

形態パターンのゆらぎを生み出すエピジェネティックな変化

Morphological fluctuation influenced by environmental conditions through modification of epigenetic factors

(日本動物学会推薦)

代表研究者 東京工業大学 田中 幹子 Tokyo Institute of Technology Mikiko TANAKA

Emus possess vestigial wings with a single digit, but the mechanisms of how wing skeletal elements have been extremely reduced remain unclear. Here we investigated the developmental mechanisms of reduction of the emu wing. Examination of twelve adult emu wings revealed that there is a great range of individual variation in the skeletal pattern. We also found that the dynamic expression pattern of the BMP antagonist *Gremlin1* (*Grem1*) in limb buds, which is critical for autopodial expansion, was consistent with the digital pattern of emu, chicken and zebra finch. Furthermore, in emu, variation among individuals was observed in the width of *Grem1* expression in forelimb buds. Our results suggest that the signalling system that regulates the dynamic expression of *Grem1* in the limb bud contributes substantially to variations in avian digital patterns.

研究目的

一般的に、動物の形態パターンは、遺伝的ネットワークで固定されていると思われるが、自然界では後天的環境要因に適合した発生プログラムの変化に起因した形態パターンのゆらぎが見られることがしばしばある。

多くの鳥類の前肢は 3 本の指からなるが、草原などに棲息するエミューは、前肢に 1 本の指しかもたないとされていた。しかし、エミューの成体の骨パターンを観察したところ、同一種内にもかかわらず、前肢の指パターンにはバリエーションがあることがわかった。これは、エミューの指パターンは、遺伝的な要因に加えて、後天的な因子により決定されることを示している。そこで本研究課題では、エミューの指パターンに着目し、指パターンに“ゆらぎ”を惹起する要因を明らかにすることを目的として研究を行った。

研究経過

複雑な自然界に目を向けると、指パターンに“ゆらぎ”を起している要因の候補は無数にある。そこで、本研究では、既知の指パターン形成遺伝子ネットワークを起点として、この遺伝的に固定されたシステムに“ゆらぎ”を与える要因を探ることとした。遺伝子ネットワークにゆらぎをもたらす前提の 1 つとして、遺伝子発現をオンにするエンハンサーが潜在的に活性な状態 (poised 状態) になっている状態を挙げることができる。そこで、鳥類の指パターン形成遺伝子がゲノム上で poised 状態で存在しているのかについて、ニワトリ胚の前肢芽を用いた ChIP シーケンス解析によって調べることにした。Hamburger Hamilton stage (HH) 20 (Hamburger and Hamilton, 1951) のニワトリ (*Gallus gallus*) 胚 39 匹、および、HH 27 のニワトリ胚 12 匹から切り出した前肢芽の第 3 指領域をそれぞれ p300 抗体、および H3K27ac 抗体で免疫共沈降した。その後、SOLID

5500 でシーケンスしたデータを 50 bp 単位で UCSC (<https://genome.ucsc.edu>) の Galgal4 ゲノム配列にマッピングした。今後、リード数が全細胞抽出液のリード数に比べて3倍以上、各領域のリード数が全ゲノムのリード数の平均値の3倍以上、かつ、各領域のリード数/全細胞抽出液のリード数の統計値が $p < e^{-4}$ の領域を「ピーク」とよぶこととする。指パターン形成に関与することが知られている既知の遺伝子のエンハンサーについて、HH20 で poised 状態にあり、HH27 で活性状態にあるピークを探索した。その結果、マウスやニワトリの肢芽の前後軸パターン形成にかかわることが知られる *Gremlin1* (*Grem1*) の転写開始点から 40 kb 下流にある肢芽特異的エンハンサー領域 (Vokes et al., 2008) において、HH20 では p300 の結合が HH27 では p300 の結合と H3K27 のアセチル化のピークが確認されたことから、poised されているエンハンサーの候補とした。

次に、*Grem1* の肢芽での発現の一部が、H3K27 のメチル化によって poised している可能性を検証するために、ヒストントリメチル化酵素の *Ezh2* の酵素活性斑である SET ドメインを欠損させた *Ezh2ΔSET* 発現コンストラクトをニワトリ胚前肢芽に導入することとした。*Ezh2ΔSET* の強制発現は、ニワトリ胚の神経管において、正常な *Ezh2* の結合が阻害されて、H3K27 のトリメチル化が阻害されることが報告されている (Akizu et al., 2010)。HH14 のニワトリ胚の予定前肢芽領域に *Ezh2ΔSET* コンストラクトを導入し、28 時間後の HH20 に到達した胚を固定し、*Grem1* の発現を検証したところ、*Grem1* の発現領域が後側に広がる様子が確認された (Fig. 1)。これらの結果から、*Grem1* の前肢芽での発現そのもの、もしくはその上流の遺伝子の発現を制御するゲノム領域の機能が H3K27 の修飾が変わることによって、変化しうることを示唆された。

