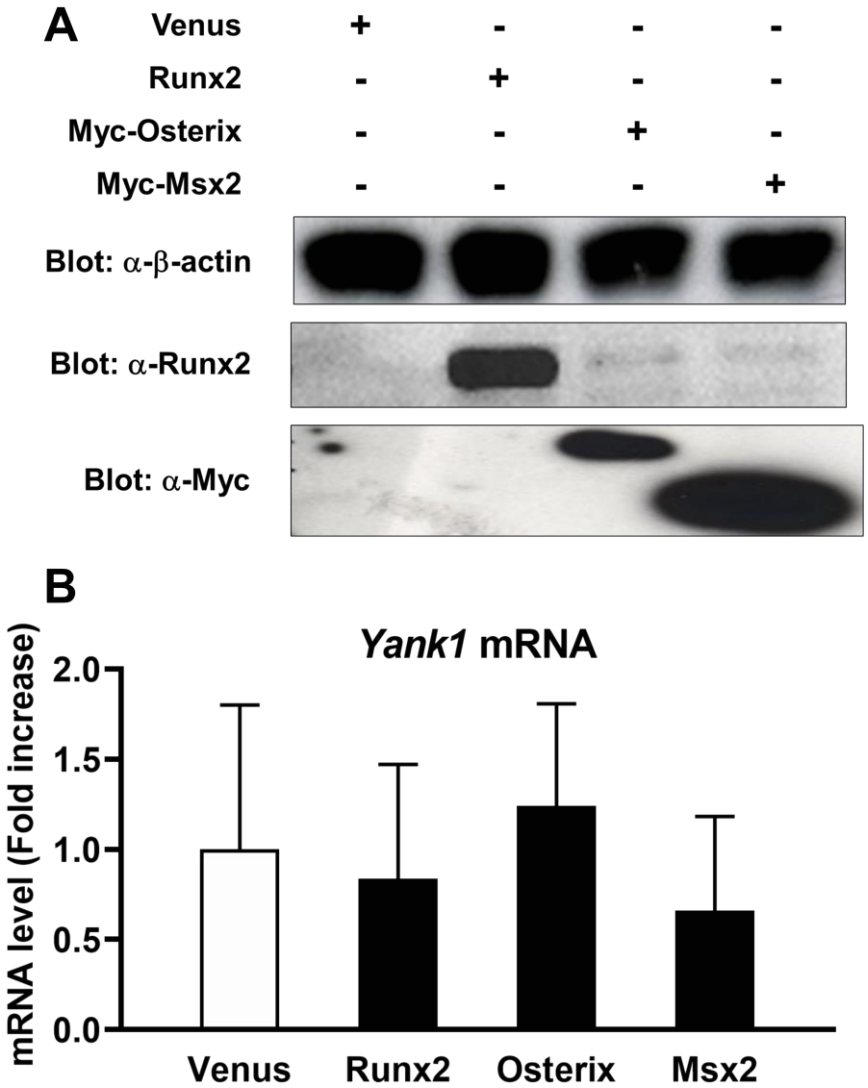


図 7. BMP2 シグナルに関連する転写因子の *Yank1* mRNA 発現に対する効果

胎生 13.5 日齢の ICR マウスの肢芽細胞を採取し、24 時間培養後、図で示したように Venus（コントロール）、Runx2、Myc-Osterix、Myc-Msx2 アデノウイルスを添加し、12 時間培養後にアデノウイルス非含有培地に交換した。さらに 36 時間培養後にタンパク質および全 RNA を回収した。

(A) 得られたタンパク質を抗 Runx2 抗体、抗 Myc 抗体、および抗β-actin 抗体にてウエスタンブロッティング法にて解析し、Runx2、Myc-Osterix、Myc-Msx2 およびβ-actin の発現を確認した。

