

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15387

研究課題名(和文) マウスの指を場としたHox遺伝子の発現転写機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of digit development by transcription factors

研究代表者

森 雅樹 (Mori, Masaki)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・特任准教授

研究者番号：10602625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物の形態を決定する分子機構には未解明な点が多い。指の発生は、生命科学の黎明期からの研究対象であるが、その機序には諸説あり結論が出ていない。指の形態形成では、位置情報やパターンニング・シグナルを付与する数々の遺伝子が重要な役割を果たす。本研究では、指の形態形成を司るホメオチック遺伝子および新規転写因子による指の形態形成機構を解析した。その成果として、指の形態形成を制御する重要な転写因子Hesr1/2およびIrx3を新規に同定した。

研究成果の概要(英文)：Limb bud patterning, outgrowth, and differentiation are precisely regulated in a spatio-temporal manner through integrated networks of transcription factors, signaling molecules, and downstream genes. However, the exact mechanisms that orchestrate morphogenesis of the limb remain to be elucidated. We focused our expression pattern analysis on a selection of transcription factor genes that exhibit spatially localized and temporally dynamic expression patterns with respect to the anterior-posterior axis in the E9.5-11.5 limb bud. In this project, we identified Hesr1/2 and Irx3 as the key genes that regulate the digit development.

研究分野：小児科学

キーワード：形態形成 指芽発生 パターンニング 転写因子 遺伝子ネットワーク 発生学

1. 研究開始当初の背景

(1) 形態形成モデルとしての指発生

指芽発生は、種々の形態形成のモデルとして重要な位置を占めるが、その分子メカニズムには未解明な点が多い。形態形成の仕組みの解明は、再生医療の実現や病態理解のために重要な意義を有する。指の発生(指芽発生)は、発生学の古典的モデルとして深く研究されており、「形態形成がどのような分子機構で起こるか」という学問の基礎を成してきた(引用文献 1)。マウスでは胎生期 10.5 日(E10.5)に四肢原基の先端部分が外胚葉性頂堤(apical ectodermal ridge, 以下 AER)として特殊化される。AER は極性化活性帯(zone of polarizing activity, 以下 ZPA)と協調し、FGF や sonic hedgehog (Shh) などのパラクライン因子が仲介分子となり指芽発生を進行させる。しかし、遺伝子ネットワークレベルでの分子機構の全貌は明らかになっていない。

(2) 転写因子による指芽発生制御

生命の形を作る仕組みは未解明な点が多い。指の形態形成は長年の研究対象となってきたが、これを司るメカニズムのモデルには諸論あり結論が出ていない。指の形態形成では、位置情報を付与するホメオチック遺伝子(Hox 遺伝子)が四肢のセグメント化を司り、Hox の最後端である Hoxa13 と Hoxd13 によって四肢最遠端である自脚領域と指の本数が決定される。Hox 遺伝子の前方から後方優位の発現への翻転現象は、体の各部位の最終形態を決める仕組みとして重要である。しかし、その分子機構は理解されておらず、Hoxa13 と Hoxd13 がどのような分子によって制御されているのかわかっていない。

(3) 抗体の質に左右されない分子解析のための技術革新

タグ配列を遺伝子座に挿入することにより、「抗体が無い」という実験的事情を解消する。抗体を用いた解析は、分子の機能を明らかにするうえで欠かせないものであり、実験目的に適した抗体の存在が研究の進行を大きく左右することは一般的に認められる。その問題を解決するために、我々は CRISPR-Cas9 法を用いて、対象遺伝子の遺伝子座に Flag タグ配列を挿入することを考えた。これが成功すれば、過剰発現をすることなく、タグを用いて内在性の蛋白の解析ができる。この原理は他の全ての遺伝子に適用でき、良い抗体が無いというマテリアルの事情で進んでいない多くの研究が前進する可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 指芽発生においてホメオチック遺伝子の発現を司る転写遺伝子の同定

