

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	鰭条形成におけるEctodysplasinシグナルの機能解析
Title(English)	
著者(和文)	飯田優希
Author(English)	Yuuki Iida
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9590号, 授与年月日:2014年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:工藤 明,川上 厚志,立花 和則,山口 雄輝,十川 久美子
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9590号, Conferred date:2014/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 25 年度 学位論文

鰭条形成における Ectodysplasin シグナルの機能解析

東京工業大学大学院

生命理工学研究科 生命情報専攻

工藤・川上研究室

飯田 優希

## 目次

1. 序論	3
1.1 緒言	3
1.2 骨形成	5
1.2.1 骨の分類	5
1.2.2 骨芽細胞	5
1.2.3 魚類の骨	6
1.2.4 鰭条形成	7
1.3 Ectodysplasin A (Eda)	7
1.3.1 Eda の変異による表現型	8
1.3.2 Eda シグナル	8
1.3.3 Eda シグナルと形態形成	9
1.4 メダカを用いた研究の意義	10
1.5 本研究の目的	11
図	12
2. 材料と方法	15
2.1 実験動物と飼育方法	15
2.2 ポジショナルクローニング	15
2.3 骨染色	17
2.4 Whole-mount RNA <i>in situ</i> hybridization & 切片作製	18
2.5 細胞増殖測定	18
2.6 免疫蛍光法	19
2.7 トランスジェニックレスキュー	20
2.8 <i>edar</i> -EGFP トランスジェニックメダカの作製	21
2.9 <i>osterix</i> -DsRed トランスジェニックメダカの作製	21
2.10 <i>in vivo</i> イメージング	22
3. 結果	23
3.1 all-fin less 変異体 <i>afl</i> の表現型	23
3.1.1 成魚の鰭における鰭条形成不全	23
3.1.2 成魚の頭蓋骨、歯、鱗における形成不全	23
3.1.3 稚魚の膜鰭尾部における表現型	24

3.2 原因遺伝子の特定 .....	25
3.2.1 ポジショナルクローニング .....	25
3.2.2 <i>afl</i> 変異体レスキュー実験.....	26
3.3 鰭条形成中の遺伝子発現 .....	26
3.4 鰭条形成における <i>Eda</i> シグナル .....	28
3.4.1 <i>edar</i> の発現 .....	28
3.4.2 NF- $\kappa$ B のリン酸化.....	29
3.4.3 <i>in vivo</i> イメージング .....	29
図.....	31
4. 考察.....	41
5. 参考文献.....	44
6. 謝辞.....	48

# 1. 序論

## 1.1 緒言

日本記念日協会は 1994 年に 10 月 8 日を「骨と関節の日」と定めている。これには、骨と関節を中心とした体の運動器が健康維持にいかに大切であるかを、より多くの人に認識してもらいたいという願いがこめられているという。日付は「ホネ」のホの字が十と八を組み合わせたように見えることから、この日に決まったそうである（日本記念日協会 HP より）。体を自由に動かすためには、骨がしっかりと体を支え、関節が滑らかに動くことが必要であるが、近年、骨と関節に障害がおきる運動器疾患患者が増加している。例えば、骨がもろくなる骨粗鬆症、膝の痛みの原因となる変形性膝関節症などがその一例である。膝や腰が痛む、足腰が弱くなるといった症状は、中高年の多くが抱える大きな悩みだが、根本的な治療法は確立されていない。

現代よりも寿命が短かった時代には、いかに寿命を延ばすかという命題に立ち向かうために研究が行われ、それが人々の願いだった。しかし、現代のように寿命が延びると、次はいかに質の良い生活が送れるかを追求することに関心が向かい、研究の方向性も変化してくる。長い人生いくつになっても元気に動き回っていたいという願いを叶えるために研究が発展するようになる。そこで注目されてきた研究の一つが骨研究である。実際、WHO は、2000 年から 2010 年までの 10 年間を「骨と関節の 10 年」と定め、これまで注目度の低かった関節疾患や骨粗鬆症などの疾患の予防法と根本的な治療法の確立を目指してきた。そして、まだ目的が十分に達成されていないという理由から、さらに 2020 年まで継続して研究を強化していく方針を打ち出している。日本においても近年、骨粗鬆症に対して骨形成促進作用のある治療薬が開発されるなど、確実に研究は進み、人々の関心が高まっている。

骨研究は、ノックアウトマウスの解析がさかんになり、骨形成に現れる表現型と原因遺伝子が次々と明らかになったことにより、分子生物学分野で発展するようになった。しかし、骨形成関連遺伝子の欠損は重篤な骨格の異常を引き起こし、胎生致死や生後すぐに死亡することが多いため、解析が難しい。そのため、*in vitro* の研究と合わせることで、研究が進められてきた。生体内で実際に行われている骨形成をさらに詳細に解析し、これまでの分子レベルでの研究結果も含めて、より体系的に骨形成を理解するためには、生体内でより長い期間骨形成を観察できる実験系を用いることが望ましい。

そこで登場するのがゼブラフィッシュやメダカなどの硬骨魚類である。ノックアウトマウスを用いた研究では成し得なかった成果が期待できるとして、骨研究に用いられている。マウスの骨を観察するためには、基本的には体外に取り出す必要があるため、体内で形成過程を観察することは容易ではない。それに対し、魚類の稚魚は体が透明であり、成魚は鱭が透明であるため、骨形成過程を外側から観察することができる。トランスジェニックラインを作製すれば、細胞の動きを容易に可視化することもできる。また、これまでの研究から硬骨魚類は進化の初期段階で出現した脊椎動物であり、脊椎動物全般に保存された発生機構を持つことが明らかになっている。そのため、硬骨魚類は骨研究に適し、かつ非常に扱いやすいモデル生物であると言える。

本研究では骨形成モデルとしてメダカを用いた。特に、鱭内部に存在する鱭条と呼ばれる骨組織に着目し、その形成機構の解析を行った。骨形成に異常を示す変異体を単離して解析する順遺伝学的手法と、魚類を用いる最大の利点である *in vivo* イメージング技術を用いて、骨形成中の新たな分子機構を明らかにした。ここで報告する結果は、骨形成の基礎研究に新たな知見を与えるものであり、今後の骨研究の発展の一翼を担うものであることを期待している。

## 1.2 骨形成

本研究の対象である脊椎動物の骨について、その種類や形成機構について説明する。さらに、骨形成モデルとして用いた硬骨魚類であるメダカの骨、特に鰭条について紹介する。

### 1.2.1 骨の分類

脊椎動物の骨は、内骨格と外骨格の二種類に分類され、その形態や骨化様式が異なることが知られている。内骨格は、背骨や四肢など、体の内部を通る長く細い骨のことを示し、その形状から長管骨と呼ばれる。一方、外骨格は頭蓋骨などの体の外側を覆う骨のことを指し、その形状から扁平骨と呼ばれる。進化の初期段階にいる甲皮類は全身が皮骨で覆われており、この皮骨が外骨格の起源だと言われている。外骨格は、進化の過程で次第に退化し、魚類では鱗・鰭条・頭蓋骨、哺乳類では頭蓋骨と鎖骨のみになったと考えられている。

また、内骨格は内軟骨性骨化、外骨格は膜性骨化によって骨化するという違いがある。内軟骨性骨化では、間葉系細胞がまず軟骨へと分化し、さらに肥大軟骨へと分化した後に、内部に血管と骨芽細胞が誘導されて内側から骨化する。一方、膜性骨化では、凝集した間葉系細胞が軟骨細胞を経ずに直接骨芽細胞へと分化し、後に骨基質を分泌して骨化する。

### 1.2.2 骨芽細胞

骨芽細胞は、間葉系細胞が分化してできる細胞で、後に骨基質を分泌して骨形成を誘導する骨細胞である。骨芽細胞に直接作用してその増殖や分化に重要な影響を与える因子として、骨形成因子(BMP)、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、インスリン様成長因子(IGF)、副甲状腺ホルモン(PTH)などが知られている。BMP は、異所性骨形成の誘導因子として同定され(Urist, 1965)、その後の研究から個体の初期発生に重要なサイトカインであることが明らかになった。BMP ノックアウトマウスはその多岐に渡る機能により胎生致死であり、骨研究

においてはコンディショナルノックアウトが用いられている。

近年、ヒトPTH製剤が、骨粗鬆症治療薬として販売されるようになり注目を集めている（テリボン皮下注用 56.5 µg）。これまでの骨粗鬆症治療薬は、破骨細胞の機能を阻害することで骨の吸収を抑えるものだった。それに対しこのヒトPTH製剤は、骨芽細胞の増殖を促進して骨形成を促すという画期的なものであった。このように臨床応用の観点からも骨芽細胞分化の分子機構の解明は注目を集めている。

骨芽細胞分化には転写因子であるRunx2とOsterixが重要であることが知られている。どちらのノックアウトマウスも骨芽細胞が存在せず、骨形成が行われないことから、骨芽細胞分化への関与が明らかになった。Runx2は間葉系幹細胞を凝集させながら骨芽前駆細胞への分化を決定し、Osterixは骨芽前駆細胞を未熟骨芽細胞へと分化させることから、Runx2とOsterixは骨芽細胞分化に必須であると言われている（Komori et al., 1997; Nakashima et al., 2002）。

### 1.2.3 魚類の骨

硬骨魚類は進化の初期段階で出現した脊椎動物であり、これまでゼブラフィッシュやメダカを用いた研究から、骨の形態や形成機構が分子レベルで哺乳類とよく保存されていることが明らかになっている。外骨格、内骨格の分類は硬骨魚類にも当てはまり、頭蓋骨、鱗、鰭条は外骨格だと考えられる。

鰭条（Fin rays）は鰭の内部にある骨組織である（図 1.1）。鰭の内部には二種類の骨があり、一つが外骨格である鰭条、もう一つが鰭の根元にあり内骨格に当たる支持骨格である。支持骨格は、鰭の根元で体幹部と鰭条を結合するように存在しており、尾鰭では下尾骨（Hypurals）、背鰭と尻鰭では担鰭骨（Radials）、胸鰭では肩甲骨、腹鰭では腰骨と呼ばれている（Crotwell and Mabee, 2007）。鰭条は節で区切られた繰り返し構造を基本骨格にしており、瓦型をした二枚の骨が合わさって一本の鰭条を形成している（Laforest et al., 1998）。

つまり鰭条は長管骨ではなく扁平骨であると言える。

#### 1.2.4 鰭条形成

鰭条を形作る二枚の骨の表面には骨芽細胞が並び、その骨と骨の間には繊維芽細胞や血管、神経が通っている。周りは表皮と色素細胞で覆われており、筋肉は存在しない。

メダカの稚魚では受精後 5 日目に尾鰭部分の鰭条の形成が始まる。発生初期の稚魚は体全体が膜鰭と呼ばれる透明な膜で覆われており、受精後 5 日目になると、その膜鰭の尾部に鰭条が形成され始める。膜鰭内部にはアクチノトリキアと呼ばれる繊維状組織が放射状に形成され、その繊維に沿って鰭条が形成されることが知られている。

鰭条形成の分子機構は、主にゼブラフィッシュを用いた鰭再生研究によって明らかにされてきた。鰭再生時の鰭条再生では、まず間葉系細胞に *bmp2b* が発現し (Quint et al., 2002)、それに誘導されて *runx2* が発現する (Smith et al., 2006)。*runx2* は *osterix* の転写を制御して骨芽前駆細胞を骨芽細胞へと分化誘導する。その後の骨芽細胞の分化段階は *bone sialoprotein (spp-1)* や *ZNS-5* などのマーカー遺伝子によって定義される (Johnson and Weston, 1995)。これらマーカー遺伝子により、鰭条の基部には成熟した骨芽細胞、先端には未熟な骨芽細胞が存在することが示されている。メダカの尾鰭においても *osterix* が骨芽前駆細胞で発現することが報告されている (Renn and Winkler, 2009)。このように鰭条の形成は、脊椎動物に共通した分子機構で説明することができると考えられる。

### 1.3 Ectodysplasin A (Eda)

本研究で用いた *afl* 変異体は、今回報告する解析結果により *ectodysplasin A (eda)* 遺伝子に変異を持つことが明らかになった。そこで *eda* 遺伝子と *eda* が関与する Eda シグナルについてこれまでの知見を紹介する。

### 1.3.1 Eda の変異による表現型

Eda は、ヒトの外胚葉異形成症の原因遺伝子であることが知られている (Mikkola, 2009)。外胚葉異形成症は、表皮またはその付属器である毛髪、皮脂腺、汗腺、乳腺、爪、歯に発育不全もしくは部分的な欠損などの症状が現れる先天性疾患である。歯科領域では、歯の欠落部を補う治療がなされるなどの対処療法があるが、皮脂腺や汗腺がなく汗をかくことができない症状に対する治療法はなく、重篤な疾患である。マウスにおいては、Eda に変異を持つ自然発生変異体 *Tabby* が報告されている (Mikkola, 2008)。*Tabby* 変異体の表現型は、体毛が減少し一部消失する、瞼が常に閉じぎみである、汗腺や乳腺が減少もしくは欠失する、歯が矮小化または欠失する、という形質として現れる (Gaide and Schneider, 2003), (図 1.2)。また、Eda と特異的に結合する Eda receptor (Edar) に変異を持つ自然発生変異体 *downless* が同様の表現型を示すことが報告されている。さらに、ゼブラフィッシュの *eda*, *edar* 変異体が同定されており、鱗の異形成と部分的な消失、咽頭歯の消失、鰭の消失などが報告されている (Harris et al., 2008), (図 1.3)。