(B) 得られた全 RNA から cDNA を合成し、*Yank1* mRNA の発現を RT-qPCR 法にて解析した。Kruskal-Wallis 検定の結果、4 群間に有意差を認めなかった。*Yank1* mRNA の発現量は*β-actin* mRNA 発現量で補正し、コントロール群の *Yank1* mRNA 発現量の倍数で示した（平均および標準偏差を示す。n=3）。

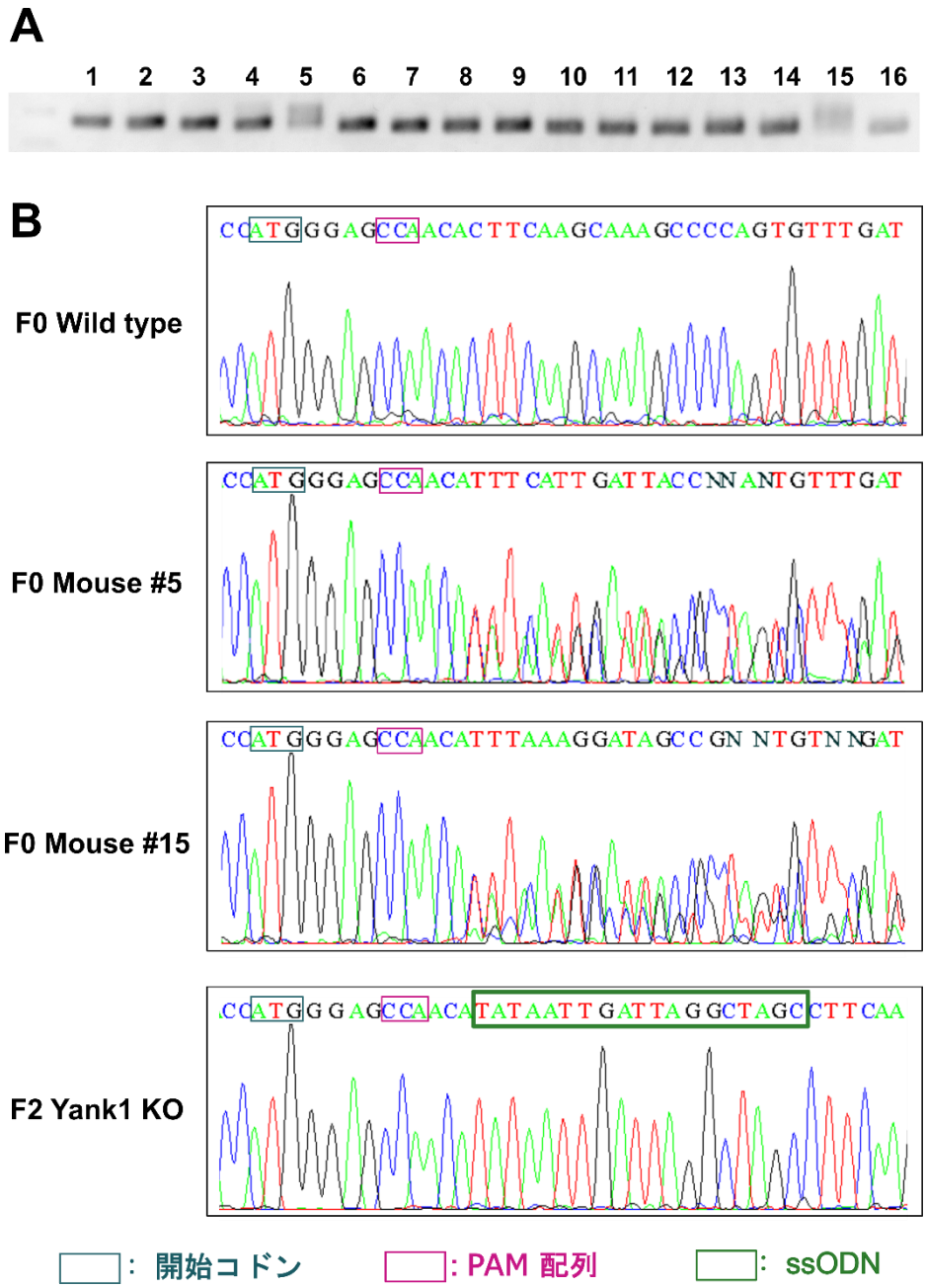


図 8. *Yank1* KO マウスのゲノム PCR 解析およびゲノムシークエンス解析

(A) F0 系統のマウスを 16 匹得、それぞれの産仔の尻尾よりゲノム DNA を回収し、プライマーF1 および R1（図 2）を用いて PCR を行い、2%アガロースゲルにて電気泳動を行った。数字は産仔の個体識別番号を示す。

