

令和元年6月7日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19411

研究課題名(和文) 構成的アプローチによる四肢形態形成の実験進化学

研究課題名(英文) Experimental evolutionary study of limb morphogenesis by a constitutive approach

研究代表者

城石 俊彦 (SHIROISHI, Toshihiko)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授

研究者番号：90171058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：指間皮膜形成は、コウモリの翼やカエル・水鳥の水かきなど異なる多くの生物種で見られる収斂形質である。本研究では、指間皮膜を有するHm変異マウスを用いて、収斂形質が発生するメカニズムを研究した。その結果、Hm変異では、既存のエンハンサーが染色体を超えて挿入されることでShhの新規発現ドメインの獲得と下流のBMPシグナルの抑制により指間皮膜の形成がもたらされることを明らかにした。しかし、Hm変異に加えてFGFシグナリングの過剰発現によって指骨を伸長させることはできなかった。マウス四肢の骨格パターンをコウモリ様に変化させるには、これらのシグナル分子をより適切にコントロールする必要があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の付属肢は、手足、翼、ヒレなど個々の種に固有でありながら非常に多様な形態を示している。しかし、分子生物学的にその形態形成過程を見れば、共通の遺伝子ネットワークが同様なコンセプトに基づいて器官構築を行っている。したがって、付属肢の形態多様性を生み出すには、普遍的なシステムを構成する因子の量・場所・時間というパラメーターを変動させ、適正に再構築する必要があると考えられる。本申請研究は、上記仮説を実証し、種の形態多様性が生み出される分子的な仕組みを理解するため、実験的に動物の器官形態を作り変えることを目的として実施したものであり、学術的にはきわめて先駆的で挑戦的なものであった。

研究成果の概要(英文)：Interdigital webbing formation is a representative convergent feature found in many different species such as bat wings and frogs and waterfowl webbing. In this study, we used Hm mutant mice with interdigital webbing to elucidate the molecular mechanism of this convergent trait development. As a result, in the Hm mutation, it was revealed that inter-chromosomal insertion of an existing enhancer leads to formation of the interdigital webbing by acquisition of novel expression domain of Shh and consequent suppression of the downstream BMP signaling. However, in addition to the Hm mutation, overexpression of Fgf8 signaling failed to extend the phalange in mouse embryos. Thus, it turned out that it is necessary to control these signal molecules appropriately in order to change the skeletal pattern of the mouse limbs in a bat-like feature.

研究分野：遺伝学

キーワード：収斂形質 水掻き Hm変異 Shh遺伝子 エンハンサー ゲノム挿入 BMPシグナリング FGFシグナリング

1. 研究開始当初の背景

自然界に存在する様々な生物形態をみると、その多様性は無限に生み出されるかのように思える。しかし、実際には、異なる生物種間で器官形態の収斂が多く見られることから、生命は有限の形態形成ツールを組み合わせることによって、その多様性を生み出しているのかもしれない。これまでの形態多様性に関する膨大な博物学的知見の蓄積にもかかわらず、実験的に種固有の形態の壁を乗り越えようという試みはほとんど存在しない。

研究代表者は、発生期の形態形成に重要な *Shh* 遺伝子のシス制御機構の解明と、複数のエンハンサーの進化系統学的解析を行ってきた (Sagai et al. *Development*, 2005, 2009; Amano et al. *Dev Cell*, 2009)。 *Hm* は、指間部に皮膜状の構造が残る変異マウスで、遺伝学的解析から、*Shh* 遺伝子座近傍に原因があり、*Hm* の指間部では *Shh* の過剰発現が認められる。野生型マウスには見られない指間部の *Shh* 発現は、野生のコウモリ胚でも観察されるため (Hockman et al., *PNAS*, 2008)、*Shh* 遺伝子の指間部の発現ドメイン獲得は、指間皮膜を有する動物種の実際の進化でも生じた可能性が高い。

Shh 遺伝子の肢芽での発現異常変異は多数報告されているが、そのほとんどが多指症を呈する。これまでの肢芽発生研究により、*Shh* シグナリングの役割は、指のパターン形成と考えられている。皮膜を生じる *Hm* の表現型は、従来の前後軸の指パターンに影響を与えずに、新規発現ドメインを獲得し得ることを示している。すなわち、正常発生の擾乱を引き起こさずに、別の素過程を変更できること、それが新規形態の生成につながることを示している。このように、*Hm* はきわめて希な形態変異であり、偶然にも進化上の新規形態獲得を部分的に再現している変異である可能性が高い。