### 1.3.2 Eda シグナル

Eda 遺伝子の翻訳物は二種類あり、EDA-A1 と EDA-A2 と命名されている。この二つはスプライシングバリエーションであり、EDA-A2 は EDA-A1 よりも 2 アミノ酸短い (Bayés et al., 1998)。EDA-A1 は EDAR と特異的に結合し、EDA-A2 は XEDAR と結合する (Yan et al., 2000)。*Tabby* 変異体では EDA-A1 の過剰発現により表現型が回復し、EDA-A2 では回復しなかったことから、*Tabby* 変異体の表現型が EDA-A1 の欠損によるものであることが示されている (Srivastava et al., 2001; Cui et al., 2003)。

EDA-A1 をリガンドとする Eda シグナルは、*Tabby* 変異体や *downless* 変異体の解析、*in vitro* の実験系により解析が進んでいる。これ以降、EDA-A1 のことを Eda と表記し、EDA-A1 と EDAR によるシグナルを Eda シグナルと表記する。Eda は三量体を形成し、フェーリンプロ

テアーゼによるタンパク分解的切断を受けることにより、細胞表面から遊離して Edar に結合する (Elomaa et al., 2001; Schneider et al., 2001; Mikkola and Thesleff, 2003)。すると、Edar の細胞内ドメインが下流へシグナルを伝え、NF- $\kappa$ B がリン酸化される。リン酸化し活性化した NF- $\kappa$ B は核内へと移行し、下流の転写因子の転写を促す。この転写因子は、マウスの皮膚を用いたマイクロアレイ解析により、*ccn2/ctgf*, *follistatin*, *shh*, *dkk4* などが候補として挙げられている (Mou et al., 2006; Pummila et al., 2007; Fliniaux et al., 2008)。BMP のアンタゴニストとして知られている *ccn2/ctgf*, *follistatin* は、recombinant EDA を作用させた培養細胞での発現誘導が観察された (Mou et al., 2006)。同時に *shh* の発現が上昇することが報告されている (Pummila et al., 2007)。Wnt のアンタゴニストである *dkk4* も recombinant EDA により発現上昇が観察されている (Fliniaux et al., 2008)。*shh* は、recombinant *shh* が *downless* 変異体の顎下腺の表現型を回復させたことから Eda シグナルのターゲット因子であることが示唆されている (Wells et al., 2010)。また、NF- $\kappa$ B の活性化が Eda シグナルのメイン経路であることは、いくつかのマウスを用いた研究によって示されている。NF- $\kappa$ B レポーターマウスを用いて NF- $\kappa$ B の活性を調べたところ、*Tabby* マウスと *downless* マウスにおいて NF- $\kappa$ B の活性が有意に低下していた (Schmidt-Ullrich et al., 2001; Schmidt-Ullrich et al., 2006)。

### 1.3.3 Eda シグナルと形態形成

Eda シグナルが形成に関与するとされている歯、毛包、汗腺などの組織の発生には共通した形態変化があることが示されている。まず、組織が形成される部分の上皮細胞が肥厚し、プラコードが形成される。その後、上皮プラコードが間葉系細胞の層へと陥入し、上皮間葉相互作用によって組織が形成されていく。この時の上皮細胞と間葉系細胞間のシグナル伝達を Eda/Edar シグナルが担っていることが示唆されている。例えば、歯胚発生期において、開始期では Eda, Edar とともに上皮での発現が観察される。Edar 発現細胞が上皮プラコー

ドを形成し、陥入後は、歯の外エナメル上皮で *Eda* が発現し、エナメル結節と呼ばれる歯の内部組織で *Edar* が発現する (Tucker et al., 2000)。ゼブラフィッシュやメダカでは、これまで *eda* 発現細胞が特定されていなかったため、このような *Eda/Edar* シグナルの機能は確認されていない。本研究で初めて、魚類における *Eda/Edar* シグナルの細胞間シグナル伝達について報告する。

#### 1.4 メダカを用いた研究の意義

小型の硬骨魚類であるメダカは、飼育が容易で、毎日約 20 個の卵を産み、約 2 ヶ月で成魚へと成長する。卵の中で発生し、卵から孵った稚魚は体が透明なため、生きたまま組織の発生を観察することができる。このような特徴から、メダカは発生学のモデル動物として非常に優れていると言える。また、基本的に哺乳類と同等の組織・器官を持つため、ヒトの疾患モデルとしても利用されている。

メダカは順遺伝学による発生学研究に適している。順遺伝学とは、スクリーニングにより注目する現象に異常を示す変異体を単離し、原因遺伝子を探索するという手法である。この手法を用いることにより、ある遺伝子のこれまで知られていなかった新たな器官形成への関与を明らかにすることや、名前のついていない新規遺伝子を発見することが比較的容易になった。単離された変異体のどの遺伝子に変異しているのかを特定する際にもメダカは非常に有用である。メダカは交配可能な北日本集団由来 (HNI) と南日本集団由来 (Cab) の純系統が樹立されており、これら系統間のゲノムを比較すると、遺伝子コード領域で約 1%、非コード領域で約 3%の塩基が異なっている (Sasado et al., 2010)。系統間で見られる多型としては非常に大きな数字であり、このことは多型マーカーの作製を容易にし、変異体の原因遺伝子の探索を有利にしている。さらにゲノムサイズが比較的小さいことから、メダカは遺伝学研究に適した優れた研究モデルであると言える。

## 1.5 本研究の目的

ノックアウトマウスを用いた研究により骨形成に必要な遺伝子が明らかになり、*in vitro*の研究により骨芽細胞分化のメカニズムが明らかにされつつある。しかし、これまでの研究結果は骨組織を組織学的、形態学的に解析したものであり、生体内での骨形成機構を正確に理解するには不十分である。そこで、小型魚類であるメダカを用いて *in vivo* イメージングを行い、生体内における骨形成中の細胞の挙動を観察することで、骨形成における新たな分子機構を提唱することを目的とした。

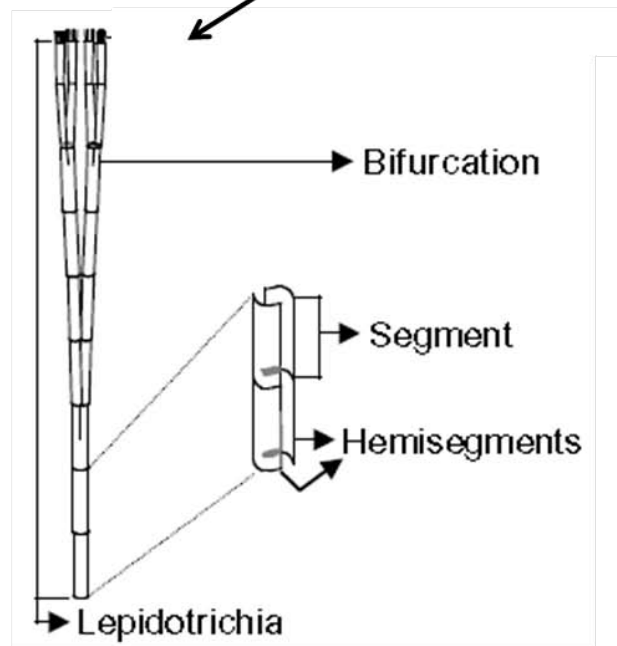
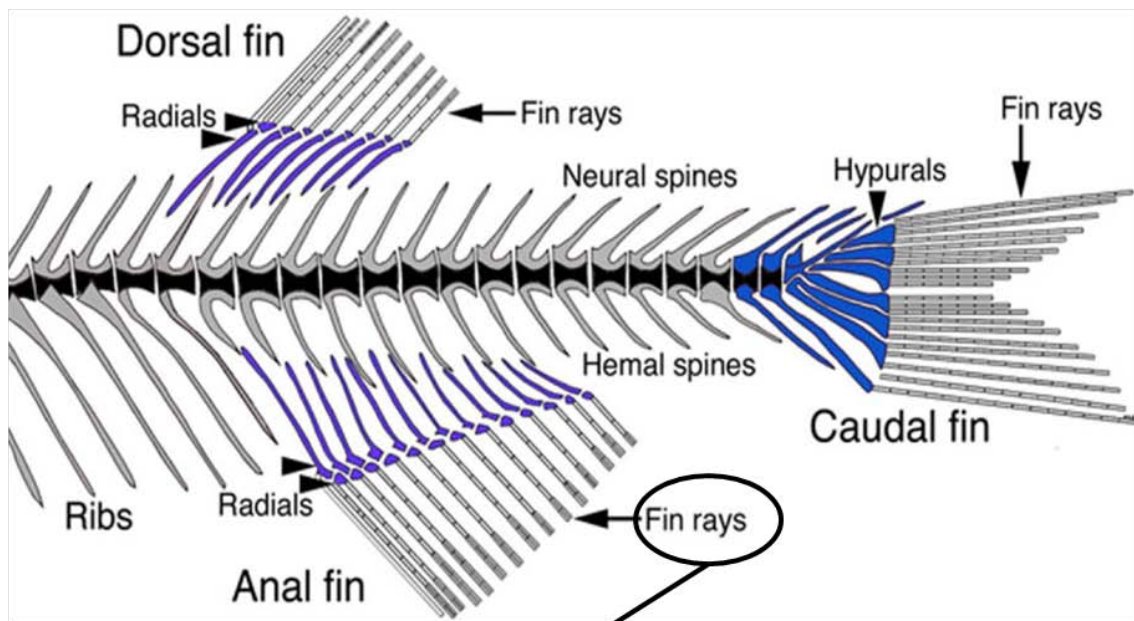


図 1.1 硬骨魚類の骨格

鰭の内部には、外骨格である鰭条 (Fin rays) と内骨格に当たる支持骨格が存在する。支持骨格は、鰭の根元で体幹部と鰭条を結合するように存在し、尾鰭では下尾骨 (Hypurals)、背鰭と尻鰭では担鰭骨 (Radials)、胸鰭では肩甲骨、腹鰭では腰骨と呼ばれている。鰭条は、節で区切られた繰り返し構造を基本骨格として、瓦型をした二枚の骨が合わさった構造をとる。(Crotwell and Mabee, 2007, Laforest et al., 1998 より改変)

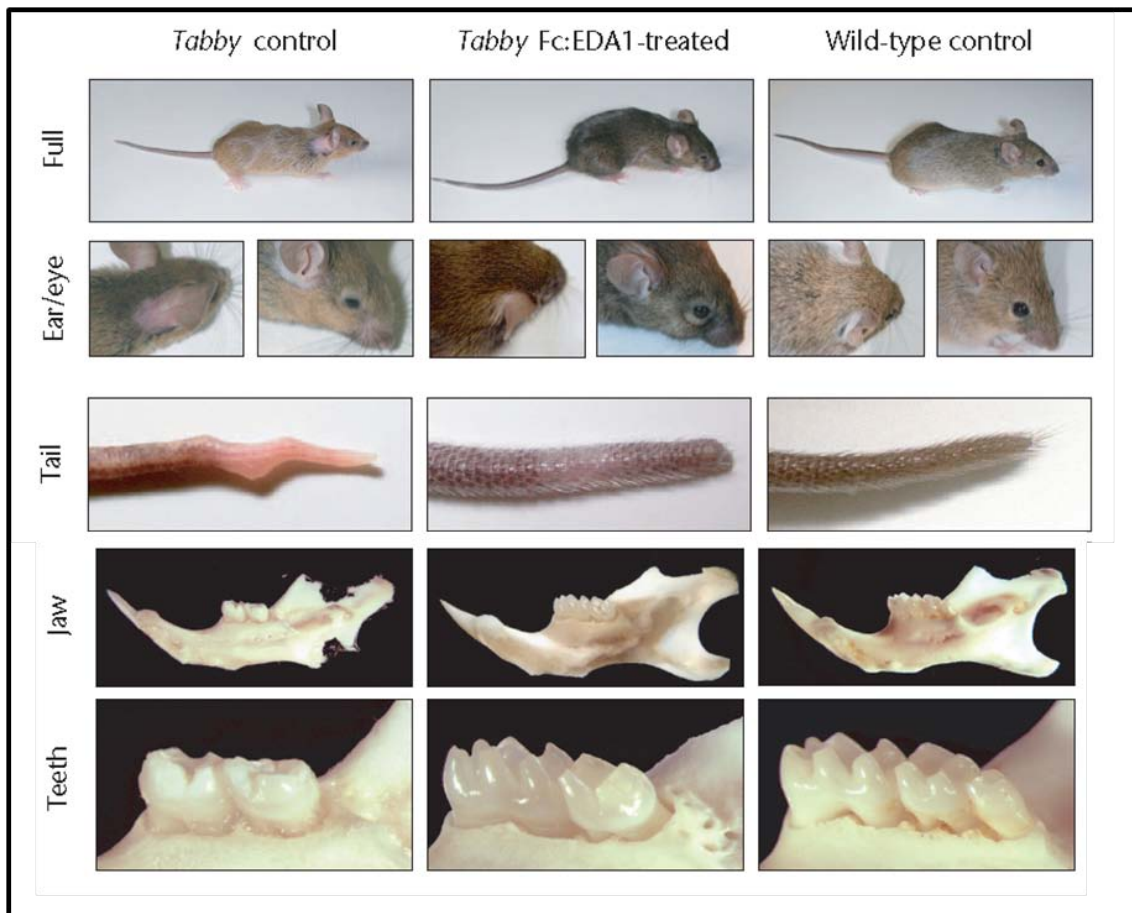


図 1.2 *Tabby* 変異体の表現型

*Tabby* control は *Tabby* ホモ変異体、*Tabby* Fc:EDA1-treated は *Tabby* 変異体に EDA を導入して表現型を回復させたもの、Wild-type control は野生型を示す。*Tabby* 変異体は、部分的に毛が少なくまた色が薄くなり、瞼が常に閉じぎみであるという表現型を示す。また、尾は毛が消失して変形し、歯は本数が減少しまた小さくなる。(Gaide and Schneider, 2003 より改変)

