

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02487

研究課題名(和文)四肢動物において後肢の位置の多様性を生み出した進化的な分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms that brought about positional diversity of the hindlimb in tetrapod

研究代表者

鈴木 孝幸 (Suzuki, Takayuki)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：40451629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、後肢の位置の異なる様々な動物胚を用いてGdf11の機能メカニズムを調べることで、脊椎動物の後肢の位置の多様性を生み出すメカニズムを解明する事を目的とした。Gdf11は予定後肢領域である側板中胚葉では発現せず、脊椎骨の原器である前体節中胚葉の末端で発現していた。Gdf11が発現すると、そこに仙椎が形成されると同時に、後肢の形成も誘導することが分かった。Gdf11の発現開始タイミングは種によって異なり、これにより脊椎動物に後肢の位置の多様性が生み出されることが分かった。この発現開始タイミングの違いを誘導するメカニズムとして種特異的なエンハンサー領域の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の後肢の位置の違いは、Gdf11というたった1つの遺伝子が、発生中に働くタイミングの違いが進化的に生じた結果もたらされたことが分かりました。またヘビはGdf11が働き始めるタイミングが他の種と比べて遅いため、長い胴体を持つということが分かりました。これらの成果は、後肢の位置の違いという生物の大進化は思った以上に少ない遺伝子の変化によりもたらされたことを示しています。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanism that produces diversity in the position of the hind limbs of vertebrates by investigating the functional mechanism of Gdf11 using various animal embryos with different positions of the hind limbs. Gdf11 was not expressed in the lateral plate mesoderm, which is the planned hindlimb region, but was expressed at the posterior end of the presomitic mesoderm, which is the prototype of the vertebra. It was found that when Gdf11 is expressed, the sacral spine is formed there and at the same time, the formation of the hind limbs is also induced. It was found that the timing of the onset of expression of Gdf11 varies from species to species, which creates a variety of hindlimb position in vertebrates. The existence of a species-specific enhancer region was suggested as a mechanism for inducing this difference in expression initiation timing.

研究分野：進化発生学

キーワード：脊椎動物 骨格 パターン 後肢 進化 遺伝子発現 ヘテロクロニー エンハンサー

## 1. 研究開始当初の背景

私達ヒトを含めた四肢動物は、種によって位置が異なるそれぞれ 1 対の前肢と後肢を持っている。例えば、スポンは頭から 19 個目の脊椎骨に後肢が接続しているが、マウスでは第 27 脊椎骨に、ニシキヘビは体の後方の第 270 脊椎骨に退化して縮退した骨盤と後肢を持つ事が知られている。四肢動物に属しながら体の前後軸に沿った骨格パターンがこれほど大きく異なるのは大変興味深い。しかしながら、このような骨格パターンの多様性が生み出された具体的なメカニズムは未だに全く明らかにされていない。骨格パターンの進化は進化発生学の学問分野において、大きな形態の変化を伴う進化（形態の大進化）のうち、体のボディープランの進化と密接に関係している。そこで我々は大きな学術的「問い」として、特に“四肢動物の体のボディープランの進化において、上記に示した後肢の位置の多様性が生み出されたメカニズムを明らかにしたい”と考えた。

