

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02490

研究課題名(和文) 哺乳類鋤鼻器進化におけるDlx4遺伝子コオプシオン進化の解析

研究課題名(英文) Dlx4 gene co-option in mammalian vomeronasal organ evolution

研究代表者

隅山 健太 (Sumiyama, Kenta)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00370114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：多くが謎に包まれている鋤鼻器の発生において重要な役割を持つと考えられるDlx3/Dlx4遺伝子の発現調節を担う非コード領域(エンハンサー)を明らかにした。この領域をゲノム編集によって欠失したノックアウトマウスは鋤鼻器で完全にDlx3/4遺伝子発現を失うことが示された。この鋤鼻器特異的遺伝子発現欠失マウスは、今後の鋤鼻器発生と機能研究のために重要なリソースとなる。このエンハンサー欠失による組織特異的遺伝子ノックアウトマウス作製法はあらゆる遺伝子機能研究に応用可能な技術成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鋤鼻器の発生におけるDlx3/Dlx4遺伝子の発現調節を担うエンハンサーを明らかにしたことにより、多くの哺乳類で重要な役割を持ちながらヒトでは機能が失われた鋤鼻器発生の進化をゲノムレベルで研究する基礎を築いた。またエンハンサー欠失による組織特異的遺伝子ノックアウトマウス作製法は、従来の費用と時間のかかる条件付きノックアウトマウス作製法よりはるかに簡便であり、個体レベルでのあらゆる遺伝子機能研究の迅速効率化に貢献する重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：We identified a non-coding region (enhancer) that regulates the expression of the Dlx3/Dlx4 gene, which is thought to play an important role in the unknown developmental process of the vomeronasal organ. Knockout mice lacking this region created by genome editing have been shown to completely lose Dlx3/Dlx4 gene expression in the vomeronasal organ. This vomeronasal organ-specific gene expression-deficient mouse will be an important resource for future vomeronasal organ development and functional studies. This tissue-specific gene knockout mouse production method by enhancer deletion is a technical achievement that can be applied to all other functional gene studies.

研究分野：発生進化遺伝学

キーワード：エンハンサー進化 鋤鼻器 ゲノム編集 Dlx遺伝子群 エンハンサーノックアウト

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

約5億年前の脊椎動物祖先での全ゲノム重複で生じた Dlx3/Dlx4 遺伝子群の祖先的機能は、ゼブラフィッシュなどの実験などから頭顔面形態発生に関わるものと考えられている。Dlx4 遺伝子のホメオドメイン領域には、有胎盤哺乳類だけに共通する特徴的な3箇所のアミノ酸置換が存在する(Sumiyama 他 JEZ partB 2012)。有胎盤哺乳類が鋤鼻器機能を発達させる進化を起こした際に、Dlx4 が鋤鼻器の特定機能、おそらく哺乳類特異的機能を持つ鋤鼻器神経細胞発生に関連する発現を獲得し、同時に適応的なアミノ酸置換を生じてコオプシオン進化が完成したと考えられる。本研究ではこの進化と機能を検証するため、Dlx4 の哺乳類特異的アミノ酸置換の表現型・機能を調べ、さらに Dlx3/Dlx4 の鋤鼻器発現を制御するエンハンサーを同定しその進化を調べることで、哺乳類ツールキット遺伝子のコオプシオン進化について多面的に解析することを計画した。

適応進化の一つとして、ツールキット遺伝子のコオプシオン進化は動物の新奇器官進化のための重要なメカニズムと考えられている。本研究が扱う Dlx 遺伝子群は、脊椎動物進化においてタンDEM重複の後2回の全ゲノム重複により哺乳類で6遺伝子となり (Dlx1~6) それぞれ独自の機能に特化している。多くの Dlx 遺伝子が四足動物では高度に保存的であるのに対して、Dlx4 だけは10倍程度進化速度が速く(Sumiyama 他 PNAS 2002)、より自由に進化していると考えられる。同時に Dlx4 はどの脊椎動物にも保存していることからどの進化段階でも重要な機能を持ち続けていると考えられる。すなわち、Dlx4 進化速度の上昇は各進化段階での適応的進化を反映している可能性があるが、現在までのところ Dlx4 の哺乳類での *in vivo* での機能は十分に明らかになっていない。そこで、ゲノム編集を駆使して Dlx 遺伝子のノックアウト、ノックイン、さらにコオプシオン進化に必須な鋤鼻器特異的エンハンサーの同定と機能解析を計画した。

