

## 研究題目 仙椎-後肢ユニットの位置決定を行う GDF11 の作用メカニズムの研究

### 研究組織

研究代表者：鈴木孝幸（名古屋大学大学院生命農学研究科）

共同研究者：竹本龍也（徳島大学先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1] 本研究の目的・概要

脊椎動物において、体の前後軸パターンは発生中に将来の脊椎骨となる体節が分節により周期的に頭側から1つずつ形成されることで形として現れる。私たちの手足の原器である肢芽（しが）は、体の前後軸に沿って種に固有な特定の体節レベルの側板中胚葉に正確に形成される。このため、これまで肢芽の発生する場所は体節の発生と何らかの関係がある可能性が強く示唆されてきたが、両者の直接的な関係性は不明であった。我々は近年、体節の原器である中軸中胚葉の後端に発現する TGF- $\beta$ スーパーファミリーの分泌因子である GDF11 が、隣接する側板中胚葉に直接作用し、下流で後肢形成に必須な遺伝子の発現を誘導しながら種に固有の体節レベルに後肢を誘導することを発見した。驚くべき事に後肢の位置が体の後側にある動物（エミューやシマヘビなど）ほど *Gdf11* の発現開始タイミングが遅く、逆に後肢の位置が体の前側にある動物（カエルやカメなど）ほど *Gdf11* の発現開始タイミングが早いことが判明した。この結果は、一見複雑かと思われる四肢動物の後肢の位置の多様性が、発生期における *Gdf11* の発現開始タイミングの違いで説明出来ることを意味している (Matsubara et al., Nature)。

我々は 2017 年度における竹本博士との共同利用研究において、後肢の位置決定に関わることが判明しつつあった、*Gdf11* 遺伝子のエンハンサー候補領域 (61bp) のノックアウトマウスを作製して頂き、名古屋大学にてその発生学的役割を解析した。その結果、*Gdf11* 遺伝子のノックアウトマウスは、仙椎と後肢の位置が脊椎骨 6 個分体の後方にシフトすることが観察さ

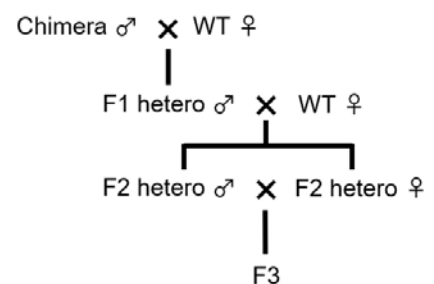
れたが、エンハンサー候補領域のノックアウトマウスは仙椎と後肢の位置が脊椎骨 1 個分体の後方にシフトすることが分かった。この結果は、欠損させたエンハンサー候補領域が仙椎と後肢の位置に必須ではあるが、*Gdf11* のノックアウトマウスの表現型を再現することは出来なかったため、仙椎と後肢の位置を決定する *Gdf11* 遺伝子の発現を誘導する他のエンハンサー領域が存在することを示していた。

そこで今回我々は、マウスの *Gdf11* 遺伝子座周辺で新たに発見した人からヘビに至るまで配列が保存されている新たなエンハンサー候補領域 (1727bp) のノックアウトマウス系統を竹本博士に作製頂き、名古屋大学でノックアウトマウス胚を発生学的に解析した。2017 年度に作製したエンハンサー候補領域 (61bp) のノックアウトマウスよりも仙椎と後肢の位置がより体の後側にシフトすることを期待した。

#### [1-2] 研究の方法・経過

*Gdf11* エンハンサー候補領域 (1727bp) を欠損させたキメラマウス (chimera) を竹本博士に作製していただき、現在名古屋大学で飼育している。

作製していただいたキメラマウスのオス 1 匹と野生型 (BDF1) のメスとかけ合わせ、F1 を作出した。ライン化するために、この F1 からヘテロのオスを 1 匹選び (F1 hetero)、このオスを野生型 (BDF1) のメスとかけ合わせ、F2 を作出した。現在、作出した F2 のうちヘテロのオスと