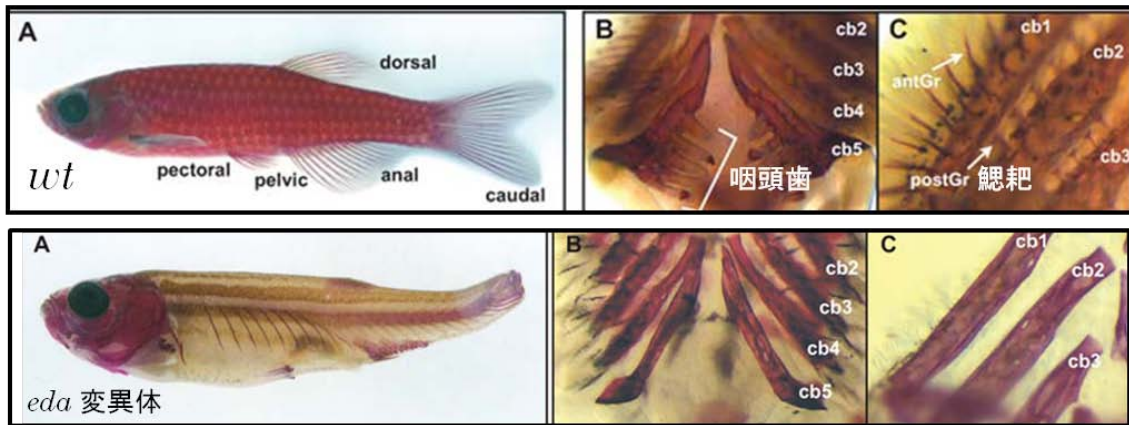


図 1.3 ゼブラフィッシュ *eda* 変異体の表現型

アリザリンレッド染色により骨組織を染色した図を示す。*eda* 変異体は体幹部の鱗の欠損、咽頭歯や鰓耙の欠損などの表現型を示す。また、鰭がなく *afl* 変異体とよく似た表現型を示す。(Harris et al., 2008 より改変)

## 2. 材料と方法

### 2.1 実験動物と飼育方法

実験動物としてメダカ (*Oryzias Latipes*) を用いた。野生型 (wt) には全て南方系メダカ Cab を使い、*afl* 変異体は Cab に変異を挿入して作製された。

飼育水には、水道水を活性炭カラムに通して塩素除去したものを用い、熱帯魚用フィルターマットと多孔質な小石 (炉材) の二層からなる濾過ユニットを用いて循環させた。水温は、ヒーターで 28 °C に設定し、照明をタイマーによって明 14 時間 / 暗 10 時間の周期に調節し、一年を通して産卵ができる環境を整えた。採取した受精卵はメダカリングーを入れたシャーレの中に入れ、28 °C のインキュベーター内で発生させた。メダカリングーの組成は、0.65 % NaCl, 0.04 % KCl, 0.0011 % CaCl<sub>2</sub>, 0.01 % MgSO<sub>4</sub>, 0.01 % NaHCO<sub>3</sub> とした。

餌は稚魚にはアユ餌付用飼料ゴールド No.0 号 (オリエンタル酵母工業株式会社) を、成魚には日清印種苗用配合飼料おとひめ B1 (日清飼料株式会社) を孵化させたブラインシュエリンプエッグス (ミヤコ株式会社) を組み合わせて与えた。

実験に使った全ての稚魚は、孵化酵素で卵膜を取り除いてから使用した。孵化酵素は、12 µl のメダカリングーに 6 dpf の卵を 5 つ入れて 28 °C, 2 時間程度において孵化するのを待ち、孵化後、その溶液を回収し、遠心分離により卵膜などの余分な成分を取り除いて作製した。

### 2.2 ポジショナルクローニング

*all-fin less (afl)* 変異体は、当研究室で以前行われた ENU による誘発突然変異体のスクリーニングによって単離された (Hibiya et al., 2009)。その後、メダカの系統間に存在する遺伝子多型を利用したゲノムマッピングを行い、変異箇所の特特定を行った。まず、Cab 由来のヘテロ変異体と北方系メダカ HNI の野生型との交配により、F1 世代を得た。F1 世代の交配

により得られた F2 世代のホモ変異体をゲノムマッピングに用いた。

*afl* ホモ変異体を、受精後約 10 日目(孵化後約 4 日目)に、尾鰭の表現型によって単離し、メタノールを入れた 96 穴プレートに一匹ずつ入れ、-20 °C で保存した。その後、メタノールを除き、Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 0.3 % Tween 20, 0.3 % Nonidet P40) を 50 µl 加えて、95 °C で 10 分間加熱処理し、内在性の DNase を失活させた。Proteinase K を終濃度 1 mg/µl になるように加えて、55 °C で 2-5 時間加熱してタンパク質を分解し、95 °C で 5 分間加熱して Proteinase K を失活させた。このようにして抽出したゲノム DNA を -20 °C で保存し、PCR テンプレートに用いた。

*afl* 変異体の原因遺伝子がどの LG (Linkage Group; LG 番号は染色体番号に一致する) 上に存在するかを見つけ出すために、野生型 24 個体と *afl* 変異体 24 個体のゲノムを抽出してそれぞれ混ぜ合わせたものをテンプレートとし、各 LG マーカーを用いてリンケージマッピングを行った。LG マーカーとして M-marker を用いた (Kimura et al., 2004)。M-marker は全ての LG に 2 つずつ配置されており、この 48 種類のプライマーを用いた PCR によって LG 番号を決定することができる。PCR 後、12 % アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行いバンドを検出した。PCR は 95 °C 2 分の後、(95 °C 30 秒, 55 °C 30 秒, 72 °C 1 分) を 40 サイクル行い、さらに 72 °C 2 分というプログラムで行った。

LG 番号決定後、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) マーカーを作製し、ファインマッピングを行った。RFLP マーカーで増幅させた領域に存在する塩基置換による系統間の多型を、制限酵素で切断することで、その領域が Cab 由来のものか HNI 由来のものかを見分けることができるため、Cab 由来の変異箇所を特定することができる。このマーカーは、MLBase (Medaka Linkage Map Database) に登録されているものと、UTGB Medaka Genome Browser に登録されている Cab と HNI の EST 情報を比較して設計したものをを用いた。PCR 後、各マーカーに対応する制限酵素で切断し、12 % アクリルアミドゲルで電気泳動をおこなった。PCR は 95 °C 2 分の後、(95 °C 30 秒, 55 °C 30 秒, 72 °C 1 分) を 40 サイクル行

い、さらに 72 °C 2 分というプログラムで行った。

アクリルアミドゲルは、分離ゲルと濃縮ゲルの二層からなるゲルを作製した。分離ゲルは 12 % とした。30 % アクリルアミド 4ml と 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 2.5 ml を調整して、全量が 10 ml になるように蒸留水を加え、さらに TEMED 5 $\mu$ l と APS 50  $\mu$ l を加えた。この溶液を組み立てたゲル板に流し込み、水飽和ブタノールで空気を遮断し、30 分かけてアクリルアミドを重合させた。重合後、分離ゲルの上に濃縮ゲルを流しこみ、コームをさして 10 分間重合させた。濃縮ゲルは 30 % アクリルアミド 440  $\mu$ l と 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 820  $\mu$ l と蒸留水 21 を混合し、さらに TEMED 3.4  $\mu$ l と APS 34  $\mu$ l を加えて作製した。泳動バッファは、Tris-Glycine バッファを用いた。Glycine 144 g とトリスアミノメタン 38.3 g を蒸留水に溶かして、全量を 1000 ml にして、10 x Tris-Glycine バッファを作製した。

### 2.3 骨染色

成魚に対して、アリザリンレッドとアルシアンブルーによるダブル染色を行った。全ての操作を室温で行った。まず、ホルマリン (10 % formaldehyde/PBS) で一晩固定し、PBST (PBS/0.1 % Tween) と蒸留水で洗浄後、アルシアンブルー溶液 (1 % Alcian blue, 70 % ethanol, 30 % acetic acid) に入れて一晩染色した。その後、ethanol で脱色し、80 %, 60 %, 40 %, 20 %, 0 % ethanol/H<sub>2</sub>O と段階的に濃度を変えて洗浄していった。続いてトリプシン溶液 (1 % トリプシン, 30 % 飽和四ホウ酸ナトリウム水溶液) に入れて、一晩処理した。さらに、新たにトリプシン溶液を調整して一日処理した。その後、0.5 % KOH で洗浄し、アリザリン溶液 (20 % Alizarin red/ethanol, 0.4 % KOH) に入れて一晩染色した。最後に 0.5 % KOH で洗浄し、80 % グリセロールに置換して観察した。

稚魚に対して、アリザリンレッド染色を行った。PFA 溶液 (4 % paraformaldehyde/PBST, 0.05 N NaOH) で 4 °C で一晩固定し、PBST で 5 分間洗浄後、アリザリンレッド溶液 (4 % Alizarin red, 0.5 % KOH) に入れて、室温で 3 時間染色した。その後、0.5 % KOH で洗浄し、

80 %グリセロール/KOH に置換して観察した。

稚魚の *in vivo* イメージングを行う際には、ALC (Alizarin complexone) で染色した。稚魚を 0.005 % ALC 溶液を入れたシャーレに移し、2 時間後、溶液を蒸留水に換えて、蛍光顕微鏡で観察した。

## 2.4 Whole-mount RNA *in situ* hybridization & 切片作製

Whole-mount RNA *in situ* hybridization (WISH) には、digoxigenin-labeled anti-sense RNA プロンプを用い、以下の論文を参考に行った (Inohaya et al., 1995; Inohaya et al., 1999)。WISH 後のサンプルはグリセロールに置換して観察後、切片を作製した。まず、蒸留水で洗浄し、4°C で 3 時間、ethanol で脱水した。その後 Technovit 8100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) を用いて切片作製の準備を行った。浸透液 (0.3 g hardener, 50 ml base-liquid Technovit 8100) にサンプルを浸し、固定液 (浸透液に 30 % hardener II を加えてよく混ぜる) を作製して型に 1 ml ずつ入れた。型に 1 サンプルずつ入れて、ピンセットで向きを決め、液が固まってきたらカバーガラスをして 4°C で固定した。固定後、型の上に Histoblock (Heraeus Kulzer) を乗せて、粘着液 (Technovit 3040) で固定して、型からサンプルを含むブロックを取り出した。このブロックから 5  $\mu$ m の切片を作製してスライドガラスの上に並べ、PI (propidium iodide) 染色をしてからカバーガラスをかけて観察した。

## 2.5 細胞増殖測定

稚魚を 5 mM の BrdU を含むメダカリンガーの中で、28 °C で 8 時間泳がせて BrdU の取り込みを行った。その後、4 % PFA に入れて 4°C で一晩固定した。PBSTx (PBS, 0.1 % Triton-X 100) で洗浄し、methanol で脱水した。この時、methanol と PBSTx の希釈系列を methanol (25-50-75 %) / PBSTx のように作り、段階的に脱水を行った。最後に 100 % methanol で洗浄し、-20°C で保存しサンプルとした。使用の際は、再び段階的に PBSTx に置き換えるために、

希釈系列を methanol (75-50-25 %)/PBSTx のように作り、各 15 分かけて置換した。さらに 100 % PBTx で 15 分置いた後、10 ng/ml の Proteinase K/PBST で処理をした。処理の時間は胚のステージによって適宜調節した。続いて 4%PFA /PBS で 20 分間の再固定を行った。再固定後は H<sub>2</sub>O/0.1% TritonX で洗浄、2N HCl/0.1% TritonX で洗浄を行い、2N HCl/0.1% TritonX で 37°C 1 時間の処理をした。その後、PBTx 溶液で 5 分の洗浄を 5 回を行い、2mg/ml BSA, 2% lamb serum/PBTx で、室温 2 時間のブロッキングを行った。Anti-Bromodeoxyuridine 抗体 (100 倍希釈、Roche) と、4°Cで一晩反応させ、PBTx 溶液で洗浄後、Alexa 488 標識 Anti-mouse IgG (1000 倍希釈、Molecular Probe) と室温で 2 時間反応させた。反応後の試料は PBTx で十分に洗浄後、グリセロールに置換したサンプルを用いてプレパラートを作製し、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。

## 2.6 免疫蛍光法

稚魚を 4 % PFA に入れて 4°Cで一晩固定した。固定後、PBSTx (PBS, 0.1 % Triton-X 100) で洗浄し、methanol で脱水した。この時、methanol と PBSTx の希釈系列を methanol (25-50-75 %) / PBSTx のように作り、段階的に脱水を行った。最後に 100 % methanol で洗浄し、-20°Cで保存しサンプルとした。使用の際は、再び段階的に PBSTx に置き換えるために、希釈系列を methanol (75-50-25 %)/PBSTx のように作り、各 15 分かけて置換した。さらに 100 % PBTx で 15 分置いた後、ブロッキングを行った。ブロッキング溶液は PBSTx 中に 2 mg/ml BSA, 2 % lamb serum となるように調整し、室温で 2 時間処理した。その後、一次抗体を加えて 4°Cで一晩反応させた。一次抗体は、rabbit anti-NF- $\kappa$ B p65 (pSer276) polyclonal antibody (AnaSpec 29775-025; 1:1000)と chicken anti-GFP polyclonal antibody (abcam ab13970; 1:1000)を用いた。反応後、PBSTx で各 15 分 6 回洗浄し、二次抗体を加えて 4°Cで一晩反応させた。二次抗体は、Alexa568-conjugated anti-rabbit IgG (1:1000)と Alexa488-conjugated anti-chicken IgY (1:1000)を用いた。反応後、PBSTx で各 15 分 6 回洗浄し、80 %グリセロールに置換して、スライドグ

