

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770234

研究課題名（和文） パラログ遺伝子のシス調節配列の進化と遺伝子ネットワークのフェイルセーフ機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of cis-regulatory evolution for the paralogous genes and failsafe networks

研究代表者

越智 陽城（OCHI HARUKI）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任助教

研究者番号：00505787

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物の発生を支配する遺伝子ネットワークにはしなやかさがある。例えば、ネットワーク構成因子のひとつを破壊しても、それを保証するようなメカニズムが働き、下流遺伝子の発現には影響しない。このような遺伝子ネットワークのフェイルセーフ機構のひとつとして、同じゲノム中に存在するパラログ遺伝子の働きが知られている。本研究では、*Pax2*、*Pax5*、*Pax8* パラログ遺伝子座の周辺の保存非コード領域 (Conserved noncoding sequence: CNS)に着目し、*Pax2* については 55 カ所、*Pax5* は 19 カ所、*Pax8* は 6 カ所の CNS 全てのエンハンサー活性調べた。さらに *Pax2* の CNS の一つが、パラログ遺伝子の発現の減少を感知して活性化する、フェイルセーフ型エンハンサーであることを発見した。

研究成果の概要（英文）：

We have studied regulatory mechanisms of vertebrate *Pax2*, *Pax5* and *Pax8* genes, which have evolved from a single ancestral gene of early cephalochordates. It is known that the three Pax genes exhibit distinct but overlapping expression during the ear, brain and kidney development, and interact each other in the co-expressed tissues. We compared human, chicken and *Xenopus* genomic sequences and identified 55 conserved noncoding sequences (CNSs) for *Pax2*, 19 for *Pax5* and 6 for *Pax8*. We subjected the CNSs to the high-throughput co-transgenesis assay in *Xenopus*, identified 13 active kidney enhancers for *Pax2*. We also identified the one of the *Pax2* kidney enhancers is activated in response to reduction of paralogous genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 発生生物学

キーワード：遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

近年の発生遺伝学的な研究から、脊椎動物の発生を支配する遺伝子ネットワークにはしなやかさがあることがわかってきた。例えば、ネットワーク構成因子のひとつを破壊しても、それを保証するようなメカニズムが働き、下流遺伝子の発現には影響しない。このような遺伝子ネットワークのフェイルセーフ（補償）機構のひとつとして、同じゲノム中に存在する相同遺伝子（パラログ）の働きが知られている。パラロググループは進化の過程でゲノム重複によって共通の祖先遺伝子から派生した遺伝子であり、その例としては *Hox* 遺伝子群がよく知られている。*Hox* 遺伝子群の研究で示されたように、パラロググループにおいては、その一つを破壊しても、残りの遺伝子の発現が亢進し、破壊された機能を失うことがある。しかしパラログ遺伝子の間でどのような相互作用が働き、片方の遺伝子の発現の消失を感知し、残りの遺伝子の発現上昇させるのか、そのメカニズムはよくわかっていない。

2. 研究の目的

脊椎動物の *Pax2*、*Pax5*、*Pax8* は、ゲノム倍化により、共通の祖先遺伝子から形成されたパラログである。頭索動物のナメクジウオはゲノム倍化の前に脊椎動物に至る系譜から分岐した種であり、祖先型遺伝子に相当する *Pax2/5/8* をもつ。脊椎動物の *Pax2* は中脳と後脳の境界領域では *Pax5* とともに発現し、いずれか一方の遺伝子を破壊しただけでは器官形成に大きな影響はみられない。しかし *Pax2* と *Pax5* を同時に破壊すると中脳と後脳の一部(小脳)が完全に欠失する。また *Pax2* は腎原基では *Pax8* とともに発現し、*Pax8* を欠失させるとその機能を補うことが知られている。

本研究はゲノム上の構造が比較的シンプルな *Pax2/Pax5/Pax8* に注目し、それぞれの発現を阻害したときに引き起こされるシス調節エレメントのクロストークを解析することによって、遺伝子ネットワークの復元力とその限界を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、*Pax2*、*Pax5*、*Pax8* のシス調節エレメントを介した、パラログ間のクロストークを解明する。そこでまずはネットワークの中でのエンハンサーの役割を明らかにするために、*Pax2*、*Pax5*、*Pax8* のエンハンサーの同定を行う。エンハンサーの候補は、四肢動

