

脊椎動物の四肢形態形成過程における 前肢・後肢の違いを引き起こすメカニズムの解析

研究代表者 東北大学大学院生命科学研究科 助教授 田村 宏治
Biological Institute, Graduate School of Life Science, Tohoku Univ.,
Koji Tamura, Ph. D. (Associate Professor)

Limb-type-specific expression of *Tbx5/Tbx4* plays a key role in drawing distinction between forelimb and hindlimb. Here, we show that some conditions to regulate the *Tbx* expressions, in order to get insights into specification and determination during commitment of limb-type identity in developing chick embryo. By RT-PCR technique the commencing time of specific *Tbx5/Tbx4* expression in the wing/leg region was estimated at stage 13. Transplantation experiments revealed that axial structures medial to the lateral plate mesoderm at the level of wing region are capable of transforming the leg identity to the wing one, suggesting that soluble factor(s) secreted from the median tissues is involved in the limb-type determination. We propose a model for limb-type identification in which the inhibitory regulation is involved in restricting one *Tbx* gene expression by masking the other *Tbx* expression there.

Emerging developmental studies contribute to our understanding of vertebrate evolution because changes in the developmental process and the genes responsible for such changes provide a unique way to evaluate the evolution morphology. Limbs, the locomotor organs that are unique to vertebrates, are often involved in the fields of paleontology and phylogeny because their structure is highly visible and their bony pattern is easily preserved in the fossil records. On the basis of the latest knowledge and viewpoints, we examined the evolution of vertebrate limb development with using embryos of cartilaginous fishes.

1. 研究目的

生物、とくに高等動物の体制がどのようにして作られてくるのか、とくにその分子メカニズムの解明は、遺伝子治療にもつながるポストゲノム時代に期待される大きな課題のひとつである。動物の発生過程における正しい形態形成（形作り）のためには、様々な細胞や組織が胚体内で正しい場所に正確に配置されなければならない。遺伝的な疾患のいくつかは発生過程における形態形成異常が原因となっており、形態形成の分子機構の解明はこのような先天性疾患の原因の解明にもつながると期待されているのである。

様々な器官構築過程における形態形成の中で、四肢（手足）の形態形成は四肢という脊椎動物固有の運動器官という特別性からも注目され、長い間数多くの科学者達によって研究が進められてきた。その研究はヒトの先天性異常の解明へとつながり、成果を上げている。その中の1つに、*Tbx5* 遺伝子の研究がある。この遺伝子は、マウスとニワトリにおいてそれらの前肢に特異的に発現する遺伝子であるが、この遺伝子がヒトの手骨の形態異常を引き起こす先天性疾患 Holt-Oram 症候群の原因遺伝子であることが突き止められている。

1999年、我々はこの *Tbx5* 遺伝子と後肢のみに発現する *Tbx4* 遺伝子が、前肢・後肢の形態を特徴づける遺伝子群であることを突き止めた。さらに、これらの遺伝子が魚類の胸鰭・尻鰭にもそれぞれ特異的に発現することも見出し、四肢の多様性を進化的な側面から追求する手がかりを報告した。

本研究は、このような *Tbx5/Tbx4* 遺伝子と前肢/後肢の形態の違いとの関連の研究を元に、それらの遺伝子の特異的な発現がどのようなメカニズムによって引き起こされるかを追求することを目的とし、具体的には、それらの特異的な発現を司る組織・分子の同定・解析を目標としてきた。

さらに本研究では、四肢構造の多様性と進化の面からも解析を行った。前述の通り、四足動物のみならず硬骨魚類の対鰭にも *Tbx5/Tbx4* が存在することを示している。脊椎動物においてもっとも原始的な鰭構造を有するのは、サメ・エイに代表される軟骨魚類群である。四肢/鰭構造の起源を探るべく、軟骨魚類胚における *Tbx5/Tbx4* 遺伝子の解析を行った。

2. 研究経過

2.1. *Tbx5/Tbx4* 遺伝子発現動態の詳細

これまでに行われてきた研究では、胚発生過程

においてどの段階から Tbx5/Tbx4 遺伝子が胚胎において発現し始めるかの詳細は調べられていなかった。そこで、RT-PCR 法を用いて、その詳細を調べた。これにより、Tbx5/Tbx4 遺伝子が四肢特異的な発現をし始めるのは、ニワトリ胚発生段階の 13 からであることが示された (図 1)。

