

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16653

研究課題名(和文)四肢の骨格形態・形成に関与するZMAT2遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the ZMAT2 gene involved in skeletal morphogenesis and formation of limbs

研究代表者

鈴木 孝子 (Suzuki, Takako)

信州大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20813885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：zmat2ノックダウンゼブラフィッシュは背側化促進現象を示しbmpシグナルの抑制効果を示すこと、これらの現象はbmp2bの過剰発現によりレスキューされることを明らかにした。ゼブラフィッシュの胸ひれに着目し、解析を行った結果、ゼブラフィッシュ胚、稚魚及び幼魚の胸ひれ、頭部～顔面部において特異的な発現を示し、immunohistochemistryにおいても胸ひれや心臓に強い発現を示すことが明らかとなった。さらにZmat2ノックダウンゼブラフィッシュでは胸ひれに異常を示すことを見出した。zmat2は四肢骨格発生においてBMPシグナルに関連した重要な働きを示す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ZMAT2はアミノ酸レベルの相同性がヒトとマウスで100%、ヒトとゼブラフィッシュで91%と種を超えて極めて保存性が高い遺伝子である。つまりZMAT2はヒトの生命現象に重要な分子といえる。しかしながら我々の知る限り、ZMAT2遺伝子に関する過去の報告は皆無である。本事業によりZMAT2は骨格の形態形成に関連した遺伝子の1つである可能性が極めて高いことが示された。本事業の成果はヒトの正常な骨格発生・分化の更なる理解に加えて、将来的には骨系統疾患の病態解明に繋がると期待できる。

研究成果の概要(英文)：It has been clarified that zmat2 knockdown zebrafish showed dorsalized-promoting phenotypes and inhibitory effects on bmp signal, and that those phenotypes were rescued by overexpression of bmp2b. Focused on the pectoral fins and head regions in zebrafish, they showed specific expression patterns during zebrafish early development. Note that strong expression was observed in pectoral fins and heart by immunohistochemistry. In addition, pectoral fin abnormalities were observed in Zmat2 knockdown zebrafish. These findings suggest that zmat2 could play an important role in BMP signaling pathway during limb skeletal development.

研究分野：骨代謝

キーワード：遺伝子 骨代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨の発生は多分化能を有する未分化間葉系幹細胞が分化した軟骨原基を起源とし、軟骨細胞の分裂と基質産生に伴う軟骨の成長と内軟性骨化によって進行する(Kronenberg HM, Nature. 2003)。未分化間葉系細胞が骨芽細胞や軟骨細胞へ分化する過程で bone morphogenetic protein (BMP:骨形成タンパク質)が重要な役割を果たす。特に四肢の骨格パターン形成には肢芽形成の初期から骨格形成に至る全ての過程で多様な発現パターンを示す BMP シグナルが重要である (Pizette S. et al., Development. 2001)。BMP は四肢形成過程において、軟骨分化、指間アポトーシスの制御、肢芽の背腹軸形成、指の形態形成など多岐にわたって関与する(Weston AD. et al., J Cell Biol. 2000)。しかしながら、肢芽分化誘導メカニズムの全貌は未だ明らかではない。先天性橈尺骨癒合症 (RUS) の患者の血液から RUS 孤発例に対して全エクソン解析を行い病的変異の強い遺伝子群を同定し新規同定した遺伝子が zinc finger matrin-type 2 (ZMAT2) である。ZMAT2 はアミノ酸レベルの相同性が ヒトとマウスで 100%、ヒトとゼブラフィッシュで 91% と種を超えて極めて保存性が高い遺伝子である。つまり ZMAT2 はヒトの生命現象に重要な分子といえる。しかしながら我々の知る限り、ZMAT2 遺伝子に関する過去の報告は皆無である。

### 2. 研究の目的

四肢の骨格パターン形成には肢芽で領域特異的に発現する BMP シグナルが重要である。ZMAT2 はアミノ酸レベルの相同性が ヒトとマウスで 100%、ヒトとゼブラフィッシュで 91% と種を超えて極めて保存性が高い遺伝子である。つまり ZMAT2 はヒトの生命現象に重要な分子といえる。しかしながら我々の知る限り、ZMAT2 遺伝子に関する過去の報告は皆無である。以上より、ZMAT2 は骨格の形態形成に関連した遺伝子の 1 つである可能性が極めて高い。本研究では、四肢の骨格発生・分化過程における ZMAT2 遺伝子の分子メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) Real-time PCR を用いて *zmat2* の mRNA 量をゼブラフィッシュの 0 hpf, 3 hpf, 6 hpf, 12 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf, 96 hpf, 120 hpf, and 144 hpf を測定した。また Western blotting 法を用いて *Zmat2* のタンパク発現量をゼブラフィッシュの 6 hpf, 12 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 96 hpf, and 7 dpf を解析した。

