

令和元年6月9日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07362

研究課題名(和文)再生にตอบสนองして活性化するゲノム領域から迫る再生能を失うまでの進化プロセスの解明

研究課題名(英文) Evolutionary loss of regenerative ability: The role of evolutionary conserved regeneration signal-response enhancer

研究代表者

越智 陽城 (Haruki, Ochi)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：00505787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、両生類の腎尿管の再生をモデルにして、その再生過程で発現が亢進するLhx1遺伝子の発現を再生中の細胞でオンにするエンハンサー(再生シグナル応答エンハンサー)が、再生能の高い動物だけでなく再生能の低い哺乳類でも保存されていること、その活性化は、転写因子Arid3aが結合することにより、Arid3aがヒストンH3タンパク質の9番目のリジン残基のトリメチル基(H3K9me3)を脱メチル化する酵素Kdm4aを呼び込み、エンハンサーのエピゲノム状態を変えることが重要であることを発見した。また、Arid3aの働きを阻害すると腎尿管の再生が起こらないことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進化の過程で両生類や魚類が再生能を獲得したのか、ほ乳類が再生能を失ったのか、これまでのところ、この問いに直接的な答えとなる分子実体を示した研究はなかった。一方で、ゲノムの比較解析と遺伝子の機能の解析からは、発生再生に関わる遺伝子は、その種類、数、機能が、進化的に高度に保存されていることが示されている。本研究により、再生を制御する遺伝子のみならず、その遺伝子の発現をオンにする調節配列も進化的に保存されていることと、その活性化メカニズムが明らかとなった。この発見は、ほ乳類においてその働きが抑制されていると予想されるシステムの解除による組織再生技術へと繋がる点において今後の発展の可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：We screened regeneration signal-response enhancers (RSREs) at the Lhx1 locus using a Xenopus transgenic system and found that the noncoding elements conserved between only highly regenerative species do not show strong enhancer activities in the regenerating amphibian nephric duct. Instead, the noncoding elements conserved from fish to humans function as enhancers in the regenerating nephric duct. We also found that DNA-binding motif of Arid3a, a component of H3K9me3 demethylases, was commonly found in RSREs. Arid3a is known as a component of H3K9me3 demethylases KDM4/JMJD2 complex. Arid3a binds to RSREs and reduces the H3K9me3 levels on RSREs. It also promotes cell cycle progression and causes the outgrowth of nephric tubules, whereas the conditional knockdown of arid3a using photo-morpholino inhibits regeneration. These results suggest that Arid3a contributes to the regeneration of nephric tubules by decreasing H3K9me3 on RSREs.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：非コードDNA 再生シグナル応答エンハンサー シス調節配列 エンハンサー 遺伝子発現制御 エピゲノム ネットアイツメガエル アフリカツメガエル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

失われた体の一部を取り換えることは、動物では一般的によく見られる現象である。例えば扁形動物のプラナリアは、ごく小さな細胞塊から全身を再構築することができる。また両生類の胚や魚類では四肢や鰭を失ったとしても、機能的な組織を再び作り上げる事ができる。一方、ほ乳類は、組織や器官を丸ごと取り換える能力を持っていない。この違いについては、再生能をもつ動物が進化の過程でその能力を適応的に獲得してきたという説と、ほ乳類が進化の過程でその能力を失ってきたとする説が唱えられてきた。これら仮説について進化生態学的な視点からは、後者の説が有力となりつつある(Bely AE., *Trend in Ecology and Evolution*, 2010)。

近年のゲノム解読の進展により、脊索動物からほ乳類までの多数の動物のゲノム配列が比較できるようになった。これらゲノムの比較解析や、これまでの発生や再生過程での遺伝子破壊実験から、発生制御遺伝子や再生に関わる遺伝子は、その種類、数、機能が進化的に高度に保存されていることが示されてきた。これらを鑑みるに、進化生態学的に示唆されている進化にともない再生能力を失ったという仮説の実体は、遺伝子を失ったというよりも、進化の過程で再生に使う遺伝子の発現が失われたと予想できる。しかしながら、再生能を失わせる遺伝子の使い方の変化が、エピゲノム修飾の変化であるのか、あるいは発現調節配列そのものの変化であるのかなど、本質に迫った研究はこれまでになく、解決すべき問題として残されていた。

