

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0106

研究課題名(和文)形態パターンのゆらぎを生み出すシステムへの構成的アプローチ

研究課題名(英文)Fluctuations of the avian digit pattern

研究代表者

田中 幹子(Tanaka, Mikiko)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：40376950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多くの鳥類の前肢は3本の指からなるが、草原などに棲息するエミューは、前肢に1本の指しかもたないとされていた。しかし、エミューの成体の骨パターンを観察したところ、同一種内にもかかわらず、前肢の指パターンにはバリエーションがあることがわかった。これは、エミューの指パターンは、遺伝的な要因に加えて、後天的な因子により決定されることを示している。本研究では、エミューの指パターンに着目し、指パターンに“ゆらぎ”を惹起する要因を明らかにすることを目的として研究を行った。この目的で、候補遺伝子を探索したところ、エミューの前肢芽芽でのみ *Grem1* の発現パターンが有意にゆらいでいることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥類の指パターンについては、異種間で多様な指パターンを示す原因やその進化の軌跡を探求する研究が盛んであり、エミューの指に着目した研究も含めて、近年、高い関心を得ている。本研究では、鳥類の同一種内で指パターンにはばつきが存在することを骨格パターンと遺伝子パターンの両者から示した初めての報告となった。一方、本研究の遂行により、エミューの前肢パターンには、今回見つけた遺伝子の発現パターンのゆらぎだけではできない個体差も存在していることが示唆されており、指パターンのゆらぎを生み出す新たな機構が存在する可能性の提案へとつながった。

研究成果の概要(英文)：Variation in digit number has occurred multiple times in the history of archosaur evolution. The five digits of dinosaur limbs were reduced to three in bird forelimbs, and were further reduced in the vestigial forelimbs of the emu. Regulation of digit number has been investigated previously by examining genes involved in anterior-posterior patterning in forelimb buds among emu, chicken and zebra finch. We found that the dynamic expression pattern of the BMP antagonist *Grem1* (*Grem1*) in limb buds, which is critical for autopodial expansion, was consistent with the digital pattern of emu, chicken and zebra finch. Furthermore, in emu, variation among individuals was observed in the width of *Grem1* expression in forelimb buds, as well as in the adult skeletal pattern. Our results support the view that the signalling system that regulates the dynamic expression of *Grem1* in the limb bud contributes substantially to variations in avian digital patterns.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：形態進化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的に、動物の形態パターンは、遺伝的ネットワークで固定されていると思われるが、自然界では後天的環境要因に適合した発生プログラムの変化に起因した形態パターンのゆらぎが見られることがしばしばある。多くの鳥類の前肢は3本の指からなるが、草原などに棲息するエミューは、前肢に1本の指しかもたないとされていた。しかし、エミューの成体の骨パターンを観察したところ、同一種内にもかかわらず、前肢の指パターンにはバリエーションがあることがわかった。これは、エミューの指パターンは、遺伝的な要因に加えて、後天的な因子により決定されることを示している。

2. 研究の目的

そこで本研究では、エミューの指パターンに着目し、指パターンに“ゆらぎ”を惹起する要因を明らかにすることを目的として研究を行った。鳥類の指の数の変遷過程については多くの研究がなされており¹⁻⁷、その発生メカニズムについては諸説が提唱されている。

脊椎動物の四肢のパターン形成は、SHH/GREMI/AER-FGF システムとよばれるフィードバックループによって制御されている⁸。SHH/GREMI/AER-FGF システムは、SHH を分泌する ZPA (zone of polarizing activity) 領域と FGF を分泌する AER (apical ectodermal ridge) という2つのシグナルセンターからなる。Gremlin1 (Grem1) は、この2つのシグナルセンター間でシグナルをリレーし、BMP シグナルを阻害することで細胞増殖を活性化するという役割がある⁹⁻¹¹。肢芽の伸長が終わると、Grem1 の発現は抑制されるため、BMP シグナルが上昇し、指原基の軟骨凝集が開始する。したがって、SHH/GREMI/AER-FGF システムは、指原基の量を制御することで、指の数を制御すると考えられている^{9,12-15}。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

ニワトリ (*Gallus gallus*) とゼブラフィンチ (*Taeniopygia guttata*) の卵は 38°C で孵卵し、エミュー (*Dromaius novaehollandiae*) の卵は 36.5°C で孵卵した。発現解析に用いた胚は、4% パラホルムアルデヒド (PFA) / PBS で固定した後、メタノールシリーズで脱水したものをを用いた。動物実験は、東京工業大学、理化学研究所、及び、慈恵医科大学のガイドラインに従って遂行した。

(2) 遺伝子発現解析

ニワトリ、ゼブラフィンチ、エミューの遺伝子発現解析では、それぞれの鳥胚から、Grem1 の相同領域をクローニングして作成した、RNA プロンプを用いた。ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションは、(Wilkinson, 1992) に従った¹⁶。