物間のゲノム配列で高度に保存されている非コード配列 (conserved noncoding sequence: CNS)に着目し、それら CNS の活性をカエルの高効率なトランスジェネシス法を用いて解析する。

シス調節エレメントの機能から考えるとエンハンサーの機能は大きく次の三種類、(1)他のパラログメンバーの発現の低下を感知して活性化するフェイルセーフ型、(2)自分自身あるいは他のパラログ遺伝子の産物によって活性化する正のフィードバック型、(3)パラログネットワーク外からのシグナルによって活性化される外部入力型に分けられる。次にアンチセンスモルフォリノでパラログの発現を阻害し、それらの発現低下にともなうエンハンサー活性の変化の解析をおこなう。

4. 研究成果

ヒト、マウス、ニワトリ、カエルの *Pax2*、*Pax5*、*Pax8* の遺伝子座の周辺約 300kbp のゲノム配列を解析したところ、*Pax2* の遺伝子座では 55 カ所、*Pax5* では 19 カ所、*Pax8* は 6 カ所の CNS が存在することがわかった。それら全ての CNS のエンハンサー活性を調べたところ、*Pax2* では中脳後脳境界領域で活性をもつ CNS が 15 カ所、腎原基では 13 カ所あることがわかった。また *Pax5* では中脳後脳境界領域で活性のある CNS が 3 カ所、内在性の *Pax5* は発現しない腎原基で活性のある CNS が 1 カ所あることがわかった。さらに *Pax8* では中脳後脳境界領域と腎原基ともに活性がある CNS が 4 カ所あることがわかった (*Pax8* と *Pax2* の CNS の結果の一部は *Nature Communication* に掲載)。

次に同定したエンハンサーが(1)フェイルセーフ型、(2)正のフィードバック型、(3)外部入力型のいずれのタイプに属するのか調べるために、*Pax2* の腎臓エンハンサーのなかでも特に活性の強い 6 つの CNS に着目し、それらのトランスジェニック胚で *Pax2*、*Pax5* あるいは *Pax8* の発現を阻害した。その結果、2 つの CNS は、*Pax2* の発現の低下を感知して、活性化するフェイルセーフ型エンハンサーであることを発見した。遺伝子発現ネットワークは、パラログ遺伝子の欠失だけでなく、環境要因によりかく乱されることが知られている。そこで *Pax2* の腎臓エンハンサーとレポーター遺伝子(GFP)をもつトランスジェニックカエルを通常の飼育水の塩濃度である 0.1%より高い濃度にしたところ、1 つの CNS がそれに応答して活性化することを見いだした。今後、遺伝子ネットワークの復元力における、パラログ遺伝子の発現の減少(遺伝的要因)と塩濃度など環境要因のクロストークについて研究を展開する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Ochi H., Tamai T., Nagano H., Kawaguchi A., Sudou N. And Ogino H., Evolution of a tissue-specific silencer underlies divergence in the expression of Pax2 and Pax8, *Nature Communications*, 3 Article number:848 (査読有り)

2. Ogino H., Ochi H., Reza HM. And Yasuda K., Transcription factors involved in lens development from the preplacodal ectoderm, *Developmental Biology*, 363, 333-47, 2012 (査読有り)

3. Hosokawa Y., Ochi H., Iino T., Hiraoka A., Tanaka M., Photoporation of biomolecules into single cells in living vertebrate embryos induced by a femtosecond laser amplifier, *PLoS ONE*, 6(11):e27677, 2011 (査読有り)

4. Yokoyama, H., Maruoka, T., Ochi, H., Aruga, A., Ohgo, S., Ogino, H. and Tamura, K. Different requirement for Wnt/ β -catenin signaling in limb regeneration of larval and adult Xenopus. *PLoS ONE*, 6(7):e21721, 2011 (査読有り)

5. Sato S., Ikeda K., Shioi G., Ochi H., Ogino H., Yajima H. and Kawakami K., Conserved expression of mouse Six1 in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the rostral PPR, *Developmental Biology*, 344(1):158-171, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計 32 件)