ラスに乗せて、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

## 2.7 トランスジェニックレスキュー

導入遺伝子には 13 kb のゲノム断片を用いた。まず、クローニングにより *eda* プロモーター領域 3 kb と *eda* ゲノム DNA 7 kb を含むコンストラクトを作製した。*eda* ゲノム DNA は全長 13 kb あるが、6 kb の 1st intron を削ってコンストラクトに用いた。プロモーターとゲノムを 3 つの部分(promoter-1st exon fragment, 2nd exon-*Xba* I fragment, *Xba* I-3' half fragment) に分けて、BAC クローン(NBRP Medaka; <http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/>)を鋳型として、それぞれ TA ベクターにクローニングした。プライマーはそれぞれ以下のように設計した。

promoter-1st exon fragment,

5'-CTCGAGCACATCGTCTGCCATTAGCC-3', 5'-CTGTCTGTTCTCTCCGCTGC-3'

2nd exon-*Xba* I fragment,

5'-GCAGCGGAGAGAACAGACAGGAAAGATTACAGTACAGAAATGACGGC-3',

5'-GCGGCCGCTTTAGAACTGACAGCACGATCC-3'

*Xba* I-3' half fragment,

5'-GGAGACAGAAATTGGTGTGGG-3', 5'-GCGGCCGCAGACATGTTTCAGCTCTCGGC-3'

2nd exon-*Xba* I fragment のプライマーは、promoter-1st exon fragment の最後の配列を含むように設計し、PCR によってこれらの 2 つのフラグメントをつなげた。つなげられたフラグメントの両端には *Xho* I/*Not* I サイトが設計されており、これらの制限酵素によって *I-Sce* I ベクターにサブクローニングした。さらに、*Xba* I/*Not* I サイトによって *Xba* I-3' half fragment を挿入し、最後に *Not* I サイトに  $\alpha A$ -*crystallin* プロモーター領域と EGFP を挿入してコンストラクトを完成させた。

完成したコンストラクトは *I-Sce* I で切断後、20 ng/ $\mu$ l で 1 細胞期の卵に導入された。導入後の卵のうち染色体上に外来遺伝子が組み込まれた個体は、*crystallin* プロモーターによ

って眼で EGFP が発現するため、蛍光顕微鏡で選別して成魚まで飼育した。次世代の稚魚の中で EGFP の発現が観察されたものを、レスキュートランスジェニックラインとして確立した。

## 2.8 *edar*-EGFP トランスジェニックメダカの作製

メダカから抽出したゲノム DNA を鋳型として、3 kb *edar* プロモーター領域を TA ベクターにクローニングした。プライマーは、5'-CTCGAGAACGATGTATTAAAGTCTGTCTG-3' と 5'-CCGCGGTTCCCTTTCCTGCTGGGGCAG-3' を用いた。*Xho* I / *Sac* II サイトによって、*I-Sce* I サイト、EGFP, SV40polyA を含む pBSKI2 ベクターにサブクローニングした。

完成したコンストラクトは *I-Sce* I で切断後、20 ng/μl で 1 細胞期の卵に導入された。蛍光顕微鏡で、EGFP が強く発現しているものを選別し、成魚まで飼育した。さらに次世代の稚魚の中で、mRNA の発現と同じ部位で発現が見られるものを選別して、トランスジェニックラインとして確立した。

## 2.9 *osterix*-DsRed トランスジェニックメダカの作製

メダカから抽出したゲノム DNA を鋳型として、4.2 kb *osterix* プロモーター領域を TA ベクターにクローニングした。その後、*Sac* II / *Xho* I によって pDsRed2-1 ベクターにサブクローニングした。

完成したコンストラクトは *I-Sce* I で切断後、2.5 ng/μl で 1 細胞期の卵に導入された。蛍光顕微鏡で、DsRed が強く発現しているものを選別し、成魚まで飼育した。さらに次世代の稚魚の中で、mRNA の発現と同じ部位で発現が見られるものを選別して、トランスジェニックラインとして確立した。

*edar*-EGFP メダカと *osterix*-DsRed メダカを掛け合わせてダブルトランスジェニックメダカを作製して、*in vivo* イメージングに用いた。

## 2.10 *in vivo* イメージング

ダブルトランスジェニックメダカの稚魚に対して、トリカイン(3-aminobenzoic acid ethyl ester)で麻酔をかけ、シャーレの中で 1 % 低融点アガロースゲルで包埋した。Olympus FV1000 共焦点顕微鏡と Leica AF6000 蛍光顕微鏡を用いて、経時観察を行った。

## 3. 結果

### 3.1 all-fin less 変異体 *afl* の表現型

#### 3.1.1 成魚の鰭における鰭条形成不全

*afl* 変異体は ENU 処理による変異体スクリーニングによって、尾鰭の鰭条に異常を示す変異体として同定された。胚性致死ではなく、成魚まで成長し野生型と同程度の寿命を持つが、全ての鰭が欠損している (図 3.1 A, B)。表現型をさらに詳細に観察するために、アリザリンレッドとアルシアンブルーによる骨軟骨染色を行った。赤く染まっている骨が硬骨であり、青く染まっている骨が軟骨である。野生型の全ての鰭の内部には、アリザリンレッドで染まる骨組織があり、鰭の付け根から外縁に向かって平行または放射状に伸長しており、これが鰭条である (図 3.1 C)。それに対し、*afl* 変異体では、全ての鰭の鰭条の形成不全が観察された (図 3.1 D)。各鰭をより詳細に観察すると、*afl* 変異体の背鰭と尻鰭の鰭条は完全に消失していた (図 3.1 D 矢印)。*afl* 変異体の胸鰭と腹鰭では、野生型では鰭条が長く伸長している位置に小さな骨が形成されていた (図 3.1 E-H)。*afl* 変異体の尾鰭では、野生型では放射状に伸長している鰭条が湾曲した短い骨となって形成されていた (図 3.1 I, J)。背鰭と尻鰭の根元にある担鰭骨や胸鰭の根元にある射出骨、尾鰭の根元にある下尾骨などの鰭の内骨格には異常は見られなかった。*afl* 変異体は脊椎骨の尾部が反り上がって変形している (図 3.1 B, D 矢頭)。これは、鰭の代わりに尾部をくねらせて泳ぐために、成長に伴って徐々に現れてくる表現型である。

#### 3.1.2 成魚の頭蓋骨、歯、鱗における形成不全

*afl* 変異体では外骨格に分類されるその他の骨組織でも異常が観察された。鰭の表現型と

同様に、赤く染まっているのが硬骨、青く染まっているのが軟骨である。頭蓋骨を真上から見ると、その縫合線に異常が観察された。頭頂部の中央に滑らかで等間隔に隙間の空いた縫合線が観察されるのに対し、*afl* 変異体の縫合線は、ゆがみや重なりが確認された (図 3.2 A, B 矢印)。*afl* 変異体の顎歯は野生型に比べて数が減少していた (図 3.2 C, D)。咽頭歯も同様に、*afl* 変異体では野生型に比べて本数が減少し、歯を支える咽頭歯骨が細くなっていた (図 3.2 E, F)。鱗に関して、野生型は体全体が鱗で覆われており、その形と大きさは均一である (図 3.2 G)。それに対し *afl* 変異体の鱗は部分的にしか形成されず、形成されている鱗は大きさも形も不均一であった (図 3.2 H)。

### 3.1.3 稚魚の膜鰭尾部における表現型

鰭の中で最初に鰭条が形成されるのは尾部である。受精後 5 日目 (5 dpf) から鰭条の形成が始まり、放射状に伸長していく。8 dpf になると 6 本の鰭条が形成される (図 3.3 A)。鰭条の形成はまず、1 とラベルされた鰭条から形成が始まる。それに続いて少しずつ遅れながら 2、3 とラベルされた順番で形成されていく。どの鰭条も伸長速度は等しく、形成開始順に長さが長くなる。*afl* 変異体では、野生型のように全ての鰭条が同一速度で伸長せず、またあまり伸長しない (図 3.3 B)。各鰭条の形成開始のタイミングは野生型と同じであり、形成の順番も 1 から 6 のラベルの順に正しく形成された。尾部の鰭条は膜鰭内部に形成されているが、その膜鰭の形や大きさに違いは見られなかった。そこで、膜鰭内部の構造に異常がないかどうかを検討した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて膜鰭を観察した結果、野生型では鰭条のパターンに沿った繊維組織が確認された (図 3.3 C 赤い線が繊維組織)。*afl* 変異体においても同様に繊維組織が形成されている様子が観察された (図 3.3 D)。さらに拡大して観察したが異常は見られなかった (図 3.3 E)。

次に、細胞増殖の様子を観察するために BrdU 染色を行った。これは、増殖中の細胞がゲノム複製を行うことを利用して、チミジンの代わりに BrdU を取り込ませ、抗体反応によ

って検出する方法である。鰭条は 5 dpf でアリザリンレッドで染まる骨が形成されるので、4 dpf は鰭条形成前のステージを示し (図 3.3 F, H)、8 dpf は鰭条形成開始から 3 日後の様子を示す (図 3.3 G, I)。野生型では 4 dpf, 8dpf 共に活発な細胞増殖が見られるが (図 3.3 F, H)、*afl* 変異体ではどちらのステージにおいても増殖が低下していた (図 3.3 G, I)。*afl* 変異体の膜鰭は大きさに異常がないことから、この増殖低下は膜鰭全体の形成には影響を与えていないと考えられる。よって、鰭条形成に必要な骨芽細胞の前駆細胞の増殖が低下していることが示唆された。

## 3.2 原因遺伝子の特定

### 3.2.1 ポジショナルクローニング

*afl* 変異体の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を行った。まず、sequence-tagged site markers を用いて、変異の存在する染色体 (LG) を特定した結果、LG10 に変異が挿入されていることがわかった。続いて、減数分裂時の相同組換えを利用したゲノムマッピングを行い、二つのマーカーにより組換え価 3/272 と 1/272 の位置を特定した。この二つのマーカーに挟まれた領域内に組換え価 0 になる位置があることを確認し、この領域内にある遺伝子の中から *ectodysplasin A (eda)* を候補遺伝子とした (図 3.4 A)。そしてシーケンスにより cDNA 配列を調べた結果、*afl* 変異体では *eda* の 301 番目の塩基が G から T に変異していることがわかった (図 3.4 B)。この変異により 101 番目のグルタミン酸がストップコドンに変化していた。メダカの *Eda* は 364 アミノ酸からなり、他の動物種との配列の比較から、N 末端側から、膜貫通ドメイン、フューリンプロテアーゼドメイン、コラーゲンドメイン、TNF ドメインの 4 つの機能ドメインを持つと予想される。*afl* 変異体の *Eda* は、膜貫通ドメインとフューリンプロテアーゼドメインの間にストップコドンがあるため、膜貫通ドメイン以外の機能ドメインを欠いたタンパクとなり、*Eda* の機能を十分に果たさない

と予想される (図 3.4 C)。

### 3.2.2 *afl* 変異体レスキュー実験

*eda* が *afl* 変異体の原因遺伝子であることを確認するために、レスキュー実験を行った。コンストラクトは、3 kb の *eda* プロモーター領域、7 kb の *eda* ゲノム領域、*crystallin* プロモーター領域と EGFP を発現ベクターに挿入したものを作製した (図 3.4 D)。ゲノム領域は全長 13 kb あったが、6 kb の 1st intron を除いた 7 kb をクローニングした。これは、このコンストラクトがゲノムに挿入されたことをシーケンスによって確認することができるようにするためである。*crystallin* プロモーターは眼のレンズ特異的に発現することが知られている遺伝子であり、このプロモーターの制御下で EGFP を発現させることにより、コンストラクトのゲノムへの挿入を確認することができる。つまり、レンズで EGFP の蛍光が確認された個体をレスキュー個体として選別すればよいということである。このコンストラクトを一細胞期の受精卵に導入し、レンズで EGFP の蛍光が確認された個体を選び、表現型とゲノム配列を確認した。その結果、内在性の *eda* に変異を持っているが、野生型のような正常な骨格を持つ個体を得ることに成功した (図 3.4 E-G)。このことから、*afl* 変異体の原因遺伝子が *eda* であることが証明された。

### 3.3 鰭条形成中の遺伝子発現

鰭条形成中のステージである 6 dpf において、*eda* の発現を観察した結果、鰭条に沿うような発現パターンが観察された (図 3.5 A)。レセプター *edar* の発現を観察すると、鰭条に沿うような、鰭条のパターンとよく似た発現パターンが観察された (図 3.5 C)。この二つの発現パターンを比べると、互いに交差するような位置関係になっていることがわかった (図 3.5 U)。鰭条のパターンと同じパターンで *edar* が発現し、その発現と互い違いになる位置で *eda* が発現していた。鰭条との位置関係を比べるために、*bmp2b* と *runx2* の発現を観察し