コウモリの翼は指間皮膜に加えて、非常に長い指骨を有する。*Hm* マウスにおける *Shh* の過剰発現は、指骨の形態には影響を与えないため、コウモリ様の形態獲得のためには、指骨伸長の素過程が新たに必要であると推測される。本研究は、指間部に皮膜構造を獲得した *Hm* 変異マウスに発想を得て、形態進化過程を要素還元し再構成することで形態進化を理解することを試みたものである。

2. 研究の目的

生物の形態は種に固有であり、種間には厳然たる壁が存在する。既知の多くの自然突然変異体や人為的な遺伝子破壊による表現型は、種固有の形態の異形成にとどまるため、そこから種間多様性を生み出すための分子基盤を説明することはできない。器官形成に働く遺伝子群の多くは種間で同様であることから、相同器官の形態を構築する分子メカニズムには、種を超えた普遍性がある。ただし、種間の形質多様性は、アミノ酸配列の置換よりも発現制御配列の多型の方が重要なことが分かってきた (Maurano et al. *Science* 2012)。すなわち、種間の形態の壁を乗り越えるには、機能する発生遺伝子セットを取捨選択するのではなく、定められた発生遺伝子セットの発現部位や発現量を大きく変更させる必要がある。すなわち、発生遺伝子の発現パターンを構成的に操作して、器官形態を別種の相同器官の形態に近づけることができれば、形態多様性を生み出す仕組みを理解する有効なアプローチになり得る。

飛行能力を獲得した付属肢であるコウモリの翼でも、上腕骨や前腕骨、指骨の本数など、基本体制は他の脊椎動物と同様であり、共通した複数の素過程がその形成に寄与している (図1)。特徴的なのは、指骨が非常に長いこと、指の間に皮膜を有することである。その形質に対応して、マウスなど他の哺乳類の発生過程では見られない *Shh*、*Fgf8* などの指間部での発現が報告されている。このように、コウモリは、二つの素過程にかかわる発生遺伝子の発現変更によって、新規形質を獲得したと考えられる (図1)。

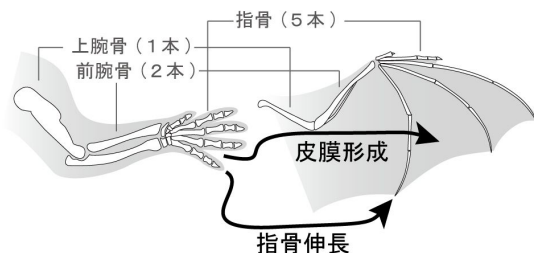


図1: マウスとコウモリの前肢パターン。二つの素過程の調整により基本的な共通体制の枠内での変更が生じ、前肢にコウモリ様形態が付与されるモデル。

本申請研究では、マウス四肢にコウモリ様の形態特性を付与させる構成的アプローチによって、種固有の形態口バストネスを乗り越えることを目的とする。そのために、指間部に皮膜を有する *Hm* マウスを用いる。*Hm* はコウモリと同様の発生素過程の変更により形態変化を起こしている可能性がある。通常、指の本数とアイデンティティ (親指と小指の違いなど) に作用する *Shh* が、*Hm* 肢芽では指形成を邪魔することなく、指間皮膜を付与している。これは、*Hm* 肢芽が一段階コウモリ様の形態に近づいたと考えることができる。さらに、指伸張の素過程に働く発生シグナルを強化することで、形態進化の種間差の壁を乗り越えられるか否かを明らかにし、素過程の変更が自然界の付属肢に見られる収斂形態を説明するか検証する。

3. 研究の方法

(1) *Hm* マウスの遺伝学的解析

Hm マウスの指間皮膜という形態表現型の原因となるゲノム領域を明らかにするために順遺伝学的アプローチによるマッピングを進める。すでに、先行研究により、第5染色体の *Shh* 遺伝子座近傍に原因があることがわかっているため、CRISPR/Cas9 系による長距離欠損マウスを作製し、原因ゲノム領域の同定の効率化を行う。

(2)原因ゲノム配列の機能解析

Hm 枝芽では、*Shh* 発現の異常が認められることから、シス制御配列に原因変異を有することが推測される。(1)で同定されたゲノム配列について、*LacZ* を用いたレポータートランスジェニックマウスを作製し、指間部での発現調節活性を評価する。また、*Hm* 枝芽を用いてヒストン ChIP-Seq や ATAC-seq を行い、*Shh* 遺伝子座近傍のエンハンサー活性状態等のエピゲノム情報を収集する。