転写因子発現データベース Embryos を用い、指芽発生に関わる転写因子を網羅同定し、

自脚形成において、ホメオチック遺伝子、特に Hoxa13 と Hoxd13 の発現を制御する転写因子を同定する。

(2) タグ配列のノックインマウス系統の樹立

タグ配列をノックインしたマウス系統を樹立し、良い抗体が存在しないため機能解析が困難な分子についての評価技術基盤を整備する。

(3) 指芽発生を制御する新規転写因子の同定

転写因子発現データベース Embryos を用い、指芽発生に関わる転写因子を網羅同定し、自脚形成におけるパターンニングを制御する転写因子を新規同定する。

3. 研究の方法

(1) 指芽発生においてホメオチック遺伝子を制御する転写因子の同定

マウスにおいて指芽発生に際して特徴的な遺伝子発現パターンを呈する転写因子について、遺伝子変異マウスを入手・解析して指芽形成における表現型を解析する。Hoxa13 および Hoxd13 の変異マウスの表現型との比較、および当該遺伝子の変異マウスにおける Hoxa13 と Hoxd13 の発現を解析することにより、Hoxa13 および Hoxd13 を制御する可能性について明らかにする。

(2) タグ配列のノックインマウス系統の樹立

ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 法を用いて、マウス Hesr1 遺伝子座の開始コドン直下に Flag 配列をノックインする。F0 世代はキメラになり易いため、世代を経て全身性にトランスジーンを有するノックインマウス系統を樹立する。ノックインマウス系統の評価として、ゲノム DNA 配列、転写産物および蛋白質分子について解析し、対象遺伝子の詳細な機能解析の技術基盤を整備する。

(3) 指芽発生を制御する新規転写因子の同定

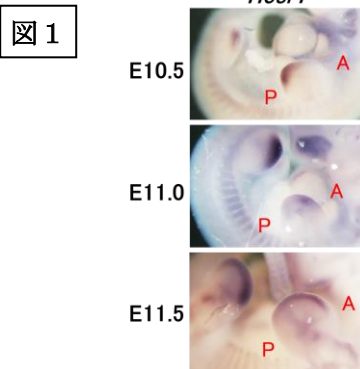
転写因子発現データベースを利用し、既報告からは想定されないような新規の転写因子を同定し、形態発生の分子機構の理解を深め、四肢奇形などの病態解明や新規治療法の開発に結び付ける。同定された転写因子については指芽発生のパターンニングにおいて中心的な役割を果たす Shh および Gli 遺伝子との機能的関係を検討する。さらに、同定された遺伝子についての機能解析を遺伝子改変マウス(トランスジェニックマウス)において施行する。

4. 研究成果

(1) 指芽発生においてホメオチック遺伝子の発現を司る転写遺伝子の同定

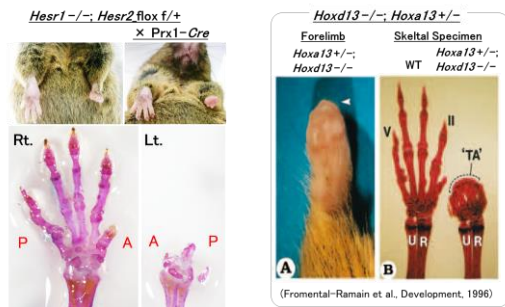
発生遺伝子データベース Embryos に基づき、

指芽の形態形成過程 (E10.5-E11.5) において特異的に発現する転写因子として、Hesr1 および Hesr2 を同定した (図 1)。



Hesr1 (*Hairy-enhancer-of-split related 1*) は、base helix-loop-helix 型の転写因子をコードする遺伝子である。重要なことに、Hesr1 および Hesr2 の変異は自脚の形成異常につながり、Hesr1 および Hesr2 遺伝子の二重変異マウスでは、浸透率は高くないが、自脚の形成不全を示す (図 2)。

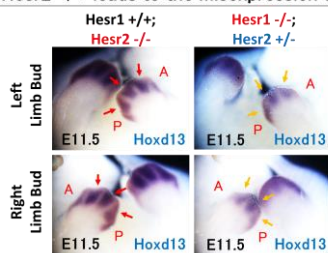
図 2 Hesr1 and Hesr2 mutation leads to autopod deficits.