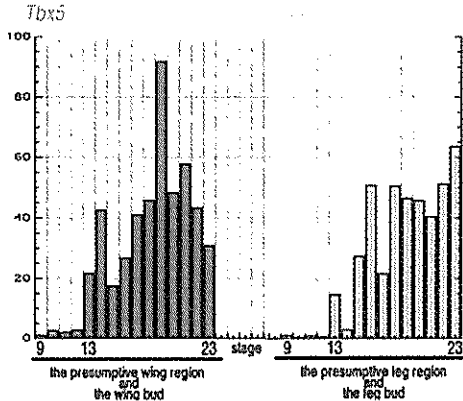


図 1. 左が前肢領域における Tbx5 遺伝子の発現量。右は後肢領域における Tbx4 遺伝子の発現量。発生段階 13 から顕著な発現が見られるのがわかる。

2.2. 移植実験による Tbx5/Tbx4 遺伝子発現調節領域の同定

Tbx5/Tbx4 遺伝子が前肢/後肢特異的な発現を表すために、どのようなメカニズムが存在するかを調べる目的で、2.1.において、まだ Tbx5/Tbx4 遺伝子を発現していない段階の組織を胚胎のさまざまな場所に移植し、Tbx5/Tbx4 遺伝子の発現状態を変更できるか、さらに前肢/後肢の形態を変更できるか、を調べた。すると、予定後肢領域を背中(肩の位置)に移植した場合に、Tbx4 遺伝子の発現を Tbx5 に変更し、さらにその形態を後肢から前肢に変更できることを見出した (図 2)。

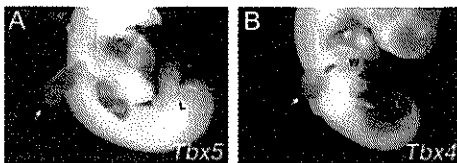


図 2. A, B ともに後ろ足を肩の部分の背中に移植したもの。A において本来発現するはずのない Tbx5 が発現し、B において本来発現してくる Tbx4 が著しく発現が低下しているのがわかる。

このことは、背中の領域に Tbx5/Tbx4 遺伝子の前肢/後肢特異的な発現を調節する能力があること、さらにそこから何らかの調節因子が生産・放出されていることを示唆する。

2.3. 背中組織の Tbx5/Tbx4 遺伝子発現に対する影響

本項目を解析するために、さまざまなレベルの背中組織と予定後肢領域を組み合わせることで培養し Tbx5/Tbx4 遺伝子の発現状態を調べた。

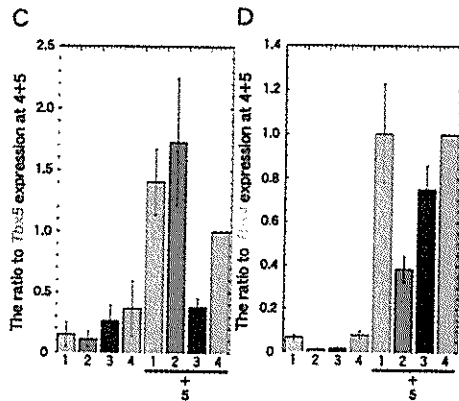
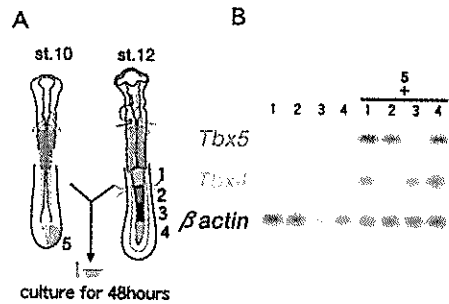


図 3. A.それぞれのレベルの背中組織(1~4)と予定後肢領域(5)を組み合わせることで培養し、B. Tbx5/Tbx4 遺伝子の発現を調べた。C, D のグラフにおいて、肩領域(A-2)が Tbx5 を優位に誘導し、Tbx4 の発現を顕著に抑制することがわかる。

