

令和元年6月21日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07463

研究課題名(和文)塩基の並びだけでは読み解けないヒト超保存配列が共有する構造と機能の発見

研究課題名(英文) Cross-species study of unsolved structure and function of human ultraconserved elements

研究代表者

高野 敏行 (Takano, Toshiyuki)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授

研究者番号：90202150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：セキツイ動物ゲノムには高度に保存された配列、超保存配列が遺伝子をコードしない領域にも多数存在することが知られている。こうした超保存配列の機能を調べる目的で、遺伝子発現の誘導能を組換え体ショウジョウバエをつかって検証した。調査した51すべてのヒト超保存配列で胚あるいは3齢幼虫のひとつ以上の組織において遺伝子発現を誘導するエンハンサー活性が認められた。ほぼすべての配列が3齢幼虫の脳をふくむ中枢神経系組織で発現を誘導する一方、精巣での活性はほとんど観察されなかった。超保存配列が組織特異的なエンハンサー活性をもつことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超保存配列は、遺伝子をコードする領域だけでなく、非コード領域にも存在し、遺伝子発現の制御に関わることを示唆されている。しかし、実際にマウス等をつかってエンハンサー活性が実証されたのは約半数にとどまる。本研究によって、はじめて超保存配列のそのすべてがエンハンサー活性を有することが明らかになった。また、エンハンサー活性の組織特異性は細胞内環境の保存性の違いを示唆する。脳と違って、精巣の発現制御の環境は速く進化しているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Comparative genomics has identified a large number of non-coding segments that have been highly conserved over hundreds of millions of years of vertebrate evolution (so-called ultra-conserved elements, UCE). To examine their functions in vivo, we generated over 400 Drosophila transgenic lines, each containing a unique human non-coding ultra-conserved element inserted upstream of a core promoter fused to a GAL4 gene, and then assessed their enhancer activities. We observed reporter GFP expression in one or more tissues of larvae or adults in all tested elements, implying that human ultra-conserved elements can function as enhancer in Drosophila. Most of the elements studied induced GFP expression in larval CNS, whereas no UCE induced expression in adult testis. The findings suggest that the transcriptional environment of testis cells significantly differs between human and fly. Alternatively, but not mutually exclusive, the UCEs may function specifically in brain.

研究分野：ゲノム進化学

キーワード：超保存配列 ショウジョウバエ 遺伝子発現制御 エンハンサー 生物種横断研究

1. 研究開始当初の背景

(1) セキツイ動物ゲノムの比較ゲノム学から非コード領域に理論上ありえないほど高度に保存された超保存配列が多数、同定されている。マウスや小型魚類をつかった調査から、少なくともその一部にエンハンサー活性があることが知られている。しかし、エンハンサー機能だけでは数百塩基にもわたる配列の保存性の説明はつかない。何かしら未知の機能が隠されていることが推察される。

2. 研究の目的

(1) ヒト超保存配列を組み込んだ組換え体ショウジョウバエを作出し、網羅的にエンハンサー活性を調査する。この調査をとおして、発現を誘導する組織・器官等、ヒト超保存配列の共通した機能を探る。

(2) エンハンサーの働きはプロモーターに依存して変動するかもしれない。複数種のプロモーターとの組み合わせでエンハンサー活性を調査し、エンハンサー×プロモーターの相互作用の有無を検証する。

(3) FANTOM5 の組織特異的エンハンサー候補配列をもちいて、ヒトエンハンサーのショウジョウバエにおける活性部位を調査し、比較解析からヒト超保存配列の特徴を抽出する。

(4) アカパンカビの QF/QUAS/QS システムを用いたサイレンサー活性のアッセイ法を新規に開発し、ヒト超保存配列のサイレンサー活性を調査する。エンハンサー活性と同様、超保存配列に共通する機能を探る。

3. 研究の方法

(1) ヒト超保存配列をゲノム DNA から PCR 増幅し、クローニングした。クローン化した配列を Gateway テクノロジーを使って、ショウジョウバエ人工プロモーター+酵母 GAL4 遺伝子との融合遺伝子コンストラクトに導入した。これをショウジョウバエ胚へインジェクションし、組換え体ショウジョウバエ系統を作出した。作出したヒト超保存配列-GAL4 融合遺伝子系統は UAS-GFP 系統と掛け合わせ、胚、3 齢幼虫と成虫でのエンハンサー活性を調査した。

(2) 興味深い発現パターンを示した 11 種のヒト超保存配列を 5 種のコアプロモーターと組み合わせ、エンハンサーとコアプロモーターとの相互作用を解析した。人工プロモーターに加え、後生動物で保存されるコアプロモーターモチーフのうち、TATA box、MTE と DPE の有無に違いのある *Heat-shock-protein-70*、*Dopa decarboxylase*、*engrailed*、*hairy* プロモーターの合わせて 5 種のプロモーターを用いた。