2. 研究の目的

遺伝子の重複とその後の適応進化はゲノムから見た進化学として重要なテーマの一つである。ツールキット遺伝子のコオプシオン進化は動物の新奇器官進化のため鍵となるメカニズムであり、どのような背景でそれが起きてきたかをゲノムレベルで明らかにすることが必要である。Dlx3/Dlx4 遺伝子群をノックアウトし、各遺伝子が鋤鼻器においてどのような機能を持っているかを解析する。また Dlx4 の特徴的なアミノ酸変化の機能は何かを知るため、ノックインマウスを解析する。さらに哺乳類鋤鼻器の Dlx3/Dlx4 遺伝子発現を制御するエンハンサーを同定し、その機能解析をゲノム編集で行うことで、エンハンサーの機能と進化を解析する。以上の実験を通じて、Dlx3/Dlx4 遺伝子のコオプシオン進化の実態に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

鋤鼻器での Dlx3/Dlx4 遺伝子の機能を明らかにするため、十分な匹数の Dlx4 KO マウス、Dlx4 祖先型ノックインマウスの行動解析 (intruder aggression test) を行い野生型 B6/N マウスと比較する。RNA-seq を行い、Dlx3/4 により制御される下流遺伝子群を同定する。

以上に加え、鋤鼻器特異的エンハンサーを同定しその進化を明らかにすることで、シス因子進化による Dlx4 コオプシオン進化を理解する。Hi-C データや CTCF-ChIP データの解析結果から、約 100kb の範囲の内部3箇所が鋤鼻器エンハンサーの候補領域である。この領域のトランスジェニックマウスによる鋤鼻器エンハンサー同定、さらにその KO 解析を行う。各候補領域をクローニングしトランスジェニックマウスによるエンハンサーアッセイ系で鋤鼻器発現活性を解析する。CRISPR/Cas9 によるエンハンサー領域欠失マウスを作製し発現解析と表現型解析を行う。

4. 研究成果

(1) Dlx4 KO マウス、Dlx4 祖先型ノックインマウスの行動解析 (intruder aggression test) を行ったところ、G1, G2 世代とで観察されていた、雄が雄に攻撃行動を行わず雌に対して行うようなマウント行動を取る例が、世代を経た同じ系統のマウスではだんだん観察されなくなることが判明した。このことは、Dlx4 の機能欠損が他の Dlx 遺伝子、特にゲノム上でペアを組む Dlx3 遺伝子により機能補償されてしまうことがその一因と考えられた。そこで、Dlx4 遺伝子単独のノックアウトでは無く、ペアを組む Dlx3 と Dlx4 を同時にノックアウトし表現型解析を行うことを次の目標とした。しかしながらこれには大きな問題がある。Dlx3 が胎盤発生に必須の遺伝子であることから、ストレートに作製したノックアウトマウスでは胎生致死となり、出生後の鋤鼻器の解析ができなくなってしまう。そこで、次項に述べる Dlx3/Dlx4 共通の鋤鼻器エンハンサーを同定し、それら全てをノックアウトすることで、鋤鼻器だけで完全な Dlx3/Dlx4 ダブルノックアウト状態を作り出し、同時に胎盤を始め他の組織では発現を十分に残すことによって、生存可能な鋤鼻器特異的ノックアウトマウスを作製し成体での機能解析を行うことを新たな目標として計画した。

(2) エンハンサー欠損による鋤鼻 Dlx3、Dlx4 遺伝子ダブルノックアウトマウスの作製を行っ

た。まず初めに、Dlx3/Dlx4 周辺領域で鋤鼻エンハンサーを探索し、エンハンサーアッセイにて鋤鼻神経での活性を確認した。これにより、3箇所の鋤鼻器エンハンサーを同定することができた(図1)。これらエンハンサーは哺乳類の間でよく保存されており、哺乳類特有の機能に関わる可能性が示された。さらに、同定された鋤鼻エンハンサー全てを含む26kb領域をゲノム編集により欠損させたエンハンサーノックアウトマウスを作製した。発現解析により鋤鼻器とそれ以外の組織でDlx3/Dlx4発現を野生型と比較し、鋤鼻器ではDlx3/Dlx4発現がほぼ完全になくなっていることを確認した。一方、胎盤を含む他の組織では発現が30%以上残っていることがわかった(図2)。胎盤発生が正常であることにより、このマウスは問題なく系統化による維持が可能であり、今後の鋤鼻器機能解析に極めて有用なリソースとして確立することができた。