(B) （A）で得られた PCR 産物を用いてシークエンス解析を行った。F0 系統の#5 および #15 のマウスにおいて、野生型アレルと変異型アレルの波形の重複がみられた。また、F1 系統の *Yank1* 遺伝子ヘテロ欠損マウス同士の交配で得られた F2 系統の遺伝子ホモ欠損（KO）マウスにおいても同様にシーケンス解析を行った。ssODN：一本鎖 DNA。

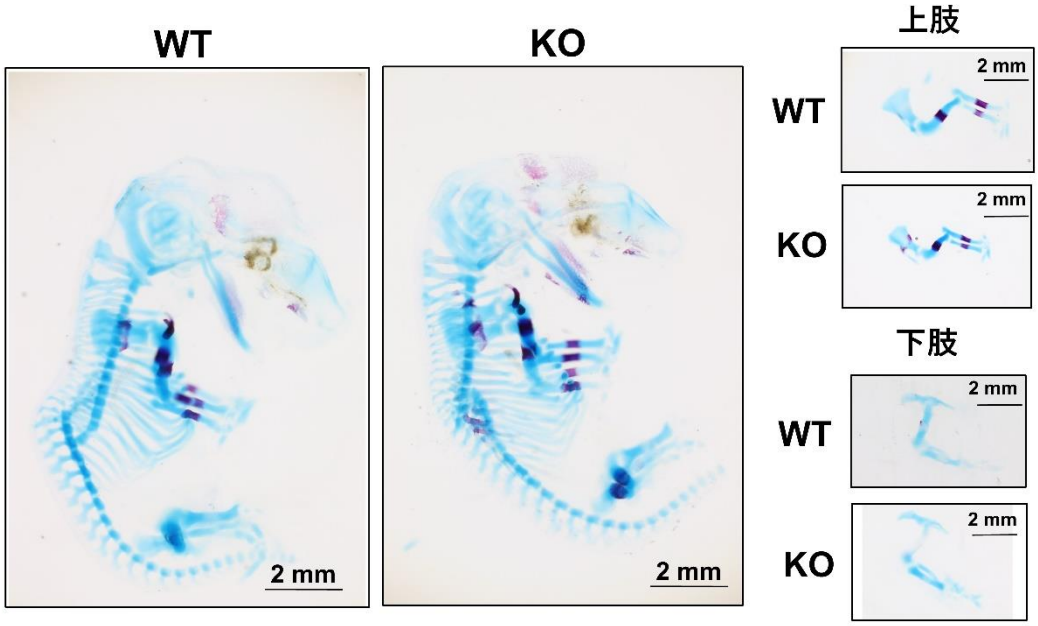


図 9. 胎生 14.5 日齢の *Yank1* KO マウスの骨格標本像

胎生 14.5 日齢の同腹の野生型および *Yank1* KO マウスをエタノールで浸漬固定後、軟骨組織はアルシアンブルーで、骨組織はアリザリンレッド S 溶液で染色した。WT：野生型マウス、KO：*Yank1* 遺伝子ホモ欠損マウス