次に、ニワトリ胚、ゼブラフィンチ胚 (*Taeniopygia guttata*)、および、エミュー胚 (*Dromaius novaehollandiae*) の肢芽における *Grem1* の発現を比較した。まず、それぞれの鳥類から *Grem1* の遺

伝子断片をクローニングし、発現パターンを解析した。その結果、肢芽での *Grem1* の発現パターンが、それぞれの鳥類の四肢骨格パターンと対応していることが明らかとなった。マウス胚を使った研究では、四肢のパターン形成を制御する SHH/GREM1/AER-FGF システムとよばれるフィードバックループが (Benazet et al., 2009)、指原基の量を制御することで、指の数を制御するとされている (Lopez-Rios et al., 2012; Scherz et al., 2004; Verheyden and Sun, 2008; Zeller, 2010; Zuniga et al., 1999)。SHH/GREM1/AER-FGF システムは、SHH を分泌する ZPA (zone of polarizing activity) 領域と FGF を分泌する AER (apical ectodermal ridge) という2つのシグナルセンターからなる。*Gremlin1* (*Grem1*) は、この2つのシグナルセンター間でシグナルをリレーし、BMP シグナルを阻害することで細胞増殖を活性化するという役割がある (Nissim et al., 2006; Panman et al., 2006; Zuniga et al., 1999)。肢芽の伸長が終わると、*Grem1* の発現は抑制されるため、BMP シグナルが上昇し、指原基の軟骨凝集が開始する (Nissim et al., 2006; Panman et al., 2006; Zuniga et al., 1999)。我々の結果は、BMP 活性のレベルが指パターンのバリエーションを生み出すとする説 (Lopez-Rios et al., 2012; Scherz et al., 2004) を支持することとなった。さらに、エミューの前肢芽では、*Grem1* の発現領域の幅の個体間での差 (1.570 ± 0.642 , mean \pm s.d., n=5) は、ニワトリの前肢芽での差 (0.716 ± 0.150 , mean \pm s.d., n=6) と比べて、著しく大きいということが明らかとなった (Fig. 2)。これらの結果は、初期肢芽での *Grem1*

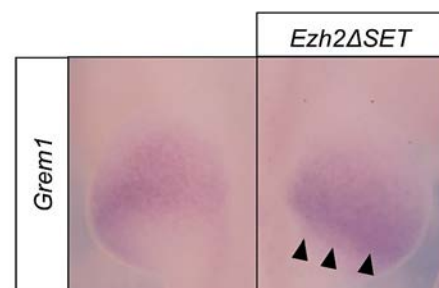


Fig. 1 Expression of *Grem1* in chicken forelimb buds electroporated with *Ezh2 Δ SET*.

の発現パターンが、鳥類の種間のみならず、種内での指パターンのバリエーションも反映していることを示唆していた。

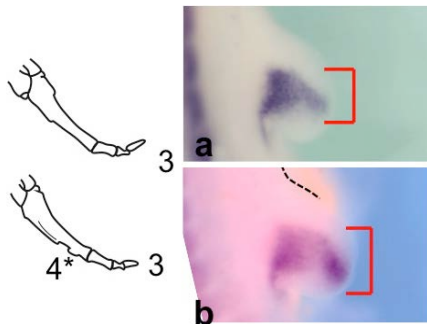


Fig. 2 Expression of *Grem1* in forelimb buds of emu embryos at stage 25.

考察

本研究では、鳥類の指パターンと初期肢芽での *Grem1* の時空間的な発現パターンが対応していることを示した。さらに、エミューの前肢芽での *Grem1* の発現は、成体の骨格パターンとも対応していた。マウス胚では、肢芽全体に *Grem1* を強制発現させることで BMP シグナルを抑制すると、指は伸長し、前後軸方向に広がった多指になることが示されている(Norrie et al., 2014)。肢芽においては、*Grem1* の発現が低下することにより、間充織細胞の増殖が停止し、軟骨へと分化し始める(Lopez-Rios et al., 2012; Pickering et al., 2018)。本研究の成果は、鳥類の指パターンは、*Grem1* によってシグナルのリレーが行われる SHH/Gremlin1/AER-FGF フィードバックループによって制御されており、種間のみならず、種内での指パターンのバリエーションは、初期肢芽での *Grem1* の発現パターンとして認識されうることを示唆していた (Kawahata et al., under revision)。