具体的には、Dlx3/Dlx4 周辺領域の次世代ゲノムデータ解析、鋤鼻器 ATAC-seq データ解析により、TAD3 周辺領域に複数の鋤鼻エンハンサー候補を決定した。鋤鼻エンハンサー候補の鋤鼻器切片でのレポーターアッセイにより、TNV1、TNV5、TAD3 に鋤鼻神経での活性を確認した(図1)。TNV5 の鋤鼻器切片での蛍光免疫染色により、鋤鼻神経において内在 Dlx3 タンパクと LacZ の共発現を確認した。さらに CRISPR/Cas9 システムを用いて TNV5-TAD3 領域の26kb欠損マウス(Δ 26kb)を作成し、ホモ接合体でも正常に繁殖できることを確認した。成体の Δ 26kbマウスの鋤鼻器 RNA を用いた qRT-PCR により、Dlx3/Dlx4 発現がほぼ消失していることを確認した。一方、胎児と成体両方の Δ 26kbマウスでの鰓弓・胎盤・皮膚・嗅上皮 RNA を用いた qRT-PCR により、Dlx3/Dlx4 発現が30%から100%維持されていることを確認した(図2)。以上の成果は現在論文としてまとめて投稿直前の段階である。

このマウスを用い、鋤鼻神経の機能的変化が起きている可能性を考慮し、鋤鼻関連行動の解析を進めている。予備実験として行った Δ 26kbよりも大きな範囲の欠損の Δ 79kbマウスでの行動解析の結果では、Dlx4 ノックアウト・ノックインの初期世代で観察された、Trpc2-KO マウスに見られる表現型と似た攻撃行動の低下・オスのオスに対するマウント行動の増加を認めた。現在世代を進めて表現型が維持されるかどうか観察を継続中である。

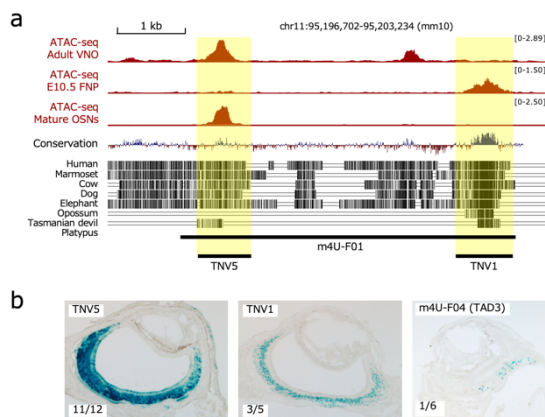


図1 同定されたDlx3/Dlx4鋤鼻器エンハンサー

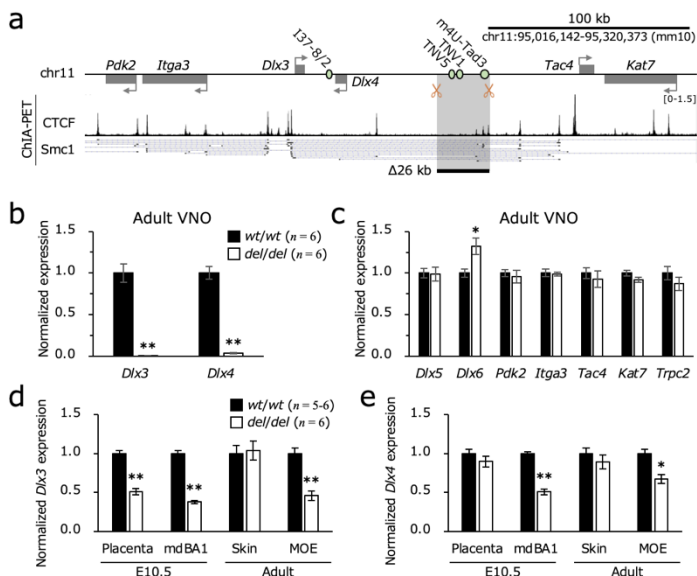


図2 鋤鼻器エンハンサー欠失による鋤鼻器Dlx3/Dlx4ノックアウトの実現

(3) 組織特異的なエンハンサーをもれなく探索しノックアウトすることで、複雑な交配をすることなく組織特異的な二重遺伝子ノックアウトマウスを作製することができ、しかも系統化することによって簡単に表現型解析ができることを示すことができた。このようにエンハンサーをノックアウトすることで、意図的に特定組織のみでの条件付き二重遺伝子ノックアウトを作り出す方法はこれまでに私たちの知る限りでは先行例が無く、新しい遺伝子機能解析手法として国内外での新たな応用の可能性が広がるものと考えられる。