脊椎骨は、頭部に近い方から頸椎-胸椎-腰椎-仙椎-尾椎と呼ばれている。このような体の前後軸に沿った脊椎骨の個性は、発生中に脊椎骨の原器である体節に発現する *Hox* 遺伝子群によって特徴付けられている。*Hox* 遺伝子群が発現する場所と脊椎骨の個性は種を超えて一致することが知られている(Burke et al., 1995)。すなわち骨格パターンの多様性は、体のボディープランのマスターレギュレーターである *Hox* 遺伝子群の発現パターンが種によって異なることで説明出来る(Durston, 2012)、と教科書にも書かれている。それでは体の前後軸に沿った後肢の位置の違いはどのように説明出来るのであろうか？残念ながら脊椎骨の個性と *Hox* 遺伝子群の発現パターンが一致する事が明らかになってから 20 年以上経つが、これまでこの問いに答える事は出来なかった。我々はそれには後肢の位置の進化に関する解剖学的知見と後肢を形成する場所を決める未知の発生メカニズムの解明が必要であると考えた。そこで我々は、四肢動物の骨格パターンの進化過程を詳しく調べた結果、興味深い事にヘビの祖先で手足を持っていたテトラポドピスや首長竜など絶滅した生物に至るまで、後肢は骨盤を介して必ず仙椎に接続していることに気付いた。ところが発生学的には仙椎を含む脊椎骨を形成する細胞は、体節と呼ばれる中軸中胚葉由来の細胞群から形成されるのに対し、後肢や骨盤を含む四肢の細胞はそれとは異なる組織である側板中胚葉と呼ばれる独立した別の細胞群から形成される。したがってこれらの細胞系譜の事実から、申請者は後肢の位置の多様性は体の前後軸に沿って形成される仙椎の位置に、細胞の由来の異なる後肢をカップリングして形成させる強い発生拘束を持つ遺伝子によって支配されているのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究を開始するにあたり、我々は将来の脊椎骨を作る組織である体節と呼ばれる部分に発現する分泌因子である *Gdf11* が、脊椎動物種間で異なる発生のタイミングで遺伝子発現が誘導され、後肢の発生する位置を制御しているという予備的知見を発見していた。そこで本研究では、後肢の位置の異なる様々な動物胚を用いて *Gdf11* の機能メカニズムを調べることで、脊椎動物の後肢の位置の多様性を生み出すメカニズムを解明する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では種間での *Gdf11* の発現タイミングの違いが生み出される分子機構の解析を通して、種によって異なる手足の形成領域が決定される生命システムの原理を明らかにすることを具体的な目標とした。そのために①まずニトリ胚を用いて GDF11 が作用する領域と、作用するメカニズムの発生学的解析を行う。②後肢の位置の異なる様々な動物胚を用いて *Gdf11* の発現開始タイミングの違いを詳細に解析する。③GDF11 タンパク質の作用するタイミングを変化させた時に手足の形成領域にどのような変化があるのか骨格パターンを解析する。④*Gdf11* のエンハンサー領域をレポーター遺伝子の導入により同定し、種間の *Gdf11* の発現タイミングの違いがシスエレメントによるものなのか、トランス因子によるものなのかを明らかにする、ことを目指した。

## 4. 研究成果

まず我々は進化の過程で後肢の位置がどのように変化していったのか、形態学的な解析を行った。図 1 は動物の骨格パターンの進化を表したものである。この結果、今生きている地球上の動物だけでなく、既に絶滅してしまった恐竜や首長竜、ヘビの祖先で手足を持つテトラポドピス

に至るまで、あらゆる生物種において青色で示した後ろ足はピンク色で示した仙椎に接続していることが判明した。このことから、仙椎の場所に後ろ足が形成されるメカニズムは進化の過程で非常に良く保存されていることが判明した。

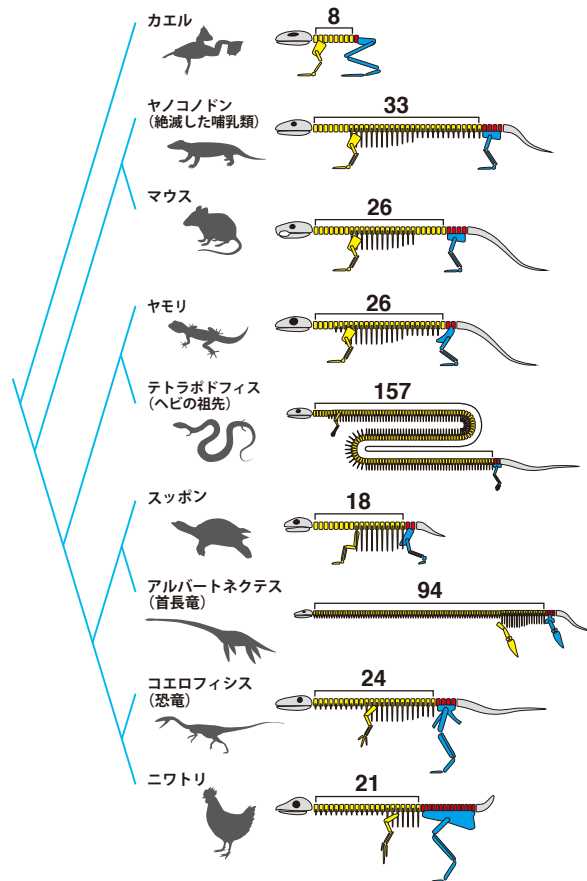


図 1. 動物の骨格パターンの進化

次に私たちは、体の発生過程を観察しやすいニワトリの胚を用いて後ろ足の発生メカニズムを詳細に観察した。その結果、*Gdf11* の発現は予定後肢領域(LPM: *Tbx4* 遺伝子が発現している領域)に見られず、将来の脊椎骨となる前体節中胚葉 (PSM) で発現していることが判明した (図 2)