たところ、5 とラベルされた鰭条の位置では、*edar* は発現しているのに対し、*bmp2b* と *runx2* は発現していなかった (図 3.5 C, E, U 矢印)。この結果は、*edar* が *bmp2b* と *runx2* に先行して発現していることを示している。一方、*afl* 変異体では、*eda* の発現は見られなかった (図 3.5 B)。*edar* は野生型に比べて狭い範囲での発現が観察された (図 3.5 D)。*bmp2b* と *runx2* も *edar* のように野生型に比べて狭い範囲で発現していた (図 3.5 F, H)。*afl* 変異体の鰭条は野生型に比べて非常に短いので、*bmp2b* や *runx2* の発現範囲が狭まっていると考えられる。

これらの遺伝子の発現細胞をさらに詳細に特定するために、野生型においてその発現パターンに対して垂直な向きの切片を作製した。赤い染色像は核を染色したものである。その結果、*eda* は間葉系細胞で (図 3.5 K, L)、*edar* は上皮細胞で (図 3.5 M, N)、*bmp2b* と *runx2* は凝集した細胞群の周りで (図 3.5 O-R)、発現している様子が観察された。この結果を模式図にしたものを図 3.5 V に示す。*eda* と *edar* の切片像にも凝集した細胞群が見られるので、その細胞群を基準にして位置関係を示した。

Eda シグナルの下流の候補遺伝子の一つに *shh* がある。そこで、鰭条形成における Eda シグナルのターゲット遺伝子が *shh* であるかを調べるために、*shh* の発現解析を行った。その結果、*shh* は野生型では 1 から 4 でラベルされた鰭条の位置で発現し (図 3.5 I)、切片を観察すると上皮細胞で発現している様子 (図 3.5 S, T) が観察された。この発現パターンは *edar* とよく似ているが、*shh* と *edar* が同じ細胞で発現しているかどうかは確認することができなかった。*afl* 変異体では *shh* の発現は見られなかった (図 3.5 J)。また、Eda シグナルの下流遺伝子候補として知られている *ccn2/ctgf*, *follistatin*, *dkk1* (マウス *dkk4* のメダカ相同遺伝子) の発現を、野生型と *afl* 変異体で比較した。しかし、これらの遺伝子の *afl* 変異体での発現に異常は見られなかった (図 3.6 A-F)。以上の結果から、鰭条形成における Eda シグナルのターゲット因子は *shh* である可能性が示唆された。

### 3.4 鰭条形成における Eda シグナル

#### 3.4.1 *edar* の発現

Eda シグナルは、リガンドである Eda が細胞外に遊離してレセプター Edar の細胞外ドメインと結合することにより、細胞内にシグナルを伝える。そこで、Eda シグナルが機能する細胞として Edar 発現細胞に着目した。鰭条形成中の 6 dpf においては、*edar* が上皮細胞で発現し、その発現パターンが鰭条のパターンと似ていることが明らかになった。さらに詳細に、Eda シグナルが鰭条形成にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、*edar* トランスジェニックメダカを作製した。作製するにあたって、*edar* 発現部位を明らかにしておく必要があるため、まず、*edar* の発現の経時変化を観察した。*edar* は鰭条形成前のステージから発現が始まり、最初は 1 の鰭条の位置で発現が観察された (図 3.7 A)。続いて 2 の位置で発現が見られ、4 dpf では 1 と 2 の位置に発現が見られた (図 3.7 A)。その後 3 から 7 の番号順に発現していく様子が観察された (図 3.7 C, E)。この順番は形成される鰭条の番号と一致していた。8 dpf における *edar* の発現を見ると、1, 2, 3 の位置の発現は鰭条の先端部のみに限られており、4, 5, 6, 7 の発現は鰭条の根元から先端にかけて全体的である様子が観察できる。一方、*afl* 変異体では野生型とは異なるパターンの *edar* の発現が観察された。*afl* 変異体における *edar* の発現開始のタイミングと位置は、野生型と同じで、4 dpf では 1 と 2 の位置で発現が観察された (図 3.7 B)。しかし、ステージが進むと、その発現は野生型のように鰭条の番号ではっきりと示すことができなくなり、鰭条の根元付近の狭い範囲で発現が見られるようになった (図 3.7 D, F)。このような発現パターンを踏まえ、*edar* トランスジェニックメダカを作製した。*edar* のプロモーター制御下で EGFP を発現するコンストラクトを作製し、一細胞期の受精卵に導入してトランスジェニックラインを確立した。そして EGFP の発現と *in situ* ハイブリダイゼーションによる *edar* の mRNA の発現を比べ、作製したトランスジェニックラインが *edar* の発現を再現していることを確認した。さらに、

トランスジェニックメダカの鰭条をアリザリンコンプレキソンで赤くラベルし、鰭条と *edar* との位置関係を観察した結果、鰭条の先端に *edar* 発現細胞が存在している様子が観察された (図 3.7 G, I)。*afl* 変異体においても、*edar* 発現細胞は鰭条の先端に位置していた (図 3.7 H, J)。*edar* の発現が鰭条の根元に留まっているように見えたのは、*afl* 変異体の鰭条が短いためであり、鰭条と *edar* 発現細胞との位置関係は *afl* 変異体でも野生型と同様であることがわかった。

### 3.4.2 NF- $\kappa$ B のリン酸化

Eda シグナルの下流では NF- $\kappa$ B がリン酸化されることが知られている。そこで、メダカの鰭条形成においても NF- $\kappa$ B の活性化が必要であるかどうかを確かめるために、リン酸化 NF- $\kappa$ B に対する抗体を用いて抗体染色を行った。*edar* トランスジェニックメダカに対して、抗 GFP 抗体と抗 NF- $\kappa$ B 抗体を同時に反応させて、抗体染色を行った。その結果、野生型において *edar* と NF- $\kappa$ B が共局在している様子が観察された (図 3.8 A, C, E)。それに対し、*afl* 変異体では、NF- $\kappa$ B の活性化は見られなかった (図 3.8 B, D, F)。

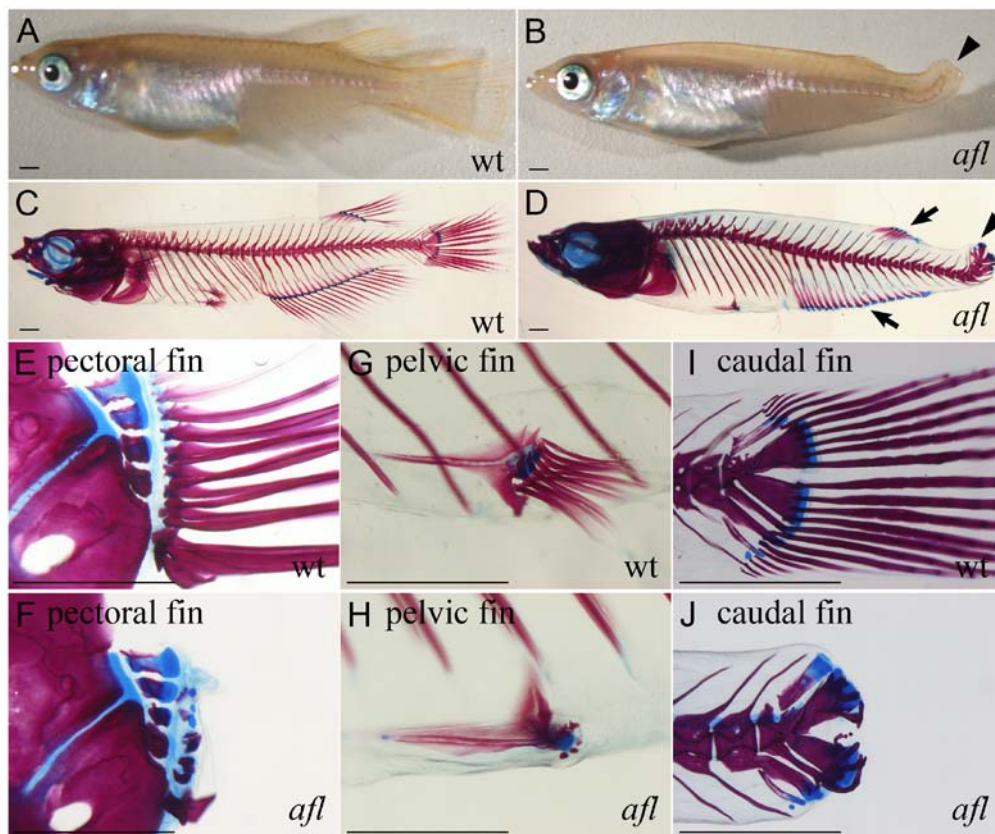
### 3.4.3 *in vivo* イメージング

鰭条形成中の Eda シグナル活性化細胞の挙動を明らかにするために、*edar-EGFP* トランスジェニックメダカに *osterix-DsRed* トランスジェニックメダカを掛け合わせて観察を行った。鰭条形成開始直後の 5 dpf から 15 時間の鰭条形成の様子を 2 時間おきに観察した。観察開始時には、*osterix* は 1 の鰭条でのみ発現し、*edar* は 1, 2, 3 の鰭条で発現していた (図 3.9 A)。まず、1 の鰭条に着目すると、*osterix* の発現領域が時間経過と共に拡大し、鰭条が太く長く形成されていく様子が観察される。それに対して、*edar* 発現領域は、常に鰭条の先端部に位置しており、鰭条の伸長と共に移動していくような様子が見られる。次に、2 の鰭条に着目すると、観察開始時には *osterix* の発現はなく、*edar* のみが発現している (図 3.9 A)。その 2 時間後にもまだ *osterix* の発現は見られないが、4 時間後になると鰭条の根元部分で発現

が見られた (図 3.9 B, C)。その後も *edar* 発現細胞は *osterix* の発現に先行して鰭条の先端部で発現していた (図 3.9 D-G)。

このような挙動を示す *edar* の発現が、一定量の *edar* が発現と消失を繰り返しながら異なる細胞で発現しているものなのか、*edar* 発現細胞が遊走しながら常に同じ細胞で発現しているものなのかを明らかにするために、共焦点顕微鏡を用いて細胞の動きを観察した。ダブルトランスジェニックメダカの1の鰭条に着目し、2分おきに5時間撮影を行い、細胞の挙動を観察した。その結果、鰭条の先端に存在する2つの *edar* 発現細胞が鰭条伸長方向に遊走する様子が観察された (図 3.10 A-F, Movie 1)。これらの細胞は、遊走細胞特有の前後極性を持ち、特徴的な動きを見せた。

図



### 図 3.1. *afl* の鰭の表現型

成魚の鰭の野生型 (A, C, E, G, I) と *afl* (B, D, F, H, J) との比較

**A, B:** 受精後 2 ヶ月のメダカ成魚の側面図。野生型は背鰭, 尻鰭, 尾鰭の 3 種類の正中鰭と胸鰭, 腹鰭の 2 種類の対鰭を持つ (A)。*afl* はこれら 5 種類の鰭すべてを持たない (B)。メダカは泳ぐ際に尾鰭を左右に大きく動かすが、*afl* は尾鰭を持たないため、代わりに体の後端部を大きく動かして泳ぐ。そのため、成長するにつれて後端部が反り上がってくる (D, 矢頭)。

**C-J:** 硬骨と軟骨に対する Alizarin red と Alcian blue 染色。鰭の内部にある赤く染まる骨が鰭条であり、野生型では線状に伸びている (C)。*afl* では背鰭と腹鰭の鰭条が完全になくなっている (D, 矢印)。胸鰭 (E, F), 腹鰭 (G, H), 尾鰭 (I, J) をそれぞれ拡大すると、野生型では鰭条がまっすぐ伸びているのに対し、*afl* では小さく短い骨が形成されている様子が観察された。Scale bars = 1 mm.

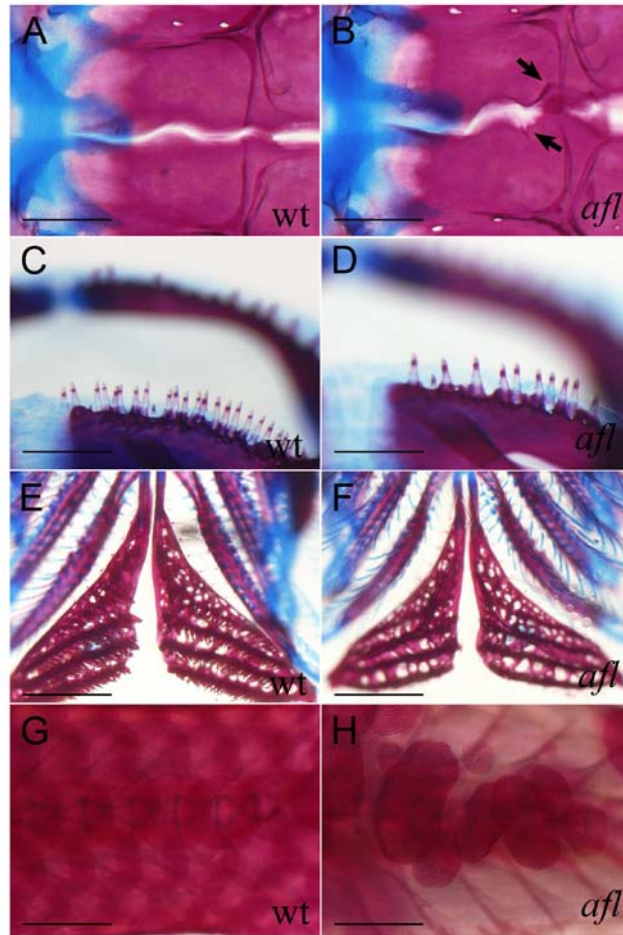


図 3.2. *afl* のその他の外骨格の表現型

硬骨と軟骨に対する Alizarin red と Alcian blue 染色を用いた野生型 (A, C, E, G) と *afl* (B, D, F, H) との比較。

**A, B:** 頭蓋骨を真上から見た図。左が前頭部、右が後頭部になる向きで示した。野生型では、頭蓋骨の中央にある矢状縫合が、左右で重なるようになめらかな隙間を作る (A)。それに対し *afl* では、欠けている部分や重なっている部分があり、左右非対称であった (B, 矢印)。

**C, D:** 上顎を真上から見た図。野生型 (C) に比べて *afl* (D) では歯の本数が減少していた。

**E, F:** 咽頭歯骨に並んだ咽頭歯を示す。野生型 (C) に比べて *afl* (D) では咽頭歯の本数が減少し、咽頭歯骨が細くなっていた。

**G, H:** 体の側面の鱗の拡大図。野生型では、形大きさ共に均一な鱗が、体表全体に規則的に並んでいる様子が観察された (G)。一方 *afl* では、一部の鱗が消失しており、できている鱗は形や大きさが不均一だった (H)。Scale bars = 500  $\mu$ m.

