

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06656

研究課題名(和文)尾の比率を決定・維持する機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of the mechanisms that determine and maintain the tail ratio

研究代表者

竹内 隆 (TAKEUCHI, Takashi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：70197268

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)：ゲノム編集で作製されたHox13変異体イモリは尾長が著しく増加する。多くが未解明である組織サイズ比の決定・維持機構の理解のため、この変異体に注目し、以下の結果を得た。(1)尾長の伸長異常がHox13遺伝子自身の変異によること、特にa13とc13が寄与することを生殖系列変異体の作製により確認した。(2)上記伸長異常は尾椎数の異常増加による。(3)野生型成体の尾端でHox13のすべてのパラログ遺伝子および中胚葉前駆細胞や神経前駆細胞のマーカー遺伝子が発現する。これらの成果からHox13が尾端の前駆体細胞の分化・増殖を制御し、尾長比が一定になるよう調節していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトも含めてほとんどの動物の組織の比率はほぼ一定になるように制御されている。その破綻は健全な生命活動を困難にする。また、この制御は様々な動物が環境に適応しながら生存するために必須である。しかし、その仕組みはほとんど解明されていない。遺伝学的にこの課題を困難にしてきた理由の一つは組織比率が異常になる変異体がほとんど発見されていないことにある。本研究はまさにその変異体に注目し、その制御機構の一端を解明した。本研究の発展により様々な組織の比率が一定になる制御機構の一般原理の解明が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Hox13 mutant newts produced by genome editing show a marked increase in tail length. To understand the mechanisms that determine and maintain tissue size ratios, which largely remain unknown, we focused on this mutant and obtained the following results. (1) We confirmed that the abnormal tail length is caused by mutation of the Hox13 genes themselves, especially a13 and c13, by generating germline mutants. (2) The abnormal tail length is caused by an abnormal increase in the number of caudal vertebrae. (3) All paralogous genes of Hox13 and marker genes of mesodermal progenitors and neural progenitors are expressed at the tail tips of wild-type adults. These results suggest that Hox13 regulates the differentiation and proliferation of progenitor cells in the tail tips and regulates the tail length ratio to be constant.

研究分野：発生生物学

キーワード：組織比率 尾 イベリアトゲイモリ ゲノム編集 Hox13

1. 研究開始当初の背景

動物の組織や四肢、尾などのサイズはそれぞれの種固有の比率をもつ。また、再生できる動物では再生過程でもこの比率が再獲得される。しかし、どのようなしくみでこの比率が決まり、維持され、そして再獲得されるかについてはほとんどわかっていない。私たちは著しい再生能力をもつが、これまでモデル動物化されていなかったイモリについて分子遺伝学の実験系を立ち上げ、極めて高効率かつ多重に遺伝子破壊ができるゲノム編集システムを構築した。このシステムを利用して、*Hox13* パラログ遺伝子を多重に破壊したところ、著しい尾の伸長（野生型の2倍以上）を見出した。この結果は、*Hox13* が尾の伸長を抑制することでイモリ固有の尾の比率の決定や維持に強く関与することを示している。したがって、この変異体の解析により組織比率の決定や維持機構の一端を解明することが期待できる。

2. 研究の目的

Hox13 遺伝子は真に尾長比率を制御するのか、また、するならば *Hox13* パラログ遺伝子のうちどれが、いつ、どこで、どのようなしくみで尾長比率を制御するのかを明らかにすること。