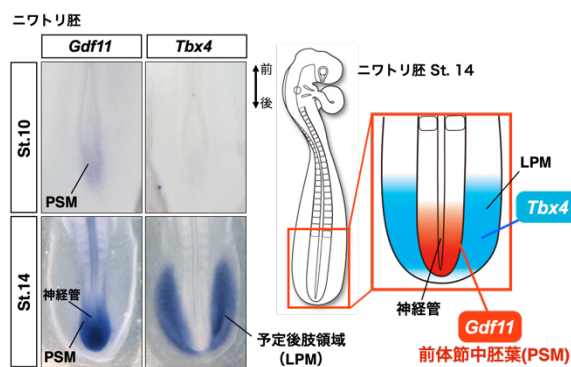


図 2. *Gdf11* の発現領域

そこで、PSM における *Gdf11* の発現が後肢領域の決定に関与しているのかを調べるために PSM に *Gdf11* の siRNA を電気穿孔法により導入し、予定後肢領域のマーカである *Tbx4* の発現を調べた。その結果、PSM に置いて *Gdf11* の発現を抑制すると *Tbx4* の発現が減少することが判明した。この結果から PSM における *Gdf11* の発現が確かに後肢領域の決定に関与していることが判明した。

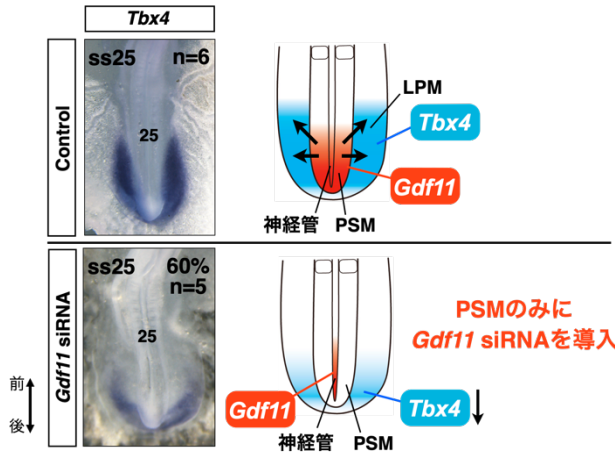


図 3. PSM における *Gdf11* 遺伝子の発現抑制実験の結果

そこで次に、*Gdf11* が予定後肢領域においてどのような遺伝子の発現を制御しているのかを調べるために GDF11 タンパク質を LPM に移植したときの *Hox* 遺伝子の発現パターンを検討した。その結果、G D F 1 1 は後肢形成に関わる *Hox9-13* 遺伝子群の発現を選択的に誘導することが明らかとなった。これらの遺伝子群は脇腹から後肢領域にかけて発現する遺伝子であるため GDF11 は下半身に発現する *Hox* 遺伝子群の発現を誘導出来ることが分かった (図 4)。

GDF11ピーズ (200 µg/ml) を St. 9ニワトリ胚の右LPMに移植→St. 14

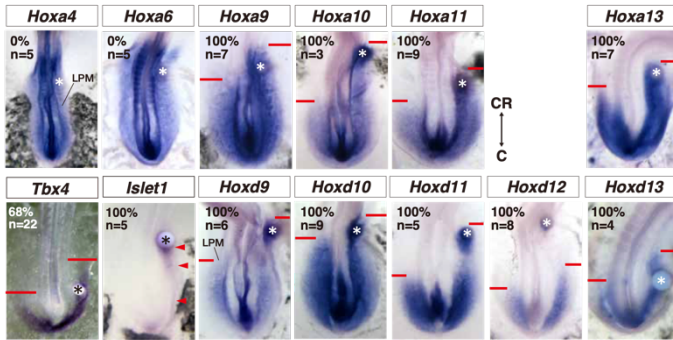


図 4. GDF11 タンパク質を LPM に作用させた結果

次に、頭部から後肢までの脊椎骨数の異なる様々な動物胚を採取し、*Gdf11* の発現開始タイミングの違いを *in situ* hybridization 法を用いて解析した。その結果、頭部から後肢までの脊椎骨数の多い動物種ほど *Gdf11* が発現開始をするタイミングが遅いことが判明した (図 5)。

