

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06651

研究課題名(和文) ホメオボックスコードによる哺乳類の異形歯性を制御するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Homeobox code-mediated regulatory mechanisms of mammalian heterodonty

研究代表者

若松 義雄 (Wakamatsu, Yoshio)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60311560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の異形歯性を制御するMsx1遺伝子の顎原基での発現制御について解析した。ニワトリ胚顎原基でMsx1プロモーターと相互作用する配列を4C-seqによって網羅的に抽出、そのうち動物種間で保存されている配列についてGFPレポーターを作成、ニワトリ胚に導入して活性を調べた。その結果、鼻隆起や上下顎原基のエンハンサーを複数同定でき、顎原基でのMsx1の発現は複数のエンハンサーの組み合わせによることがわかった。また、マウスを用いた同様の解析の結果、哺乳類および有胎盤類特異的なエンハンサーの存在が示唆された。哺乳類の進化における異形歯性の発達に伴い、Msx1の発現制御が変化したと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異形歯性の制御機構を明らかにすることは哺乳類の進化を理解するために重要であるが、本研究により哺乳類の進化過程でおきたMsx1遺伝子の発現制御の変化を捉えることができたのは大きな前進である。また、4C-seqという次世代シーケンス技術を用いた最新の解析手法を導入してより網羅的にMsx1遺伝子の組織特異的なエンハンサー候補配列を抽出することに成功し、これまでの手法より効率的なエンハンサーの同定につながったことは、遺伝子発現制御の研究分野において大きく貢献したと考えられる。Msx1遺伝子の異常はヒトの部分性無歯症の原因であり、本研究は医学的観点からも重要な情報を提供したと言えるだろう。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the regulation of Msx1 gene in the jaw primordium, as Msx1 is important for the establishment of mammalian heterodonty. I identified genomic sequences interacting with the Msx1 promoter region in chicken jaw primordium by 4C-seq analysis. Among such sequences, the ones highly conserved among vertebrate species were isolated, and GFP reporter genes were constructed. The enhancer activities of those reporters were tested in chicken embryos, and I have identified front-nasal, maxillary, and mandibular enhancers, suggesting that the Msx1 expression in the jaw primordium is established by a combination of distinct enhancer elements. I also performed similar analyses with mouse tissues, and found some mammal-specific and placental mammal-specific enhancers. These results indicate that, during mammalian evolution, the regulatory mechanisms of Msx1 expression have been modified to achieve the heterodonty.

研究分野：発生学

キーワード：異形歯性 歯 発生 進化 哺乳類 Msx1 エンハンサー 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む哺乳類が祖先の単弓類から獣弓類を経て進化してくる過程では、顎の先端部から基部の軸に沿って切歯、犬歯、前臼歯、臼歯という形態や機能の異なる歯の分化、すなわち「異形歯性」の獲得が進んだ。また、これらの歯の形態をさらに変化させて、様々な食物を利用し多様な環境に適応できるようになった。したがって、異形歯性は現在の哺乳類の繁栄に大きく貢献していると考えられる。一方、様々な歯の形態がどのようにして作られるのかはほとんどわかっていない。他方、各歯のタイプの数と生える位置は種によって決まっている。これまでの研究から、*Alx3*、*Msx1*、*BarX1*等のホメオボックス型転写因子をコードする遺伝子が顎原基の間充織において先端部-基部軸に沿って異なる領域に発現しており、特定の歯が生える顎の領域を規定しているとされ、ホメオボックスコードと呼ばれる^①。このモデルを構築するために用いられたデータのほとんどはマウスを材料とした研究によるものだが、マウスは前臼歯や犬歯が無い特殊な歯式を持っており、このモデルがヒトのように全てのタイプの歯を持つ哺乳類にあてはまるか確かめるためには、そのような哺乳類の胚を解析する必要がある。

