

# 外的ストレスが創出する新奇形質

東京工業大学 生命理工学院

田中幹子

## <研究背景>

アフリカツメガエルなどの両生類では、指と指間の細胞増殖の違いで手足の形を作っている。一方、羊膜類のニワトリやマウスなどでは、これに加えて「指間細胞死」によっても手足が形づくられる。このことから、指間細胞死による形づくりのシステムは、両生類から羊膜類への進化の過程で出現したと考えられている。しかしながら、指間細胞死は、BMP シグナルが必要であるということ以外、その作用機序は、ほとんど明らかにされておらず、「指間細胞死」というシステムがどのようにして進化したのかについても不明のままであった。近年、我々は、四肢動物の進化の過程で出現した指間細胞死に、驚くべき要素が必要であったことを見出した。大気中の「酸素」である。

ニワトリ胚の肢芽を低酸素環境に数時間おくだけで、指間細胞死が起こらなくなったのだ。この結果は、指間細胞死には環境中の酸素が必須であることを示していた。さらに、手足の形態形成に指間細胞死を必要としていないアフリカツメガエルであっても、飼育環境中の酸素濃度をあげるだけ、もしくは、人為的に指間の血管網の密度をあげるだけで指間に細胞死が誘発されること、幼生期に陸棲であるコキコヤスガエルでも指間で細胞死が起こっていることが明らかとなった。さらに、この指間細胞死は、環境中の酸素に由来する活性酸素種 (Reactive Oxygen Species:ROS) によって促されていることが示された (Cordeiro et al., 2019)。これらの結果は、疾患の発症に深く関連する酸化ストレスが、個体発生の可塑的变化を引き起こすだけでなく、形態進化を導きうることを示唆していた。そこで本研究では、両生類では酸化ストレスに適応した変化でしかなかった指間での細胞死が、羊膜類では四肢パターン形成に必須なプロセスとなるように発生プログラムに組み込まれた過程にアプローチすることとした。

## <研究手法と研究成果>

アフリカツメガエルを高濃度酸素環境下で飼育するだけで、指間に細胞死が誘発されるということは、アフリカツメガエルは、四肢のパターン形成に指間細胞死のシステムを必要としないにもかかわらず、指間細胞死に必要な分子的背景は備わっていることを意味している。実際、アフリカツメガエルの幼生の肢芽の指間領域では、ニワトリ胚の肢芽同様に *Bmp* 遺伝子が発現している。四肢のパターン形成過程では、指と指間のパターンは、指間で働く *Bmp* が *Wnt* と *Sox9* とともに作り出すチューリングパターンによって調節されている。*Bmp*-*Sox9*-*Wnt* による指のパターン形成機構の起源は古く、サメの胸鰭の先端骨のパターン形成過程でも働いている (Onimaru et al., 2016)。したがって、指間の *Bmp* シグナルは元来、指と指間のパターン形成を制御するために存在していたもので

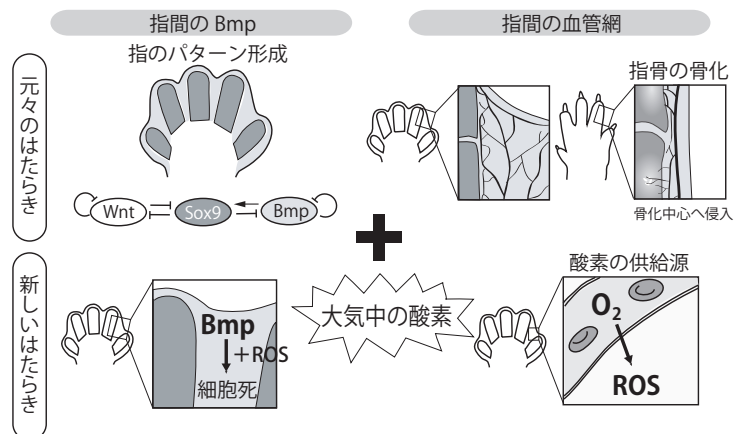


図 1. 指間細胞死のシステムの進化のモデル。

あり、四肢動物が陸上に進出したことで、指間の Bmp は、細胞死の制御という新しい機能を持つようになったと考えられる。一方、指間特異的に産生が確認された ROS は、指間の血管によって運搬された酸素に由来したと考えられた。四肢骨格の形成過程では、枝芽の間充細胞が凝集することで生じた軟骨が骨に置換される軟骨内骨化というステップがある。この骨化の際には、軟骨に侵入した血管から骨芽細胞が流入する必要があるため、指軟骨の周りに血管が存在している必要がある。元来、指骨の骨化のために発達した指間の血管は、四肢動物の中に陸上で発生するものが出現したことで、指間組織へ酸素を供給することとなり、活性酸素種が産生されるようになったと考えられる(図1: Cordeiro et al., 2019; Cordeiro and Tanaka, 2020)。すなわち指間細胞死は、指-指間パターン形成のために存在していた BMP シグナル経路と、指骨の骨化のために存在していた血管網から供給された酸素によって産生された ROS シグナル経路、という独立して出現した経路によって制御されていることを意味している。そこで、本研究では、これらの二つの経路に着目し、両生類から羊膜類への進化の過程でこの二つの経路の作用機序に違いが生じているかを調べることにした。