この表現型は、自脚領域のパターニングを制御するホメオチック遺伝子 Hoxd13 および Hoxa13 の二重変異マウスと類似していた (図 2 右。引用文献 2)。

この知見は、転写因子 Hesr1/2 が Hoxa13/Hoxd13 の発現を制御している可能性を示唆した。その可能性を検証するために、Hesr1 および Hesr2 の変異マウスの発生中の指芽において in situ hybridization を施行した。その結果、Hesr1/2 の変異マウスでは Hoxd13 の発現パターンが異常を呈することがわかった (図 3)。

図 3 Hesr1-/-; Hesr2-/+ leads to the misexpression of Hoxd13.

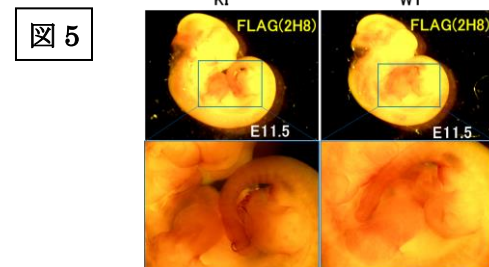
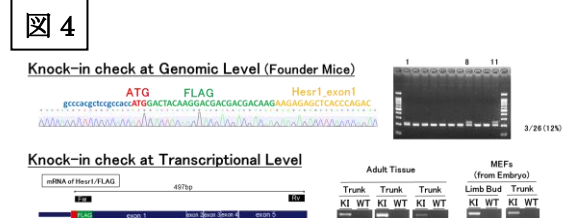


これらの結果は、転写因子 Hesr1/2 がホメオチック遺伝子の発現パターンニングを介して指芽発生の形態形成を制御している可能性を示唆した。

(2) タグ配列のノックインマウス系統の樹立

Hesr1/2 蛋白分子の検出に適した抗体がなく、Hesr1/2 蛋白分子の機能解析の妨げとなっていた。この課題を解決するため、ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 システムを用い、Hesr1 遺伝子座に Flag タグ配列をノックイン (以下 KI) されたマウス系統の樹立に取り組んだ。本系統の樹立に成功すれば、「良い抗体がないため進まない」生命科学研究所の課題を解決できる可能性がある。マウス受精卵に対する guideRNA、Cas9 mRNA、Flag 配列を含む鋳型 DNA のインジェクションを経て、Flag 配列を Hesr1 の開始コドン直下に KI することに成功した (図 4)。

この転写産物は mRNA レベル (図 4 下段) および蛋白質レベル (図 5) で検出された。



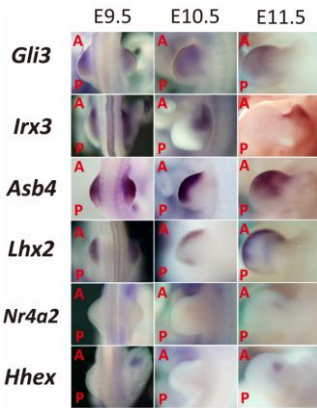
また、同マウスにおいて抗 Flag 抗体を用いて KI マウスから樹立された胎児線維芽細胞で Flag-Hesr1 遺伝子の発現を調べた結果、同方法によっても、同遺伝子が特異的に検出されることが判明した。このことから、本マウス系統により、良い抗体が存在しないためこれまで困難であった Hesr1 の生化学的解析が可能になると考えられた。またこのアプローチは原則的に全遺伝子に適用可能であり、抗体の質に依存しない分子解析への道が開かれた。

(3) 指芽発生の制御する新規転写因子の同定

Hesr1 と同様に自脚の形態形成に関わる転写因子として、Irx3 を同定した。転写因子データベース Embryos を用い、指芽において前後軸に沿って特徴的な発現パターンを示す遺伝子群に着眼した。Irx3 は発生中の指芽 E10.5-11.5 において前方に発現されるパターンニングを示した (図 6)。