3. 研究の方法

- (1) 上記ゲノム編集で得られた *Hox13* 変異体の尾の異常伸長をより長期に観測し、成長過程における変化を詳細に調べる。
- (2) *Hox13* 変異体の尾の表現型が真に *Hox13* 自体の変異によること（オフターゲットによるものではないこと）を示すために交配を繰り返し、生殖系列変異体を得て、表現型解析を行う。同時に *Hox13* パラログ遺伝子のうち、尾の比率維持への貢献度を明らかにする。
- (3) マイクロCTによる骨構造解析により、*Hox13* 変異体の尾の異常伸長の原因を明らかにする。このため、様々な発生、成長ステージで尾椎数とその一個一個のサイズを測定し、野生型と比較する。
- (4) 野生型成体の尾端で *Hox13* パラログ遺伝子のうちどの遺伝子が発現しているか、また、尾椎や脊髄の形成に関与すると予想される中胚葉前駆細胞や神経幹細胞の分子マーカーの発現を RT-PCR で解析する。一方、*Hoxa13* 遺伝子内に GFP 遺伝子をノックインした個体を作製し、個体内で *Hoxa13* 遺伝子の発現をモニターする。
- (5) RNAseq により野生型と *Hox13* 変異体間の遺伝子発現プロファイルを比較し、増殖や分化状態の変化を明らかにする。また、変異体で活性化もしくは抑制化されている遺伝子を特定する。

4. 研究成果

研究の主な成果

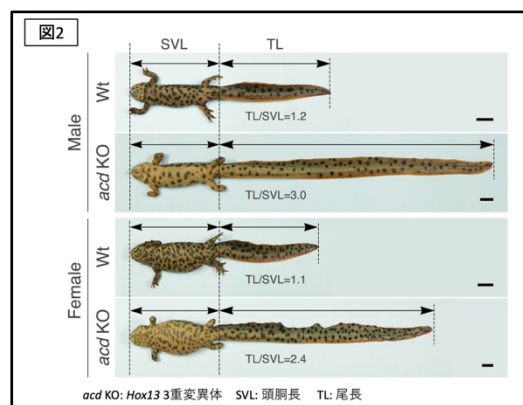
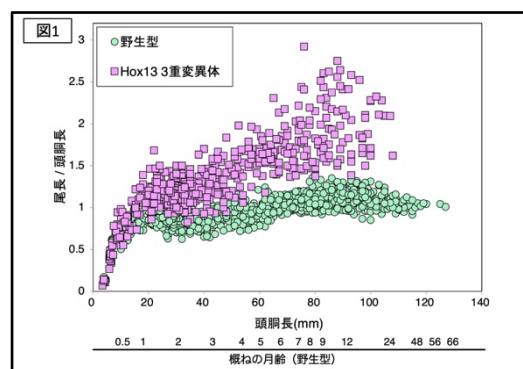
(1) 野生型およびゲノム編集によって作製された *Hoxa13*, *c13*, *d13* 三重変異体 (F0、以下変異体) を長期飼育 (3 年齢以上) し、様々な成長ステージで尾長を観測してきた (図 1)。測定した個体数とデータ数は、野生型および変異体でそれぞれ、324 匹、1083 点および 110 匹、585 点である。その結果、以下が判明した。

- ① 野生型と変異体間で尾長比に差が生じ始めるのは発生がほぼ終了してからである (図 1)。
- ② 野生型および変異体の頭胴長および野生型の尾長の増加は 2 年齢以降、ほぼ停止していた。しかし、変異体の尾長は増加し続け、最大で頭胴長の約 3 倍に達した (野生型では最大 1.3 倍) (図 1, 2)。

変異体の尾長は依然、緩やかに増加し続けているので、この先も計測を続けたい。

(2) オフターゲット効果やモザイクによる影響を排除するため、上記三重変異体 (F0) と野生型イモリを交配し、*Hoxa13*, *c13*, *d13* 三重ヘテロ生殖系列変異体を得た。このヘテロイモリ同士の交配により、様々な遺伝子型のイモリを得て、尾長の経過観察を行った。その結果、以下を見出した。

- ① *Hoxa13*, *c13* の二重変異体 (*ac*-/-) は



Hoxa13, *c13*, *d13* 三重変異体 (*acd*^{-/-}) とほぼ同様に、また、ゲノム編集によって作製された *Hoxa13*, *c13*, *d13* 三重変異体 (F0) と同等に、最高の尾長伸長を認めた (図3)。