(3) FANTOM (Functional Annotation of the Mammalian Genome) コンソーシアムが行っている FANTOM5 プロジェクトでは、多くの組織特異的エンハンサー候補配列を同定している。超保存配列との比較のため、FANTOM5 の脳特異的、精巣特異的エンハンサー各 2 配列を選び、組換え体ショウジョウバエ系統を確立し、エンハンサー活性を調査した。

(4) アカパンカビの遺伝子発現 Q-system と α -*Tubulin at 84B* (α *Tub84B*) ユビキタスプロモーターを用いて、ユビキタスプロモーターの上流、あるいは遺伝子の下流に調査配列を置いたコンストラクトを構築し、サイレンサー活性を調査した。テスト配列として、ショウジョウバエにおいて組織特異的なエンハンサーとしてよく知られる *decapentaplegic* (*dpp*) エンハンサー、*even skipped* (*eve*) の Strip 2 エンハンサーおよび *Ultrabithorax* (*Ubx*) の Polycomb response element (PRE) を用いた。

また、サイレンサーアッセイにつかうユビキタスプロモーターの最適化のため、 α *Tub84B* と *Actin 5C* (*Act5C*)、*Ubiquitin-63E* (*Ubi-p63E*)、*daughterless* (*da*) プロモーターとの比較解析をおこなった。周辺配列の影響をできるだけ遮断するためインスレーター配列を両端に置いた。また、全長を 1/3 程度まで短くした α *Tub84B. S* と *Act5C. S*、さらに α *Tub84B. S* からインスレーターを削除したコンストラクトも合わせて作成した。

4. 研究成果

(1) 調査した 51 の超保存配列のすべてで 3 齢幼虫あるいは成体の一つ以上の組織でレポーター遺伝子の発現が認められた。超保存配列がショウジョウバエにおいてエンハンサーとして機能することを示す。マウスの一過性のアッセイでは検出率は 52%に留まる。組換え体系統の確

立が容易で、繰り返し解析できるショウジョウバエがより有効なアッセイ系になっているといえる。このうち、49配列(92%)は幼虫の中樞神経系でエンハンサー活性を示した。一方、成虫原基、末梢神経系などの組織でエンハンサー活性を示したものは半数を下回る。特に、成虫の精巣で発現を示したものは皆無であった。一般に精巣は、脳と同じか、それ以上に転写物が多種多様であることで知られる。精巣の転写制御環境がヒトとショウジョウバエで大きく違うのか、あるいは細胞環境の観点から脳は特に保守的で、超保存配列は脳の発生に特異的に働いていることが考えられる。

(2) 調査した11のヒト超保存配列のうち10配列は幼虫期において2種以上のプロモーターとの組み合わせでも共通の発現パターンを誘導した。そのうち3配列は5種のプロモーターのいずれとの組み合わせでも共通の発現パターンを誘導した。この3配列のうち2つは、マウスの先行研究において、ショウジョウバエと機能的に類似の組織で発現を誘導している。ショウジョウバエで腹部神経節に発現を誘導した配列は、マウスでは脊髄においてエンハンサー活性を示した。また、ショウジョウバエでcentral brainに活性を示した配列は、マウスにおいても脳で発現を誘導した。超保存配列は他の組織と比べ、中枢神経においてエンハンサー活性をもつ傾向があることが再確認された。

(3) FANTOM5の脳、精巣特異的エンハンサー候補の2配列いずれもショウジョウバエにおいてエンハンサー活性を示し、精巣特異的エンハンサー1配列を除き、中枢神経系で特徴的な発現を誘導した。しかし、精巣で発現を誘導したものはなかった。つまり超保存配列の結果を再確認する結果となった。精巣の遺伝子発現の制御環境がヒトとハエで大きく異なっている、あるいは精巣での転写時期が極端に短いことによるものかもしれない。

(4) サイレンサーアッセイ系を構築し、特異的な発現パターンで知られる*dpp* エンハンサーと*eve Strip 2* エンハンサーおよび*Ubx PRE*のサイレンサー活性を調査したが、一定の活性パターンを見出すことはできず、アッセイ系の開発には至らなかった。そこでアッセイに用いるユビキタスプロモーターの構造解明と最適化を目的に、汎用的につかわれている4種のユビキタスプロモーターの発現活性を比較調査した。*α Tub84B*、*α Tub84B. S*、*Ubi-p63E*の3種のプロモーターは全ての成虫原基と脳でGFPの発現を誘導した。ただし、*Ubi-p63E*プロモーターでは翅原基および平均棍原基の翅ポーチ領域で発現の著しい低下があった。中枢神経系も含めた全ての成虫原基と脳において、*α Tub84B*、*α Tub84B. S*、*Ubi-p63E*の順の発現強度で全体的に発現が観察された。また、インスレーターを外した*α Tub84B. S*では脳以外の成虫原基でクローナルと思われるランダムなGFPの発現消失が観察された。プロモーター自体にインスレーター機能をもった配列が含まれていることが示唆される。これがサイレンサーアッセイ系が確立できなかった大きな理由のひとつと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① 高野敏行, 茨木公英, 大迫隆史, “ヒト化ショウジョウバエ”の作出進む—非コード領域の変異の高感度アッセイ法の開発が課題、エヌ・ティー・エス、生物の科学 遺伝, 査読なし、Vol. 72 No. 5、2018、484-491
- ② M. Itoh, R. Kajihara, Y. Kato, T. Takano-Shimizu, and Y. Inoue, Frequencies of chromosomal inversions in *Drosophila melanogaster* in Fukushima after the nuclear power plant accident, PLoS ONE, 査読あり、Vol. 13 No. 2, 2018, e0192096, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192096>