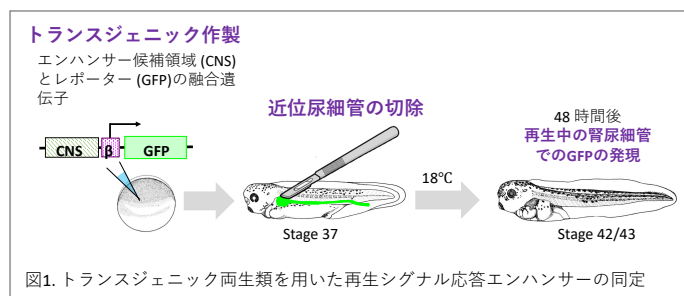
2. 研究の目的

ほ乳類の再生能は魚類や両生類と比べて限られていることから、進化の過程でその能力を失ったという仮説が提唱されてきた。一方で、ゲノムの比較解析と遺伝子の機能の解析からは、発生再生に関わる遺伝子は、その種類、数、機能が、進化的に高度に保存されていることが示されている。ゆえに進化にともない再生能を失ったという仮説の実体は、遺伝子を失ったというよりも、再生に使う遺伝子の発現システムが変容したと予想される。しかしながら、これまでその実体に迫った研究はない。そこで本研究では、再生に応答して活性化する両生類のゲノム領域を足がかりとして、非コード DNA 領域に刻まれた再生能を失うまでの進化プロセスの解明を目指ものであった。

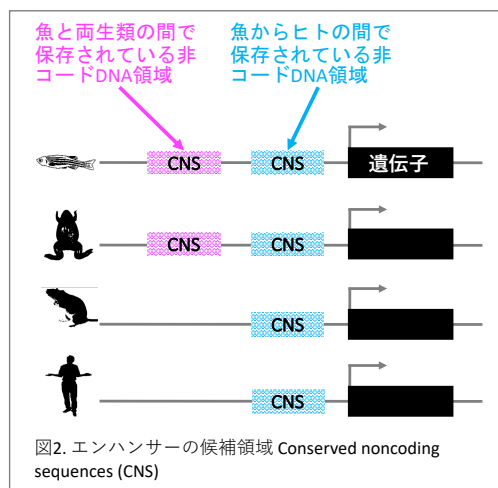
3. 研究の方法

申請者らは、両生類のトランスジェニックシステムを使った遺伝子発現調節領域の網羅的なスクリーニングを得意としており、これまでに腎形成に関わる Pax2 や Pax8 のエンハンサーやサイレンサーを同定してきた (Ochi H., *Nature Communications*, 2012)。この方法を発展させることで、両生類の再生過程で活性化する発現調節領域を発見できるのではないかと考え、予備実験としてネフロン再生に関わることが報告されている Lhx1 の遺伝子座で、エンハンサーと予想される領域の一部についてレポーター遺伝子(GFP)をもつトランスジェニック胚を作製し、

それらトランスジェニック個体で、近位尿細管の一部を切除し、その再生過程を観察した(図1)。その結果、前腎の再生過程で、Lhx1 遺伝子の発現をオンにするエンハンサーを同定できることがわかってきた。そこで、まずはエンハンサーの候補として、再生能力の高い魚類と両生類の間で進化的に保存されている非コード DNA 領域 (Conserved noncoding DNA sequences, CNS) と、再生能に関わらず魚類からヒトの間で進化的に保存されている CNS を抽出した(図2)。抽出したエンハンサー候補領域のクローニングを行い、レポーターDNA を作製した後、トランスジェニック個体を作製、再生中の腎尿細管での活性の有無を調べた。次に、再生中の腎尿細管でエンハンサー活性を示した配列中の転写因子の結合モチーフ調べ、腎尿細管の再生で遺伝子の発現を活性化する入力転写因子の候補を抽出、ヒト胎児腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney cells 293)を用いたルシフェラーゼレポーター解析、ならびにヒートショック