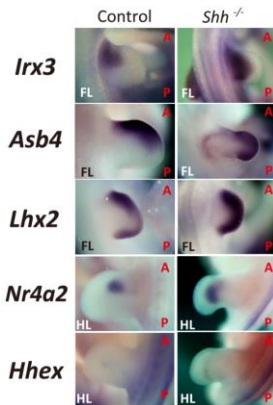
指芽発生のパターンニングを中心的に制御する Shh および Gli3 との機能的関係性を調

図 6



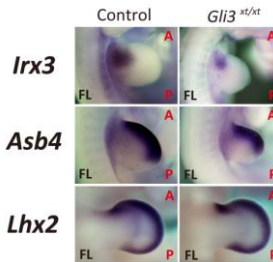
べるため、*Shh*、および *Gli3* のノックアウトマウス胚において *Irx3* の *in situ* hybridization を行った。その結果、*Irx3* の発現は、*Shh* ノックアウトマウスの指芽では後方に拡張した(図 7)。

図 7



さらに *Gli3* ノックアウトマウスの指芽では前方で減弱した(図 8)。

図 8



これらの結果は、指芽形態形成を制御する新規転写因子としての *Irx3* の役割を示唆するものであった。

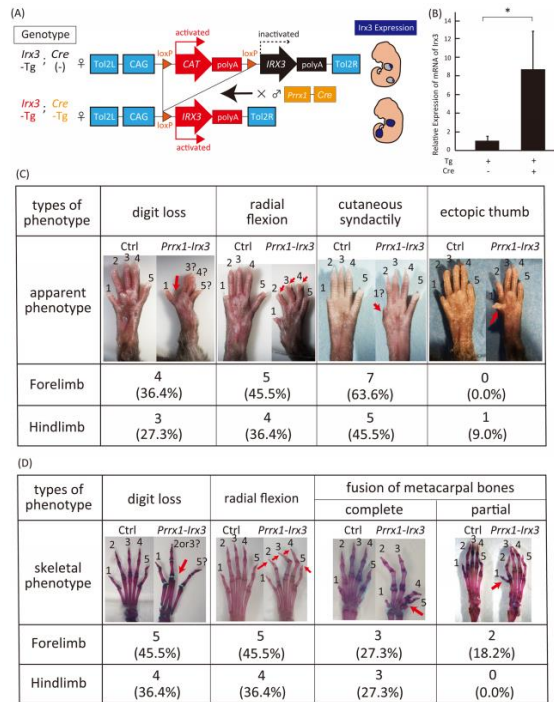
マウス個体において *Irx3* の機能を検証するため、*Prrx1* プロモータを用い、指芽特異的な *Irx3* トランスジェニックマウスを樹立し、*Irx3* の過剰発現の影響を検討した。その結果、同マウス系統は、指の欠損・機側偏移および中手骨癒合などの自脚形成異常を呈することがわかった(図 9, PLOS One, 2017 にて発表)。

以上のように、自脚形成における新規転写因子として *Irx3* を同定した。

本研究において、指芽形態形成の新規転写因子として *Hesr1* および *Irx3* を同定した。*Hesr1* は自脚領域の形成を規定する *Hoxa13* および *Hoxd13* の発現制御に関わっており、*Hesr1* および *Hesr2* の変異は *Hoxa13* および

hoxd13 の発現異常につながるばかりでなく、自脚の形成不全を引き起こす。また、*Irx3* は *Shh* および *Gli3* の制御下に挙動する新規転写因子であり、*Hesr1/2* と同様に自脚の形成に関わり、*Irx3* の過剰発現は自脚形成異常の原因となる。

図 9



<引用文献>

1. C. Tabin, L. Wolpert, Genes Dev. 21, 1433–42 (2007)
 2. C. Fromental-Ramain et al., Development, 122, 2997-3011 (1999)
5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計 5 件) すべて査読あり