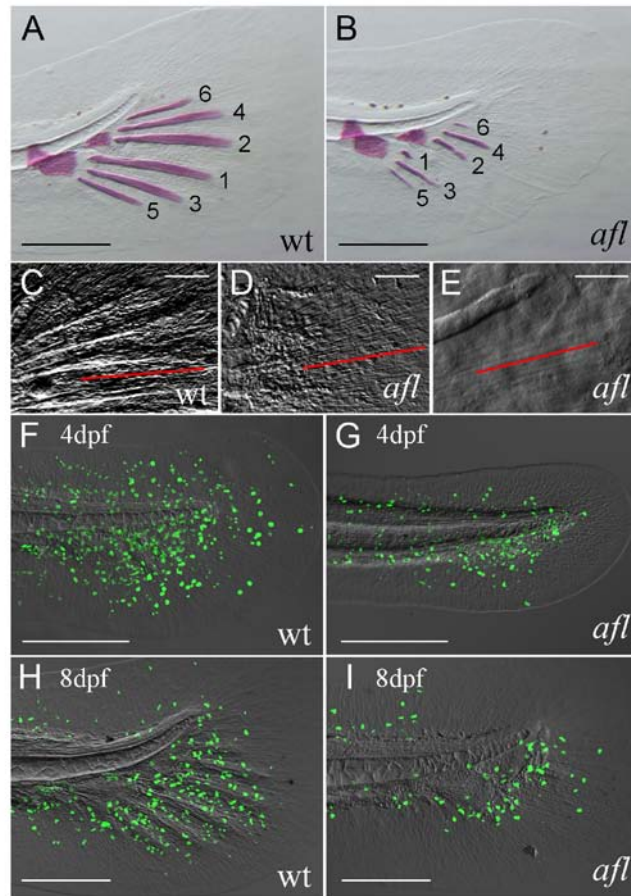


図 3.3. *afl* 稚魚の尾鰭の表現型

**A, B:** 受精後 8 日目の稚魚の尾鰭を Alizarin red で染色した図。野生型, *afl* 共に 1 から 6 の番号順に鰭条が形成される。そのため野生型では 1 の鰭条が最も長くなるが (A)、*afl* では 1 の鰭条は長くない (B)。また、全ての鰭条が細く短くなっていた。

**C-E:** 受精後 8 日目の稚魚の尾鰭を共焦点顕微鏡を用いて拡大した図。尾鰭には actinotrichia と呼ばれる原繊維が放射状に存在しており、赤い線はその向きを示している。野生型, *afl* 共に actinotrichia は正常に形成されていた (C, D)。E はさらに拡大した図であり、*afl* の actinotrichia が正常であることを示している。

**F-I:** BrdU の取り込みによる細胞増殖の比較。受精後 4 日目 (F, G) と 8 日目 (H, I) の結果を示す。緑の点が BrdU を取り込んだ細胞を示しており、野生型では両ステージにおいて鰭条の周りで活発に細胞が増殖している様子が観察された (F, H)。それに対し *afl* では両ステージ共、細胞の増殖が抑制されていた (G, I)。Scale bars = 250  $\mu\text{m}$  in A-D, F-I; 150  $\mu\text{m}$  in E.

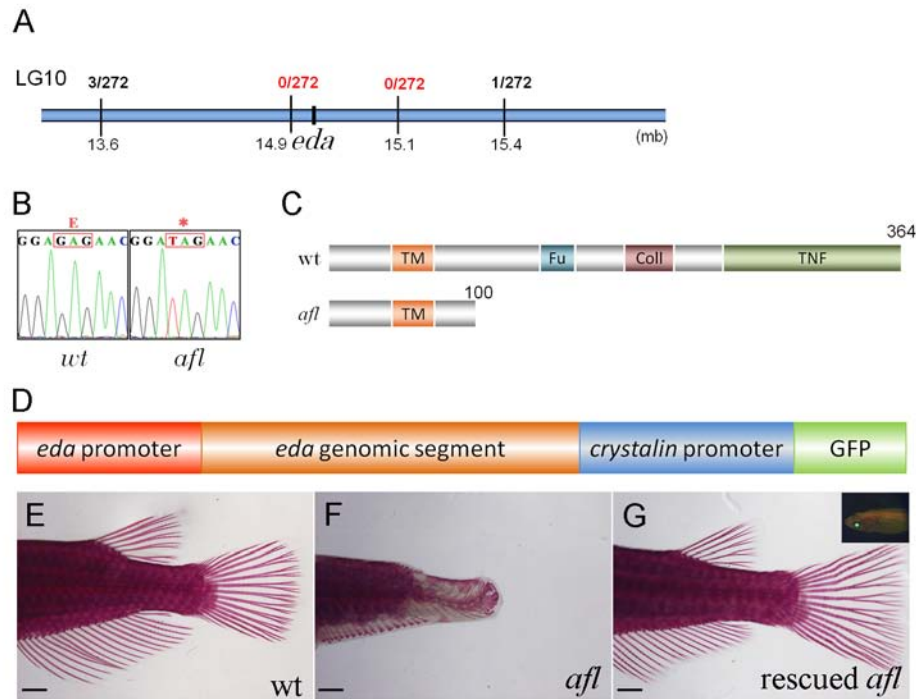


図 3.4. *afl* はメダカ *eda* 遺伝子を欠損している

**A:** ポジショナルクローニングによる *afl* 原因遺伝子の探索。 *afl* の変異は 10 番染色体上の 1.5-cM の領域に存在することが確認された。上段の数字は組み換え体数、下段の数字は染色体上の位置を示す。

**B:** *eda* 遺伝子のシーケンス結果。 *afl* では G から T への核酸変換が起き、その結果グルタミン酸が終止コドンに変化していた。

**C:** Eda タンパク質の構造の模式図。 Eda タンパク質は 364 アミノ酸からなり、TM は膜貫通ドメイン、Fu はフューリンプロテアーゼ認識配列、Coll はコラーゲンドメイン、TNF は TNF ドメインを示す。 *afl* の Eda タンパク質は 101 番目のアミノ酸が終止コドンに変化していた。

**D-G:** DNA 導入によるレスキュー実験。レスキューコンストラクトの模式図を示す (D)。受精後 2 ヶ月の野生型 (E) と *afl* (F) とレスキューコンストラクトがゲノムに挿入された *afl* (G) を比較すると、表現型が完全に回復していた。G の右上の写真は、コンストラクトがゲノムに挿入されたことを確認するための、*crystalin*-GFP による眼での GFP の発現を示す。

Scale bars = 1 mm.

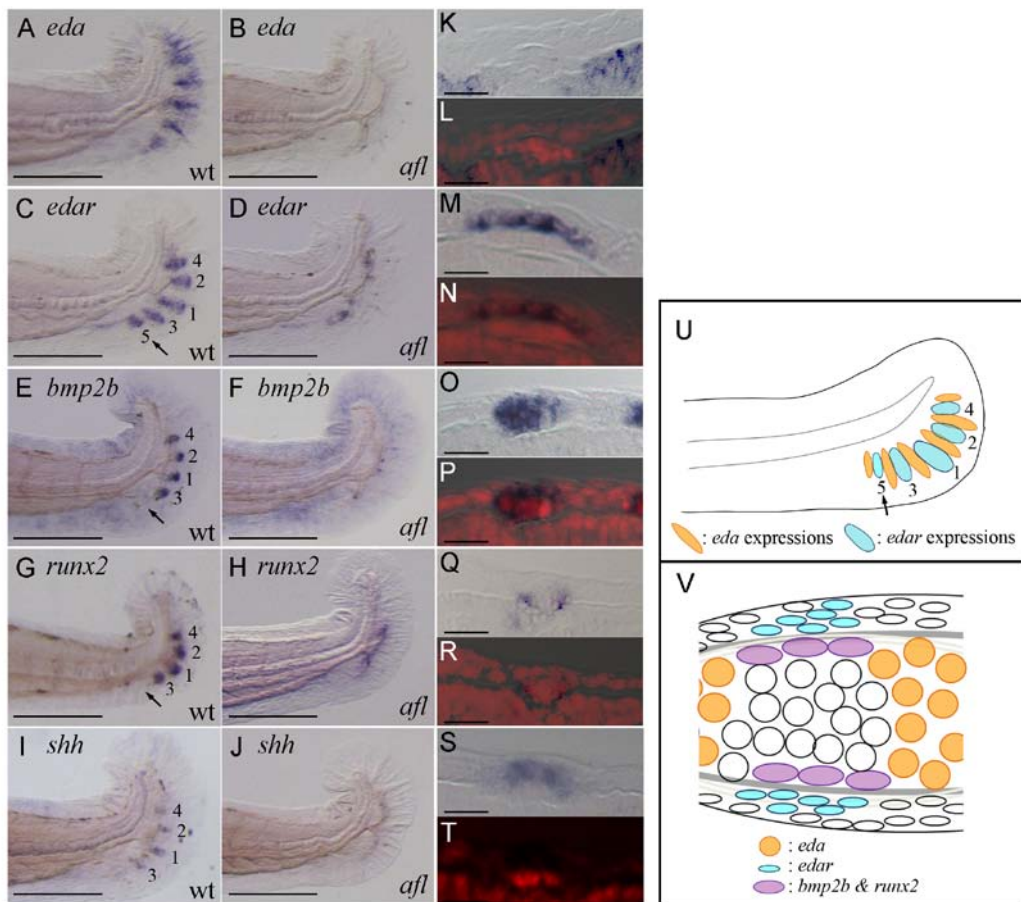


図 3.5. 尾鰭での *eda*, *edar*, *bmp2b*, *runx2*, *shh* の発現解析

**A-J, U:** Whole-mount RNA *in situ* hybridization による発現パターンの比較。野生型では *eda* (A) は鰭条と鰭条の間で、*edar* (C) は鰭条の位置と似たパターンで発現しており、比較するとその発現パターンは交互になっていた (U)。*afl* では *eda* は発現せず (B)、*edar* は野生型とは異なるパターンで発現した(D)。 *bmp2b* と *runx2* は野生型では、*edar* の発現と同様に鰭条と似たパターンで発現したが、5 の位置では発現していなかった (E, G, U, 矢印)。 *afl* ではこれらの発現は減少していた (F, H)。 *shh* は野生型では *edar* と同様に鰭条と似たパターンで発現したが (I)、*afl* では消失していた (J)。

**K-T, V:** 野生型の発現に対して垂直な断面図。赤い染色像は PI による核染色を示す。A, C, E, G, I のそれぞれの発現に対して垂直な切片を作製した結果を V の模式図に示した。 *eda* は間葉系細胞で、*edar* と *shh* は凝集した細胞群に隣接する上皮細胞で、*bmp2b* と *runx2* は凝集した細胞群の周りで発現していた (V)。 Scale bars = 200  $\mu$ m in A-J; 20  $\mu$ m in K-T.

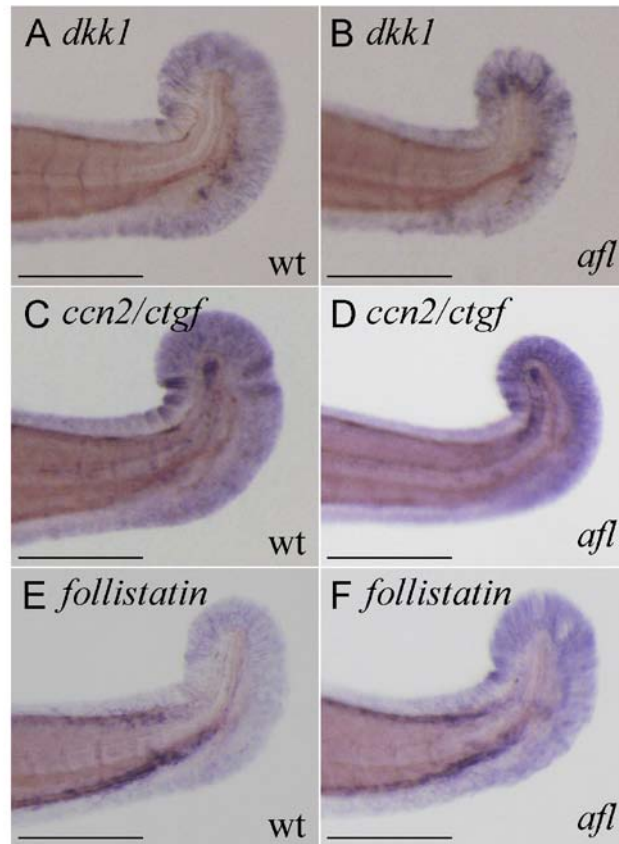


図 3.6. 尾鰭での *dkk1*, *ccn2/ctgf*, *follistatin* の発現解析

**A-F:** Whole-mount RNA *in situ* hybridization による発現パターンの比較。*dkk1* は鰭条と似たパターンで (A)、*ccn2/ctgf* は体幹の後端部で (C)、*follistatin* は体幹の上下で (E)、それぞれ発現が観察された。*afl* でも同様の発現パターンが観察された (B, D, F)。Scale bars = 200  $\mu$ m.