- ② *Hoxa13*, *d13* の二重変異体 (*ad*^{-/-}) の尾長は上記2種類の遺伝子型個体よりも小さいが、野生型よりも大きかった (図3)。
 - ③ *Hoxc13*, *d13* (*cd*^{-/-}) の二重変異体は野生型と変わらなかった (図3)。
 - ④ *Hoxa13*, *c13* (*a*^{-/-}, *c*^{-/-}) の単独変異体は野生型よりやや大きく、*Hoxd13* (*d*^{-/-}) のそれは野生型と変わらなかった (図3)。
- ①-④の結果から尾長制御の貢献度は *a13*, *c13*, *d13* の順で高いと結論づけた。また、上記の結果はゲノム編集による様々な変異体の結果と概ね一致した。

以上から、ゲノム編集変異体の尾長異常は *Hox13* 自体の変異によることが明確に示され、かつ各パラログの貢献度が示された。

(3) 野生型および *Hoxa13*, *c13*, *d13* 三重変異体 (以下、変異体)、それぞれ20-30個体について、マイクロCTによる骨構造解析を行い (基礎生物学研究所との共同利用研究)、以下を明らかにした。

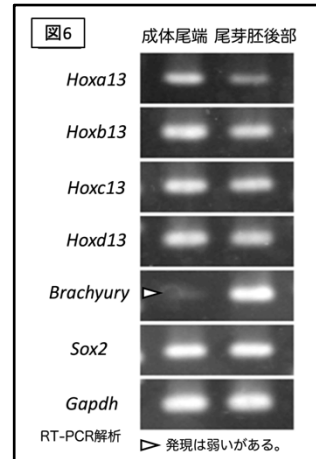
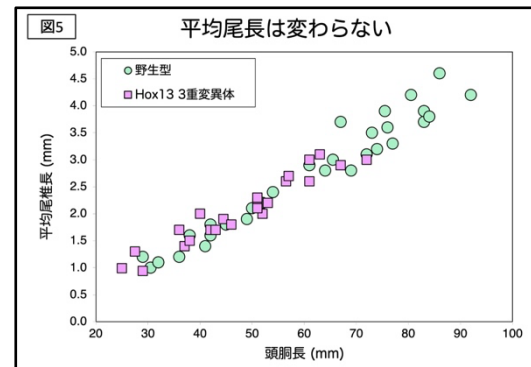
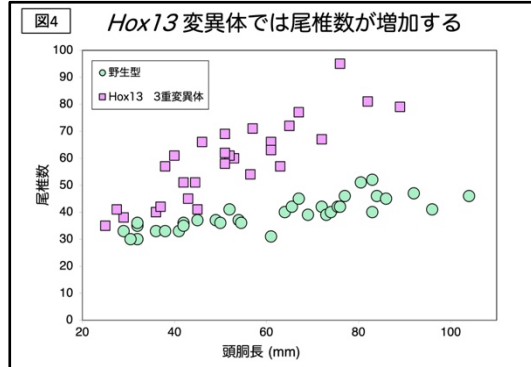
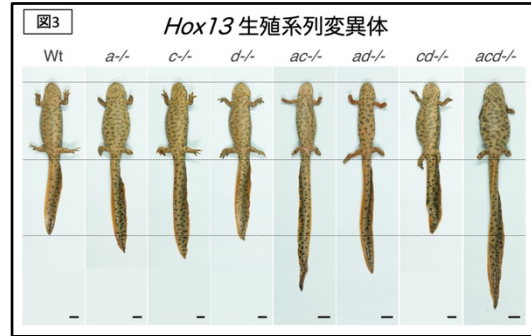
- ① 変異体は野生型に比較し、尾椎数が顕著に増加していた。その増加は主に発生後の成長過程で観察された (図4)。
- ② 上記は *Hoxa13*, *c13*, *d13* の生殖系列三重変異体でも同様であることが確認できた。
- ③ 尾を構成する全ての尾椎の前後軸方向のサイズの平均は等しい頭胴長の野生型と変異体で大きな違いはなかった (図5)。