(3) 軟骨染色と CT 画像解析

軟骨染色に用いたエミュー胚は、4% PFA で固定した後、0.1% アルシアンブルー / 1% HCl / 70% エタノールで染色した後に、エタノールシリーズで脱水し、サリチル酸メチルで透明化した。CT 画像解析では、エミュー成体の前肢をマイクロ-CT システム (日立アロカ) で連続断面画像を撮影し、VGStudio MAX2.0 (Volume Graphics GmbH) で、立体構築した。

4. 研究成果

鳥類の指パターンの形成における SHH/GREMI/AER-FGF フィードバックループの役割を検証する目的で、このフィードバックループでシグナルをリレーする BMP アンタゴニストである Gremlin1 に着目した。この目的で、まず、それぞれの鳥類から Grem1 の遺伝子断片をクローニングし、発現パターンを解析した (図 1)。その結果、肢芽での Grem1 の発現パターンが、それぞれの鳥類の四肢骨格パターンと対応していることが明らかとなった (図 1)。この結果は、BMP 活性のレベルが指パターンのバリエーションを生み出すとする説を支持していた^{12,15}。さらに興味深いことに、エミューの前肢芽では、Grem1 の発現領域の幅の個体間での差 (1.570 ± 0.642 , mean \pm s.d., n=5) は、ニワトリの前肢芽での差 (0.716 ± 0.150 , mean \pm s.d., n=6) と比べて、著しく大きいということが明らかとなった。さらに、エミューの成体の前肢骨格パターンにも著しい個体差が観察された (図 2a-c)。エミューの成体の 24 の前肢について、骨格パターンを調べたところ、10 の前肢では、2 番の指骨片が 3 番の指の基部と融合し、15 の前肢では、4 番の指骨片が 3 番の指の後側に融合している様子が確認された (図 2a-c)。指パターンの著しい個体差は、発生中の前肢の軟骨パターンでも確認された (図 2d-f)。これらの結果は、初期肢芽での Grem1 の発現パターンが、鳥類の種間のみならず、種内での指パターンのバリエーションも反映していることを示唆していた。

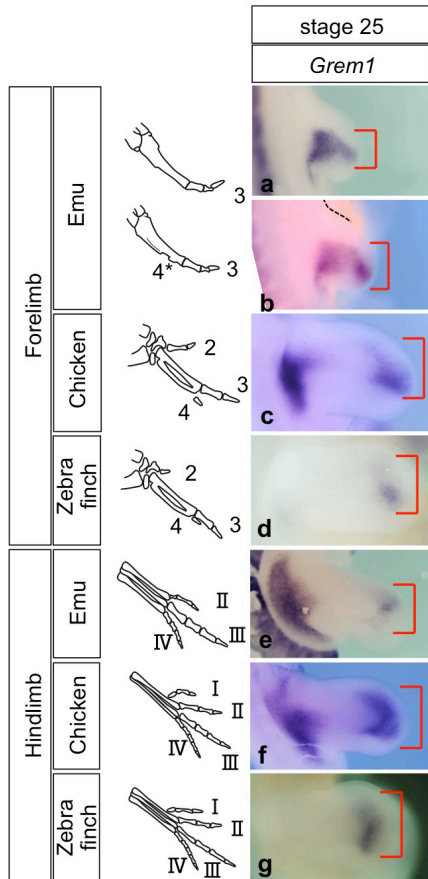


図 1. 肢芽での *Grem1* の発現パターンと骨格パターン
 a-g, ステージ 25 のエミュー、ニワトリ、ゼブラフィンチの胚の前肢芽と後肢芽における *Grem1* (赤括弧) の発現パターン. a, b, は左肢芽を水平方向に反転している. エミューの *Grem1* 陽性の領域には個体差がある. a-c, エミュー成体の前肢の CT 画像. 右は、断面図. 矢尻は 4 番の指骨片. c, 右手を水平方向で反転している. スケールバーは 20 mm(左)と 10 mm(右). d-f, ステージ 36 (d), 37 (e), 40 (f) のエミュー胚の前肢の軟骨パターン. 左手を水平方向で反転している. 数字は指の番号. スケールバーは 2 mm. (Kawahata et al., 2019).