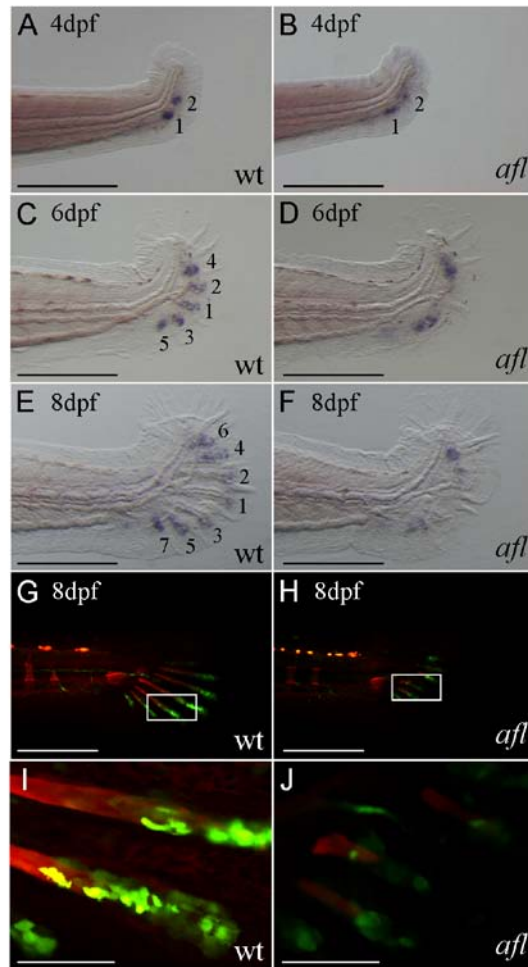
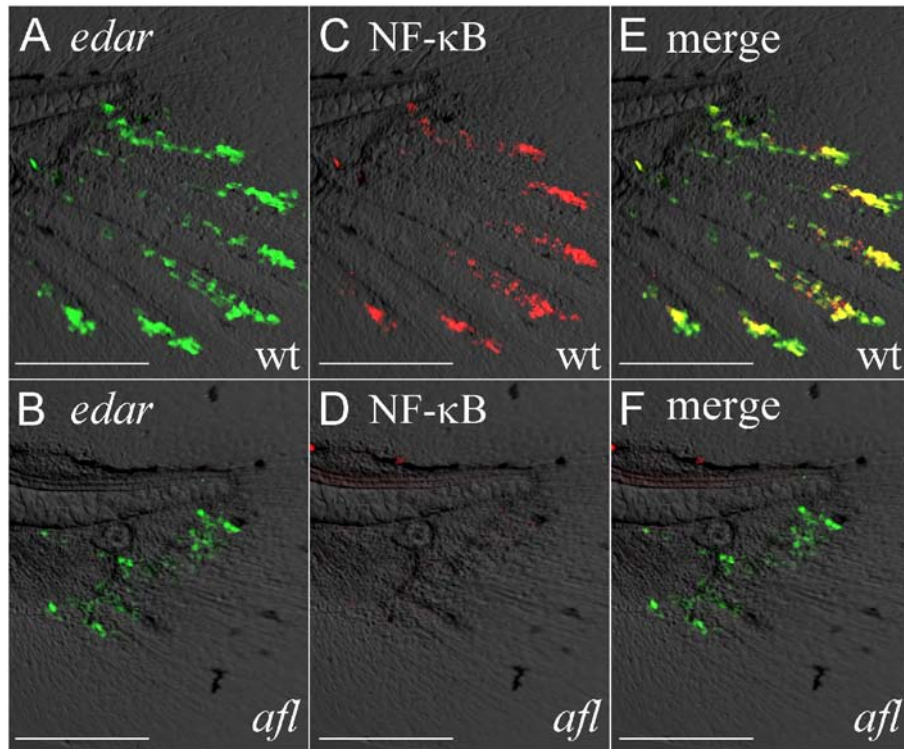


図 3.7. *edar* の発現は鰭条の石灰化に先行している

**A-F:** Whole-mount RNA *in situ* hybridization による *edar* の発現パターンの経時変化。野生型では、4dpf で1と2の位置で発現し (A)、その後6dpf では3から5 (C)、8dpf では6から7 (E)、と発現箇所が増えていく。このとき、発現部位が基部から先端へと移っている様子が観察された (E)。それに対し *afl* では、4dpf では1と2の位置で発現しているが (B)、その後6dpf、8dpf ではその発現が基部で凝集し、野生型のように何番の鰭条の位置で発現しているかはわからない状態になっていた (D, F)。

**G-J:** *edar*-EGFP トランスジェニックメダカを用いた *in vivo* イメージング。*edar*-EGFP トランスジェニックメダカの鰭条を Alizarin complexone で赤くラベルして観察した。野生型, *afl* どちらにおいても鰭条の先端部で EGFP の発現が観察された (G, H)。白いボックスを拡大した図を I, J に示す。Scale bars = 200  $\mu$ m in A-H and 50  $\mu$ m in I, J.



### 図 3.8. Eda/Edar シグナルは NF-κB を活性化する

*edar*-EGFP トランスジェニックメダカを用いた、抗 GFP 抗体と抗 NF-κB 抗体の染色図。

**A, B:** *edar*-EGFP トランスジェニックメダカに対して抗 GFP 抗体で染色した。野生型では鰭条の先端部で発現が見られ (A)、*afl* では基部で発現が観察された (B)。

**C, D:** 同じ個体に対して、抗 NF-κB 抗体で染色した。野生型では鰭条の先端部で発現が見られ (C)、*afl* では発現が見られなかった (D)。

**E, F:** 両染色像を重ね合わせた画像。野生型では GFP と NF-κB の発現箇所が重なっていた (E)。Scale bars = 100 μm.

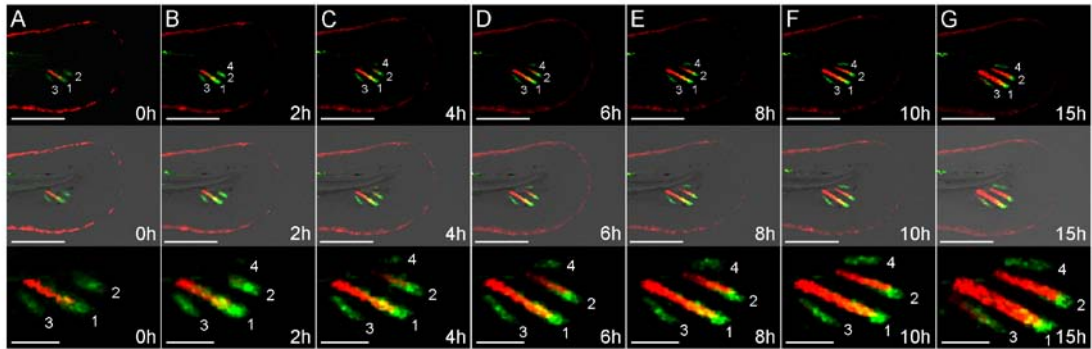


図 3.9. *edar* の発現は *osterix* の発現に先行している

**A-G:** *edar*-EGFP & *osterix*-DsRed ダブルトランスジェニックメダカの *in vivo* イメージング。イメージング開始を 0h とし(A)、その後 2, 4, 6, 8, 10 時間後に観察をし(B-F)、計 15 時間撮影を行った(G)。上段は蛍光写真、中段は蛍光写真に明視野写真を重ねたもの、下段は発現部位を拡大した写真を示す。0h では、*edar* は鰭条 1, 2, 3 の位置で発現しており、*osterix* は鰭条 1 の位置でのみ発現している (A)。15 時間後、*edar* は鰭条 1, 2, 3, 4 の位置で発現し、*osterix* は鰭条 1, 2, 3 の位置で発現している (G)。鰭条 1 では、*edar* は常に *osterix* の発現より先端部に位置していることがわかる。鰭条 2 に着目すると、0h での *edar* の発現が 2h で強くなり、4h で少し位置が変わると *osterix* の発現が始まる。さらに 6-15h にかけて、*edar* は常に *osterix* より先端に位置しながら、鰭条伸長方向へ移動していく。Scale bars = 200  $\mu$ m in upper and middle views, and 50  $\mu$ m in lower views.

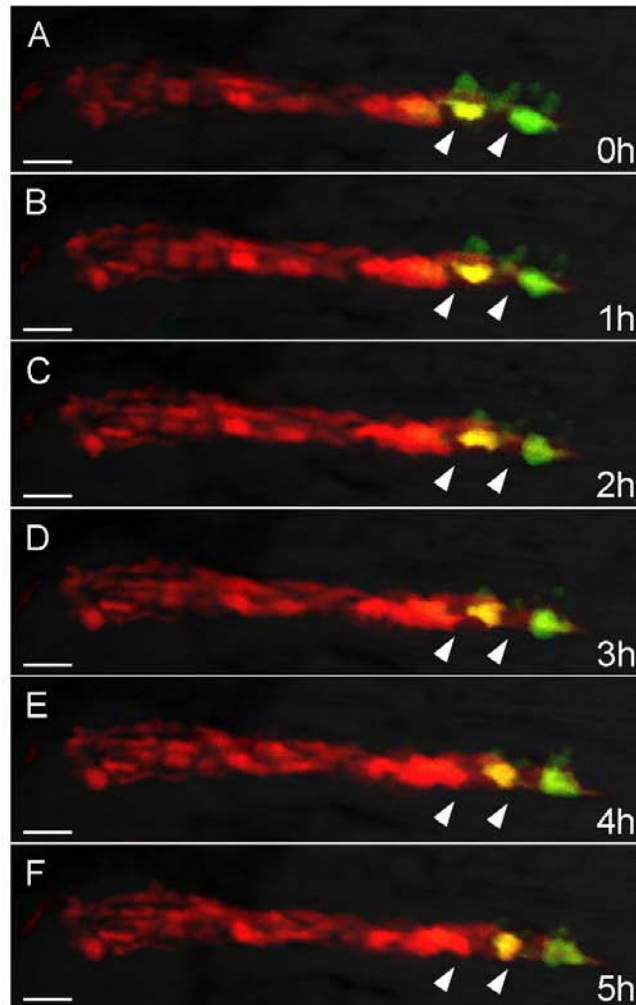


図 3.10. *edar* 発現細胞は鰭条伸長方向に遊走する

**A-F:** *edar*-EGFP & *osterix*-DsRed ダブルトランスジェニックメダカの *in vivo* イメージング。イメージング開始から 2 分間隔で 5 時間、共焦点顕微鏡下で撮影した写真のうち、1, 2, 3, 4, 5 時間後に撮影されたものを示した。白矢頭は 0 h で観察された 2 つの *edar* 発現細胞の位置を示している。時間の経過に伴い、2 つの細胞が先端方向に移動していく様子が観察された。撮影された全ての写真をつなぎあわせて動画にしたものを Movie 1 で示した。Scale bars = 5  $\mu\text{m}$ .

