

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14718

研究課題名（和文）頸に前肢が形成されない分子基盤の解明

研究課題名（英文）Analysis of the molecular basis of the limb-incompetence in the neck

研究代表者

向笠 勝貴（Mukaigasa, Katsuki）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60706349

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：過去の報告で、発生期ニワトリ胚胸腹部にFGFを作用させると肢芽形成が強制的に誘導されるが、頸部ではそれが起こらないことが知られていた。本研究では、この現象の分子基盤について解析を行った。ニワトリ胚側板中胚葉の頸部、前肢部、胸腹部、後肢部それぞれを試料としてRNA-seq解析を行った結果、それぞれの領域で特異的に発現する遺伝子群を選出できた。この遺伝子群でエンリッチメント解析を行ったところ、頸部側板中胚葉のトランスクリプトームは、発生期心臓に一部類似することが示唆された。頸部側板中胚葉で特異的に発現する遺伝子の中から転写因子に着目し、より詳細な発現解析や機能解析を進めているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の頸の長さは種によって異なるが、発生初期の段階から種特有の頸の長さは決まっている。つまり、頸の長い生物（鳥類など）は短い生物（魚類、両生類など）に比べ、頸部側板中胚葉の領域が広い。この領域はどのような分子生物学的性質を持っているのか、これまでよくわかっていなかったが、本研究により、心臓に関連が深い可能性が浮かび上がってきた。脊椎動物は進化の過程で頸の長さを伸ばしているが、その際、発生期の胚組織のどの領域に変更を加えたのか、よくわかっていない。本研究で得られた知見はこの疑問を解明する可能性を持つものであり、今後の研究でさらに発展させる計画である。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that in the lateral plate mesoderm (LPM) of chick embryo, local treatment of FGF at flank region induced the limb bud formation. However, this is not the case in the neck LPM. In this study, we examined the molecular basis of this phenomenon. RNA-seq analysis of the neck, forelimb, flank, and hindlimb region of the LPM of chick embryo were performed, and genes expressed in the specific region of LPM were identified. We applied the enrichment analysis to these gene sets, and obtained the results that the GO TERM relating to the heart development, such as "cardiovascular system development", was enriched in the neck gene sets. Now, we focus on the transcription factors specific for neck LPM, and plan to examine the detailed expression pattern and function of these genes.

研究分野：発生生物学

キーワード：側板中胚葉 トランスクリプトーム ニワトリ胚

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

側板中胚葉 (lateral plate mesoderm: LPM) から肢芽が誘導される過程は魚類から哺乳類までよく保存されており、その分子基盤はよく研究されている。しかし、前肢芽形成領域の LPM が盛んに研究されているのに対して、隣接する領域である頸部 LPM の研究はほとんど行われていない。興味深いことに、ニワトリ胚胸腹部 LPM に強制的に FGF を作用させると、異所的に肢芽が誘導され、ほぼ完全な前肢あるいは後肢にまで発生する。この結果は、本来肢芽の形成されない胸腹部 LPM にも肢芽形成能が備わっていること(Limb-competent)を意味している。ところが、頸部 LPM では、FGF を作用させても肢芽形成が起こらない。つまり、頸部 LPM には肢芽形成能がない(Limb-incompetent)と考えられる。しかし、この LPM の性質の違いを規定している分子基盤は全くわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、LPM におけるこのような肢芽形成能の違いがどのような分子基盤で規定されているのかを明らかにすることを目的とする。特に、頸部 LPM はなぜ肢芽形成能を持っていないのか、という点の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

当初の計画では、Hox 遺伝子群、レチノイン酸シグナル、Tbx5 に着目し、頸部 LPM におけるこれらの因子の機能解析などを予定していたが、近年、RNA-seq 解析が容易にできるようになってきたことから、LPM の領域別トランスクリプトーム比較解析を行うこととした。ニワトリ胚(HH-stage15-18)の頸部 LPM (8-13 体節レベル)、前肢部 LPM (16-20 体節レベル)、胸腹部 LPM (21-25 体節レベル)、および後肢部 LPM (27-31 体節レベル)を顕微鏡下で外科的に切り出し、20-30 個体分をまとめて RNA を抽出した後、RNA-seq を行った。得られたシーケンスデータは salmon (Patro et al., 2017)によりリードカウントを行い、DESeq2 (Love et al., 2014)により発現変動遺伝子解析を行った。また、DAVID (Huang et al., 2009)によりエンリッチメント解析も行った。