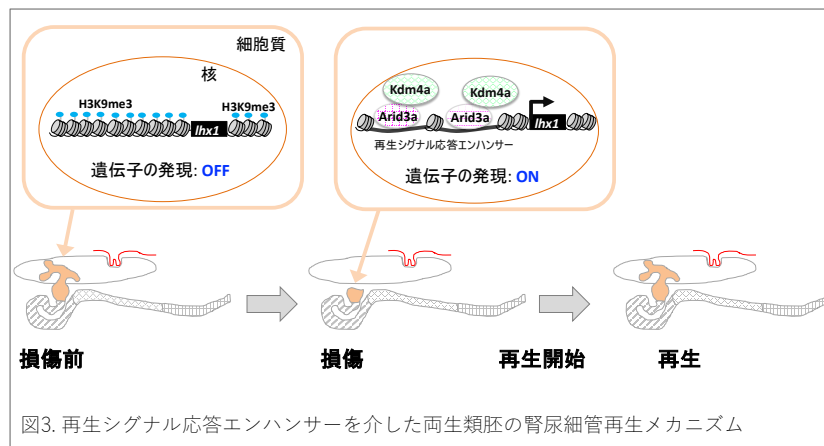
それらトランスジェニック個体で、近位尿細管の一部を切除し、その再生過程を観察した(図1)。その結果、前腎の再生過程で、Lhx1 遺伝子の発現をオンにするエンハンサーを同定できることがわかってきた。そこで、まずはエンハンサーの候補として、再生能力の高い魚類と両生類の間で進化的に保存されている非コード DNA 領域 (Conserved noncoding DNA sequences, CNS) と、再生能に関わらず魚類からヒトの間で進化的に保存されている CNS を抽出した(図2)。抽出したエンハンサー候補領域のクローニングを行い、レポーターDNA を作製した後、トランスジェニック個体を作製、再生中の腎尿細管での活性の有無を調べた。次に、再生中の腎尿細管でエンハンサー活性を示した配列中の転写因子の結合モチーフ調べ、腎尿細管の再生で遺伝子の発現を活性化する入力転写因子の候補を抽出、ヒト胎児腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney cells 293)を用いたルシフェラーゼレポーター解析、ならびにヒートショック



依存的に遺伝子を発現できるトランスジェニックツメガエルを用いて、再生シグナル応答エンハンサーを活性化する転写因子の同定を行った。次に、UV 光の照射で遺伝子の発現の ON/OFF ができる、センス Photo-モルフォリノオリゴヌクレオチド / アンチセンス モルフォリノオリゴヌクレオチドをツメガエル胚に導入し、腎尿細管の再生が開始される前に UV 光を照射することでエンハンサーを活性化する転写因子の発現を抑制し、それらが再生に必要な因子であるかどうか検討した。

4. 研究成果

再生シグナルに応答して活性化するエンハンサーは、ほ乳類と両生類の間で高度に保存されている領域であること、またこれらエンハンサーは腎管の発生では使われていないことを発見した。我々は、これら腎管の再生時に *Lhx1* の発現をオンにするエンハンサーを、再生シグナル応答エンハンサー (Regeneration Signal-Response enhancer: RSRE) と命名した。次に、RSRE の活性化メカニズムを解析し、転写因子 *Arid3a* が RSRE に直接結合すること、*Arid3a* はヒストン H3 タンパク質の 9 番目のリジンのトリメチル基 (H3K9me3) を脱メチル化する酵素 *Kdm4a* と協調してエンハンサーのエピゲノム状態を変化させること、このエピゲノム変化がエンハンサーの活性化に重要であることを、*Arid3a* の働きが阻害されると腎管の再生が起こらないことを発見した (図 3) (Suzuki N., et al., eLife, 2019)。また、RSRE はヒトから魚類の間で進化的に保存された配列であることから、ほ乳類ゲノムにあるカエル RSRE の相同領域にも再生シグナルに応答する活性があるのか調べたところ、マウスの RSRE 相同領域は両生類の腎管の再生中にエンハンサー活性を示すことがわかった。これらから、マウスのゲノムには腎管の再生に必要な遺伝子だけでなく、再生に使う調節配列の機能も残されていることがわかった。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Suzuki N, Hirano K, Ogino H, ***Ochi H**: Arid3a Regulates Nephric Tubule Regeneration via Evolutionarily Conserved Regeneration Signal-Response Enhancers. eLife, 8: e43186. doi: 10.7554/eLife.43186 (査読有り)
- ② ***Ochi H**, Suzuki N, Kawaguchi A, Ogino H: Asymmetrically reduced expression of hand1 homeologs involving a single nucleotide substitution in a cis-regulatory element. Developmental Biology 425(2):152-160, 2017. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.03.021 (査読有り)
- ③ **Ochi H**, Kawaguchi A, Tanouchi M, Suzuki N, Kumada T, Iwata Y, *Ogino H: Co-accumulation of cis-regulatory and coding mutations during the pseudogenization of the *Xenopus laevis* homeologs six6L and six6S. Developmental Biology 427(1):84-92, 2017. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.05.004 (査読有り)
- ④ *Sato A, Mitogawa K, Saito N, Suzuki M, Suzuki KT, **Ochi H**, Mikanoe A: Reactivation of larval keratin gene (*krt62L*) in blastema epithelium during *Xenopus* froglet limb regeneration. Developmental Biology 432(2):265-272. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.10.015 (査読有り)
- ⑤ Session AM, Uno Y, Kwon T, Chapman JA, Toyoda A, Takahashi S, Fukui A, Hikosaka A, Suzuki A, Kondo M, van Heeringen SJ, Quigley I, Heinz S, Ogino H, **Ochi H**, Hellsten U, Lyons JB, Simakov O, Putnam N, Stites J, Kuroki Y, Tanaka T, Michiue T, Watanabe M, Bogdanovic O, Lister R, Georgiou G, Paranjpe SS, van Kruijsbergen I, Shu S, Carlson J, Kinoshita T, Ohta Y, Mawaribuchi S, Jenkins J, Grimwood J, Schmutz J, Mitros T, Mozaffari SV, Suzuki Y, Haramoto Y, Yamamoto TS, Takagi C,

