

平成 23 年 4 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21770226

研究課題名 (和文) 指の発生における PFR の極性獲得機構の解析

研究課題名 (英文) Role of PFR cells during digit identity determination.

研究代表者 鈴木 孝幸 (SUZUKI TAKAYUKI)
東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：40451629

研究成果の概要 (和文)：

これまでの研究で、指が発生する時には指原器の先端の細胞群が重要であり、この細胞群に指間部からのBMP(骨形成成長因子)のシグナルが特異的に入る事が分かりました。そして私はこの細胞群をPFR (phalanx forming region) の細胞群と名付けました。本研究でPFRの細胞群は驚くべき事に後側からのシグナルにしか反応しないと言う特性を持っている事が示されました。そしてその原因として、指間部において後側から前側にかけて液性因子の流れがあることが判明しました。また多指の鶏である烏骨鶏の原因遺伝子座も特定し、論文が受理され現在 *in press* です。

研究成果の概要 (英文)：

We found that the cells located distal to the digital lay received positional information from interdigit. These cells get BMP signaling from adjacent interdigit located at the posterior side. I named this region 'PFR'. We found that digit identity is controlled by physical flow in the interdigit, and this conclusion brings us new insight how morphogen gradient works in the embryos. Further, we identified single point mutation in Silkie chicken that causes preaxial polydactyly in the leg. We will publish this data in this May, *in press* now

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：指の個性、骨、BMP、PFR、指間部、ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

ふと日常何気なく使っている手を見てみると、とてもおもしろい形をしていることに気付く。われわれヒトは手足に5本の指を持っており、それぞれの指は前後軸上に沿って特徴ある形態をしている。このようにヒトを始め、多くの脊椎動物の指は一見一様に見えるが各々に個性がある。それではこのようなそれぞれの指の個性の違いというものほどのような分子メカニズムによって決まっているのであろうか。また、異なる指が肢芽の前後軸に規則正しく形成される基盤となる遺伝プログラムはどのようなものなのであろうか。

これまで指の形が決まるメカニズムとしては、肢芽の後側から分泌される Shh の濃度勾配や Hox 遺伝子群によって前後軸に沿った指のそれぞれの形が決まるのではないかと議論されてきた (reviewed McGlinn, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2006)。しかし、実際には Shh は指が形成されるときには発現していない。また、標的遺伝子破壊の結果から、Hox 遺伝子は指の形成自体には必要であるが、指のかたちを決める直接の因子ではないことが分かる。一方私が留学をしていた研究室より、指形成期の指間部が BMP シグナルを介して、その前側の指の個性を決定するという報告がされた (Dahn & Fallon, *Science*, 2000)。このため、それぞれの指の形を特徴付ける因子としては Shh、Hox、BMP 遺伝子を包括的に制御し、かつ指間部に特徴的に発現するマスターレギュレーターが存在が考えられた。

そこで私は指の個性を決定付ける候補因子の中から BMP シグナルに着目し、指間部において指原器に作用する BMP が量的に異なるためにそれぞれの指の個性の違いが生み出されることを発見した (Suzuki et al., *PNAS*, 2008)。

2. 研究の目的

上述したような一連の研究の中で、私は指間部から産生されて指先の先端の細胞群が受け取る BMP シグナルの受け取り手の細胞群を PFR(**p**halanx **f**orming **r**egion)と名付けた。第3番目の指間部を第2指の前側に移植しても第2指は全く変化がないことから、PFR の細胞群は後側に位置する指間部の情報のみを受け取るという極性を持っていることが分かった。このような現象論を発見したことから、次に私はこのメカニズムを明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

ニワトリ胚後肢を研究材料とし、指間部に存在する可能性のある液性因子の流れを可視化する実験系を構築することを試みた。まず、RCAS-Luciferase の遺伝子を後肢の肢芽に遺伝子導入し、指が発生する時期まで育ててから指が形成される領域である自脚領域を切り出した。そして、Luciferase の基質である Luciferin を吸着させたアクリルビーズを第3番目の指間部に移植し、発光顕微鏡を用いて Luciferase の発光を計測した。もし指間部に一方向の流れがあるのならば、基質である Luciferin は後側から前側に流れ、前側の指間部にのみ発光のシグナルとして検出されるはずである。このような実験系を用いて液性因子の embryo 内での流れを直接可視化することを試みた。

また、肢芽における前後軸の極性を決定する SHH シグナルは、異所的に前側に誘導されると前側多指となることがヒトで知られている。ニワトリは通常は後肢に4本の指を持つが、鳥骨鶏は5本の指を持つことが知られている。そこで鳥骨鶏でも前側多指のメカニズムがヒトと同じく SHH の肢芽の前側での異所的発現によるものではないかと考え、SHH

のエンハンサー領域を解析した。

4. 研究成果

Luciferase のシステムを用いて指間部における液性因子の流れを解析した結果、Luciferin を吸着させたビーズを移植した前側に発光のシグナルが観察させた (図1)。

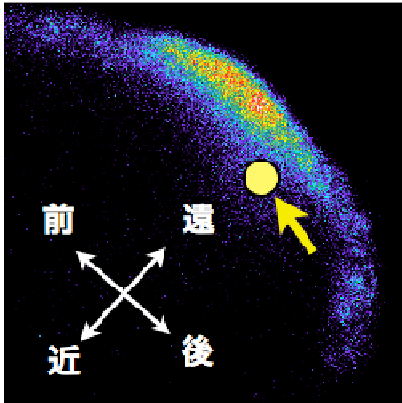


図1：指間部内での液性因子の流れの可視化
この結果は、Luciferin を含む液性因子が指間部において後側から前側にのみ極性を持って流れていることを示している。これまで発生学的なデータからPFRの細胞群は後側の指間部からしかシグナルを受け取れないことが分かっていたが、このメカニズムは液性因子の一方向性の流れが原因であることが分かった。本結果から、液性因子の流れが胚の中でもあることが示唆されたが、今回用いたLuciferinは細胞内にも浸透するため、発光シグナルが、細胞外を流れて来たLuciferinと反応して検出されたのか、細胞内を伝播して来たLuciferinと反応した結果検出されたのか、区別することが出来ない。今後は細胞外ドメインに露出するLuciferaseの遺伝子を肢芽に利用して細胞内に流れがあるのか、細胞外に流れがあるのかを区別して検出出来る様にする必要がある。