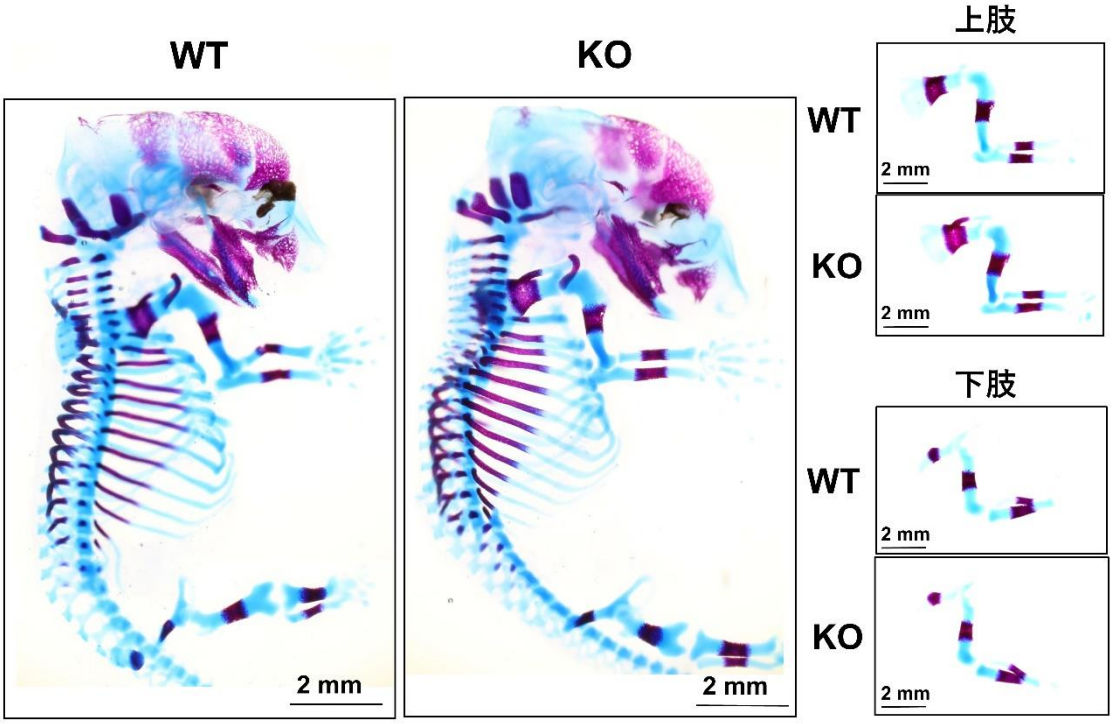


図 10. 胎生 16.5 日齢の *Yank1* KO マウスの骨格標本像

胎生 16.5 日齢の同腹の野生型および *Yank1* KO マウスをエタノールで浸漬固定後、軟骨組織はアルシアンブルーで、骨組織はアリザリンレッド S 溶液で染色した。WT：野生型マウス、KO：*Yank1* 遺伝子ホモ欠損マウス