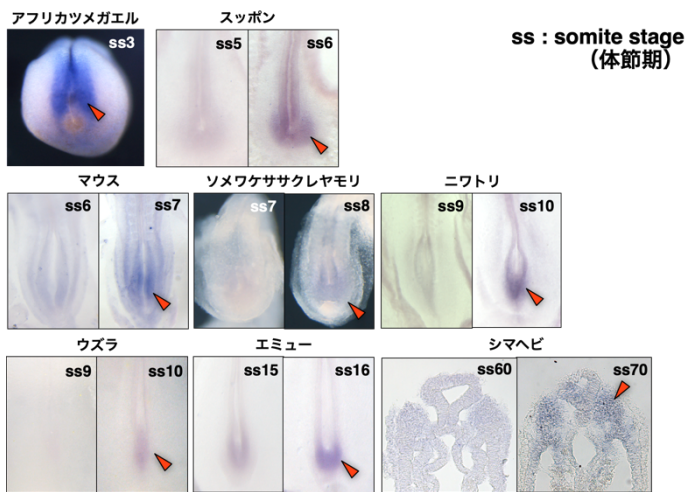


図 5. *Gdf11* の発現開始タイミングの種間比較

そこで、発生中に *Gdf11* が発現を開始するタイミングの違いが種間の後肢の位置の違いを生み出しているのかどうかを調べるために、ニワトリ胚の LPM に正常胚ではまだ *Gdf11* が発現を開始していない発生段階で GDF11 タンパク質を人工的に作用させた。その結果、GDF11 の

作用するタイミングを早めると後肢の位置が体の前側にシフトすることが判明した (図 6)。

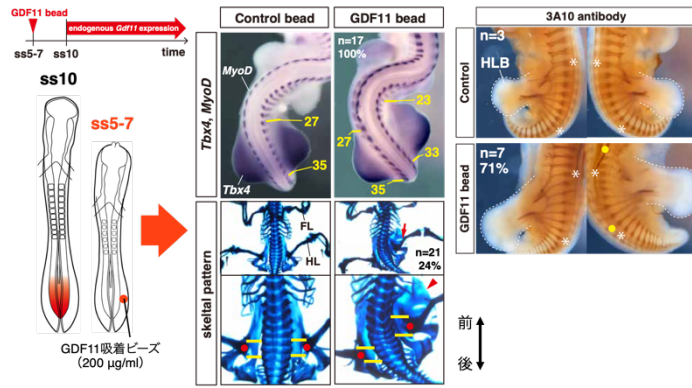


図 6. GDF11 の作用するタイミングを早めると後肢が体の前側にシフトした

これらの結果から、PSM に *Gdf11* が発現を開始すると予定後肢領域の LPM に作用して Hox 遺伝子の発現が誘導され、その結果後肢の位置が決定されることが判明した。さらに脊椎動物における後肢の位置の多様性は発生中に PSM に発現を開始する *Gdf11* の発現開始タイミングの違いによってもたらされたことが強く示唆された。

特にヘビにおいては *Gdf11* が発現を開始するタイミングが極めて遅いため多くの脊椎骨が形成され長い胴体の後側に後肢が形成されることが明らかとなった。

次に種間における *Gdf11* の発現開始タイミングの違いが生み出されたメカニズムを調べるために、マウス胚とニワトリ胚を用いて ATAC-seq を行い *Gdf11* のエンハンサー領域を解析した。その結果、それぞれの種において、種特異的なエンハンサー候補領域があることが判明した。これらの結果から *Gdf11* の発現開始タイミングの種間の違いは、進化の過程において種特異的なエンハンサーの獲得によりもたらされたことが強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kinoshita Keiji, Suzuki Takayuki, Koike Manabu, Nishida Chizuko, Koike Aki, Nunome Mitsuo, Uemura Takeo, Ichiyanagi Kenji, Matsuda Yoichi	4. 巻 3
2. 論文標題 Combined deletions of IHH and NHEJ1 cause chondrodystrophy and embryonic lethality in the Creeper chicken	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 144-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0870-z	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 Okuzaki Yuya, Kaneoka Hidenori, Suzuki Takayuki, Hagihara Yota, Nakayama Yuki, Murakami Seitaro, Murase Yusuke, Kuroiwa Atsushi, Iijima Shinji, Nishijima Ken-ichi	4. 巻 455
2. 論文標題 PRDM14 and BLIMP1 control the development of chicken primordial germ cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 32 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.06.018	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 Watanabe Hidetaka, Higashimoto Ken, Miyake Noriko, Morita Sumiyo, Horii Takuro, Kimura Mika, Suzuki Takayuki, Maeda Toshiyuki, Hidaka Hidenori, Aoki Saori, Yatsuki Hitomi, Okamoto Nobuhiko, Uemura Tetsuji, Hatada Izuho, Matsumoto Naomichi, Soejima Hidenobu	4. 巻 34
2. 論文標題 DNA methylation analysis of multiple imprinted DMRs in Sotos syndrome reveals IGF2 DMRO as a DNA methylation dependent, P0 promoter specific enhancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 960 ~ 973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901757R	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 Tsuji Kaori, Okuzaki Yuya, Hibino Nobuyuki, Kawamura Kazuki, Saito Seiji, Ozaki Yumi, Ishishita Satoshi, Kuroiwa Atsushi, Iijima Shinji, Matsuda Yoichi, Nishijima Kenichi, Suzuki Takayuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Identification of transgene integration site and anatomical properties of fluorescence intensity in a EGFP transgenic chicken line	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 393 ~ 401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12631	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 Saito S., Kawamura K., Matsuda Y. Suzuki T.	4. 巻 61
2. 論文標題 Recommendation of Brilliant Blue instead of Fast Green as a dye at in ovo electroporation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 402-409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12629.	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 Mori S., Sakakura E., Tsunekawa Y., Hagiwara M., Suzuki T., Eiraku M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Self-organized formation of developing appendages from murine pluripotent stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3802-3802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11702-y.	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 Lancman Joseph J., Hasso Sean M., Suzuki Takayuki, Kherdjemil Yacine, Kmita Marie, Ferris Andrea, Dong P. Duc S., Ros Marian A., Fallon John F.	4. 巻 251
2. 論文標題 Downregulation of <i>Grem1</i> expression in the distal limb mesoderm is a necessary precondition for phalanx development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.431	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 該当する