## 4. 考察

本研究で我々は、*afl* 変異体が *eda* にナンセンス変異を持ち、鰭条、頭蓋骨、歯、鱗などの外骨格に異常を示すことを明らかにした。これにより外骨格の形成に共通する *Eda* シグナルの存在を明らかにした。*Eda* はレセプター *Edar* と特異的に結合して *Eda* シグナルを下流に伝えるため、*Eda* と *Edar* のどちらに変異があっても同様の表現型を示す。先行研究ではトランスポゾン様配列の挿入による *edar* メダカ変異体 *rs-3* が報告されている。メダカ *rs-3* 変異体は大部分の鱗が消失するという表現型により同定され、その後咽頭歯と顎歯の数が減少するという表現型も報告されている (Kondo et al., 2001; Atukorala et al., 2011)。このような鱗と歯に見られる表現型は *afl* 変異体とよく似ている。しかし、鰭に関しては、*rs-3* 変異体では尾鰭が少し曲がっているのみで、*afl* 変異体のように鰭が消失するような表現型は見られていない。また、ゼブラフィッシュでは変異の位置や種類によっていくつかの *edar* 変異体が報告されている (Harris et al., 2008)。すべての機能ドメインを欠いた変異体では咽頭歯の消失、鱗や鰭の消失が観察された。また、C 末端付近のアミノ酸変化によるミスセンス変異を持つ変異体では、咽頭歯や鱗の消失は見られたものの鰭の異常は観察されなかった。ミスセンス変異体では、正常な *edar* タンパク質が少量ながら産出されており、鰭の形成には十分な量であった可能性があることを示唆している。このことから、メダカ *rs-3* 変異体では変異にも拘わらず少量の *edar* タンパク質が産出され、鰭条の形成に寄与していると考えられる。本研究で用いた *afl* 変異体では、その変異の位置により *Eda* の膜貫通ドメイン以外のドメインが翻訳されず、また NF- $\kappa$ B のリン酸化が起こらないという結果から、*Eda* の機能が完全に消失した変異体であると言える。

尾鰭の発現解析から、*eda* が間葉系細胞で、*edar* が上皮細胞で発現していることが明らかになった。また、凝集した細胞群の周囲では *bmp2b* と *runx2* が発現していたことから、こ

の細胞群は骨芽前駆細胞であることが示唆される。間葉系細胞が骨芽細胞へと分化する過程で、まず間葉系細胞が凝集して骨芽前駆細胞へと分化することが知られており、この時骨芽前駆細胞で *runx2* が発現することが知られている。また、この *runx2* の発現には *bmp2* の発現が必須であることが報告されている (Ducy et al., 1997; Stricker et al., 2002)。このことから、鰭条形成中に見られた *bmp2b* と *runx2* の発現は間葉系細胞の凝集と骨芽前駆細胞への分化に関与していると考えられる。これまでの *in vitro* の研究により、Eda はフェーリンプロテアーゼによって切断されて細胞外に放出されて Edar と結合することが知られている (Elomaa et al., 2001; Schneider et al., 2001)。本研究と照らし合わせると、鰭条形成において、間葉系細胞で発現した Eda がタンパク的切断を受けて上皮細胞で発現する Edar と結合し隣接する骨芽前駆細胞になんらかの作用を及ぼすと考えることができる。*afl* 変異体でも *bmp2b* と *runx2* の発現、間葉系細胞の凝集が見られることから、Eda シグナルは骨芽細胞分化には直接関与していないと言える。

*edar* の発現解析から、鰭条の形成開始位置は *edar* の上皮細胞での発現によって決まり、この発現は *eda* とは独立していることが明らかになった。これは、*afl* 変異体が *eda* を完全に欠損しているにも拘わらず、*edar* の最初の発現パターンが正常であり、また鰭条の形成開始位置も正常であることから証明された。しかし、*afl* 変異体ではその後の鰭条形成が正常に起こらない。このことから鰭条の形成に、*eda* と *edar* の相互作用による *edar* 発現細胞の遊走が必須であることが明らかになった。*edar*-EGFP トランスジェニックメダカの解析により、*edar* 発現細胞が *osterix* の発現に先行して鰭条の形成位置と伸長方向を決定しながら遊走していく様子が観察された。*afl* 変異体ではこの遊走が起こらないために、鰭条が伸長せず短いまま根元に留まると考えられる。さらに、発現解析により、*afl* 変異体で *shh* の発現が消失していることから、この細胞遊走に *shh* が関与している可能性が示唆された。ショウジョウバエを用いた先行研究により、生殖細胞の遊走に Hedgehog シグナルが必須であることが示唆されている。またマウスを用いた先行研究では Eda シグナルの下流の転写因子

が *shh* であることを示している (Deshpande et al., 2001)。さらにゼブラフィッシュの鰭再生研究において *shh* が細胞増殖を制御することが示されている (Quint et al., 2002)。これは再生中の鰭に Hedgehog シグナルの阻害剤を作用させると間葉系細胞の増殖能が低下するというものである。*afl* 変異体において、細胞増殖が減少していることから *shh* が Eda シグナルのターゲット因子である可能性が示唆される。

以上の結果と考察を踏まえて、Eda シグナルが関与する鰭条形成について、我々の考える新たな形成機構を仮説として提案する。メダカの鰭条形成は *eda* と *edar* の独立した発現によって始まる。*eda* が間葉系細胞で、*edar* が上皮細胞で、それぞれ独立した機構により発現を開始すると、*edar* 発現細胞を感知する機構により *bmp2b* が誘導され、さらに *runx2* が発現すると、*edar* 発現細胞に隣接した間葉系細胞の凝集が始まる。凝集した間葉系細胞は骨芽前駆細胞へと分化し、後に鰭条を形成する。*edar* 発現細胞内では、*eda* の結合により下流の NF- $\kappa$ B がリン酸化され、核内でターゲットとなる転写因子の転写が始まる。すると、下流の転写因子は細胞外に分泌され、骨芽前駆細胞となる間葉系細胞に対して増殖シグナルを与え、自身の細胞遊走を促す。そして鰭条の伸長方向に遊走しながら、遊走した位置でまた *bmp2b* の発現を誘導し、一連のシグナル伝達を繰り返しながら徐々に鰭条を形成していく。*afl* 変異体では、*eda* の発現とは独立した機構で発現の決まる *edar* の発現により、鰭条の形成位置が決定される。この *edar* の発現により *bmp2b* と *runx2* の発現が誘導されて、間葉系細胞の凝集と骨芽前駆細胞への分化が誘導される。しかし、*eda* が *edar* に結合しないために、下流の NF- $\kappa$ B が活性化せず、さらに下流の転写因子も活性化しない。これにより、間葉系細胞の増殖は止まり、*edar* 発現細胞は遊走しない。その結果、鰭条は伸長せず、短い骨が形成されるのみで鰭条の成長が止まることになる。

## 5. 参考文献

- Atukorala ADS, Inohaya K, Baba O, Tabata MJ, Ratnayake RARK, Abduweli D, Kasugai S, Mitani H, Takano Y. 2011. Scale and tooth phenotypes in medaka with a mutated ectodysplasin-A receptor: implications for the evolutionary origin of oral and pharyngeal teeth. *Archives of Histology and Cytology* 73:139-148.
- Bayés M, Hartung AJ, Ezer S, Pispá J, Thesleff I, Srivastava AK, Kere J. 1998. The Anhidrotic Ectodermal Dysplasia Gene (EDA) Undergoes Alternative Splicing and Encodes Ectodysplasin-A with Deletion Mutations in Collagenous Repeats. *Human Molecular Genetics* 7:1661-1669.
- Crotwell PL, Mabee PM. 2007. Gene expression patterns underlying proximal–distal skeletal segmentation in late-stage zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Dynamics* 236:3111-3128.
- Cui C-Y, Durmowicz M, Ottolenghi C, Hashimoto T, Griggs B, Srivastava AK, Schlessinger D. 2003. Inducible mEDA-A1 transgene mediates sebaceous gland hyperplasia and differential formation of two types of mouse hair follicles. *Human Molecular Genetics* 12:2931-2940.
- Deshpande G, Swanhart L, Chiang P, Schedl P. 2001. Hedgehog Signaling in Germ Cell Migration. *Cell* 106:759-769.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell* 89:747-754.
- Elomaa O, Pulkkinen K, Hannelius U, Mikkola M, Saarialho-Kere U, Kere J. 2001. Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the EDAR protein. *Human Molecular Genetics* 10:953-962.
- Fliniaux I, Mikkola ML, Lefebvre S, Thesleff I. 2008. Identification of *dkk4* as a target of *Eda-A1/Edar* pathway reveals an unexpected role of ectodysplasin as inhibitor of Wnt signalling in ectodermal placodes. *Developmental Biology* 320:60-71.
- Gaide O, Schneider P. 2003. Permanent correction of an inherited ectodermal dysplasia with recombinant EDA. *Nature Medicine* 9:614-618.
- Harris MP, Rohner N, Schwarz H, Perathoner S, Konstantinidis P, Nüsslein-Volhard C. 2008. Zebrafish *eda* and *edar* Mutants Reveal Conserved and Ancestral Roles of Ectodysplasin Signaling in Vertebrates. *PLoS Genet* 4:e1000206.
- Hibiya K, Katsumoto T, Kondo T, Kitabayashi I, Kudo A. 2009. *Brpf1*, a subunit of the MOZ histone acetyl transferase complex, maintains expression of anterior and posterior

- Hox genes for proper patterning of craniofacial and caudal skeletons. *Developmental Biology* 329:176-190.
- Inohaya K, Yasumasu S, Ishimaru M, Ohyama A, Iuchi I, Yamagami K. 1995. Temporal and Spatial Patterns of Gene Expression for the Hatching Enzyme in the Teleost Embryo, *Oryzias latipes*. *Developmental Biology* 171:374-385.
- Inohaya K, Yasumasu S, Yasumasu I, Iuchi I, Yamagami K. 1999. Analysis of the origin and development of hatching gland cells by transplantation of the embryonic shield in the fish, *Oryzias latipes*. *Development, Growth & Differentiation* 41:557-566.
- Johnson SL, Weston JA. 1995. Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in Zebrafish fin regeneration. *Genetics* 141:1583-1595.
- Kimura T, Jindo T, Narita T, Naruse K, Kobayashi D, Shin-I T, Kitagawa T, Sakaguchi T, Mitani H, Shima A, Kohara Y, Takeda H. 2004. Large-scale isolation of ESTs from medaka embryos and its application to medaka developmental genetics. *Mechanisms of Development* 121:915-932.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. 1997. Targeted Disruption of *Cbfa1* Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell* 89:755-764.
- Kondo S, Kuwahara Y, Kondo M, Naruse K, Mitani H, Wakamatsu Y, Ozato K, Asakawa S, Shimizu N, Shima A. 2001. The medaka *rs-3* locus required for scale development encodes ectodysplasin-A receptor. *Current Biology* 11:1202-1206.
- Laforest L, Brown CW, Poleo G, Geraudie J, Tada M, Ekker M, Akimenko MA. 1998. Involvement of the sonic hedgehog, *patched 1* and *bmp2* genes in patterning of the zebrafish dermal fin rays. *Development* 125:4175-4184.
- Mikkola ML. 2008. TNF superfamily in skin appendage development. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 19:219-230.
- Mikkola ML. 2009. Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A* 149A:2031-2036.
- Mikkola ML, Thesleff I. 2003. Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14:211-224.
- Mou C, Jackson B, Schneider P, Overbeek PA, Headon DJ. 2006. Generation of the primary hair follicle pattern. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:9075-9080.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. 2002. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 108:17-29.

- Pummila M, Fliniaux I, Jaatinen R, James MJ, Laurikkala J, Schneider P, Thesleff I, Mikkola ML. 2007. Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. *Development* 134:117-125.
- Quint E, Smith A, Avaron F, Laforest L, Miles J, Gaffield W, Akimenko M-A. 2002. Bone patterning is altered in the regenerating zebrafish caudal fin after ectopic expression of sonic hedgehog and bmp2b or exposure to cyclopamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:8713-8718.
- Renn J, Winkler C. 2009. Osterix-mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation. *Developmental Dynamics* 238:241-248.
- Sasado T, Tanaka M, Kobayashi K, Sato T, Sakaizumi M, Naruse K. 2010. The National BioResource Project Medaka (NBRP Medaka): An Integrated Bioresource for Biological and Biomedical Sciences. *Experimental Animals* 59:13-23.
- Schmidt-Ullrich R, Aebischer T, Hülsken J, Birchmeier W, Klemm U, Scheidereit C. 2001. Requirement of NF- $\kappa$ B/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development* 128:3843-3853.
- Schmidt-Ullrich R, Tobin DJ, Lenhard D, Schneider P, Paus R, Scheidereit C. 2006. NF- $\kappa$ B transmits Eda A1/EdaR signalling to activate Shh and cyclin D1 expression, and controls post-initiation hair placode down growth. *Development* 133:1045-1057.
- Schneider P, Street SL, Gaide O, Hertig S, Tardivel A, Tschopp J, Runkel L, Alevizopoulos K, Ferguson BM, Zonana J. 2001. Mutations Leading to X-linked Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia Affect Three Major Functional Domains in the Tumor Necrosis Factor Family Member Ectodysplasin-A. *Journal of Biological Chemistry* 276:18819-18827.
- Smith A, Avaron F, Guay D, Padhi BK, Akimenko MA. 2006. Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblast differentiation and function. *Developmental Biology* 299:438-454.
- Srivastava AK, Durmowicz MC, Hartung AJ, Hudson J, Ouzts LV, Donovan DM, Cui C-Y, Schlessinger D. 2001. Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice. *Human Molecular Genetics* 10:2973-2981.
- Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S. 2002. Role of Runx Genes in Chondrocyte Differentiation. *Developmental Biology* 245:95-108.
- Tucker AS, Headon DJ, Schneider P, Ferguson BM, Overbeek P, Tschopp J, Sharpe PT. 2000. Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* 127:4691-4700.
- Urist M. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 12:150:893-899.

- Wells KL, Mou C, Headon DJ, Tucker AS. 2010. Recombinant EDA or Sonic Hedgehog rescue the branching defect in Ectodysplasin A pathway mutant salivary glands in vitro. *Developmental Dynamics* 239:2674-2684.
- Yan M, Wang L-C, Hymowitz SG, Schilbach S, Lee J, Goddard A, de Vos AM, Gao W-Q, Dixit VM. 2000. Two-Amino Acid Molecular Switch in an Epithelial Morphogen That Regulates Binding to Two Distinct Receptors. *Science* 290:523-527.

## 6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました工藤明教授に心から感謝致します。

技術的な御指導、御助言を頂きました川上厚志准教授に心から感謝致します。

トランスジェニックメダカの提供をはじめ多くの御協力と御助言を頂きました猪早敬二先生に深く感謝致します。

本研究を進めるために必要な実験技術を指導して下さいると共に、多くの御助言を与えて下さり、研究に対する真摯な姿勢をその身を持って教えて下さった日比谷健太さんに深く感謝致します。

この 6 年間を通して研究を含め様々な方面でお世話になりました工藤・川上研究室の諸先輩方、同期ならびに後輩の皆様に深く感謝致します。

最後に、今まで私の研究生活を支え、温かく見守ってくれた家族に心より感謝します。