次に、PFRの細胞群がどのレセプターを介してBMPシグナルを受け取っているのか調べ

る為に *BMPR1a*、*BMPR1b*、*BMPR2* の発現を *in situ hybridization* 法を用いて調べた。その結果 *BMPR1b* だけが指原器の中に特異的に発現していることが分かった。そこで *BMPR1B* のタンパク質の発現を抗体染色法により調べた結果、*BMPR1B* のタンパク質はPFRにおけるすべての細胞群で均一に発現していた (図2)。

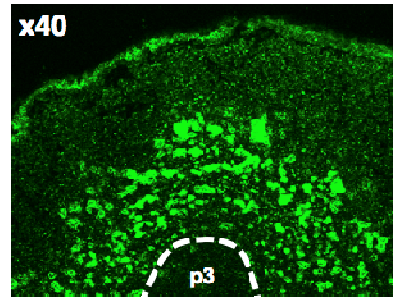


図2：BMPR1Bタンパク質の局在

左側が肢芽の前側、右側が肢芽の後側を示す

これからの結果から、BMPシグナルがPFRの後側の細胞群にしか伝わらないメカニズムはレセプターの局在ではないことが分かった。さらに、BMPシグナルの下流で活性化されるSMAD1/5/8のリン酸化を抗体染色法を用いて検討した結果、やはりPFRの後側でのみBMPシグナルが活性化していることが分かった (図3)。

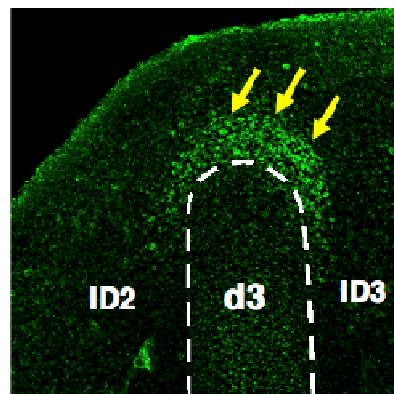


図3：第3指の指原器におけるリン酸化SMAD1/5/8の活性化

左側が肢芽の前側、右側が肢芽の後側を示す

これらの結果より、PFR の細胞群は、前側にも BMP シグナルを受け取るコンピテンスはあるものの、分泌因子としての BMP が後側の指間部からしか作用しないため、PFR の後側だけシグナルが活性化されると考えられる。

このような閉じた間充織内でのシグナルの一方方向性の流れは例がない。これらの結果は、分泌因子の発現している場所の特定はもちろん重要だが、作用する方向性も重要であることを示している。

肢芽の前後軸は SHH と呼ばれる分泌因子が肢芽の後側に特異的に発現し、前へと拡散することで肢芽の後側の個性が決定されると考えられている。SHH が発現する後側では濃度依存的に後側の指が形成されることから SHH はモルフォゲンと呼ばれている。

SHH が肢芽の前側で異所的に発現してしまう家系がヒトであり、preaxial polydactyly(前側多指)と呼ばれている。烏骨鶏も通常トリでは4本ある後肢が5本ある。そこで烏骨鶏もヒトの前側多指と同じ現象が起こっている可能性が考えられたため、烏骨鶏における SHH のエンハンサー領域を解析した。その結果、A から C への1塩基置換を発見した。このポイントミューテーションが肢芽の前側に SHH の発現を誘導するのかどうかを調べる為に、烏骨鶏のエンハンサー領域の下流に LacZ を連結させたものを構築し、野生型のニワトリ胚にエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入した。その結果、ポイントミューテーションの有無だけの变化で前側にも LacZ の発現が誘導された(図4)。



図4: 烏骨鶏のエンハンサーを用いると LacZ の発現が肢芽の前側にも誘導される

この結果は、烏骨鶏の表現型は SHH のエンハンサーのポイントミューテーションが原因で、肢芽の前側にも SHH が誘導された結果であることを示している。これらのデータをまとめて *Developmental Dynamics* に投稿誌し、accept された。現在論文が *in press* の状況である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件) 以下査読あり

1. Maas S. A. *, Suzuki T. *, and Fallon J. F.

Identification of spontaneous mutations within the long-range limb-specific *Sonic Hedgehog* enhancer (ZRS) that alter *Sonic Hedgehog* expression in the chicken limb mutants *oligozeugodactyly* and *Silkie* Breed. **Dev. Dyn.** *in press*(2011).

2. Ito T, Ando H, Suzuki T., Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H.

Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. **Science.** 327, 1345-1350 (2010).

[学会発表] (計2件)

1. Takayuki Suzuki, モルフォゲンの活性を発光顕微鏡を用いて可視化する, 第32回日本分子生物学会、横浜、2009.12.10

2. Takayuki Suzuki, Molecular profile and functional role of the PFR to specify each digit identity, 第16回国際発生生物学会、エジンバラ (イギリス)、2009.9.7

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://web.me.com/stakayuki77/Takayuki/Takayuki_Suzuki.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 孝幸(SUZUKI TAKAYUKI)
東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：40451629