- Heald R, Miller K, Haudenschild C, Kitzman J, Nakayama T, Izutsu Y, Robert J, Fortriede J, Burns K, Lotay V, Karimi K, Yasuoka Y, Dichmann DS, Flajnik MF, Houston DW, Shendure J, DuPasquier L, Vize PD, Zorn AM, Ito M, Marcotte EM, Wallingford JB, Ito Y, Asashima M, Ueno N, Matsuda Y, Veenstra GJ, Fujiyama A, *Harland RM, *Taira M, *Rokhsar DS: Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* 538(7625):336-343, 2016. doi: 10.1038/nature19840. (査読有り)
- ⑥ Watanabe M, Yasuoka Y, Mawaribuchi S, Kuretani A, Ito M, Kondo M, Ochi H, Ogino H, Fukui M, Taira M, *Kinoshita T: Conservatism and variability of gene expression profiles among homeologous transcription factors in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* 426(2):301-324, 2016. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.09.017 (査読有り)
- ⑦ *Tanaka T, Ochi H, Takahashi S, Ueno N, Taira M: Genes coding for cyclin-dependent kinase inhibitors are fragile in *Xenopus*. *Developmental Biology* 426(2):291-300, 2017. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.06.019 (査読有り)
- ⑧ Yokoe M, Takayama-Watanabe E, Saito Y, Kutsuzawa M, Fujita K, Ochi H, Nakauchi Y, *Watanabe A: A Novel Cysteine Knot Protein for Enhancing Sperm Motility That Might Facilitate the Evolution of Internal Fertilization in Amphibians. *PLoS ONE*, 11(8):e0160445, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0160445. (査読有り)

[学会発表] (計 18 件)