(2) ゼブラフィッシュ *zmat2* 野生型全長遺伝子クローニング、whole-mount *in situ* hybridization 特異的なプローブの作成を行った。

(3) アンチセンスオリゴであるモルフォリノ (MO) 2 種類以上を用いて、遺伝子ノックダウンを行った。さらに *zmat2* ノックアウトゼブラフィッシュの解析・卵へのマイクロインジェクション後、ヒレ(ヒト四肢に相当)の初期発生期を中心に特に骨格発生における表現系を観察する。生後 5 - 10 日ゼブラフィッシュを用いアルシヤンブルー染色、アリザリンレッド染色を行い、骨格の評価を行う。

(4) *Zmat2* ノックアウトマウスの作製と解析

CRISPR/Cas9 システムを用い、*Zmat2* ノックアウトマウスを作製(すでに F0 まで作製済)する。また F0 はモザイクマウスである可能性が高いため、F2 まで継代し、解析に用いる。

### 4. 研究成果

(1) Real-time PCR を用いたゼブラフィッシュにおける *zmat2* の mRNA 量は全体を通して発現をしていたが、0 hpf での発現量が最も高かった(図 1)。また Western blotting 法を用いた *Zmat2* のタンパク発現量は初期段階から発現を示し、24 hpf での発現量が高いことが明らかとなった。

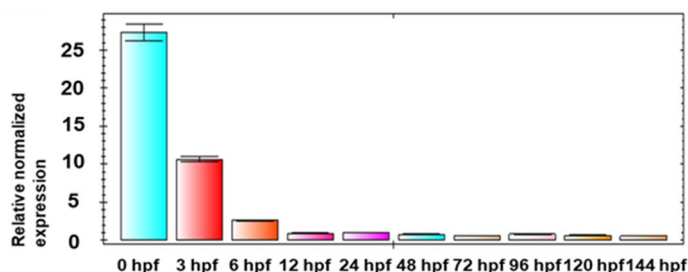


図1 ゼブラフィッシュにおける *zmat2* 遺伝子の mRNA 発現量

(2) whole-mount *in situ* hybridization 法によりゼブラフィッシュ稚魚の胸ひれ、頭部～顔面部において特異的な発現を示し、immunohistochemistry においても胸ひれや心臓に強い発現を示すことが明らかとなった(図2)。



図2 ゼブラフィッシュにおける zmat2 遺伝子の immunohistochemistry

(3) zmat2 ノックアウトゼブラフィッシュの解析を行った結果、Zmat2 ノックダウンゼブラフィッシュでは胸ひれに異常を示し、背側化促進現象、つまり bmp シグナルの抑制効果を示した(図3)。また ZMAT2 ノックダウンゼブラフィッシュは野生型 zmat2 の過剰発現によりレスキューされ、さらに ZMAT2 のモルフォリノ(MO)に bmp2b を co-injection しレスキュー実験を行った結果、大部分がレスキューされることが示された(図4)。



図3: zmat2 遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュの表現型 Zmat2 の機能喪失が bmp の抑制効果(背側化促進現象)を示した。正常の背腹軸形成に zmat2 が関与する可能性が示唆された。

生後 5 - 10 日ゼブラフィッシュを用いアルシャンブルー染色、アリザリンレッド染色を行い、骨格の評価を行った。その結果、生後 6 日 ZMAT2 ノックダウンゼブラフィッシュにおいて胸ひれに異常を示した (11 of 13 morphants; 84.6%)。さらにそれらは野生型 zmat2 及び bmp2b の co-injection によりレスキューされることが明らかとなった(図5)。ゼブラフィッシュの四肢発生、形成は、主に hox 遺伝子群によりパターン形成される。特に肢芽では bmp ファミリーの分泌タンパク質などが誘導因子として作用する。bmp は fgf, shh, wnt の機能分子と協調して四肢の骨格発生・分化の全ての場面に関与している。そこで、本研究において bmp シグナルの下流に存在する smad1/5/9 の発現を zmat2 ノックダウンゼブラフィッシュにおいて解析をしたところ、抑制されることが明らかとなった。またこれらの発現は bmp2b の過剰発現によりレスキューされることも明らかにした。さらに smad1/5/9 の発現は zmat2 ノックダウンゼブラフィッシュに zmat2 を co-injection した際には発現がレスキューされるが、zmat2 の遺伝子の一部に変異を起こさせた zmat2 変異遺伝子(MT)ではレスキューされず、抑制されたままであることも明らかとなった。