これに関して申請者は、全てのタイプの歯を持つオポッサムやフェレットとマウスの顎原基の発生について比較研究をおこない、全てのタイプの歯を持つ場合のホメオボックスコードを明らかにするとともに、マウスではそれが変化していることを示した^② (先行研究課題：科学研究費・基盤 (C) 課題番号 26440127)。しかし、全てのタイプの歯を持つ哺乳類でこれらのホメオボックス遺伝子がどのような制御を受け、またマウスでは異なる発現パターンを示すのか、これらのホメオボックス遺伝子の下流でどのような遺伝子が機能して異なる歯の形態を生み出すのかについては、ほとんどわかっていない。これらの背景から、本研究課題「ホメオボックスコードによる哺乳類の異形歯性を制御するメカニズムの解明」を立案した。

2. 研究の目的

本研究課題は、顎原基における異形歯性を司るホメオボックスコードがどのようにして成立し、それがどのような下流遺伝子を支配して異なる形態の歯を作るために作用するのか、そして生物種間の歯式の多様性形成にどう貢献しているのか明らかにすることを大きな目的とした。より具体的には、ホメオボックスコードの1つである *Msx1* 遺伝子が受ける発現制御に着目した。その理由の1つとして、フェレットやオポッサムといった全ての歯のタイプを持っている動物では *Msx1* 遺伝子の下顎原基における発現領域が広く、*BarX1* 遺伝子と同時に発現する領域で前臼歯の位置を規定しているのに対し、マウスでは発現領域が狭く *BarX1* 遺伝子と同時に発現する領域がほとんどないことから、*Msx1* 遺伝子の発現制御の違いが種間の歯式の違いを作り出している可能性が考えられたことによる^②。また、*MSX1* 遺伝子に変異のある家系では前臼歯や犬歯が失われることがわかっており^③、その発生機序の理解につながると考えられたことも、*Msx1* 遺伝子の制御に着目した理由である。

3. 研究の方法

当初、本研究の計画時には、顎原基における *Msx1* 遺伝子が受ける発現制御や *Msx1* の下流で働く遺伝子の同定を課題としたが、次世代シーケンシング技術を用いた最新の研究手法を取り入れるよう計画を変更したため、*Msx1* 遺伝子が受ける発現制御、とりわけ顎原基エンハンサーの同

定に絞って研究を進めていくこととした。

近年クロマチン構造解析技術が発達してきていることから、ビューポイントとして設定される特定のゲノム領域と相互作用する配列を網羅的に同定する手法として、4C-seq 法^④を導入した。これによって、*Msx1* 遺伝子のプロモーター部分に相互作用するゲノム配列として、エンハンサー候補配列を同定する。まず、材料の入手が容易なニワトリ胚から上顎隆起および下顎突起を取り出し、酵素処理によって間充織細胞のみを単離する。その細胞核より *Msx1* 遺伝子プロモーター領域に相互作用しているゲノム配列を選択的に増幅、次世代シーケンスにより増幅された DNA 断片の塩基配列を決定して、ゲノムデータ上にアノテーションして、*Msx1* プロモーターに相互作用するゲノム領域を解析した。

4C-seq 法ではビューポイントの近傍に位置する配列が全て同定されるため、同定された配列全てがエンハンサーであるとは限らない。そのため、*Msx1* 遺伝子近傍のゲノム配列を動物種間で比較することによって得られる、種間で保存された領域のデータと 4C-seq のデータを組み合わせて、顎原基エンハンサーの可能性が高い配列を絞り込んだ。次にその配列をオポッサムゲノムよりクローニングして GFP レポーター遺伝子を作成、ニワトリ胚に導入して顎原基でのエンハンサー活性を調べた。

動物種間でのエンハンサー活性の違いについて解析するために、マウスの上顎隆起・下顎突起を用いた 4C-seq 解析を行った。また、種間で保存された領域のデータとの比較解析を行うとともに、CHIP-Atlas のデータベースを参照することで、上記の解析から抽出された *Msx1* 遺伝子の顎原基エンハンサーに結合する転写因子を検索した。