(3)*Hm* マウス枝芽の網羅的発現解析

Hm マウス並びに野生型マウスの 12.5 日胚の枝芽から mRNA を調製し、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行う。野生型との比較により、指間皮膜形成に関与する遺伝子カスケードを明らかにする。*Hm* 枝芽で発現レベルが有意に上昇していた遺伝子に関しては、過剰発現トランスジェニックマウスを作製し、指間部の形態表現型に寄与するかどうかを個体レベルで評価する。

(4)トランスジェニックマウスにおける形態発生遺伝子の過剰発現

Hm マウス枝芽の発現解析データを元に、*Hm* の指間皮膜表現型に寄与する形態形成遺伝子をリストアップする。これらの対象遺伝子をマウス枝芽特異的な発現調節能を有するエンハンサーもしくはプロモーター下流につなげたコンストラクトを作製し、トランスジェニックマウスを用いた表現型解析を行う。ここでは、*Hm* マウス枝芽で高発現の遺伝子を野生型の枝芽に導入することで、*Hm* 様の枝芽形態を模倣できるかどうか注目する。

Hm マウスは、コウモリのように指間皮膜が残る変異体であるが、指の長さは通常のマウスと変わらない。コウモリでは、翼芽特異的に指骨での *Bmp2* シグナルが活性化され、軟骨細胞の増殖が盛んになっている (Sears et al., PNAS, 2006)。また、自脚部 (手のひらの領域) で細胞増殖因子である *Fgf8* が高発現している (Hockman et al., PNAS, 2008)。ニワトリ胚を用いた先行研究では、*Fgf* タンパク質の局所的添加によって、指骨の伸長が報告されている (Sanz-Ezquerro et al., Curr. Biol. 2003)。

上記の先行研究を踏まえ、*Bmp2* と *Fgf8* の過剰発現を *Hm* マウス枝芽で行う。軟骨細胞特異的に機能する *Col11* プロモーター下流に *Bmp2* のコーディング配列をつないだコンストラクト、もしくは、枝芽間充織特異的に機能する *Prx* プロモーター下流に *Fgf8* をつなげたコンストラクトを用いて、トランスジェニックマウスを作製し、骨格パターンを評価する。*Shh* と二つのシグナリング系が相乗的に機能し、マウスの四肢形態をコウモリ様に変化させられるかどうかに着目する。

4. 研究成果

(1)*Hm* 挿入変異の同定

順遺伝学的アプローチと PCR スクリーニングにより、*Hm* マウスには第 14 番染色体から第 5 番染色体の *Shh* 遺伝子座への挿入変異があることを見出した。この挿入変異は、150 kb に及ぶものであったが、遺伝子の翻訳領域などを含んでいなかった。*Hm* マウスの *Shh* 過剰発現から、この挿入変異が *Shh* の発現に影響を与えるシス制御因子を含む可能性が考えられたため、以下の解析を行った。

挿入変異と相同な第 14 番染色体領域を含む BAC DNA を用いてレポータートランスジェニックマウスを作製し、このゲノム領域がマウス指間部での遺伝子発現調節能を有することを確認した (図 2)。

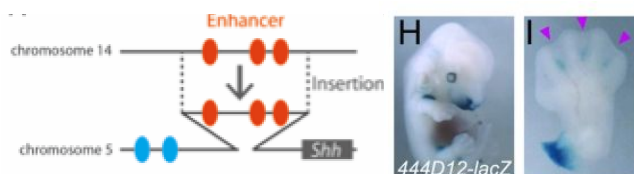


図 2: *Hm* マウスにおける第 5 染色体への第 14 染色体領域の挿入 (左)。第 14 染色体の相当領域を有する BAC DNA は、指間部にレポーター遺伝子を誘導する活性を有する (右)

クロマチンのオープン領域 (活性化領域) を明らかにする目的で *Hm* 枝芽に対する ATAC-Seq 解析を行った。*Hm* の挿入変異領域に複数のピークを確認し、シス制御因子の候補領域としてリストアップすることができた。ピークを有するゲノム配列を用いたレポータートランスジェニックアッセイの結果、この内の少なくとも 3 つの領域が、枝芽での発現活性を有していることを明らかにした。