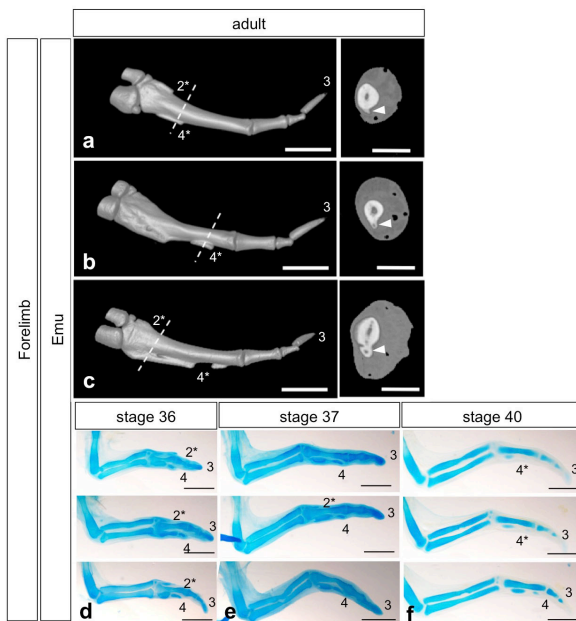


図 2. エミュー成体と胚の前肢のパターン
 a-c, エミュー成体の前肢の CT 画像. 右は、断面図. 矢尻は 4 番の指骨片. c, 右手を水平方向で反転している. スケールバーは 20 mm(左)と 10 mm(右). d-f, ステージ 36 (d), 37 (e), 40 (f) のエミュー胚の前肢の軟骨パターン. 左手を水平方向で反転している. 数字は指の番号. スケールバーは 2 mm. (Kawahata et al., 2019).

本研究では、鳥類の指パターンと初期肢芽での *Grem1* の時空間的な発現パターンが対応していることを示した。さらに、エミューの前肢芽での *Grem1* の発現は、成体の骨格パターンとも対応していた。マウス胚では、肢芽全体に *Grem1* を強制発現させることで BMP シグナルを抑制すると、指は伸長し、前後軸方向に広がった多指になることが示されている¹⁷。肢芽においては、*Grem1* の発現が低下することにより、間充織細胞の増殖が停止し、軟骨へと分化し始める^{15,18}。本研究の成果は、鳥類の指パターンは、*Grem1* によってシグナルのリレーが行われる SHH/Gremlin1/AER-FGF フィードバックループによって制御されており、種間のみならず、種内での指パターンのバリエーションは、初期肢芽での *Grem1* の発現パターンとして認識されることを示唆していた¹⁹。

<引用文献>

- 1 Wagner, G. P. & Gauthier, J. A. 1,2,3 = 2,3,4: a solution to the problem of the homology of the digits in the avian hand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5111-5116 (1999).
- 2 Xu, X. *et al.* A Jurassic ceratosaur from China helps clarify avian digital homologies. *Nature* **459**, 940-944, doi:10.1038/nature08124 (2009).
- 3 Towers, M., Signolet, J., Sherman, A., Sang, H. & Tickle, C. Insights into bird wing evolution and digit specification from polarizing region fate maps. *Nature communications* **2**, 426, doi:10.1038/ncomms1437 (2011).
- 4 Tamura, K., Nomura, N., Seki, R., Yonei-Tamura, S. & Yokoyama, H. Embryological evidence identifies wing digits in birds as digits 1, 2, and 3. *Science* **331**, 753-757, doi:10.1126/science.1198229 (2011).
- 5 Wang, Z., Young, R. L., Xue, H. & Wagner, G. P. Transcriptomic analysis of avian digits reveals conserved and derived digit identities in birds. *Nature* **477**, 583-586, doi:10.1038/nature10391 (2011).
- 6 Xu, X. & Mackem, S. Tracing the evolution of avian wing digits. *Curr Biol* **23**, R538-544, doi:10.1016/j.cub.2013.04.071 (2013).
- 7 de Bakker, M. A. *et al.* Digit loss in archosaur evolution and the interplay between selection and constraints. *Nature* **500**, 445-448, doi:10.1038/nature12336 (2013).
- 8 Benazet, J. D. *et al.* A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* **323**, 1050-1053, doi:10.1126/science.1168755 (2009).
- 9 Zuniga, A., Haramis, A. P., McMahon, A. P. & Zeller, R. Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* **401**, 598-602 (1999).
- 10 Panman, L. *et al.* Differential regulation of gene expression in the digit forming area of the mouse limb bud by SHH and gremlin 1/FGF-mediated epithelial-mesenchymal signalling. *Development* **133**, 3419-3428 (2006).
- 11 Nissim, S., Hasso, S. M., Fallon, J. F. & Tabin, C. J. Regulation of Gremlin expression in the posterior limb bud. *Developmental biology* **299**, 12-21, doi:10.1016/j.ydbio.2006.05.026 (2006).
- 12 Scherz, P. J., Harfe, B. D., McMahon, A. P. & Tabin, C. J. The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science* **305**, 396-399 (2004).
- 13 Verheyden, J. M. & Sun, X. An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature* **454**, 638-641, doi:10.1038/nature07085 (2008).
- 14 Zeller, R. The temporal dynamics of vertebrate limb development, teratogenesis and evolution. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 384-390, doi:10.1016/j.gde.2010.04.014 (2010).
- 15 Lopez-Rios, J. *et al.* GLI3 constrains digit number by controlling both progenitor proliferation and BMP-dependent exit to chondrogenesis. *Developmental cell* **22**, 837-848, doi:10.1016/j.devcel.2012.01.006 (2012).
- 16 Wilkinson, D. G. *In Situ Hybridization: A Practical Approach*. (Oxford University Press, 1992).
- 17 Norrie, J. L. *et al.* Dynamics of BMP signaling in limb bud mesenchyme and polydactyly. *Developmental biology* **393**, 270-281 (2014).
- 18 Pickering, J. *et al.* An intrinsic cell cycle timer terminates limb bud outgrowth. *eLife* **7**, 3e7429 (2018).
- 19 Kawahata, K. *et al.* Evolution of the avian digital pattern. *Scientific Reports* **9**, 8560 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kenta Kawahata, Ingrid Rosenburg Cordeiro, Shogo Ueda, Guojun Sheng, Yuuta Moriyama, Reiko Yu, Makoto Koizumi, Masataka Okabe, and Mikiko Tanaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Evolution of the avian digital pattern	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44913-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mikiko Tanaka	4. 巻 61
2. 論文標題 Preface: Ecology, Evolution and Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev. Growth Dev.	6. 最初と最後の頁 3-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mikiko Tanaka	4. 巻 61
2. 論文標題 Preface Ecology, Evolution and Development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 3-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shogo Ueda, Ingrid Rosenburg Cordeiro, Yuuta Moriyama, Chika Nishiomri, Kei-ichi Kai, Reiko Yu, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, and Mikiko Tanaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Cux2 refines the forelimb field by controlling expression of Raldh2 and Hox genes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio040584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.040584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mikiko Tanaka	4. 巻 56
2. 論文標題 Alternation in anterior-posterior patterning during the fin-to-limb transition.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genesis	6. 最初と最後の頁 e23053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mikiko Tanaka	4. 巻 NA
2. 論文標題 Evolution of vertebrate limb development	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Essential for Life Sciences	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/9780470015902.a0002099.pub2	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 -

