

研究題目 スッポンの後肢の位置を決定する *Gdf11* エンハンサー配列の マウス胚へのノックイン実験

研究組織

研究代表者：鈴木孝幸（大阪公立大学大学院理学研究科）

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

我々のこれまでの研究で、体の前後軸形成過程において後肢の位置を決めるために必須な *Gdf11* の発生的役割を明らかにした。興味深いことに、頭から後肢までの位置が近いスッポンでは発生中の前体節中胚葉に発現する *Gdf11* の発現開始タイミングが早く、頭から後肢までの位置がスッポンより遠いマウスでは、*Gdf11* の発現開始タイミングが遅いと言う結果が得られた。この結果から、四肢動物の後肢は発生中に前体節中胚葉に発現する *Gdf11* の発現開始タイミングの種間の違いに起因することが明らかとなった。さらに、近年の研究で *Gdf11* の発現を誘導するためのエンハンサー領域を探索し、スッポン特異的なエンハンサー候補配列を2つ発見し、領域1と領域2と命名した（図1）。

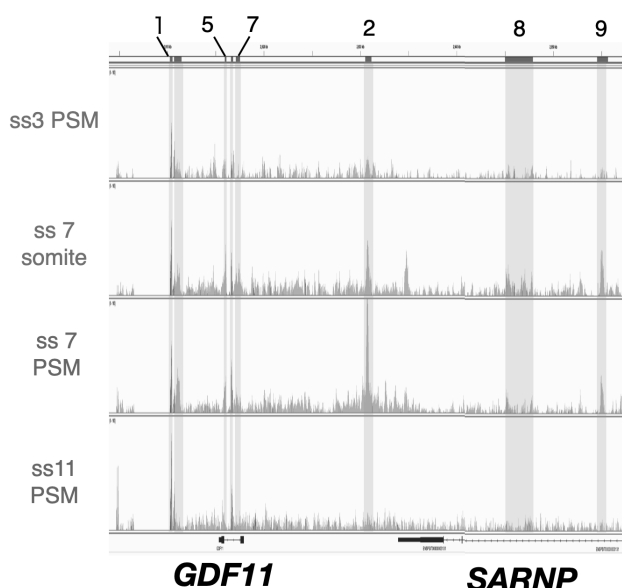


図1.スッポンにおける *Gdf11* 遺伝子のエンハンサー候補配列（領域1と領域2, ssは体節ステ

ジを示す）。

この領域はマウスには存在しないことから、スッポンにおいてマウスより *Gdf11* の発現開始タイミングを早めるために機能している可能性が強く示唆される。そこで本研究では、スッポンの *Gdf11* 遺伝子のエンハンサー候補配列である領域1と領域2がエンハンサー活性を示す場所とタイミングを詳細に観察したのちに、マウスに CRISPER ノックインを用いて導入し、マウスの後肢が体の前側にシフトし、スッポン様の形態を示すのかを骨染色により解析する。これにより、種間の後肢の位置の違いを生み出した進化的な分子基盤の実体を明らかにすることを旨とする。

[1-2]研究の方法・経過

スッポンの *Gdf11* のエンハンサー候補配列である領域1と領域2をクローニングし、tk-EGFPの上流に挿入した。このレポーターコンストラクトをニワトリ胚において *Gdf11* が発現する ss10 より早いステージの PSM(中軸中胚葉)組織に電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、それぞれの領域がエンハンサー活性を示す領域とステージを観察する。ニワトリ胚において *Gdf11* の発現が観察される ss10 より早い発生段階で PSM で強い活性が見られた方の配列をマウスの *Gdf11* 遺伝子座周辺にノックインし、後肢の位置が変化するかどうかを解析する。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

領域1と領域2がエンハンサー活性を示すタイミングと場所を詳細に調べるためにニワトリ胚の ss4 の primitive streak の領域にレポーターコンストラクトを電気穿孔法を用いて遺伝

