

研究題目 仙椎-後肢ユニットの位置決定を行う *Gdf11* の エンハンサー群の包括的理解

研究組織

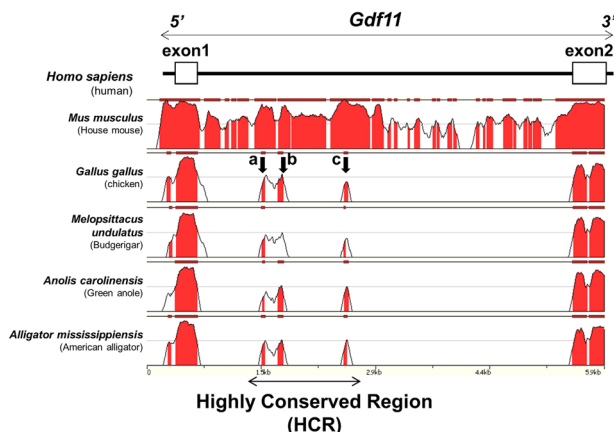
研究代表者：鈴木孝幸（大阪公立大学大学院理学研究科）

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* の発生学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候補領域を配列の保存性から探索し、下図内のエンハンサー候補領域 a, b, c を同定した。これらの領域は約 1500bp の領域内に局在していたことから本領域をまとめて Highly conserved region(HCR) と命名した。



この領域はヒトを基準にしてマウスやニワトリ、スッポン、シマヘビにおいても保存されており、種を超えて *Gdf11* の発現を介して、脊椎動物の後肢の位置決定に関与している可能

性が強く示唆された。そこで、本研究においては種を超えて配列が保存されている *Gdf11* のエンハンサー候補配列群を含む HCR 領域の後肢の位置決定に与える機能を解析したいと考えた。

[1-2]研究の方法・経過

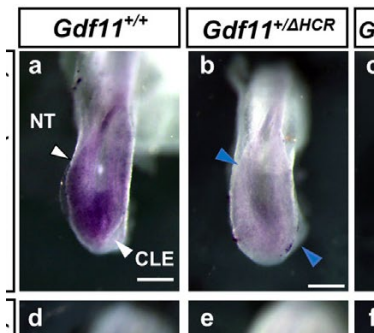
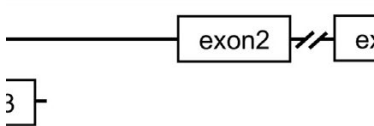
本研究では、種を超えて保存された *Gdf11* 遺伝子のエンハンサー候補配列群を含む HCR 領域を竹本博士との共同研究によりマウスで CRISPE/Cas9 を用いてノックアウトすることで、*Gdf11* 遺伝子の発現が低下し、マウスの後肢が体の後側にシフトするのかを骨染色により解析したいと考えた。これにより、種を超えて保存された後肢の位置の違いを生み出した進化的な分子基盤の実体を明らかにすることを目指すことにした。具体的にはマウスの HCR 領域をクローニングし、tk-EGFP の上流に挿入する。このレポーターコンストラクトをニワトリ胚において *Gdf11* が発現する ss10 より早いステージの PSM(中軸中胚葉)組織に電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、HCR 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。また HCR 領域内において特に配列が保存されていた a, b, c 領域のどの領域が重要であるかも検討したいと考えた。

【2】研究成果

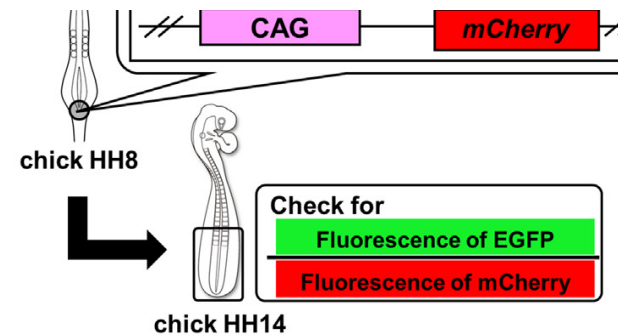
[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