1. 著者名 Suzuki Takayuki, Fallon John F.	4. 巻 250
2. 論文標題 The dynamic spatial and temporal relationships between the phalanx forming region and the interdigits determine digit identity in the chick limb autopod	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1318 ~ 1329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.323	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 該当する



1. 著者名 Ishishita Satoshi, Kitahara Shumpei, Takahashi Mayuko, Iwasaki Sakura, Tatsumoto Shoji, Hara Izumi, Kaneko Yoshiki, Kinoshita Keiji, Yamaguchi Katsushi, Harada Akihito, Ohmori Yasushige, Ohkawa Yasuyuki, Go Yasuhiro, Shigenobu Shuji, Matsuda Yoichi, Suzuki Takayuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Uterus-specific transcriptional regulation underlies eggshell pigment production in Japanese quail	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0265008	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 Hata Ayano, Nunome Mitsuo, Suwanasopee Thanathip, Duengkae Prateep, Chaiwatana Soontorn, Chamchumroon Wiyada, Suzuki Takayuki, Koonawootrittriron Skorn, Matsuda Yoichi, Srikulnath Kornorn	4. 巻 11
2. 論文標題 Origin and evolutionary history of domestic chickens inferred from a large population study of Thai red junglefowl and indigenous chickens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81589-7	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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takayuki Suzuki
2. 発表標題 Molecular mechanisms that explain positional diversity of hindlimb position during vertebrate embryogenesis
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Saito
2. 発表標題 Identification and functional analysis of Gdf11 enhancer that determines the hindlimb position.
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Haruka Fujita
2. 発表標題 Expression pattern of Hox11 paralogous genes in the somites is determined by GDF11 with dose-dependent manner.
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Suzuki, Yoshiyuki Matsubara, Ayumi Hattori, Toshihiko Ogura, Se-Jin Lee, Atsushi Kuroiwa
2. 発表標題 脊椎動物における後肢の位置の多様性を生み出した種に固有の発生の時間制御機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木孝幸
2. 発表標題 ニワトリ胚を用いた四肢動物における後肢の位置の多様性を生み出す発生メカニズム
3. 学会等名 第42回鳥類内分泌学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木孝幸、松原由幸、平沢達矢、江川史朗、服部亜由美、菅沼貴也、小原裕平、永井達也、田村宏治、倉谷滋、黒岩厚
2. 発表標題 ニワトリ胚を用いた四肢動物における後肢の位置の多様性を生み出した発生メカニズム
3. 学会等名 平成30年度 東海畜産学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Suzuki
2. 発表標題 Heterochrony in initiation of Gdf11 expression specifies unique hindlimb positioning through coordination of Hox gene expression in tetrapods
3. 学会等名 第51回 日本発生生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木孝幸
2. 発表標題 四肢動物における後肢の位置の多様性を生み出す発生メカニズムの解明
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会第51回日本発生生物学会合同大会NBRPワーク ショップ(招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥類バイオサイエンス研究室 <a href="https://animgenet.wixsite.com/avianbioscience/publications">https://animgenet.wixsite.com/avianbioscience/publications</a>
--

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0件

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			
米国	University of Wisconsin			