### 4. 研究成果

RNA-seq により得られたトランスクリプトームデータを、頸部、前肢部、胸腹部、および後肢部の全ての組み合わせで 2 群比較し、発現量に 2 倍以上の差が見られた遺伝子を選出した(合計 2010 遺伝子)。この遺伝子群を LPM 各領域における発現量を基にクラスタリングすると、頸部、前肢部、胸腹部、および後肢部に特異的に発現する遺伝子群に分類することができた(図 1)。

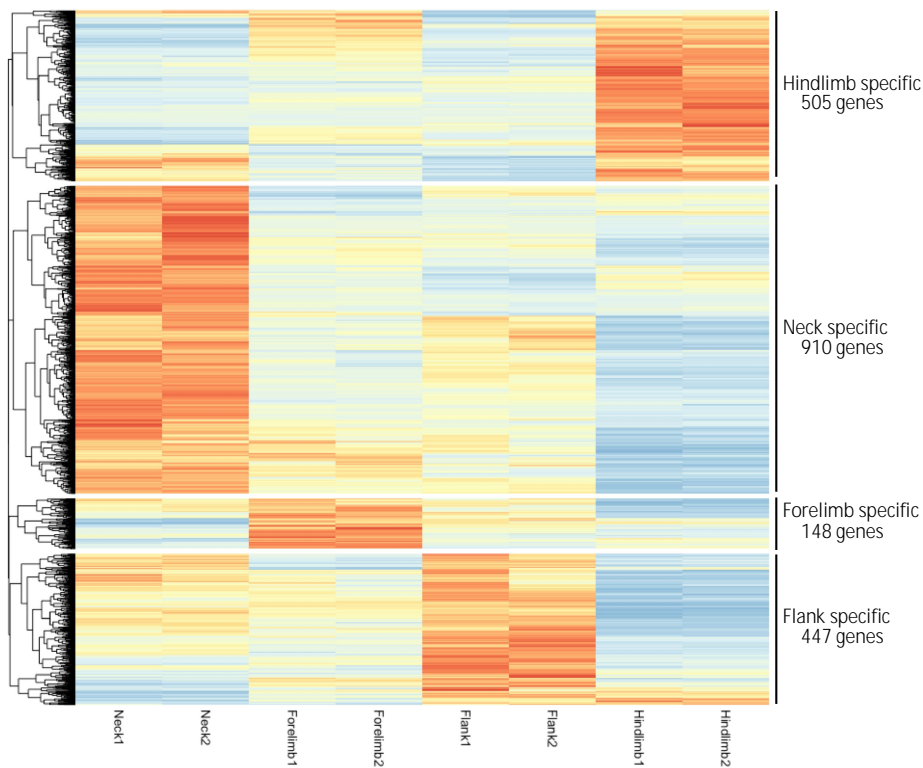


図 1. LPM における領域別遺伝子発現量のヒートマップ

この中で、頸部 LPM 特異的に発現する遺伝子が最も多く、910 遺伝子を選出した。これらの遺伝

子群は全体的な傾向としてどのような特徴を持っているのかを調べるために、DAVID を利用したエンリッチメント解析を行った。その結果、頸部特異的な遺伝子群では、"cardiovascular system development"、"vasculature development"などの心臓血管系の発生に関わる GO term が有意に多く、頸部 LPM は心臓発生に関連が強いことが示唆された(図 2)。ニワトリ胚の発生期心臓の RNA-seq がすでに発表されていたため、心臓のトランスクリプトームと、本研究で得られた LPM トランスクリプトームを主成分分析で比較したところ、LPM と心臓の遺伝子発現は明らかに異なるものであったが、LPM の中で見れば、頸部 LPM が最も心臓に近かった。今後、より具体的な遺伝子を調べることで、心臓と頸部 LPM の関連を検討したい。また、頸部 LPM ではその他にも、"cell migration"や"enzyme linked receptor protein signaling pathway"といった GO term も多かった。これらの GO term は前肢部、胸腹部、後肢部ではほとんど見られず、頸部 LPM が前肢部以後と異なった性質を持っていることが示唆された。