[学会発表] (計9件)

- ① T. Toshiyuki, Gain-of-function & loss-of-function mutations in disease candidate genes, 2nd International Symposium for Model Organism Research on Human Rare Diseases, 2019
- ② S. Yamamoto, K.H. Wan, T. Johnson, H. K. Graves, V.H. Havana, H. Pan, D. Bei, O. Kania, S. Jankas, S. I. Park, W.W. Fisher, Y. Takashima, S. Ravani, M. Tomaru, T. Ohsako, M. F. Wangler, C. Warr, T. Takano-Shimizu, H. J. Bellen, and S.E. Celniker, A large library of USA-human cDNA constructs and transgenic *Drosophila* stocks to

facilitate translational research, 60th Annual Drosophila Research Conference, 2019

③ T. Ohsako, T. Matsuda, D. Sasazaki, M. Tomaru, T. Awasaki, and T. Takano, Tissue specificity of Enhancer activity of human ultra-conserved elements in fruit fly, The 13th Japanese Drosophila Research Conference, 2018

④ 高野敏行、ヒト化ショウジョウバエでヒトゲノム配列の機能、比較解析はできるのか、国立遺伝学研究所 研究集会「理論分子進化学の新機軸」、2018

⑤ 茨木公英, 中塚三保子, 渡邊昌秀, 白神真知, 大迫隆史, 都丸雅敏, 高野敏行、ショウジョウバエ *Rack1* は精子形成, 受精の複数ステップで働く雄不妊遺伝子である、日本遺伝学会年会、2018

⑥ 高野敏行、ショウジョウバエで何が出来る? 生物横断研究のハブとなる先端昆虫モデル研究拠点、第1回 IRUD-Beyond モデル生物 国際シンポジウム モデル生物を用いた希少、未診断疾患へのアプローチ、2018

⑦ 白神真知、中塚三保子、宮崎友、都丸雅敏、Tim Karr、高野敏行、ショウジョウバエ父性効果遺伝子の解析、2017年度生命科学系学会合同年次大会 第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会、2017

⑧ T. Ohsako, R. Nakano, T. Matsuda, M. Tomaru, and T. Takano-Shimizu, Enhancer activity of vertebrate ultra-conserved elements in fruit flies, The Allied Genetics Conference, 2016

⑨ T. Ohsako, R. Nakano, T. Matsuda, T. Awasaki, M. Tomaru, T. Karr, and T. Takano-Shimizu, Enhancer activity of human ultra-conserved elements in fruit fly, 12th Japanese Drosophila Research Conference, 2016

〔図書〕(計2件)

① T. Adachi-Yamada, Y. Azuma, J. Cassim, S. Cotterill, E. Fukusaki, T. Igaki, Y. H. Inoue, Y. Nagai, L. L. Piccolo, S. Potikanond, T. Takano-Shimizu-Kouno, D. T. P. Thao, L. Tsuda, L. Waltzer, and M. Yamaguchi, Springer Nature Singapore Pte Ltd., Drosophila Models for Human Diseases, 2018, 308

② 植田充美、北野宏明、馬見塚拓、花井泰三、山本泰智、藤田広志、桜田一洋、城戸隆、三浦夏子、田中博、徳久淳師、種石慶、奥野恭史、富井健太郎、関嶋政和、澤芳樹、徳増有治、三宅淳、田川聖一、新岡宏彦、高野敏行 他16名、シーエムシー出版、バイオテクノロジーシリーズ AI 導入によるバイオテクノロジーの発展、2018、234

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：都丸 雅敏

ローマ字氏名：Tomaru, Masatoshi

所属研究機関名：京都工芸繊維大学

部局名：応用生物学系

職名：助教

研究者番号(8桁)：70324720

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：大迫 隆史

ローマ字氏名：Ohsako, Takashi

(3) 研究協力者

研究協力者氏名：カー ティモシー

ローマ字氏名：Karr, Timothy