(4) 鋤鼻神経ではパラログであるDlx5とDlx6の発現があることも知られている。Dlx5とDlx6が機能的に冗長である可能性もあり、厳密な機能解析のためにはさらにDlx3、Dlx4との4重遺伝子ノックアウトを鋤鼻器特異的に作製する必要も考えられる。このため、まず鋤鼻器特異的Dlx5/Dlx6エンハンサーを同定し、そのノックアウトによりDlx5/Dlx6二重変異体を作製する計画を進めている。これまでにDlx5/6周辺領域の次世代ゲノムデータ解析、鋤鼻器 ATAC-seq データ解析により、近傍のDync1i1 遺伝子上に複数の鋤鼻エンハンサー候補を同定することができた。これについて現在さらに in vivo エンハンサーアッセイを進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sumiyama Kenta, Tanave Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 The regulatory landscape of the Dlx gene system in branchial arches: shared characteristics among Dlx bigene clusters and evolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12671	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fumoto Katsumi, Takigawa-Imamura Hisako, Sumiyama Kenta, Yoshimura Shige H., Maehara Natsumi, Kikuchi Akira	4. 巻 132
2. 論文標題 Mark1 regulates distal airspace expansion through type I pneumocyte flattening in lung development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs235556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.235556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 田邊彰、隅山健太	4. 巻 9
2. 論文標題 ゲノム編集技術を用いたDlx遺伝子群機能解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 50 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobachi Kenju, Kuno Sota, Sato Shinya, Sumiyama Kenta, Matsuda Michiyuki, Terai Kenta	4. 巻 45
2. 論文標題 Biliverdin Reductase-A Deficiency Brighten and Sensitize Biliverdin-binding Chromoproteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 131 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.20010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Tsubasa, Takeuchi Miki, Sakagami Marina, Asakawa Kazuhide, Sumiyama Kenta, Kawakami Koichi, Shimizu Takashi, Hibi Masahiko	4. 巻 147
2. 論文標題 Gsx2 is required for specification of neurons in the inferior olivary nuclei from Ptf1a-expressing neural progenitors in zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev190603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.190603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件(うち招待講演 2件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 田邊 彰、隅山 健太
2. 発表標題 鋤鼻器のDlx3 /Dlx4 遺伝子発現に必須なシス調節モジュールクラスターの発見
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会(オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 隅山 健太、田邊 彰
2. 発表標題 遺伝子機能欠損をパラログ遺伝子の活性化で補償する
3. 学会等名 Online MM meeting 2020、京都大学医学部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenta Sumiyama, Genshiro Sunagawa, Maki Ukai-Tadenuma, Perrin Dimitri, Hiroki Ueda
2. 発表標題 Triple-target CRISPR enabled almost perfect whole-body bi-allelic knockouts at first generation
3. 学会等名 The 15th Transgenic Technology Meeting (TT2019)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Sumiyama
2. 発表標題 Cis-regulatory mechanism and evolution of mammalian Dlx gene clusters
3. 学会等名 52nd JSDB Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 隅山 健太
2. 発表標題 頭顔面形態形成を規定するDlx遺伝子群の発現パターンを進化機構に則って変更する試み
3. 学会等名 第9回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 隅山 健太
2. 発表標題 脊椎動物形態形成遺伝子発現調節機構の進化：Dlx 遺伝子群を例に
3. 学会等名 日本遺伝学会第91 回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Sumiyama, Hiroki Ueda
2. 発表標題 Triple-target CRISPR enabled production of complete bi-allelic double and triple gene knockouts
3. 学会等名 Frontiers in Genome Engineering 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Sumiyama
2. 発表標題 Inferring ancestral state before WGD from enhancers and CTCF/cohesin loops in developmental genes
3. 学会等名 SMBE 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 隅山 健太
2. 発表標題 ゲノム重複前の脊椎動物形質を推定する試み
3. 学会等名 第8回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 隅山 健太
2. 発表標題 ゲノム重複前の脊椎動物表現型を推定する新しい試み
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田邊 彰、隅山 健太
2. 発表標題 トリプルCRISPR法による交配無しでのダブルノックアウト、トリプルノックアウトマウス作製
3. 学会等名 大阪大学大学院医学系研究科 第12回若手研究フォーラム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 斎藤 成也、海部 陽介、米田 穰、隅山 健太	4. 発行年 2021年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 272
3. 書名 図解 人類の進化 猿人から原人、旧人、現生人類へ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	小出 剛 (Koide Tsuyoshi) (20221955)	国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・准教授 (63801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------