今後は、頸部 LPM 特異的な遺伝子群の中から、特に転写因子に着目し、*in situ* hybridization などにより、詳細な発現解析を行い、結果次第ではノックダウンや異所性強制発現などの機能解析も行う予定である。候補遺伝子としては、GATA4/5/6, IRX1, NKX3-2, ALX1, ZFPM1/2 などである。これらの遺伝子はいずれも本研究により頸部 LPM 特異的な発現を示す遺伝子として浮かび上がってきたものだが、LPM における機能は全くわかっていない。例えば、GATA4/5/6 は心臓の発生に関わる転写因子としてよく知られているが、LPM でどのような働きをしているか不明である。頸部と心臓の発生学的類似性の観点からも、今後の研究でこれらの遺伝子の解析を進めていきたい。

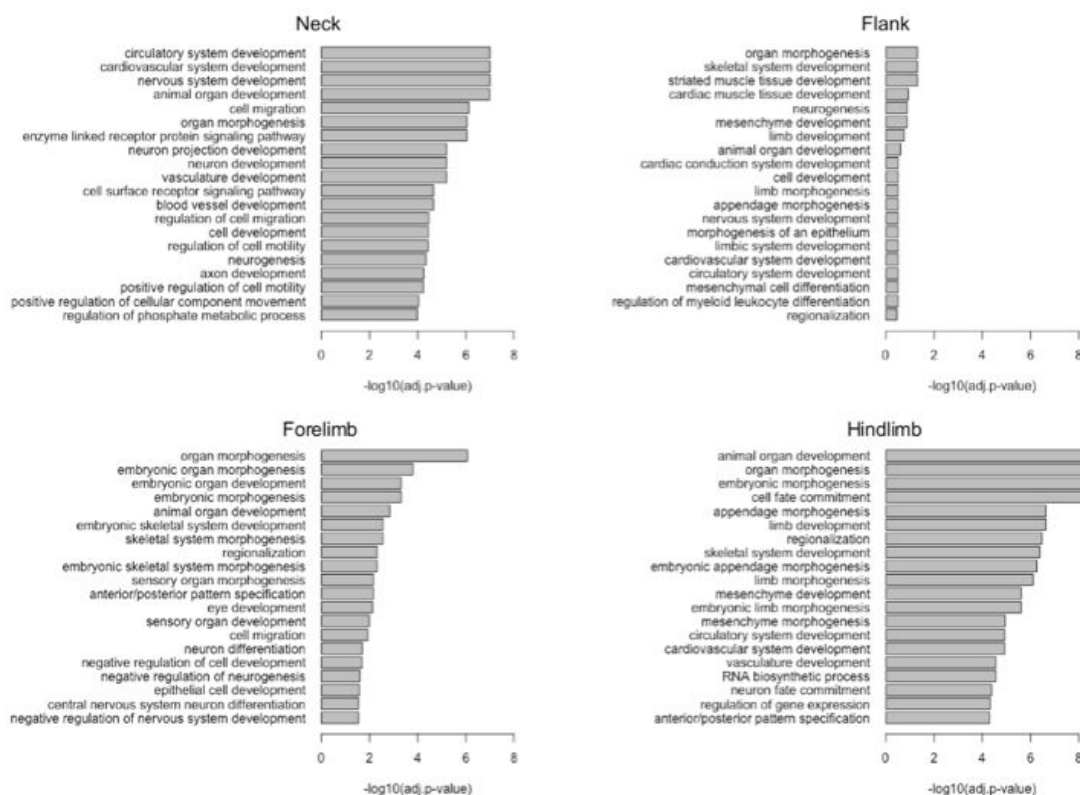


図 2. 頸部(Neck)、前肢部(Forelimb)、胸腹部(Flank)、および後肢部(Hindlimb)LPM において特異的に発現する遺伝子群のエンリッチメント解析の結果。

#### 引用文献

- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*. 14:417-419
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15:550
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 4(1):44-57

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------