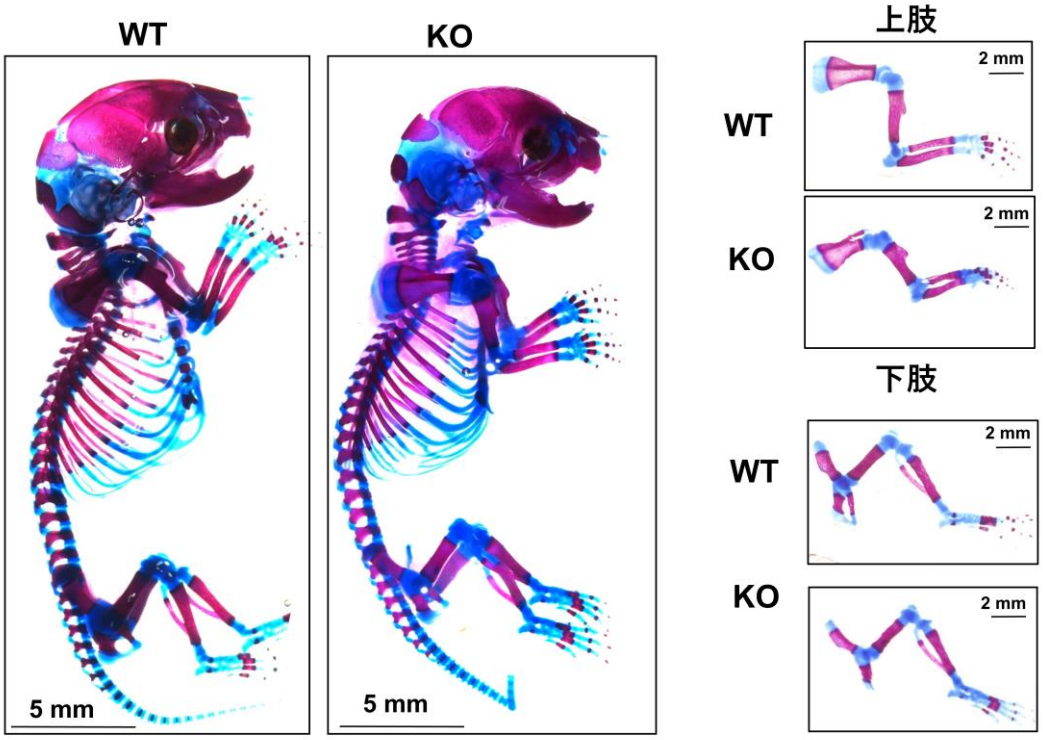


図 11. 生後 0 日齢の Yank1 KO マウスの骨格標本像

生後 0 日齢の同腹の野生型および *Yank1* KO マウスをエタノールで浸漬固定後、軟骨組織はアルシアンブルーで、骨組織はアリザリンレッド S 溶液で染色した。WT：野生型マウス、KO：*Yank1* 遺伝子ホモ欠損マウス

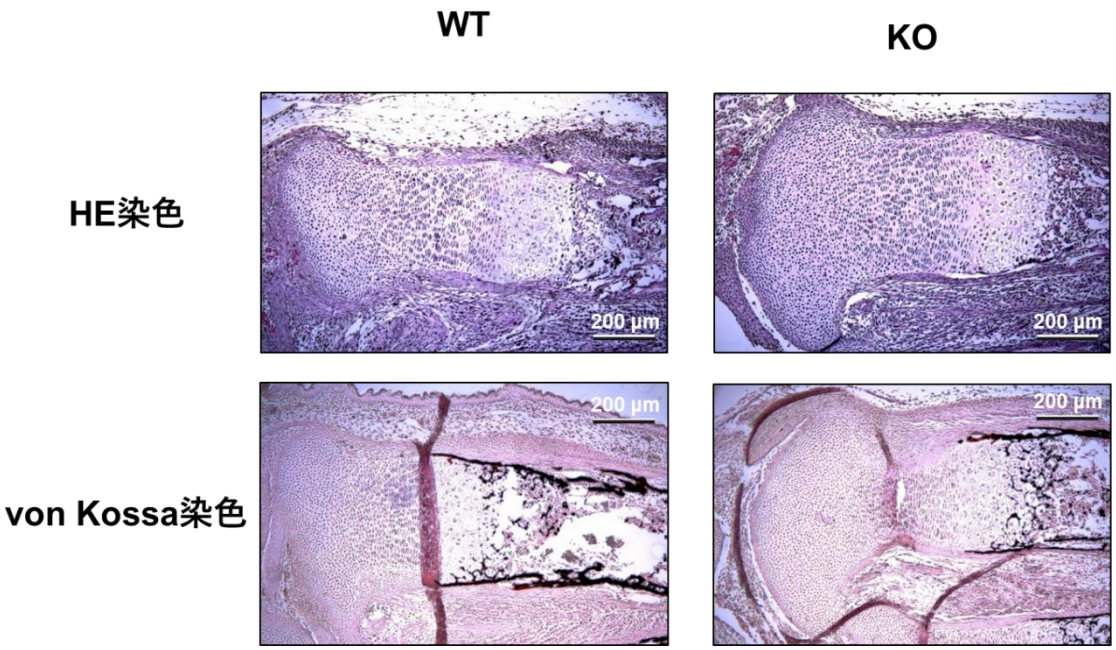


図 12. 胎生 16.5 日齢の *Yank1* KO マウスの脛骨の病理組織学的解析

胎生 16.5 日齢の野生型および同腹の *Yank1* KO マウスの脛骨近位骨端の病理組織切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色（パネル上側）および von Kossa 染色（パネル下側）を行った。スケールバー：200 μm。WT：野生型マウス、KO：*Yank1* 遺伝子ホモ欠損マウス。