1. 著者名 Shogo Ueda, Takayuki Suzuki and Mikiko Tanaka	4. 巻 1650
2. 論文標題 Transgene introduction into the chick limb bud by electroporation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology: Avian and reptilian Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 203-208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7216-6_13	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8件(うち招待講演 5件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Ingrid Rosenburg Cordeiro, Eriko Tsuboi, Makoto Koizumi, Guojun Sheng, Masataka Okabe, Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Left-right asymmetric reduction of skeletal elements in emu wings
3. 学会等名 EMBO Workshop Limb Development and Regeneration: New Tools for a Classic Model System (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Morphological novelty in the vertebrate limb created by the water-to-land transition
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ingrid Rosenburg Cordeiro, Kaori Kabashima, Haruki Ochi, Kenjiro Munakata, Chika Nishimori, Mara Laslo, James Hanken , Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Morphological novelty in the vertebrate limb created by the water-to-land transition
3. 学会等名 th Meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ingrid Rosenburg Cordeiro, Kaori Kabashima, Haruki Ochi, Kenjiro Munakata, Chika Nishimori, Mara Laslo, James Hanken , Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Morphological novelty in the vertebrate limb created by the water-to-land transition
3. 学会等名 The 1st AsiaEvo Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中幹子
2. 発表標題 環境ストレスがもたらした新奇形質の獲得機構
3. 学会等名 遺伝研研究会「マクロ生態学と遺伝学の融合」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Evolution from fins into limbs
3. 学会等名 2017 International Symposium on Evolutionary Genomics and Bioinformatics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ingrid R Cordeiro, Kaori Kabashima, Haruki Ochi, Keijiro Munakata, Mara Laslo, James Hanken, Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Morphological novelty in the vertebrate limb created by the water-to-land transition
3. 学会等名 The 29th CDB meeting, Marvericks, New Models in Developmental Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Adaptive evolution of vertebrate limb morphology
3. 学会等名 The 14th International Limb Development and Regeneration Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田中幹子、日本魚類学会編	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 2 out of 756 pages
3. 書名 鱗形成に関する遺伝子、第9章 遺伝、「魚類学の百科事典」	

1. 著者名 田中幹子 (第6章 高宗和史、田中幹子 編) 日本動物学会編	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 2 out of 808 pages
3. 書名 肢芽の発生 手足のかたちのできかた、第6章 動物の発生、「動物学の百科事典」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

田中幹子研究室 http://www.evodevo.bio.titech.ac.jp 東京工業大学生命理工学院 田中幹子研究室 http://www.evodevo.bio.titech.ac.jp

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