

## 研究題目 仙椎-後肢ユニットの位置決定を行う *Gdf11* の種特異的なエンハンサー配列の機能解析

### 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）

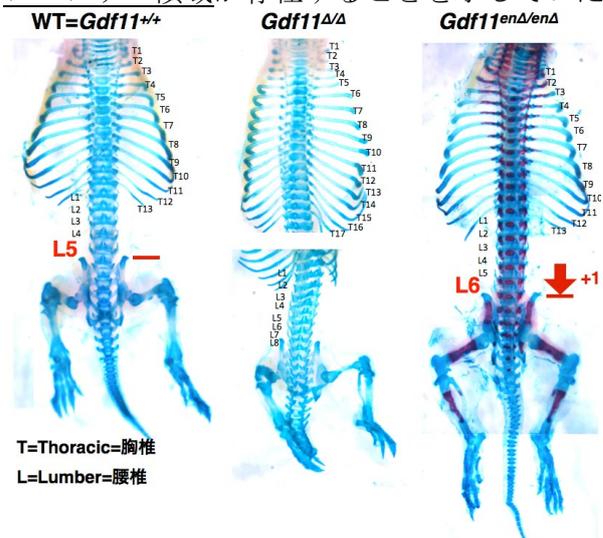
### 【1】研究の概要

#### [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、これまで竹本龍也先生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 (b 領域) 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（下図の中央）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、b 領域のエンハンサー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（下図の右）。また、ノックアウトマウスにおいて内因性の *Gdf11* の発現は有意に低下していたことから、b 領域は生体において *Gdf11* のエンハンサーとして機能することが明らかとなった。しかしながら、この結果は、b 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。



そこでマウス胚の *Gdf11* が発現している領域を採取し、ATAC-seq を用いてオープンクロマチン領域を同定した結果、*Gdf11* の隣の遺伝子 (SARNP) のイントロンの中にピークが検

出された。さらに、ChIAPET シグナルとの比較によりこの領域 (SARNP 領域) は *Gdf11* 遺伝子を含むクロマチン領域内の、プロモーターエンハンサーインターラクシオンが想定される領域に含まれている事が判明した。この領域は他の四肢動物種との配列の保存性がないことから、マウス特異的な *Gdf11* のエンハンサー候補配列にある可能性が高いと考えた。そこで、この配列 (SARNP 領域) を tk-EGFP のベクターの上流に挿入し、ニワトリ胚を用いたレポーターアッセイを行った結果、*Gdf11* が発現する領域で EGFP の発現が観察された。

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新たなエンハンサー候補領域 (SARNP 領域) 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。

#### [1-2] 研究の方法・経過

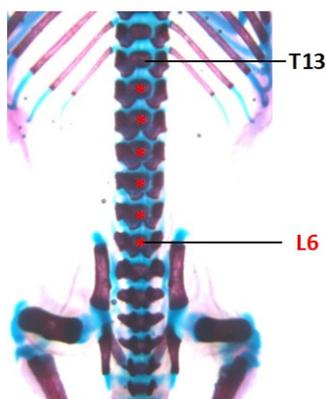
*Gdf11* エンハンサー候補領域 (SARNP 領域) を欠損させたキメラマウス (chimera) を竹本博士に作製していただき、1 2 月に名古屋大学に導入して飼育している。

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、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

キメラマウスと野生ヘテロマウス同士を交配して作出した F1 のヘテロマウス (6 個体) を用いて骨染色を行った結果、これまでに作出した b 領域を欠損したホモ個体と同様に、6/6 の確率で腰椎の数が 1 つ増えて 6 個になり、仙椎後肢ユニットの位置が脊椎骨 1 つ分後方にシフトすることが明らかとなった (右図)。この結果から、SARNP 領域は体の前後軸に沿った仙椎後肢ユニットの位置決定に必須の領域であることが明らかとなった。この SARNP 領域を欠損したヘテロ



マウスは、b 領域を欠損させたホモマウスと同様の表現型を示したことから、SARNP 領域を欠損させたホモマウスにおいては、仙椎後肢ユニットの位置がさらにシビアに後側にシフトする可能性が高い。

#### [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、最初に発見した *Gdf11* 遺伝子のエンハンサー領域 (61bp) である b 領域のノックアウトマウスは、RT-qPCR での解析により内因性の *Gdf11* の発現が低下していた。今回新たに仙椎後肢ユニットの位置が後方にシフトすることが判明した SARNP 領域も、同様に *Gdf11* の発現誘導を介して仙椎後肢ユニットの位置決定に関与していることが考えられる。この SARNP 領域は、マウス以外のスッポンやニワトリにおいても種を越えて配列が保存されていることが明らかとなっており、仙椎後肢ユニットの位置を決定するシステムは、種を越えて b 領域と SARNP 領域の少なくとも 2 つの領域のエンハンサーによって制御されていることが強く示唆された。

### 【3】主な発表論文等

#### [3-1] 論文発表

なし

#### [3-2] 学会発表

なし

#### [3-3] 成果資料等

左下の図 (ヘテロマウスの骨染色の写真)

### 【4】今後の課題等

現在、作成して頂いた SARNP 領域を欠損させたキメラマウスからヘテロマウスを作成し、ホモマウスを得るための交配を行っている。*Gdf11* 遺伝子はマウス胚において E9.5 から中軸中胚葉の後端で発現が開始される。そこで、ホモ胚における *Gdf11* の発現量を RT-qPCR で解析し、実際に内因性の *Gdf11* のエンハンサーとして働いているかどうかを検討する予定である。また、*Gdf11* 遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死であるため、SARNP 領域を欠損させたホモマウスが生まれるかどうかを検討し、生まれた直後または生まれる直前の胚を採取し、骨染色により仙椎後肢ユニットの位置がヘテロマウスと比べてどれだけ異なるか解析する予定である。今後の課題として、b 領域と SARNP 領域を同時に欠損した個体における *Gdf11* の発現量を解析する必要がある。