国内学会 (講演)

1. Ogino H., Ochi H. and Uchiyama C. Conservation and neofunctionalization of cis-regulatory elements in paralog

evolution、第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会、兵庫、2010 年 12 月 9 日

2. 細川陽一郎、越智陽城、田中幹子再生増幅フェムト秒チタンサファイアレーザーを利用した動物胚中の 1 細胞への DNA・RNA の導、第 31 回日本レーザー医学学会、愛知学院大学、2010 年 11 月 13 日

3. 越智陽城、玉井智子、長野紘樹、川口茜、須藤則広、荻野肇、組織特異的サイレンサーの獲得によるパラログ遺伝子の発現の多様化、第 5 回日本ツメガエル研究集会、静岡、2011 年 10 月 6 日

4. 横山仁、丸岡玉枝、越智陽城、有賀章郎、天野孝紀、城石俊彦、荻野肇、田村宏治、両生類における皮膚の完全再生 -四肢再生の基盤として -、第 5 回日本ツメガエル研究集会、静岡、2011 年 10 月 6 日

5. 川口茜、越智陽城、須藤則広、荻野肇、ツメガエルの初期発生におけるヒストン H3 メチル化因子と脱メチル化因子の機能解析、第 5 回日本ツメガエル研究集会、静岡、2011 年 10 月 6 日

6. 須藤則広、川口茜、越智陽城、荻野肇、エピジェネティック因子 Jmjd3 による異所的な細胞分化と器官形成の促進、第 5 回日本ツメガエル研究集会、静岡、2011 年 10 月 6 日

7. 細川陽一郎、越智陽城、飯野敬矩、平岡章宏、田中幹子フェムト秒レーザー誘起衝撃力によるゼブラフィッシュ胚への生体分子導入、第 71 回 応用物理学会学術講演会、長崎大学、2010 年 9 月 15 日

8. 荻野肇、越智陽城
パラログ形成にともなうシス調節機構の進化、第 12 回 日本進化学会大会、東京工業大学、2010 年 8 月 5 日

9. 越智陽城

Skeletal muscle development in zebrafish 第 5 回関西小魚セミナー、京都大学 農学部、2010 年 7 月 30 日

10. Ogino H. and Ochi H.

Evolution of cis-regulatory mechanisms in

paralog formation, 第 43 回 日本発生物学学会、京都、2010 年 6 月 21 日

11. Ogino H. and Ochi H.

Pax2/5/8 パラログ遺伝子群のシス調節ネットワークの進化の解析、第 3 回 日本ツメガエル研究集会、日本ツメガエル研究集会、広島、2009 年 10 月 6 日

12. Sato S., Ikeda K., Hayashibara Y., Nakao K., Aizawa S, Ochi H., Ogino H., Kawakami K., Cis-regulatory mechanisms controlling Six1 expression in the preplacodal region and sensory placode、第 42 回 日本発生物学学会、新潟、2009 年 5 月 29 日

国際学会

1. Ochi H., Tamai T., Nagano H., Kawaguchi A., Sudou N. and Ogino H., Conservation and diversification of cis-regulatory mechanisms for pax2/5/8 paralog group in chordates, The American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, Denver, Colorado, USA, **2011年12月4日**

2. Kawaguchi A, Ochi H., Sudou H., Okano M. and Ogino H., Functional analysis of the histone H3K27 methyltransferase and demethylase in *Xenopus* embryonic development, The 16th International Conference of the international Society of differentiation, From Stem Cells to Organisms November, Nara, **2010 年 11 月 15-18 日**

3. Ochi H., Uchiyama C., Kawaguchi A. and Ogino H. Evolution of a fail-safe regulatory system for kidney development, The 16th International Conference of the international Society of differentiation, From Stem Cells to Organisms November, Nara, **2010 年 11 月 15-18 日**

4. Yokoyama H., Maruoka T., Ochi H., Aruga A., Ohgo S., Ogino H. and Tamura K., EMBO Conference Series (3rd) "Molecular and Cellular basis of Regeneration and Tissue Repair" Different involvement of Wnt/ β -catenin signaling in limb regeneration of larval and adult *Xenopus*,