以上から、*Hox13* 変異体の尾長伸長異常の原因は、発生後の尾椎数の顕著な増加によることが示された。

(4) 成体野生型尾端からRNAを抽出し、RT-PCRによる遺伝子発現パターンを解析したところ、*Hox13* の全てのパラログ遺伝子の発現が検出された。また、中胚葉前駆細胞のマーカである *Brachyury*、神経幹細胞のマーカである *Sox2* のいずれもが検出された (図6)。これらは本来、発生胚期に発現するとされる遺伝子であるが、成体尾端でも発現されている。また、GFP遺伝子を *Hoxa13* 遺伝子内にノックインした結果、幼生尾端で発現が示された (図7)。今後、成体尾端での発現パターンを確認する。

以上から、*Hox13* 変異体の尾長伸長異常は成体尾端での同遺伝子欠損による直接的な効果によるものであること、また、中胚葉前駆細胞や神経幹細胞が尾端に存在すること、同遺伝子がこれら細胞の分化、増殖を制御し、尾端で成体の尾椎や脊髄の形成を制御していることが示唆された。

(5) 網羅的遺伝子発現プロファイルの比較のため、発生後の野生型およびゲノム編集 *Hoxa13*, *c13*, *d13* 三重変異体、生殖系列 *Hoxa13*, *c13*, *d13* 三重変異体の尾端からRNAを精製した。また、変異体の尾端の状況と尾再生芽での状況を比較するため、さらに野生型尾再生芽からもRNAを精製した。これらで現在、RNAseq解析を行なっているところである。



得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

(1) 組織比率の決定・維持機構の仕組みの解明は非常に遅れている。また、組織比率に異常をきたす動物変異体はほとんど知られていない。そのような中、まさに該当する変異体を発見、着目し、異常をきたす原因解明を進めた本研究は類がなく、意義は高い。

(2) 発生過程の体軸や四肢の軸における特異化に重要な機能をもつ *Hox* 遺伝子が成体の尾長率維持に寄与するという全く新しい知見、および、その仕組みの一端を示した。これは発生過程で形態形成に働く遺伝子が成体になっても組織の維持や形成にも生涯関与し続ける可能性を示しており、極めて興味深い。

今後の展望

(1) 組織比率が決定・維持される機構のさらなる理解のために、イモリにおいて *Hox13* 遺伝子がどのように尾長率を維持しているのかをより詳細に解明していきたい。さらにその仕組みをもとに動物がどのように全身の中で尾の長さを決定し、維持するのか、その機構や原理に迫りたい。これはおそらく全身性のシグナルと尾端との応答があるに違いない。

