

平成 28 年度徳島大学先端酵素学研究所共同利用成果報告書

平成 29 年 3 月 25 日

《課題》 *Fgf10* が持つ Hox 依存的肢芽エンハンサー群の協調的作動機構の解析

《申請者氏名・所属・職位》

黒岩 厚・名古屋大学大学院理学研究科、生命理学専攻、
形態発生学研究室・教授

《成果報告》

Fgf10 は、予定肢芽領域の中胚葉、次いで肢芽間充織で発現する肢芽の誘導及び成長に必須な因子である。私達は、*Fgf10* の肢芽間充織での特異的な発現を制御する、特異性の異なるエンハンサーをトランスジェニックマウスを用いたレポーターアッセイ系で複数同定している。この中でも R3 領域には進化的な保存性が高く、ゾウギンザメからヒトまで保存されている配列を持つ R31 と R33 が存在する。興味深いことに、両者には進化的な保存性の高い Hox 転写因子結合配列が複数存在し、私達はこれらがエンハンサー活性に必須であることを示してきた。最近、肢芽では *Hoxa11* と *Hoxa13* が実際に R31 および R33 に結合していることが、私達の CHIP-SEQ 解析で明らかになった。これらは Hox による組織特異的遺伝子発現の制御を研究する上でも重要な知見を提供している。また、R31 と R33 は肢芽において量的には相乗的に、質的には相加的に機能することも判明している。このように R31 と R33 は *Fgf10* のヒレ原基・肢芽での発現に重要な役割を果たしていると予想され、染色体上でのこれらのエンハンサーの役割を、欠失変異系統の作成により解析する研究計画を立案し、本共同利用の援助を受けることとなった。欠失変異を効率的に作成するために、CRISPR/Cas9 の系を用い、マウス受精卵への電気穿孔法による欠失構築の高効率な導入法を開発・確立した徳島大学先端酵素学研究所、竹本龍也氏との共同研究を実施した。

R31 の欠失変異は既に ES 細胞を用いたスタンダードな方法で作製してあるので (Δ R31ES)、本研究では、R33 単独の欠失 (Δ R33) 及び R31 と R33 の

二重欠失系統を作成する ($\Delta R31 \Delta R33$)。R31 と R33 は染色体上で近接しているため、二重欠失変異構築を一挙に導入すると R31-R33 間欠失してしまう可能性が高いと考え、まず R31 もしくは R33 を単独で欠失させ、次いでこの欠失系統の受精卵に二つ目の領域の欠失構築を導入するという逐次欠失方法を採用した。実施してみると R33 の欠失系統作製の効率があまり芳しくないため、効率よく作製できた R31 の欠失導入系統をまず確立し、この系統の受精卵を用いて R33 欠失の導入を行った。

$\Delta R33$ については欠失系統の作製に成功しており、ヘテロ個体同士の交配の結果、ホモ個体が生存可能であり成体の四肢形態には異常が無いことが判明した。 $\Delta R31ES$ 及び $\Delta R31$ はともにホモ個体が生存可能であり成体の四肢形態には異常が無いことが判っている。しかし、 $Fgf10/\Delta R31ES$ では胚肢芽における $Fgf10$ mRNA 量は半減していることが判明し、染色体上の R31 エンハンサーは転写活性に十分に寄与していることが判っている。R31 もしくは、 $Fgf10$ の下流にあって $Hoxa13$ や $Hoxa11$ が *in vivo* で結合していることが最近判明した進化的な保存性の高い新たな配列が、 $Fgf10$ の肢芽での発現に冗長的な機能を持つため、 $\Delta R33/\Delta R33$ 胚肢芽でも一定レベルの $Fgf10$ 発現が可能となって、発生が進行している可能性が高い。本系統は既に名古屋での繁殖が開始されている。今後交配により $Fgf10/\Delta R33$ の胚を調製し、肢芽における $Fgf10$ mRNA 量の定量や発現パターンの解析を行い、R33 の $Fgf10$ 発現に寄与する割合や発現様式の変化を解析してゆく。

また $\Delta R31 \Delta R33$ については、 $\Delta R31/\Delta R31$ 受精卵への R33 欠失構築導入により、PCR で判定する限りにおいては R33 が欠失している可能性が高い個体が漸く最近複数匹得られた。現在野生系統との戻し交配により、同一染色体上での R31 と R33 の同時欠失について確認作業中である。 $\Delta R31 \Delta R33$ 系統が得られたならば、ホモ胚や $Fgf10/\Delta R31 \Delta R33$ 胚における肢芽の表現型観察を実施し、さらに $Fgf10$ 発現の質的、量的変動を whole mount in situ hybridization や定量的 PCR 等で解析する予定である。

これらの研究結果が得られたならば、トランスジェニックマウスやニワトリ胚肢芽への遺伝子導入法を用いたレポーターアッセイによるデータと合わせて、肢芽における $Fgf10$ 発現の制御に関する Hox 依存性の R3 エンハンサーの機能研究に大きな進展が得られることになるかと大いに期待している。