招待講演

- ① *越智陽城: 再生シグナル応答エンハンサー ~活性化メカニズムと進化的保存性の意味~. 動物学会関東支部大会 公開シンポジウム 挑戦する両生類: カエル・イモリを使った研究の最前線 オーガナイザー: 福井彰雅, 2019
- ② Suzuki N, Hirano K, Ogino H, *Ochi H: Arid3a regulates the nephric tubule regeneration via the evolutionarily conserved regeneration signal-response enhancer. 第 12 回日本ツメガエル研究集会・第 4 回次世代両生類研究会 合同シンポジウム, 広島県, 2018.
- ③ *荻野肇, 田内幹大, 岩田 唯, 越智陽城, 井川武, 鈴木菜花, 柏木昭彦, 柏木啓子: ツメガエルを用いたゲノム進化研究とリソース事業について. 第 12 回日本ツメガエル研究集会・第 4 回次世代両生類研究会 合同シンポジウム, 広島県, 2018.
- ④ *蓮瀉里帆, 小林託也, 越智陽城, 田村宏治, 横山仁: 局所的な shh の発現誘導による *Xenopus* の四肢のパターン形成への影響. 再生学異分野融合研究会 (第 1 回), 愛知県, 2018.
- ⑤ *嶋田侑莉, 越智陽城, 横山仁: *Xenopus* の四肢再生における背腹軸形成機構の解析. 再生学異分野融合研究会 (第 1 回), 愛知県, 2018.
- ⑥ Suzuki N, Ogino H, *Ochi H: AT-rich interaction domain 3A regulates the regeneration of the nephric duct through the evolutionary conserved regeneration signal response enhancer. 17th International *Xenopus* Conference. Seattle, WA, USA, 2018.
- ⑦ *蓮瀉里帆, 小林託也, 越智陽城, 田村宏治, 横山仁: ツメガエル幼生における局所的な遺伝子発現誘導技術の確立. 平成 30 年度動物学会東北支部大会, 山形県, 2018.
- ⑧ *Iwata Y, Tanouchi M, Igawa T, Sakagami K, Ochi H, Ogino H: The wild-type *Xenopus laevis* is an asymptomatic carrier of aniridia-like pax6 mutations. 51h Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tokyo, 2018.
- ⑨ *Tanouchi M, Ochi H, Kawaguchi A, Igawa T, Iwata Y, Sakagami K, Ogino H: The hypomorphic mutations hidden in the allotetraploid genome of *Xenopus laevis*. 51h Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tokyo, 2018.
- ⑩ 鈴木菜花, 熊田樹, 荻野肇, *越智陽城: 腎組織再生における Arid3a による再生シグナル応答エンハンサーの活性化メカニズム. シンポジウム: 2 倍体と 4 倍体の両生類ゲノム情報の整備をうけて -両生類を利用した生命科学研究の次の 10 年を探る-, オーガナイザー: 越智陽城, 荻野肇. 第 88 回日本動物学会, 2017.
- ⑪ 鈴木菜花, 熊田樹, 川口茜, 荻野肇, *越智陽城: 二倍体と四倍体のカエルのゲノムに刻まれたシス調節配列から遺伝子発現調節の進化を読み解く. ワークショップ: 遺伝子重複は生物進化になにをもたらしたのか?, オーガナイザー: 宇野好宣, 一柳健司. 第 89 回日本遺伝学会, 2017.
- ⑫ *越智陽城: 両生類のゲノム情報を利用したゲノム倍化後の遺伝子発現調節メカニズムの進化の研究. 国立遺伝学研究所ワークショップ 次世代モデル生物におけるゲノム情報利用ワークショップ, オーガナイザー: 坊農秀雅, 中村保一. 2016.
- ⑬ *越智陽城, 鈴木菜花, 平野高大, 荻野肇: 再生シグナルに応答する非コード DNA 領域から迫る再生を可能とさせる転写制御メカニズムの理解. シンポジウム: 再生研究の新機軸 -不可能を可能とする内在性プログラムの探索-, オーガナイザー: 北田容章, 板東哲哉. 第 121 回日本解剖学会総会, 2016.
- ⑭ *蓮瀉里帆, 小林託也, 越智陽城, 田村宏治, 横山仁: ツメガエルの四肢における局所的な遺伝子発現誘導技術の確立. 第 88 回日本動物学会, 富山県, 2017.
- ⑮ Suzuki N, Kumada T, Ogino H, *Ochi H: Evolutionary conserved regeneration signal

response enhancers for renal regeneration. The 16th Xenopus international conference, Cania, Greece, 2016.

- ⑩ 鈴木菜花, 熊田樹, 荻野肇, ***越智陽城**: シス調節配列の1塩基置換による重複伝子の発現進化. 第24回山形分子生物学セミナー, 山形県 山形大学, 2016.
- ⑪ *熊田樹, 鈴木菜花, 平野高大, **越智陽城**: ゲノム編集ツールを使った両生類のコンディショナル遺伝子破壊法の確立. 第24回山形分子生物学セミナー, 山形県 山形大学, 2016
- ⑫ ***Ochi H**, Suzuki S, Kawaguchi A, Ogino H: Single nucleotide substitution in cis-regulatory element causes asymmetrically reduced expression of hand1 homologs in heart. The 22nd International Congress of Zoology (ICZ), Okinawa, Japan, 2016.

[その他]

ホームページ等

<http://ochi.yu-med-tenure.com>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 横山 仁

ローマ字氏名: YOKOYAMA Hitoshi

所属研究機関名: 弘前大学

部局名: 農学生命科学部

職名: 准教授

研究者番号 (8桁): 90455816

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 鈴木 菜花

ローマ字氏名: SUZUKI Nanoka

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。