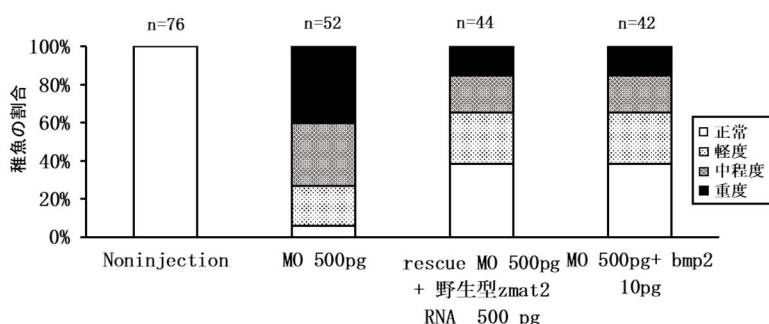


図4: モルフォリノ(MO)による zmat2 遺伝子ノックダウンとレスキュー実験 MO注射に伴うbmp抑制効果は、野生型bmp2bの共注射により、表現型のレスキューが確認できた。内因性 zmat2 遺伝子の機能を bmp シグナルが制御している可能性が示唆された。

図5: MOsを injectionし、生後6日後のゼブラフィッシュの発生様子を解析した。a: WT (a), b: morphant, c: MOsを wild-type zmat2 RNAでレスキューした。

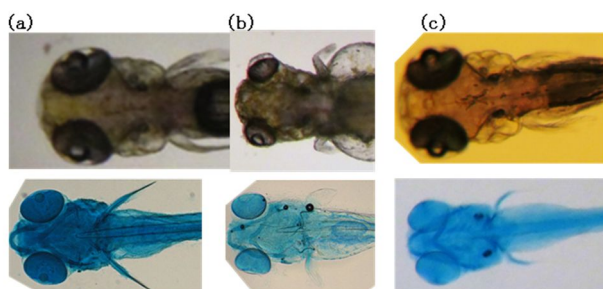


図5: MOsを injectionし、生後6日後のゼブラフィッシュの発生様子を解析した。a: WT (a), b: morphant, c: MOsを wild-type zmat2 RNAでレスキューした。

(4) 遺伝子改変マウスに関する研究を遂行した。CRISPR/Cas9システムを用い、Zmat2 遺伝子ノックアウトマウスの作製及び維持を行った。現在までF3まで世代を維持している

が、ノックアウトホモタイプは胎生致死のためライン化の成功に至っていない。妊娠マウスを用いて胎生致死の状況を調べたところ、E13.5の段階でも胎児は見られず血腫様であった。Zmat2遺伝子ノックアウトマウスは原因不明だが胎生致死を起こすことから、ZMAT2はヒトの生命現象に重要な分子であることが明らかとなった。今後、ノックアウトマウスの解析については引き続き遂行していく必要がある。

以上の結果から zmat2 は四肢骨格発生において BMP シグナルに関連した重要な働きを示す可能性が示唆

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki T, Nakano M, Komatsu M, Takahashi J, Kato H, Nakamura Y.	4. 巻 136
2. 論文標題 ZMAT2, a newly-identified potential disease-causing gene in congenital radioulnar synostosis, modulates BMP signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone.	6. 最初と最後の頁 115349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115349.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takako Suzuki, Yukio Nakamura, Tatsuya Kobayashi, Hiroyuki Kato.
2. 発表標題 Identification and Molecular Analysis of a Potential Disease-causing Mutation in ZMAT2 in Congenital Radioulnar Synostosis.
3. 学会等名 Mechanistic and Therapeutic Advances in Rare Skeletal Diseases 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takako Suzuki, Yukio Nakamura, Tatsuya Kobayashi, Hiroyuki Kato.
2. 発表標題 Identification and Molecular Analysis of a Potential Disease-causing Mutation in ZMAT2 in Congenital Radioulnar Synostosis.
3. 学会等名 米国骨代謝学会 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 孝子, 中野 真樹, 中村 幸男
2. 発表標題 先天性橈尺骨癒合症の新規原因遺伝子ZMAT2の同定と機能解析
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計2件

国際研究集会 Mechanistic and Therapeutic Advances in Rare Skeletal Diseases 2018	開催年 2018年～2018年
国際研究集会 米国骨代謝学会 2018	開催年 2018年～2018年

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------