

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Hox及びその標的遺伝子による位置固有な四肢骨分化機構の解明

氏 名 山本 詩織

論 文 内 容 の 要 旨

四足動物の自由肢は、近位から遠位方向に向かって柱脚、軛脚、自脚(前肢では手首・掌・指)の形態的かつ機能的な領域に区画化される。それぞれの領域には、固有の形態を持つ固有の数の四肢骨が存在している。肢芽は四肢の原基であり、発生過程において肢芽の成長・形態形成プログラムと遠近軸に沿った位置指定プログラムが協調的に機能することにより、位置固有な四肢形態形成が実行される。*Hox* 転写因子群は、このような四肢形態形成プログラムを制御する遺伝子カスケードにおいて、上位部分で機能している主要な因子であることが知られている。自脚は五本の指を持つという大きな特徴を持ち、これは脊椎動物の多様化を可能にする重要な基盤の一つとなっている。*Hox13*(*Hoxa13* と *Hoxd13*)は、自脚形態形成を制御する最上位遺伝子として知られている。しかし、転写調節因子として機能する HOX の直接の制御下にある位置固有な形態形成を実現化する遺伝子群の実体や、HOX による転写調節機構については未解明の部分が多く残されている。申請者はこの課題に対して、肢芽で HOX 転写因子が結合している DNA の領域を次世代シーケンサーにより網羅的に同定する Chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-Seq)解析と、*Hox* 変異を持つ肢芽で発現変動を示す遺伝子を網羅的に同定するマイクロアレイ解析を用いて取り組んだ。

申請者はまず、それぞれ軛脚と自脚の予定領域で発現して発現領域での軟骨形成の位置特性を決定する HOXA11 と HOXA13 に対する特異抗体を用いて ChIP-Seq を行い、

マウス E11.5 肢芽においてそれぞれが結合している染色体領域を同定した。その結果、HOXA11 が軀脚で結合している領域のほとんどは HOXA13 が自脚で結合している領域に含まれることが判明し、HOXA11 と HOXA13 が共通した標的配列 (CHBRL: Common Hox binding region in limb bud) に結合していることが明らかになった。CHBRL には多くの場合、進化的に良く保存された複数の HOX 転写因子結合配列が存在するという特徴が見いだされた。典型的な CHBRL を用いた *in vitro* の実験から、これらには直接 HOX 転写因子が結合しうることが明らかとなり、複数および複数種の HOX やホメオドメイン転写因子が肢芽で CHBRL に結合していることが示された。さらに同じくホメオドメイン転写因子であり、四肢骨形成に関わることが知られている PITX1 および SHOX2 も、既報情報の申請者による解析により CHBRL に結合していることが判明した。四肢骨形成における HOX およびホメオドメイン転写因子群の、CHBRL という標的配列を共有した組合せによる多様な制御方式を可能とする転写調節機構の存在が明らかとなった。

さらに申請者は、CHBRL 近傍に存在しかつ *Hox13* 変異胚肢芽で発現変動を示す遺伝子を HOX の直接標的遺伝子として同定したところ、*Hox13* 変異肢芽で発現が上昇する標的遺伝子として軟骨分化に必要な転写因子をコードするものが多いことを見いだした。これらの転写因子群は、E10.5 肢芽および E11.5 の軀脚では *Hoxa11* と共発現しているが、E11.5 自脚では発現していない。しかし自脚軟骨形成が視覚化できる E12.5 においてはこれらの転写因子群発現は自脚軟骨において観察されるようになる。一方で、*Hox13* 変異自脚で発現が低下する *Hox* 標的転写因子として BCL11a を見だし、さらに BCL11a は軟骨分化を抑制する機能を持つことが示された。このように、HOX13 には正常発生過程の予定自脚領域において正および負の両面から軟骨形成を一時的に抑制しておく機能があるものと推測された。

肢芽成長過程において予定自脚領域は、5 本の指を形成するために必要な細胞数と形態を提供するために拡張して団扇型構造をとるが、これはこの領域において細胞増殖を正に制御する *Fgf10* と *Shh* が *Hox13* により予定自脚領域固有の発現制御を受けることに起因することが知られている。*Hox13* はこの自脚原基の拡張期に、五本の指形成に必要な細胞量が確保されるまで軟骨分化を留保させるという、他の肢芽領域で発現する *Hox* と比較して特徴的な機能を発揮しているものと推測される。このように四足動物の *Hox13* は、魚類のヒレから自脚に五本の指を持つ四足動物固有の形態へと進化する過程において、重要な役割を獲得したものと推測される。