Portugal, **2011年9月26-30日**

国内学会 ポスター

1. Yajima H., Suzuki M., Ochi H., Ikeda K., Sato S., Ogino H., Ueno N. and Kawakami K., Heterochronic shift of *Six1* expression drives evolutionary transition of vertebrate primary sensory neurons、第 44 回 日本発生物学学会、沖縄、2011 年 5 月 20 日

2. Ochi H., Uchiyama C., Kawaguchi A., Tamai T. and Ogino H., A pair of duplicated enhancers controls both a fail-safe regulation for development and adaptation to environmental stress、第 44 回 日本発生物学学会、沖縄、2011 年 5 月 20 日

3. Kawaguchi A., Ochi H., Sudou N. and Ogino H., A H3K27 demethylase, *Jmjd3*, is essential for *Xenopus* eye development, 第 44 回 日本発生物学学会、沖縄、2011 年 5 月 19 日

4. Kikuchi Y., Nakatani Y., Ochi H. and Tanaka M., Morphological and Molecular Basis of Pelvic Fin Muscle Development in Zebrafish, The 20th CDB Meeting Molecular Bases for Evolution of Complex Traits、神戸、2011 年 2 月 23-24 日

5. 横山仁、丸岡玉枝、越智陽城、有賀章郎、大湖史、萩野肇、田村宏治、幼生期と成体期の *Xenopus* でみられる四肢再生における異なる開始機構、日本動物学会-東北支部大会、福島、2010年8月25-27日

6. Ochi H. and Ogino H., A fail-safe regulatory system generated by genome duplications for kidney development、第 43 回 日本発生物学学会、京都、2010 年 6 月 21 日

7. Kawaguchi A., Ochi H., Okano M. and Ogino H., Functional analysis of epigenetic regulators, *Ezh2* and *Jmjd3*, in *Xenopus* embryonic development、第 43 回 日本発生物学学会、京都、2010 年 6 月 21 日

8. Yajima H., Suzuki M., Ochi H., Ikeda K., Sato S., Ogino H., Ueno N. and Kawakami K., Developmental switch from Rohon-Beard

cells to dorsal root ganglia、第43回日本発生生物学学会、京都、2010年6月20日

9. Okano M., Kawaguchi A. Ochi H. and Ogino H., Expression and functional analysis of epigenetic regulators, Eed, Ezh2, Jmjd3 and Utx in Xenopus embryonic development、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9日-12日

10. Sakamoto K., Onimura K., Munakata K., Suda N., Tamura, M. Ochi H. and Tanaka M., Heterochronic shift in Hox-mediated activation of Sonic hedgehog leads to morphological changes during vertebrate fin evolution、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9日-12日

11. Yokoyama H., Ochi H., Ogino H. and Tamura K., Wnt シグナルは四肢再生に対して幼生期と成体期で異なる関与をする、第80回日本動物学会、静岡、2009年9月19日

12. Ogino H. and Ochi H.、カエルの高効率トランスジェニックシステムを用いた機能ゲノム学的研究の展開、第80回日本動物学会、静岡、2009年9月19日

13. Ochi H. and Ogino H., Pax2/5/8 パラログ遺伝子群のシス調節ネットワークの進化の解析、第80回日本動物学会大会、静岡、2009年9月17日

14. 大湖史朗、横山仁、越智陽城、荻野肇、田村宏治、アフリカツメガエル四肢発生-再生過程におけるレチノイン酸のはたらき、日本動物学会-東北支部大会、宮城、2009年8月1日

15. Ochi H. and Ogino H., Transgenic analysis of a cis-regulatory network for the Pax3/5/8 paralog group in Xenopus; an evolutionary view、第42回日本発生生物学学会、新潟、2009年5月29日

16. Yokoyama H., Ochi H., Ogino Hajime and Tamura K., Different involvement of Wnt/B-catenin signaling in limb regulation of larval and adult Xenopus、第42回日本発生生物学学会、新潟、2009年5月29日

[その他]
ホームページ等
<http://bsgcoe.naist.jp/ogino/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越智 陽城 (OCHI HARUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任助教

研究者番号：00505787