1. Yokoyama S#, Furukawa S#, Kitada S#, Masaki Mori, Saito T, Kawakami K, Izpisua Belmonte JC, Kawakami Y, Ito Y, Sato T, Asahara H, Analysis of transcription factors expressed at the anterior mouse limb bud. (#, equally contributing authors) PLOS One, 2017, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175673>.
2. Hongpeng Guan, HongKuan Yang, Mingchun Yang, Daijiro Yanagisawa, Jean-Pierre Bellier, Masaki Mori, Shogo Takahata, Takashi Nonaka, Shiguang Zhao, Ikuo Tooyama. Mitochondrial Ferritin protects SH-SY5Y cells against H₂O₂-induced oxidative stress and modulates alpha-Synuclein expression. Experimental Neurology, 2017, Feb 03; 291:51–61, 2017

3. Masashi Naito, Masaki Mori, Inagawa M, Miyata K, Hashimoto N, Tanaka S, Asahara H. Dnmt3a Regulates Proliferation of Muscle Satellite Cells via p57Kip2. *PLOS Genetics*, 12(7):e1006167, 2016
4. Rho Nakamichi, Nakamichi R, Ito Y, Inui M, Onizuka N, Kayama T, Kataoka K, Suzuki H, Mori M, Inagawa M, Ichinose S, Lotz M, Sakai D, Masuda K, Ozaki T, Asahara H. Mohawk promotes the maintenance and regeneration of the outer annulus fibrosus of intervertebral discs. *Nature Communications*, 7:12503, 2016
5. Tomohiro Kayama, Masaki Mori, Yoshiaki Ito, Takahide Matsushima, Ryo Nakamichi, Hidetsugu Suzuki, Shizuko Ichinose, Mitsuru Saito, Keishi Marumo, Hiroshi Asahara. Gtf2ird1-dependent Mohawk (Mkx) expression regulates mechanosensing properties of tendon. *Molecular and Cellular Biology*, 36(8):1297-309, 2016

[学会発表] (計 19 件)

1. 森 雅樹、小児の特性を活用した小児難病治療研究とマウスにおける若年性遺伝子群の同定、第 120 回日本小児科学会、2017 年 4 月 14~16 日、東京
2. 森 雅樹、乾 雅史、小須賀 基通、奥山 虎之、CRISPR/Cas9 によるハンター症候群遺伝子変異を有するマウス系統樹立、第 120 回日本小児科学会、2017 年 4 月 14~16 日、東京
3. 森 雅樹、細胞競合における成長関連遺伝子の役割、第 6 回細胞競合コロキウム、口頭発表、2017 年 3 月 16-18 日、北海道大学遺伝子病制御研究所
4. 森 雅樹、小児難病の治療を目指した基礎医学研究への取り組み、第 48 回大阪小児先進医療研究会セミナー、2017 年 3 月 2 日、大阪
5. Masaki Mori, Therapeutic strategies for neurologic intractable diseases utilizing juvenile properties of children The 22nd MNRC international symposium, Oct 28th, 2016, 滋賀
6. 森 雅樹、細胞競合の哺乳類成長での役割と染色体異常症への治療応用、新学術領域研究 -細胞競合- 細胞社会を支える適者生存システム、第 4 回領域会議、口頭発表、2016 年 8 月 30-31 日、東京
7. 梅田勝比呂、西澤賢治、森 雅樹、水野大介、細胞周期と細胞力学、新学術領域研究 -細胞競合- 細胞社会を支える適者生存システム、第 4 回領域会議、2016 年 8 月 30 日、東京
8. 片岡健輔、中道亮、鈴木英嗣、内藤昌志、望月祐輔、幸田直己、森雅樹、篠原正浩、伊藤義晃、嘉山智大、「腱組織の恒常性維持と再生の分子メカニズムの解析」、第 2 回骨免疫学会、2016 年、沖縄
9. 古川聡一、森 雅樹、浅原弘嗣、指芽発生