(2) (1)で解明される原理はイモリや尾にとどまらず、様々な種の様々な組織の比率の決定・維持機構に関わることが大いに期待できる。

(3) *Hox13* 変異体で認められた尾長伸長異常と尾再生の関係にも興味をもたれる。尾再生芽と *Hox13* 変異体尾端のいずれでも類似した尾椎追加機構が起動している可能性も考えられる。この可能性を検証するため、両者の遺伝子発現プロファイルを比較する RNAseq を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 1. Matsubara, H., Kawasumi, A., Nara, S., Yokoyama, H., Hayashi, T., Takeuchi, T., and Yokoyama, H. | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Appendage-restricted gene induction using a heated agarose gel for studying regeneration in metamorphosed <i>Xenopus laevis</i> and <i>Pleurodeles waltl</i> . | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Dev. Growth Differ. | 6. 最初と最後の頁 86-93 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12841. Epub 2023 Feb 16. | 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 Kyakuno Mitsuki, Nakamori Rei, Tazawa Ichiro, Uemasu Hitoshi, Namba Noriyuki, Tsunekawa Naoki, Noce Toshiaki, Satoh Yukio, Takeuchi Takashi, Hayashi Toshinori | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 Photoperiod independent testicular development in the model newt <i>Pleurodeles waltl</i> | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Development, Growth and Differentiation | 6. 最初と最後の頁 277 ~ 284 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12738 | 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 Uemasu Hitoshi, Ikuta Hiromi, Igawa Takeshi, Suzuki Makoto, Kyakuno Mitsuki, Iwata Yui, Tazawa Ichiro, Ogino Hajime, Satoh Yukio, Takeuchi Takashi, Namba Noriyuki, Hayashi Toshinori | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Cryo injury procedure induced cardiac regeneration shows unique gene expression profiles in the newt <i>Pleurodeles waltl</i> | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Developmental Dynamics | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.450 | 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 Takeuchi Takashi, Matsubara Haruka, Minamitani Fumina, Satoh Yukio, Tozawa Sayo, Moriyama Tomoki, Maruyama Kohei, Suzuki Ken-ichi T., Shigenobu Shuji, Inoue Takeshi, Tamura Koji, Agata Kiyokazu, Hayashi Toshinori | 4. 巻 149 |
| 2. 論文標題 Newt <i>Hoxa13</i> has an essential and predominant role in digit formation during development and regeneration | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Development | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200282 | 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 Kazuki, Y., 32名, Takeuchi, T., Oshimura, M., Reeves. R. H. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 A non-mosaic transchromosomal mouse model of Down syndrome carrying the long arm of human chromosome 21. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e56223 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.56223 | 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22件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 8件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takeuchi, T., Matsubara, H., Satoh, Y., Tozawa, S., and Hayashi, T. |
| 2. 発表標題 Multiple disruption of newt Hox13 paralogs revealed that Hoxa13 has an essential and predominant role in digit formation during limb development and regeneration |
| 3. 学会等名 Salamander Meeting 2022 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashi Takeuchi, Haruka Matsubara, Fumina Minamitani, Yukio Satoh, Sayo Tozawa, Tomoki Moriyama, Kohei Maruyama, Ken-ichi T. Suzuki, Shuji Shigenobu, Takeshi Inoue, Koji Tamura, Kiyokazu Agata, Toshinori Hayashi |
| 2. 発表標題 Newt Hoxa13 has an essential and predominant role in digit formation during development and regeneration |
| 3. 学会等名 第55回発生生物学会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Haruka Matsubara, Takashi Takeuchi |
| 2. 発表標題 Tbx3 differently regulate digits morphogenesis of the fore- and hindlimbs in the newt (<i>Pleurodeles waltl</i>) |