これらの結果から、次に示すような前肢/後肢の決定に関するモデルを提唱した(図 4)。

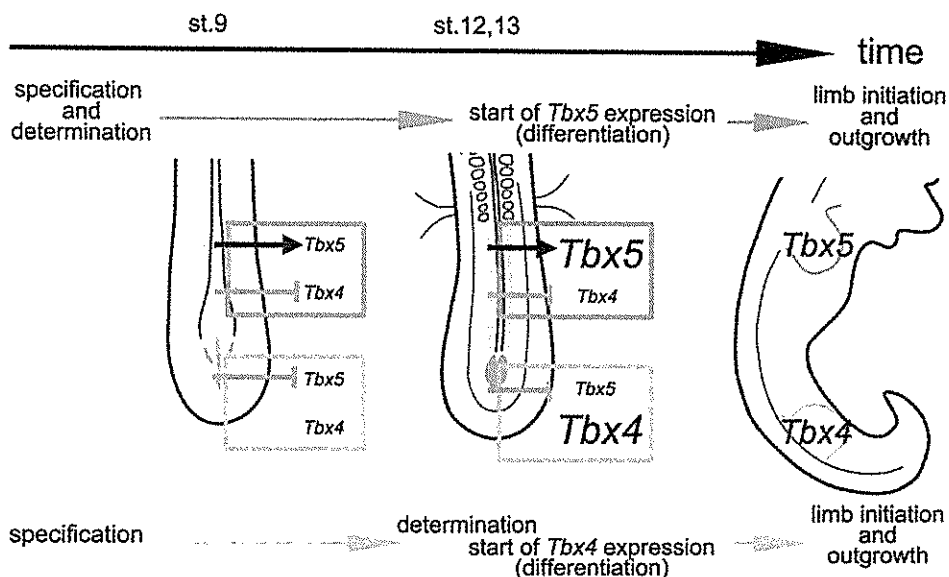


図 4. 発生段階にしたがって Tbx5/Tbx4 がそれぞれ前肢/後肢に局限して発現していく過程を示したモデル

2.4. 軟骨魚類胚における Tbx5/Tbx4 遺伝子のクローニング

本項目 2.4.のためには、まず実験材料として軟骨魚類胚を得ることが必須である。このために 2 つの手段を手がけた。まずエイについてであるが、東北大学理学部附属浅虫臨海実験所の協力によりガンギエイを飼育し、卵を得た(図 5)。この卵を飼育し、

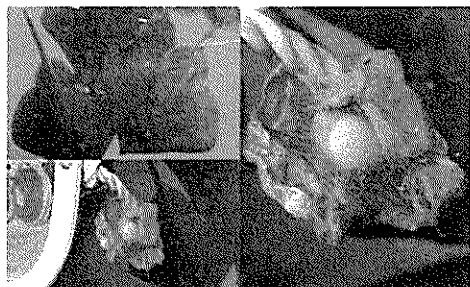
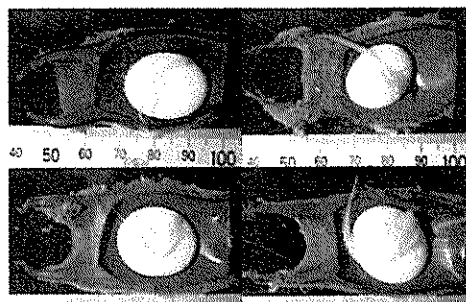


図 5. ガンギエイ(左上)とその卵(右)

いくつかの発生段階の胚を得た(図 6)。まずそれらの形態を詳細に観察し、胸鰭(前肢)と腹鰭(後肢)がどのようにして形成されてくるかを調べた。



40 50 60 70 80 90 100 40 50 60 70 80 90 100 図 6.

ガンギエイ胚

サメについては水産庁中央水産研究所に依頼してトラザメを飼育し、卵を得た(図 8、図 9)。

エイ、サメいずれの場合も、現在までに発生学だけでなくほかの分野ですら実験材料としてそれらの胚が使用されたことは非常に稀で、今回、これらを得るために 2 年ほどの月日を費やしたが、苦勞の甲斐があって貴重な実験材料を得ることができるようになった。

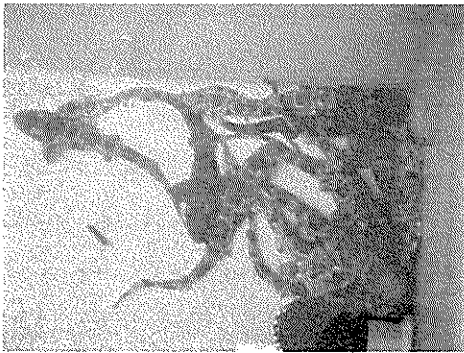


図 7. トラザメ

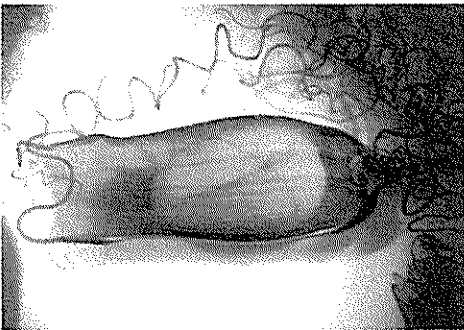


図 8. トラザメの卵

いくつかの胚から RNA を抽出し、RT-PCR 法により Tbx5 遺伝子の断片を獲得した(図 9)。

3. 研究成果

本研究により得られた結果は非常に重要な意味をもつ。まず前半に示した Tbx5/Tbx4 遺伝子の発現調節に関わる組織間相互作用の同定は、これらの遺伝子の機能解析をする上で重要な示唆を与えた。さらに後半に示したように軟骨魚類胚から Tbx5 遺伝子断片がクローニングされたことは、軟骨魚類においても Tbx5/Tbx4 遺伝子が存在することを非常に強く示唆する。すなわち現存する脊椎動物はすべて Tbx5/tbx4 遺伝子に規定される前後肢の identity をもっていることを意味する。この事実は、脊椎動物の四肢の起源と進化そしてその多様性を考える上で、非常に重要な知見をもたらした。