### レドックス環境に応じた細胞死カスケードの活性化の検証

両生類から羊膜類への進化の過程において、レドックス環境に応じて活性が制御される因子 A が、細胞死カスケードを促進する遺伝子 B の発現を直接制御する機構が、進化した可能性を検証することとした。この目的で、アフリカツメガエル幼生、及び、ニワトリ胚の枝芽の指間組織について、異なるレドックス環境において、因子 A の遺伝子 B のエンハンサーへの結合能に変化が生じるのかを、ChIP(クロマチン免疫沈降)定量 PCR で解析した。その結果、ニワトリ胚の枝芽の指間組織では、レドックス環境の異なる条件では、因子 A の遺伝子 B のエンハンサー領域への結合能が変化することが明らかとなった。一方、アフリカツメガエル幼生の枝芽の指間組織については、レドックス環境に関わらず、因子 A は遺伝子 B のエンハンサーに結合できないことが明らかとなった。これらの結果から、ニワトリ胚の枝芽の指間組織では、レドックス環境に応じて因子 A が遺伝子 B の転写を直接制御しているが、この制御機構はアフリカツメガエルの指間組織では成り立っていない可能性が示唆された。

### 指間細胞死過程における BMP シグナル経路と ROS シグナル経路の関係性の解析

ニワトリ胚の枝芽に、BMP シグナル経路、及び、ROS シグナル経路に関連する因子の作用を阻害する阻害剤を作用させた上で、その影響を解析した。

各種阻害剤は、HH31 のニワトリ胚の後肢芽を培養した培養系に添加することで、影響を調べた。まず、因子 A の活性化に関与する因子 C の阻害剤を作用させたところ、第 3 指間領域での細胞死数が減少することが明らかとなった。一方、ROS シグナル経路の関連因子 D の作用を阻害したところ、第3指間領域での細胞死数が 90 % 以上減少することが明らかとなった。さらに、それぞれの経路を阻害した後に Bmp 遺伝子群、および、ROS の産生レベルも検証し、その関係性の一部を明らかにすることができた。

また、指間での BMP シグナル経路と ROS シグナル経路の関係を調べるために、異なるレドックス条件下で培養したニワトリ胚の枝芽の指間組織について、RNA-seq 解析を行った。その結果、異なる条件で発現が変化する複数の遺伝子を明らかにすることができた(図2)。

一方、ニワトリ胚の枝芽の培養系で、影響をみることであった各種阻害剤のうち、因子 D の阻害剤については、両生類での作用機序を検討した。両生類については、コキコヤスガエルのように、高い酸素濃度環境で生息し、枝芽で細胞死が生じる両生類を見つけたため、このカエルを用いて検証する実験に切り替え、条件検討しているところである。

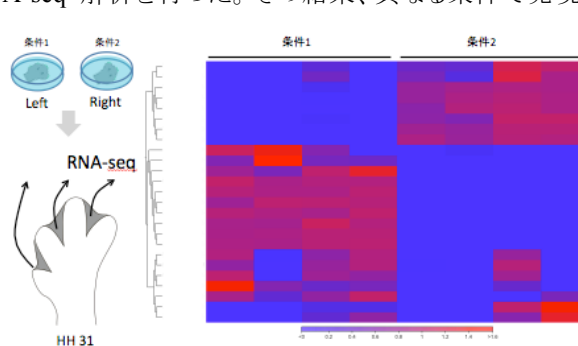


図 2. 指間組織で発現が変化する遺伝子群の解析.

### 3. まとめと今後の展望

本研究により、ニワトリ胚の肢芽でレドックス環境に応じて活性化される因子によって、細胞死カスケードの上流にある遺伝子の転写が直接促されること、この制御機構はアフリカツメガエル幼生の肢芽ではなりたっていないことが明らかとなった。また、ニワトリ胚の肢芽の指間領域で、レドックス環境の変化によって、発現が変化する複数の遺伝子も明らかとすることができた。同定した遺伝子のいくつかについては、今後、指間細胞死における機能を検証していく予定である。さらに、指間での BMP シグナル経路と ROS シグナル経路の関係については、その関係性を示唆するデータは得ているが、詳細とその進化機構については、さらなる検証を行う予定である。

本報告書の内容は、成果発表会で報告させて頂いた内容と同じものです。しかしながら、研究成果は学位論文研究に含まれる未発表データであるため、遺伝子名等の記載や研究成果の具体的記述を避けさせて頂きました。不明瞭な記載が多くなってしまいましたことを、心よりお詫び申し上げます。

### 4. 参考文献

- Cordeiro IR and Tanaka M (2020). Environmental oxygen is a key modulator of the development across species: from molecules to ecology. *BioEssays* 42, 202000025.
- Cordeiro IR, Kabashima K, Ochi H, Munakata K, Nishimori C, Laslo M, Hanken J and Tanaka M (2019). Environmental oxygen exposure allows for the evolution of interdigital cell death in limb patterning. *Developmental Cell* 50, 155-166.
- Onimaru K, Marcon L, Musy M, Tanaka M, Sharpe J (2016). The fin-to-limb transition as the re-organization of a Turing pattern. *Nat Commun* 7, 11582.

### 5. 謝辞

最後に、本研究にご支援賜りました公益財団法人アステラス病態研究会に深く感謝致します。