| 3. 学会等名 第55回発生生物学会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sayo Tozawa, Haruka Matsubara, Fumina Minamitani, Yukio Satoh, Toshinori Hayashi, Takashi Takeuchi |
| 2. 発表標題 The mechanism of hindlimb defect in Hox13 mutant newts |
| 3. 学会等名 第55回発生生物学会（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mai Takehara, Mitsuki Kyakuno, Yukio Sato, Takashi Takeuchi, Ichiro Tazawa, Nobuaki Furuno, Toshinori Hayashi |
| 2. 発表標題 Investigation of the initiation mechanism of testicular regeneration in the newt |
| 3. 学会等名 第55回発生生物学会（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuta Nakao, Ichiro Tazawa, Nobuaki Furuno, Takashi Takeuchi, Toshinori Hayashi |
| 2. 発表標題 Analysis of the progression of cell proliferation in CDK1 knockout newts |
| 3. 学会等名 第55回発生生物学会（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiromi Ikuta, Hitoshi Uemasu, Shouhei Azuma, Takeshi Igawa, Ichiro Tazawa ^{1,2} , Nobuaki Huru no, Noriyuki Namba, Hajime Ogino, Takashi Takeuchi, Toshinori Hayashi |
| 2. 発表標題 Function of cyclin D1 in the regulation of the cell cycle in newts |
| 3. 学会等名 第55回発生生物学会（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 松原遼、竹内隆 |
| 2. 発表標題 イモリ指形態とShhシグナルの関係性 |
| 3. 学会等名 第93回動物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 裏川浩平、松原遼、阿部玄武、竹内隆 |
| 2. 発表標題 イモリHox9およびHox10の四肢形成における機能 |
| 3. 学会等名 第93回動物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹内隆、松原遼、戸澤紗代、伊藤優、裏川浩平、明日香智絵、林利憲 |
| 2. 発表標題 イペリアトゲイモリの発生や再生におけるHox遺伝子の機能解析 |
| 3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 裏川浩平、松原遼、阿部玄武、竹内隆 |
| 2. 発表標題 イペリアトゲイモリの四肢形成におけるHox9/10遺伝子の機能解析 |
| 3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊藤優、松原遼、戸澤紗代、裏川浩平、明日香智絵、林利憲、竹内隆 |
| 2. 発表標題 イペリアトゲイモリの四肢形成におけるHox11-13の機能について |
| 3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 戸澤紗代、松原遼、南谷史奈、佐藤幸夫、林利憲、竹内隆 |
| 2. 発表標題 Hox13変異イモリにおける後肢欠損の仕組みについて |
| 3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 阿南有紗、松原遼、阿部玄武、竹内隆 |
| 2. 発表標題 四肢の切断面より基部領域で除去した骨格が再生する |
| 3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiromi Ikuta, Hitoshi Uemasu, Shouhei Azuma, Takeshi Igawa, Ichiro Tazawa, Nobuaki Huru no, Noriyuki Namba, Hajime Ogino, Takashi Takeuchi, Toshinori Hayashi |
| 2. 発表標題 Function of cyclin D1 in the regulation of the cell cycle in newts |
| 3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuta Nakao, Ichiro Tazawa, Nobuaki Furuno, Takashi Takeuchi , Toshinori Hayashi |
| 2. 発表標題 CDK1 ノックアウトイモリにおける細胞増殖の進行の解析 |
| 3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mai Takehara, Mitsuki Kyakuno, Yukio Sato, Takashi Takeuchi, Ichiro Tazawa, Nobuaki Furuno, Toshinori Hayashi |
| 2. 発表標題 イモリの精巢再生を開始させる機構の研究 |
| 3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Haruka Matsubara and Takashi Takeuchi |
| 2. 発表標題 Changes in the pattern of genes expression could provide the fore- and hindlimb digital pattern of the newt (<i>Pleurodeles waltl</i>) |
| 3. 学会等名 日本発生生物学会年会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 竹原 舞、客野 瑞月、佐藤 幸雄、竹内 隆、田澤 一朗、古野 伸明、林 利憲 |
| 2. 発表標題 イモリにおける精巢再生機構の解明 |
| 3. 学会等名 日本動物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 戸澤 紗代、南谷 史菜、林 利憲、松原 遼、竹内 隆 |
| 2. 発表標題 イモリ後肢発生におけるHox13 遺伝子の機能解析 |
| 3. 学会等名 日本動物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松原 遼、竹内 隆 |
| 2. 発表標題 イモリ四肢発生における前後軸形成遺伝子の指形態形成への機能 |
| 3. 学会等名 日本動物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 竹内 隆、松原 遼、南谷 史菜、佐藤 幸夫、戸澤 紗代、林 利憲 |
| 2. 発表標題 イベリアトゲイモリの四肢発生・再生におけるHox13遺伝子の機能解析 |
| 3. 学会等名 第3回 再生学異分野融合研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/lifesciences/about/3319/3335/23806.html>
https://www.med.tottori-u.ac.jp/lifesciences/research/staff_takeuchi.html

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 |
|---------|---------|