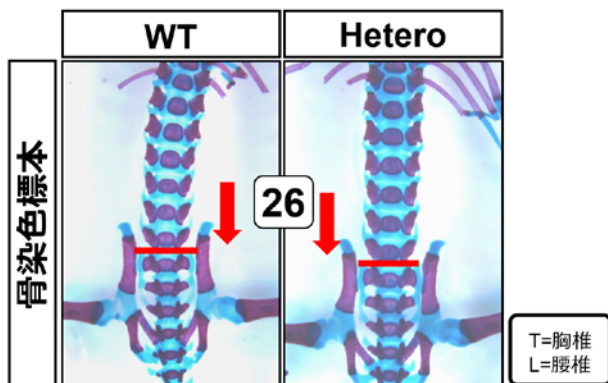


メス(F2 hetero)をかけ合わせ、*Gdf11* エンハンサー候補領域(1727bp)をホモで欠損したマウスを取得するべく、F3 を作出しているところである。

## 【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

F2 ヘテロマウス同士をかけ合わせて作出した F3 は現在まで野生型(n=1)またはヘテロ(n=6)の個体のみ生まれていた。野生型とヘテロマウスの椎骨の表現型を観察したところ、どちらも第一頸椎から第一仙椎までの椎骨数は 26 個であった(下図)。このことから *Gdf11* エンハンサー候補領域(1727bp)をヘテロで欠損しただけでは椎骨のパターニングに変化は現れず、仙椎後肢ユニットの位置は変化しないことが明らかとなった。またヘテロ同士をかけ合わせて、ホモのマウスが生まれにくいという表現型は *Gdf11* の遺伝子標的破壊マウスの表現型と同じであり、この領域が *Gdf11* の発現制御に大きな役割を担っていることが推測される。



[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

2017 年度に作成して頂いた *Gdf11* 遺伝子のエンハンサー候補領域 (61bp) のノックアウトマウスは、ホモ個体は致死ではなく、第一頸椎から第一仙椎までの椎骨数は 27 個であった。今回の研究で、新たな *Gdf11* 遺伝子のエンハンサー候補領域 (1727bp) のノックアウトマウスは胎生致死である事が判明した。*Gdf11* 遺伝子のノックアウトマウスも胎生致死となることから、現在解析している F3 マウスは *Gdf11* 遺伝子のノックアウトマウスと同じく後肢の位置がより体の後側にずれている可能性が考えられる。今後は F3 のホモ個体の数を増やし、*Gdf11* 遺伝子の発現が観察されるのかを *in situ* hybridization 法を用いて調べる必要がある。*Gdf11* 遺伝子の発現が観察されない場合は、後肢の位置を決定するエンハンサー配列が機能的に同定出来たことになる。

## 【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

1. Identification and functional analysis of *Gdf11* enhancer that determines the hindlimb position, Seiji Saito, Utsugi Kanazawa, Nobuyuki Hibino, Tatsuya Takemoto, Yoichi Matsuda, Atsushi Kuroiwa, Takayuki Suzuki, 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 大阪 (2019)
2. 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、Takayuki Suzuki, 第92回日本生化学会大会、横浜 (2019)
3. Molecular mechanisms that explain positional diversity of hindlimb position during vertebrate embryogenesis, Takayuki Suzuki, 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 大阪 (2019)

[3-3] 成果資料等

左の図 (ヘテロマウスの骨染色の写真)

## 【4】今後の課題等

これまで我々は、*Gdf11* 遺伝子のエンハンサー候補配列を探索するために、進化的保存された配列を頼りに候補配列を同定し、マウスを用いてその配列をノックアウトすることでその表現型を解析し、*Gdf11* 遺伝子のノックアウトマウスと同じ骨格パターンになるのかどうか検討を行って来た。

しかしながら、近年の他のエンハンサーの研究で、注目している遺伝子の近傍ではなく、数十 kb 以上離れたところにエンハンサーが存在することも報告されている。

そこで今後は、ATAC-seq などを用いて広範囲にエンハンサーの候補領域を選定し、種を越えて保存されている領域の情報と一緒に効率的にエンハンサー候補領域を選定して行く必要があると考えている。