4. 研究成果

初めて行う 4C-seq 法はかなり複雑な実験プロセスを含んでいたものの、過去の文献と同様のデータが得られ、また再現性も高かったことから、うまくいったと考えられた (図 1)

。また、得られたシーケンスデータを Integrative Genome Browser (以下 IGV) 上で既存のニワトリゲノム配列にアノテーションして調べることができた。同時に *Msx1* 遺伝子近傍で動物種間で保存されている配列を VISTA 解析して、4C-seq のデータと比較することで、複数のエンハンサー候補配列を抽出することができた。

エンハンサー候補配列の活性を胚体内で検出するために、ニワトリ胚を用いることにした。顎原基の間充織は遺伝子導入が困難であるため、顎原基間充織の由来となる頭部神経堤に遺伝子導入し、顎原基ができるまで発生を進めてアッセイすることにした。遺伝子導入から 3 日後の解析となるが、その間に通常のプラスミド DNA は分解されてしまうことから、導入遺伝子がゲノムに取り込まれるようにトランスポゾンを利用した to12 システムを採用した。エンハンサー候補配列を持つ GFP レポーターを作成し、ニワトリ胚に導入したところ、鼻隆起特異的なものや、上

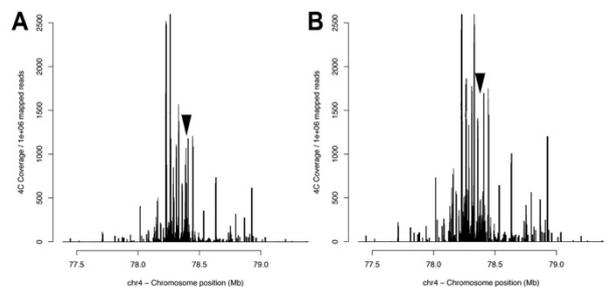


図 1: ニワトリ *Msx1* プロモーターをビューポイント (矢頭) とした 4C-seq のプロット結果。A: 下顎突起、B: 上顎隆起

下顎特異的なもの、下顎に限局したものなど、複数のエンハンサーを同定することができた (図2)。

マウスの組織を用いた 4C-seq もおこない、ニワトリと似た結果が得られた。しかし、マウスの 4C-seq シークエンスデータを IGV 上で既存のマウスゲノム配列にアノテーションするとともに、動物種間で保存されている配列との比較検討をおこなったところ、哺乳類特異的、もしくは有胎盤類特異的な配列が発見された (図3)。また、CHIP-Atlas のデータベースを利用してエンハンサーに結合する転写因子を検索したところ、複数の *Msx1* 遺伝子の顎原基エンハンサーに *Pitx1* が結合することがわかった。*Pitx1* 遺伝子は下顎原基間充織の一部に領域特異的に発現しており、下顎の発生過程で *Msx1* 遺伝子の発現を直接制御している因子であると考えられた。これらの成果の一部について、第 62 回日本先天異常学会 (<https://jts62.jp>) 及び第 128 回日本解剖学会 (<https://www.procomu.jp/anat2023/>) の各シンポジウムにおいて口頭で発表した。

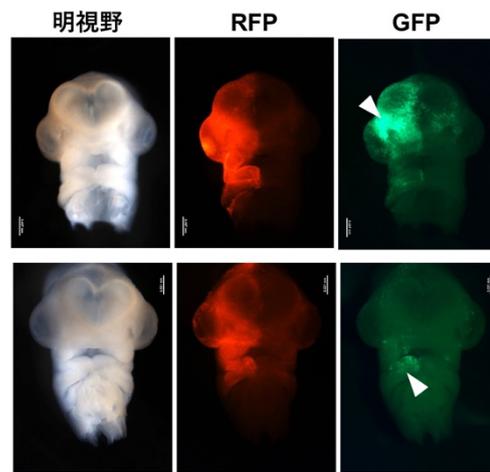


図2：ニワトリ胚を用いたエンハンサー活性の検出。RFPの蛍光は遺伝子導入された領域。GFPの蛍光はエンハンサー活性。上段は鼻隆起に、下段は上下顎に活性が検出された