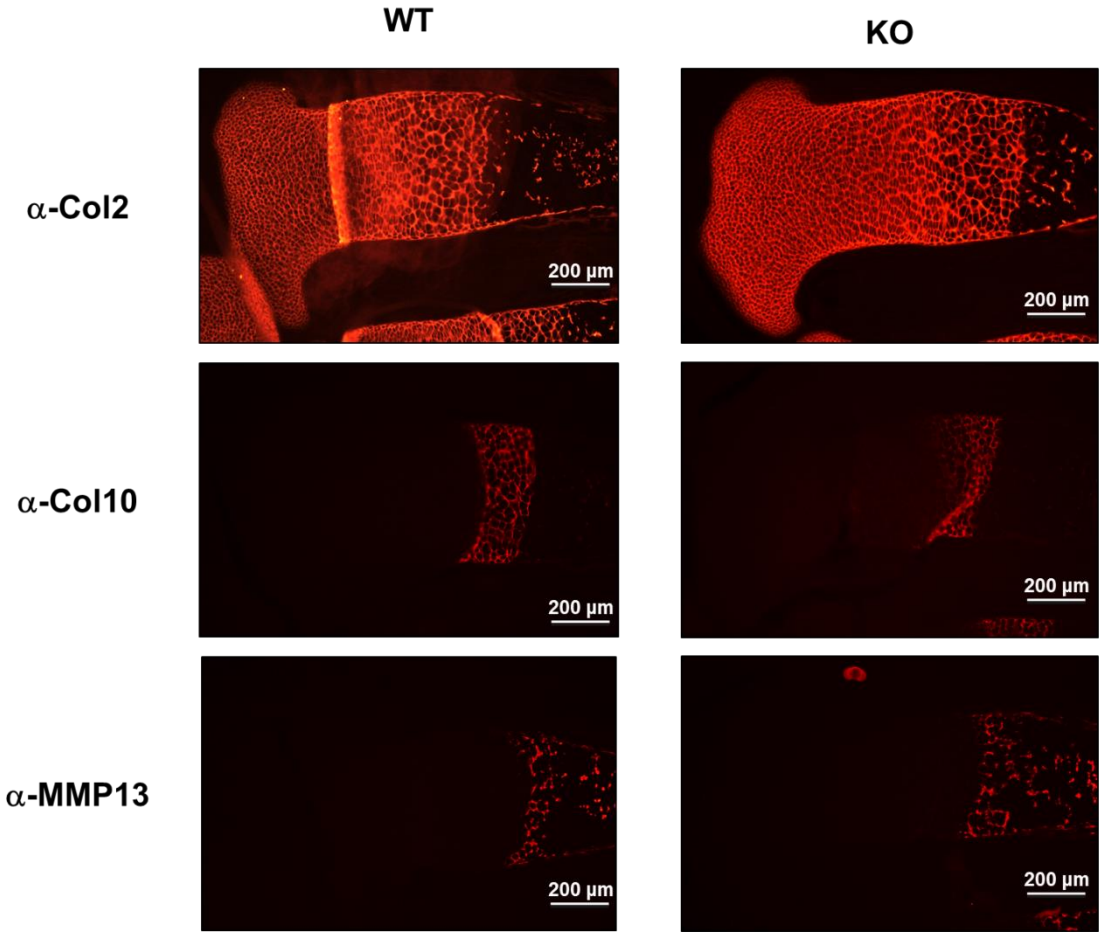


図 13. 胎生 16.5 日齢の *Yank1* KO マウスの免疫染色像

胎生 16.5 日齢の野生型および同腹の *Yank1* KO マウスの脛骨近位骨端の病理組織切片を作成し、抗 2 型コラーゲン抗体（α-Col2）、抗 10 型コラーゲン抗体（α -Col10）、抗 MMP13 抗体（α-MMP13）を用いて免疫染色を行った。染色した切片を、蛍光顕微鏡下にて写真撮影した。スケールバー : 200 μm。WT : 野生型マウス、KO : *Yank1* 遺伝子ホモ欠損マウス。