子導入し、EGFP の発現を調べた。その結果ニワトリ胚で *Gdf11* が発現する ss10 の PSM で領域 1、領域 2 ともにエンハンサー活性を示した。そのため、より早い発生段階で EGFP の発現を調べる必要が生じた。ss4 の primitive streak にレポーターコンストラクトを遺伝子導入した場合 EGFP の発現が観察され始めるのが ss10 付近であることからこの方法を用いた遺伝子導入実験ではより早い発生段階における領域 1 と領域 2 が示すエンハンサー活性を調べることが出来ないことが判明した。

そこで次に、遺伝子導入の時期をまだ体節が発生していないステージの primitive streak 全体に行い下半身全体にレポーターコンストラクトを導入した。その結果、領域 1 と領域 2 ともに ss10 より早い発生段階の PSM で EGFP の発現が観察されたが領域 1 より領域 2 の方がより強い EGFP の発現が、より発生の早い段階から観察された。この結果から、領域 2 の方がスッポンにおける *Gdf11* の発現をニワトリより早く誘導するためのエンハンサーとして機能している可能性が示唆された (図 2)。

次に領域 2 がエンハンサー活性を示した組織を調べるために凍結切片を作成し、EGFP の発現が見られた細胞を観察した。その結果、EGFP は primitive streak の細胞が中胚葉に換入する直前の場所と、換入し中胚葉に分化した前体節中胚葉で発現が観察された。これらの場所はニワトリ胚において将来 *Gdf11* 遺伝子の発現が観察される場所であることから、スッポンの領域 2 の配列は、ニワトリ胚においてニワトリの内因性の *Gdf11* の発現が観察される前の発生段階でエンハンサー活性を有していることが判明した (図 2)。

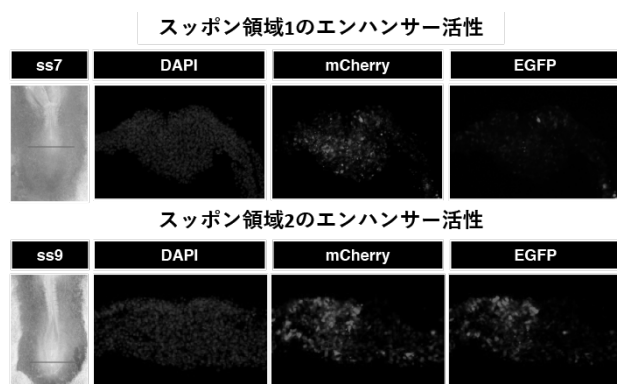


図 2.スッポンの領域 1 及び領域 2 の早い発生段階におけるエンハンサー活性の評価：領域 2 の方が強いエンハンサー活性を示した。

本共同研究により、スッポンが頭部から数えて後肢までの脊椎骨がなぜ他の生物と比べて少ないのか、その分子メカニズムの一端が明らかとなった。本共同研究の成果から四肢動物の骨格パターンの多様性は遺伝子の変化ではなく、その遺伝子の発現調節領域の進化で説明できる可能性が高いことが判明し、今後の生物進化のメカニズムを分子レベルで説明するために大きく貢献することが期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

1. 日本解剖学会招待公演 ”四肢動物における後肢の位置の多様性を生み出した分子基盤”
2023.3.20(仙台)
2. 動物学会招待公演 ”四肢動物における後肢の位置の多様性を生み出した分子基盤”
2023.9.8 (東京)

【4】今後の課題等

今回、スッポンの *Gdf11* 遺伝子のエンハンサー候補領域として領域 1 と領域 2 の 2 つの配列がいつどこで活性を示すのかニワトリ胚を用いて詳細に解析した。その結果領域 2 が期待されるスッポンで *Gdf11* の発現を早期に誘導するエンハンサー候補配列として有望であることが判明した。今後は、実際にこの領域 2 をマウスの *Gdf11* 遺伝子の周辺にノックインをしていく必要がある。今回ニワトリ胚の非常に早い発生段階でレポーターアッセイを行う必要が生じ、その実験方法の構築と詳細なレポーターアッセイを行った。マウスにどの領域をノックインするのか慎重に決定することが出来たがノックイン実験を完成させるところまでは実験が進まなかったので引き続きマウスへのノックイン実験に取り組んで行きたい。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性