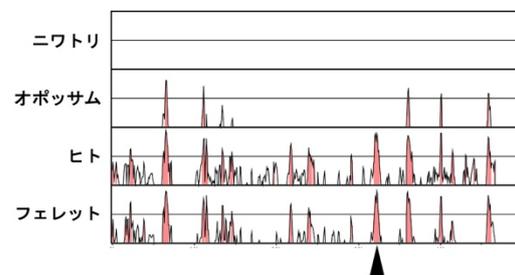


図3：マウス *Msx1* 遺伝子近傍のゲノム配列を他の動物種と比較した VISTA プロット。矢頭はマウスの 4C-seq で強いピークの出た場所を示す。この配列はマウス、ヒト、フェレットといった有胎盤類にのみ保存されている。

引用文献

- ① McCollum, M. & Sharpe, P. T. Evolution and development of teeth. *J. Anat.* **199**, 53-59 (2001).
- ② Wakamatsu, Y., Egawa, S., Terashita, Y., Kawasaki, H., Tamura, K., Suzuki, T. *Sci. Rep.* **9** (1): 12865 (2019)
- ③ Abid, M. F., Simpson, M. A., Petridis, C., Cobourne, M. T. & Sharpe, P. T. *Arch. Oral Biol.* **75**, 8-13 (2017).
- ④ Krijger, P. H. L., Geeven, G., Bianchi, V., Hilvering, C. R. E., de Laat, W. *Methods* **170**, 17-32 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wakamatsu Yoshio, Uchikawa Masanori	4. 巻 63
2. 論文標題 The many faces of Sox2 function in neural crest development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12705	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 若松義雄、金輝、鈴木久仁博
2. 発表標題 Spatio-temporal regulation of Msx1 in the vertebrate jaw primordium
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川貴子、若松義雄、井上-上野由紀子、鈴木久仁博、井上高良、大隅典子
2. 発表標題 有胎盤類特有のzip code配列獲得による放射状グリア細胞内mRNA輸送機構の進化
3. 学会等名 第126回日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川貴子、若松義雄、井上-上野由紀子、鈴木久仁博、井上高良、大隅典子
2. 発表標題 放射状グリア細胞における細胞周期因子Cyclin D2のmRNA輸送機構の解析：有胎盤類の大脳皮質拡大に寄与する可能性
3. 学会等名 日本解剖学会第66回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y., Inoue U, Y., Inoue,T.,Tsunekawa, Y., Matsuzaki, F., Suzuki, K.,Osumi, N.
2. 発表標題 mRNA transport mechanism of a cell cycle regulator Cyclin D2 in neural stem/progenitor cells during corticogenesis.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Osumi, N., Wakamatsu, Y., Inoue U, Y.,Suzuki, K. Inoue,T., Kikkawa, T.
2. 発表標題 Molecular mechanism for basal transport of Cyclin D2 mRNA within highly polarized cells and its evolutionary significance.
3. 学会等名 JSDB Online Trial Meeting 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wakamatsu, Y., Kon, H., Suzuki, K.
2. 発表標題 Spatio-temporal regulation of homeobox genes in the vertebrate jaw primordium
3. 学会等名 53rd annual meeting of JSDB/APDBN (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y., Inoue U, Y., Suzuki, K.,Inoue,T., Osumi, N.
2. 発表標題 Analysis of mRNA transport mechanism of a cell cycle regulator Cyclin D2 in radial glial cells: a possible mechanism for enlargement of the cortex in placental mammal.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------