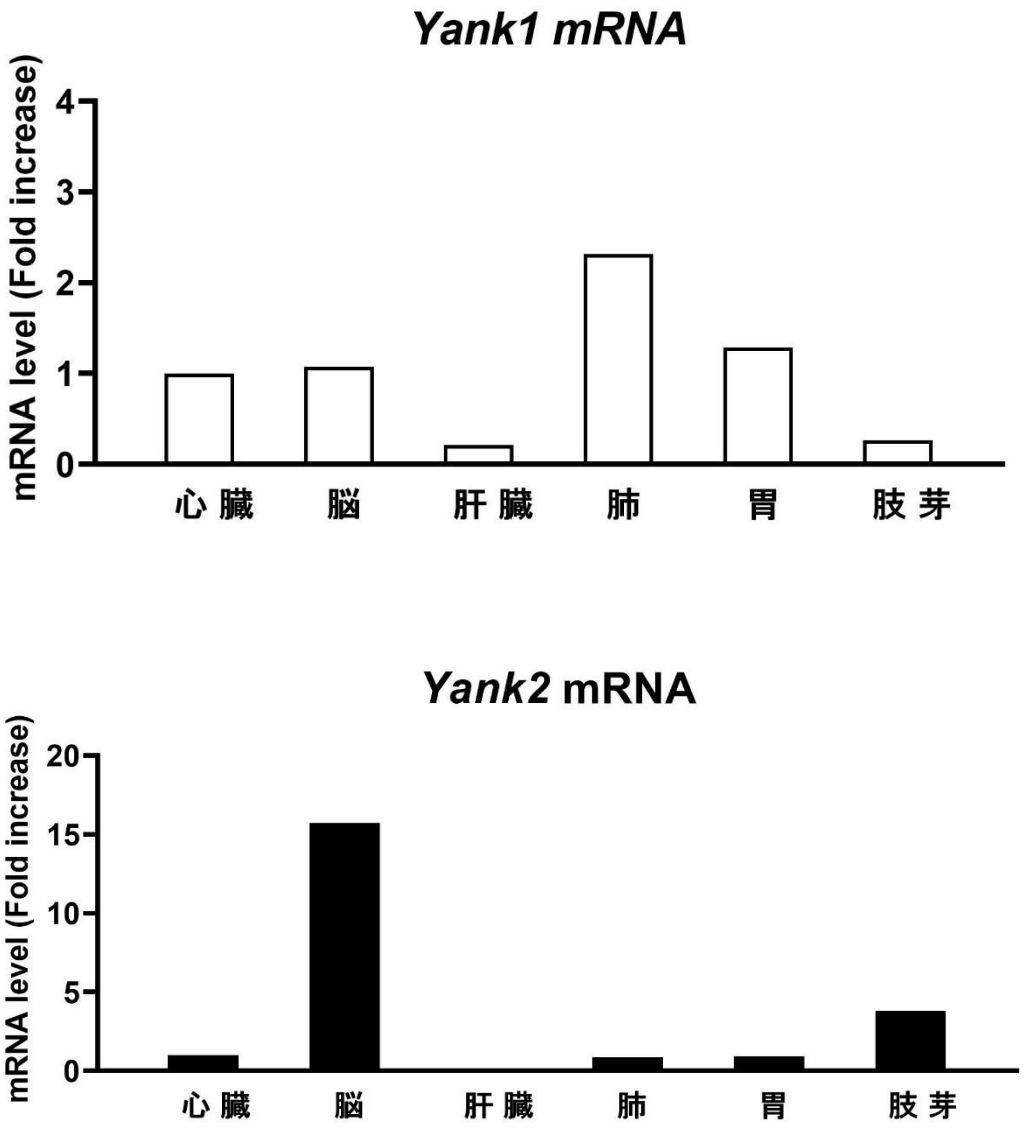


図 14. マウス組織あるいは臓器における ***Yank1*** および ***Yank2*** **mRNA** 発現

胎生 12.5 日齢の ICR マウスから採取した各組織を凍結破砕後、全 RNA を回収した。全 RNA を用いて cDNA を合成し、*Yank1* および *Yank2* mRNA の発現を RT-qPCR 法にて検索した。各生体内組織の *Yank1* あるいは *Yank2* の遺伝子発現量は*β-actin* mRNA 発現量で補正し、心臓での *Yank1* および *Yank2* mRNA の発現量の倍数で示した。

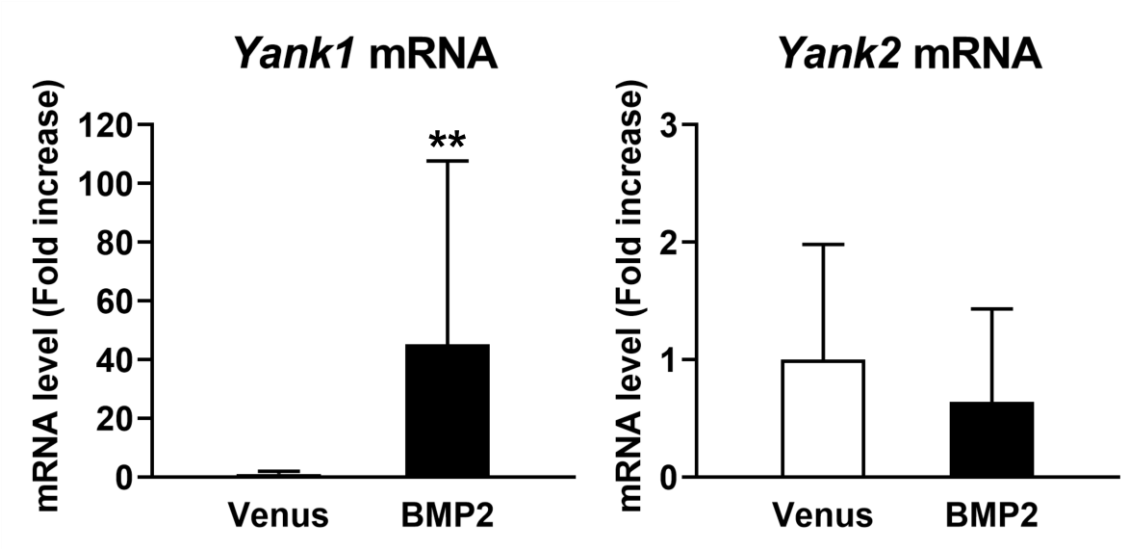


図 15. 肢芽細胞における *Yank2* mRNA の発現に対する BMP2 の効果

胎生 13.5 日齢の ICR マウスよりマウス肢芽細胞を採取し、24 時間培養後、Venus（コントロール）あるいは BMP2 アデノウイルスを添加し、12 時間培養後にアデノウイルス非含有培地に交換した。さらに 36 時間培養後に全 RNA を回収した。全 RNA から cDNA を合成し、*Yank1* および *Yank2* mRNA の発現を RT-qPCR 法にて解析した。*Yank1* および *Yank2* mRNA 発現量は、同じサンプルの*β-actin* mRNA 発現量で補正し、Venus アデノウイルス添加群における *Yank1* および *Yank2* mRNA の発現量の倍数で示した（平均および標準偏差を示す。n=6、** : P<0.01 vs Venus アデノウイルス添加群 ; マン・ホイットニーの U 検定）。