参考文献

1. Akizu, N., Estaras, C., Guerrero, L., Marti, E., Martinez-Balbas, M.A., 2010. H3K27me3 regulates BMP activity in developing spinal cord. *Development* 137, 2915-2925.
2. Benazet, J.D., Bischofberger, M., Tiecke, E., Goncalves, A., Martin, J.F., Zuniga, A., Naef, F., Zeller, R., 2009. A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* 323, 1050-1053.
3. Hamburger, V., Hamilton, H., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88, 49-92.
4. Lopez-Rios, J., Speziale, D., Robay, D., Scotti, M., Osterwalder, M., Nusspaumer, G., Galli, A., Hollander, G.A., Kmita, M., Zeller, R., 2012. GLI3 constrains digit number by controlling both progenitor proliferation and BMP-dependent exit to chondrogenesis. *Developmental cell* 22, 837-848.
5. Nissim, S., Hasso, S.M., Fallon, J.F., Tabin, C.J., 2006. Regulation of Gremlin expression in the posterior limb bud. *Developmental biology* 299, 12-21.
6. Norrie, J.L., Lewandowski, J.P., Bouldin, C.M., Amarnath, S., Li, Q., Vokes, M.S., Ehrlich, L.I.R., Harfe, B.D., Vokes, S.A., 2014. Dynamics of BMP signaling in limb bud mesenchyme and polydactyly. *Developmental biology* 393, 270-281.
7. Panman, L., Galli, A., Lagarde, N., Michos, O., Soete, G., Zuniga, A., Zeller, R., 2006. Differential regulation of gene expression in the digit forming area of the mouse limb bud by SHH and gremlin 1/FGF-mediated epithelial-mesenchymal signalling. *Development* 133, 3419-3428.
8. Pickering, J., Rich, C.A., Stainton, H., Aceituno, C., Chinnaiya, K., Saiz-Lopez, P., Ros, M.A., Towers, M., 2018. An intrinsic cell cycle timer terminates limb bud outgrowth. *eLife* 7, 3e7429.
9. Scherz, P.J., Harfe, B.D., McMahon, A.P.,

- Tabin, C.J., 2004. The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science* 305, 396-399.
10. Verheyden, J.M., Sun, X., 2008. An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature* 454, 638-641.
 11. Vokes, S.A., Ji, H., Wong, W.H., McMahon, A.P., 2008. A genome-scale analysis of the cis-regulatory circuitry underlying sonic hedgehog-mediated patterning of the mammalian limb. *Genes Dev* 22, 2651-2663.
 12. Zeller, R., 2010. The temporal dynamics of vertebrate limb development, teratogenesis and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 20, 384-390.
 13. Zuniga, A., Haramis, A.P., McMahon, A.P., Zeller, R., 1999. Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* 401, 598-602.
- Evolution and Development. *Development Growth & Differentiation* 61, 3-4. doi: 10.1111/dgd.12586
2. Mikiko Tanaka* (2018). Alternation in anterior-posterior patterning during the fin-to-limb transition. *Genesis* 56, e23053. DOI: 10.1002/dvg.23053.
 3. Mikiko Tanaka* (2017) Evolution of vertebrate limb development (version 2.0). *Essential for Life Sciences*
 4. Shogo Ueda, Takayuki Suzuki and Mikiko Tanaka* (2017). Transgene introduction into the chick limb bud by electroporation. *Methods in Molecular Biology: Avian and reptilian Developmental Biology*. Vol. 1650, 203-208.
 5. 田中幹子 (in press) 2-5-12 脊椎動物の上陸、2-5 動物の進化の歴史、第2章 動物の進化「動物の辞典」、朝倉書店
 6. 田中幹子 (2018) 肢芽の発生—手足のかたちのできかた、第6章 動物の発生、「動物学の百科事典」(第6章 高宗和史、田中幹子 編) 日本動物学会編、丸善出版

研究の発表

口頭発表

1. 田中幹子「環境ストレスがもたらした新奇形質の獲得機構」遺伝研研究会「マクロ生態学と遺伝学の融合」、2018年4月14日-15日、遺伝研
2. Mikiko Tanaka. "Evolution from fins into limbs", 2017 International Symposium on Evolutionary Genomics and Bioinformatics, 5-6 November, 2017, Tzu Chi University, Hualien, Taiwan
3. Mikiko Tanaka. "Adaptive evolution of vertebrate limb morphology", The 14th International Limb Development and Regeneration Conference, 23-26 July, 2017, Edinburgh, UK

誌上発表

1. Mikiko Tanaka* (2019). Preface *Ecology*,