		10	20	30	40	50
eiTBX5	1	SVTQKGEFPH	PGRLVNPDS	FATGQ#R#RQ	LVSFQKLLT	IR#LDPFGH
humanTBX5	1	CVTQGEFPH	AGRLVNPDS	FATGQ#R#RQ	LVSFQKLLT	IR#LDPFGH
mouseTBX5	1	SVTQGEFPH	PGRLVNPDS	FATGQ#R#RQ	LVSFQKLLT	IR#LDPFGH
chickTBX5	1	SVTQGEFPH	PGRLVNPDS	FATGQ#R#RQ	LVSFQKLLT	IR#LDPFGH
newtTBX5	1	SVTQGEFPH	PGRLVNPDS	FATGQ#R#RQ	LVSFQKLLT	IR#LDPFGH
zebraTBX5	1	SVTQGEFPH	PGRLVNPDS	FATGQ#R#RQ	LVSFQKLLT	IR#LDPFGH
mouseTBX4	1	IRWQKGEFPH	PGRLVNPDS	FATGQ#R#RQ	LVSFQKLLT	IR#LDPFGH
chickTBX4	1	IRWQKGEFPH	PGRLVNPDS	FATGQ#R#RQ	LVSFQKLLT	IR#LDPFGH
zebraTBX4	1	IRWQKGEFPH	PGRLVNPDS	FATGQ#R#RQ	LVSFQKLLT	IR#LDPFGH
		*				
		60	70	80	90	100
eiTBX5	51	ILIS#R#VQ#P	RLHIVKQEH	NGFQK#IT#F	CT#H.....100
humanTBX5	51	ILIS#R#VQ#P	RLHIVKQEH	NGFQK#IT#F	CT#H.....100
mouseTBX5	51	ILIS#R#VQ#P	RLHIVKQEH	NGFQK#IT#F	CT#H.....100
chickTBX5	51	ILIS#R#VQ#P	RLHIVKQEH	NGFQK#IT#F	CT#H.....100
newtTBX5	51	ILIS#R#VQ#P	RLHIVKQEH	NGFQK#IT#F	CT#H.....100
zebraTBX5	51	ILIS#R#VQ#P	RLHIVKQEH	NGFQK#IT#F	CT#H.....100
mouseTBX4	51	ILIS#R#VQ#P	RLHIVKQEH	IRFQK#IT#F	CT#H.....100
chickTBX4	51	ILIS#R#VQ#P	RLHIVKQEH	IRFQK#IT#F	CT#H.....100
zebraTBX4	51	ILIS#R#VQ#P	RLHIVKQEH	IRFQK#IT#F	CT#H.....100

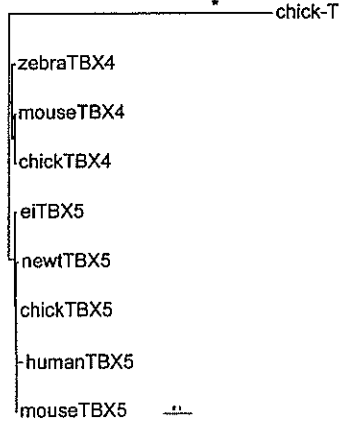


図 9. 軟

骨魚類から得られた Tbx5 遺伝子断片の系統関係

4. 今後の課題と発展

Tbx5/Tbx4 遺伝子の発現調節に関しては、その分子機構を明らかにするために背中領域において発現する Tbx 遺伝子発現を調節しうる分子を同定していくことが必要になる。また、軟骨魚類胚のモデル実験動物化とそこからの Tbx5 遺伝子の獲得は、新たな研究分野を発生学に産む可能性を秘めており、今後さらに発展させていきたい。

5. 発表論文リスト

1. Evolutionary aspects of positioning and identification of vertebrate limbs. Koji Tamura, Ritsu Kuraishi, Daisuke Saito, Hideki Masaki, Hiroyuki Ide, and Sayuri Yonei-Tamura. *Journal of Anatomy*, in press.

2. Specification and determination of limb identity: evidence for inhibitory regulation on *Tbx* gene expression. Daisuke Saito, Sayuri Yonei-Tamura, Kohko Kano, Hiroyuki Ide, and Koji Tamura. (投稿・査読中)