CRISPR/Cas9 系を用いて *Hm* の挿入変異領域に 5 ~ 100 Kb の欠失を誘導した。各欠失変異系統の表現型解析の結果、150 kb の挿入変異内の少なくとも 2 カ所のシス制御因子が複合的に指間

皮膜形成に関与していることが分かった。この結果は、 のレポータートランスジェニックアッセイで3つのシス制御因子が見出されたこととも矛盾しない。

(2) *Hm* 枝芽のトランスクリプトーム解析

Hm 枝芽から調製した total RNA に対するマイクロアレイ解析を行い、野生型と異なる発現レベルを示す遺伝子群を明らかにした。この遺伝子群には、指間部のプログラム細胞死に関連する *Chrd* や *Msx2* が含まれていた。

実際に *Chrd* が皮膜表現型に寄与するかどうかを明らかにするため、*Chrd* のタンパク質翻訳領域をクローニングし、K14 プロモーター下で過剰発現させるトランスジェニックマウスを作製した。X線 microCT を用いた形態解析により、このトランスジェニックマウスに *Hm* 様の指間皮膜が観察された。これにより、*Shh* の過剰発現が *Chrd* を含む下流の遺伝子ネットワークに影響し、細胞死抑制のプログラムを駆動して、指間皮膜を形成することが明らかになった (図3)。

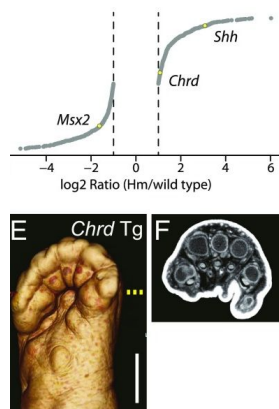


図3：マイクロアレイによる *Hm* と野生型の枝芽の遺伝子発現比較解析。*Hm* では、BMP シグナリングマーカーの *Msx2* の低発現と BMP アンタゴニストの *Chrd* の高発現が観察された (上)。K14 プロモーターの制御下で *Chrd* を発現させたマウス前肢 (下)。*Hm* 用の指間皮膜が形成されている。

(3) 過剰発現による指骨パターンの変化

軟骨細胞特異的に機能する *Col11* プロモーター下流に *Bmp2* のコーディング配列をつないだコンストラクト、肢芽間充織特異的に機能する *Prrx1* プロモーター下流に *Fgf8* のコーディング配列をつなげたコンストラクトをそれぞれ作製した。これらのコンストラクトを *Hm* マウス由来の前核期胚に注入し、トランスジェニックマウスを作製した。その後、骨格パターンを評価するために、18.5日胚で解剖し、四肢軟骨をアルシアンブルーで染色した。*Bmp2* と *Fgf8* が高発現になった四肢では、軟骨が高形成になり、太い前腕骨・指骨が認められるとともに、関節部の異形成がみられた (図4)。今回のトランスジェニックマウスには、コウモリ様の長い指骨を有する個体は、観察されなかった。

Chrd の過剰発現によるマウス肢芽への指間皮膜の付与には成功したものの、*Bmp2* と *Fgf8* の過剰発現によって指骨を伸長させることはできなかった。過剰発現肢では、軟骨の異形成は認められたため、*Bmp2* と *Fgf8* が軟骨細胞の成長と分化に一定程度の影響を与える可能性は認められる。実際に、マウス四肢の骨格パターンをコウモリ様に変化させるためには、これらのシグナル分子の発現量や発現場所を適切にコントロールする必要があると考えられる。

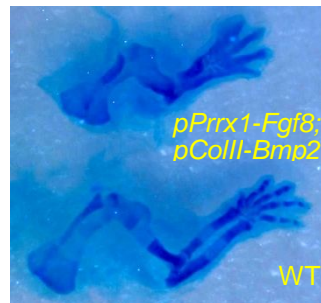


図4：軟骨細胞で *Bmp2* が間充織細胞で *Fgf8* が過剰に発現したトランスジェニックマウスの前肢 (上) と野生型の前肢 (下)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Mouri K, Sagai T, Maeno A, Amano T, Toyoda A and Shiroishi T. Enhancer adoption caused by genomic insertion elicits interdigital *Shh* expression and syndactyly in mouse. (2018) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, 1021-1026. Peer-reviewed. <https://www.pnas.org/content/115/5/1021>

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：天野 孝紀

ローマ字氏名：(AMANO, takanori)

研究協力者氏名：毛利 巨輔

ローマ字氏名：(MOURI, kousuke)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。