HCR 領域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 で強いエ

ンハンサー活性を示した（下図）。

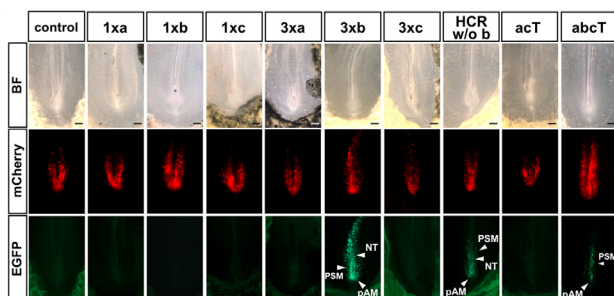


そこで次に、HCR 領域が実際に後肢の位置決定に必須であることを HCR 領域のノックアウトマウスを竹本博士に作成頂き解析した（下図）。



その結果、HCR 領域破壊マウスにおいては、仙椎と後肢の位置が野生型のマウスと比べて脊椎骨 2 つ分体の後方にシフトすることが判明した。この結果より HCR 領域は、後肢の位置決定に必須な領域であることが明らかとなった。

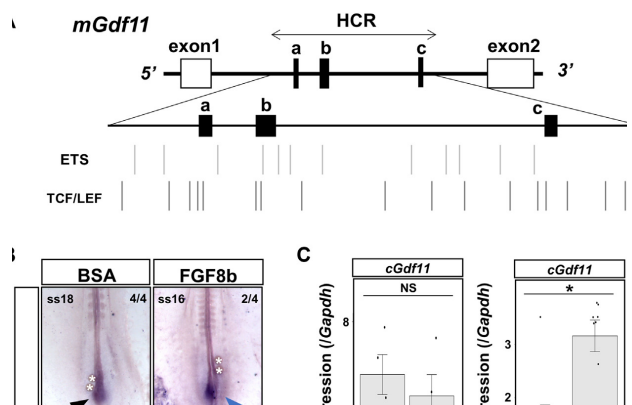
ノックアウトマウスにおける *Gdf11* 遺伝子の発現を調べた結果、PSM における *Gdf11* 遺伝子の発現が顕著に低下していることが判明した。この結果より HCR 領域は PSM における *Gdf11* 遺伝子の発現に必須であることが明らかとなった。



そこで次に HCR 領域内のどの領域がエンハンサー活性に重要であるかどうかを調べるために、それぞれの単独のエンハンサー活性の役

割を解析した。その結果、興味深いことに、a, b, c 領域の中で b 領域のみが最も重要であることが示唆された。

そこで、次にこの HCR 領域の活性にどのような細胞内シグナル伝達に関与しているのかを調べるために、*in silico* の解析により転写因子の結合予測配列を調査した。その結果、FGF シグナル伝達系の転写因子が結合する可能性が示唆された。そこで FGF8 タンパク質を吸着させたビースを *Gdf11* の発現領域に移植して作用させた時の *Gdf11* の発現を調べた。その結果 *Gdf11* の発現が現象した。また FGF シグナルを阻害する PD173074 をニワトリ胚に作用させると *Gdf11* の発現が増加することが判明した。これらの結果から、FGF シグナルは *Gdf11* の発現を負に制御することが判明した（下図）。



[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究により、今回の共同研究で発見した HCR 領域が種を超えて保存された *Gdf11* の発現を介して脊椎動物の後肢の位置決定に必須である配列である可能性が強く示唆された。本共同研究から脊椎動物の後肢の位置の多様性は *Gdf11* 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

Saito et al., Functional analysis of a first hindlimb positioning enhancer via *Gdf11* expression, *Frontiers Cells ad Dev. Biol.*, 2024)

[3-2]学会発表

1. 第 8 回摂動研究会公演 ”脊椎動物の骨格パターンの形成と進化の分子メカニズム”
2025.3.20(奈良)

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)

[3-3] 成果資料等

DOI 10.3389/fcell.2024.1302141

【4】 今後の課題等

今後は、今回発表した種を超えて保存された *Gdf11* 遺伝子のエンハンサー領域である HCR 以外に種特異的な後肢の位置決定領域が存在する可能性が強く示唆される。例えばスッポンの *Gdf11* 遺伝子のエンハンサー候補領域として HCR 領域以外の領域 1, 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(未発表)。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することで、種特異的に後肢の位置を決定する種特異的なエンハンサー領域を解明していくことが強く期待される。