- において転写因子 Hesr は重要な役割を果たす、第 5 回細胞競合コロキウム、口頭発表、2016 年 3 月 18-20 日、北海道
10. 宮嶋さなえ、森 雅樹、田中陽子、浅原弘嗣、マウス四肢長制御における DNA メチル化酵素 Dnmt3a/b の役割、第 5 回細胞競合コロキウム、口頭発表、2016 年 3 月 18-20 日、北海道
 11. Tomohiro Kayama, Masaki Mori, Yoshiaki Ito, Ryo Nakamichi, Takahide Matsushima, Shizuko Ichinose, Mitsuru Saito, Keishi Marumo, Hiroshi Asahara, Elucidating The Transcriptional Network of Mechanosensitive Tendon Master Gene Mohawk (Mkx). Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting, [Oral presentation], 2016 年 3 月 5-8 日, Orlando, Florida, USA. (The NIRA Award Winner)
 12. Tomohiro Kayama, Masaki Mori, Yoshiaki Ito, Ryo Nakamichi, Takahide Matsushima, Shizuko Ichinose, Mitsuru Saito, Keishi Marumo, Hiroshi Asahara, "Elucidating The Transcriptional Network of Mechanosensitive Tendon Master Gene Mohawk (Mkx)" [Poster presentation], Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting, 2016 年 3 月 5-8 日, Florida, USA
 13. 森 雅樹、細胞はどのようにして場を読むのか。第 5 回細胞競合コロキウム、口頭発表、2016 年 3 月 18~20 日、北海道大学遺伝子病制御研究所
 14. 内藤昌志、森 雅樹、田中栄、浅原弘嗣、「正常な骨格筋分化には筋前駆細胞における de novo DNA メチル化が必要である」、第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、最優秀演題賞 (一般演題口演の部)、2015 年 10 月 富山
 15. 嘉山智大、森 雅樹、伊藤義晃、松島隆英、中道亮、市野瀬志津子、斎藤充、丸毛啓史、浅原弘嗣、「腱・靭帯特異的遺伝子 Mohawk の上流転写因子 ETS2 の機能解析」、2015 年 10 月 23 日、第 30 回 日本整形外科学会基礎学術集会、富山
 16. 内藤昌志、森 雅樹、田中栄、浅原弘嗣、「骨格筋の正常な発生には Dnmt3a による de novo DNA メチル化が必要である」、第 1 回日本筋学会学術集会、2015 年、東京
 17. 内藤昌志、森 雅樹、田中栄、浅原弘嗣、「骨格筋の正常な発生には Dnmt3a による de novo DNA メチル化が必要である」第 1 回日本骨免疫学会、2015 年、沖縄
 18. 森 雅樹、細胞競合の哺乳類成長での役割と染色体異常症への治療応用、新学術領域研究 -細胞競合- 細胞社会を支える適者生存システム、第 3 回領域会議、口頭発表、2015 年 9 月 11 日、京都
 19. Masaki Mori, Fernando D. Camargo, Richard I. Gregory, Hiroshi Asahara, 成長の分子医学を通じた小児難病治療の試み、第 118 回日本小児科学会学術集会、2015 年 4

月 17-19 日、大阪

〔図書〕(計 2 件)

1. 森 雅樹、浅原弘嗣、羊土社、実験医学 増刊号「ノンコーディング RNA テキストブック」『骨・関節を守る microRNA. “microRNA as a keeper of bones and joints”』、2015、251
2. 森 雅樹、中川真一、千葉朋希、浅原弘嗣、羊土社、実験医学 増刊号「ノンコーディング RNA テキストブック」『代表的な ncRNA カタログ』2015、251

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

アウトリーチ活動

1. 森 雅樹

「生きものの科学 ～科学者になるには～」
世田谷区立砧小学校サマースクール (対
象：小学生 1-6 年、参加者 51 名) 2016 年 8
月 29 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 雅樹 (MORI, Masaki)
滋賀医科大学・神経難病研究センター・
特任准教授
研究者番号：10602625