

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770214

研究課題名(和文)パラログ間クロストークによる遺伝子発現の安定化機構

研究課題名(英文)Robustness mechanisms for gene expression through the paralogous genes

## 研究代表者

越智 陽城(Ochi, Haruki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：00505787

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)：遺伝子発現の安定化には、遺伝子重複により生じたパラログの働きが鍵であることが指摘されている。本研究では脊椎動物のパラログペアであるPax2とPax5に着目しその分子実体の解明に迫った。ツメガエルのPax2は前腎では発現する。一方Pax5の発現はみられない。しかしながらPax2の機能阻害と浸透圧ストレスにより、Pax5の発現が前腎で亢進することがわかった。さらに祖先型遺伝子のナメクジウオのPax2/5/8は、浸透圧ストレスにより活性化することを発見した。これらからPax2とPax5のパラログ間での発現の安定化機構は、祖先遺伝子が持っていた浸透圧ストレス応答のメカニズムから進化したことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Paralogous genes often have redundant functions, while little is known about the evolution of their regulatory interactions. It has been reported that, while pax2 and ancestral-type ortholog pax2/5/8 show constitutive expression in the pronephros and its orthologous tissue in amphioxus respectively, pax5 shows no expression in the pronephros. We found that pax5 gets activated in the pronephros, by either the down-regulation of pax2, or by hypertonic osmotic stress. We identified a pronephric enhancer of pax2, and revealed that its paralogous counterpart in pax5 is involved in both the functional compensation of pax2 and the osmotic stress response. Their ancestral-type enhancer in pax2/5/8 was also active in the normal pronephros but got further activated by the hypertonic osmotic stress. These results suggest that the mechanisms for the functional compensation of pax2 by pax5 evolved from the osmotic stress response mechanism of their ancestral gene.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：パラログ 発生制御遺伝子 Pax2 Pax5 ナメクジウオ ツメガエル トランスジェニックシステム  
浸透圧ストレス

1. 研究開始当初の背景

発生プログラムの正常な進行には、多数の遺伝子の発現が複雑に絡みつつ正確に制御されることが必要である。しかし一般の野生生物のゲノムには様々なポリモルフィズムが存在し、それらは個々の遺伝子の発現量等に複雑な影響を及ぼす。また温度等の環境要因も遺伝子発現に対して大きな影響を与える。これら遺伝あるいは環境要因による攪乱作用から、発生制御遺伝子の発現量を安定化させる仕組みの1つとして、遺伝子発現をオンにする入力シグナルに対して、その遺伝子の下流の抑制因子が拮抗することで発現のバランスをとる抑制フィードバック回路が知られている。しかしシミュレーション解析をおこなってみると、この回路だけでは、発現量のベースレベルの低下や上昇によりフィードバックのタイミングが少しでも遅れると、「発現し過ぎ」と「減少し過ぎ」の状態が繰り返されるようになり、発現量は一定の値に収束することなく振動し続けてしまう。したがって実際には抑制フィードバックだけではなく、何か振動を避ける仕組みが存在すると推測されるが、その分子実体はいまだに捉えられていない。

2. 研究の目的

先に述べたように、発生制御遺伝子は、環境変化や遺伝的な攪乱に対して自身の発現量を安定に保つ力を備えている。抑制フィードバックは発現安定化の中心的な遺伝子回路であるが、これのみでは一旦揺らぎに陥ると発現の振動が続いてしまう。本研究では、パラログ遺伝子とパラログ間で保存されているエンハンサーに着目し、これらエンハンサーの胚内での働きを調べ、遺伝子発現の揺らぎを安定化させる仕組みや進化プロセスを解明する。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子発現の安定化機構におけるパラログ遺伝子のエンハンサーの働きについて、レポーター・トランスジェニックやライブイメージング法を使い、その役割を解明する。まず Pax2、Pax5 あるいは WT1 のエンハンサーをそれぞれ蛍光蛋白質やルシフェラーゼ遺伝子に連結し、トランスジェニックツメガエルを作製する。これを用いて、正常発生時の遺伝子発現のダイナミクスを調べる。次にアンチセンス法により Pax5 の発現を完全に抑制した上で、Pax2 の発現を少し抑制したとき、シミュレーション予測の通りに Pax2 やその下流遺伝子 WT1 のレポーターの発現が大きく振動するかどうか解析する。次に高塩濃度ストレスが Pax2 の発現の一過的な振動を引き起こすのか、その作用点はどこか、Pax5 の発現を抑制した状態ではより大きな振動が続くのか調べる。また、Pax2 と Pax5 の場合と同様に、祖先遺伝子由来のエンハンサーが保存されているパラログベ

アが多数存在するが、それらのいくつか (Sox2 と Sox3、COUP-TF1 と COUP-TF2 等) についてもライブイメージング解析をおこない、相同なエンハンサーを介した遺伝子発現の安定化機構の普遍性について検討する。

4. 研究成果

Pax2 は転写因子をコードしており、その発現は転写をオンにする入力シグナルと、下流遺伝子の1つで Wilms' Tumor 1 (WT1) と呼ばれる転写抑制因子との拮抗作用により調節されることが知られている (抑制フィードバック)。また Pax2 とその類似遺伝子 Pax5 は、脊椎動物の祖先種で起きたゲノム重複によって同じ祖先遺伝子から形成されたパラロググループである (図1)。Pax2 と Pax5 のゲノム配列を比較すると、イントロン内に部分的に保存された配列が見つかる (図1、灰色のボックス)。これらは祖先遺伝子のシス調節エレメントに由来するもので、ゲノム重複後もそれぞれの遺伝子座で少しずつ配列を変化させて発現調節を担っていると考えられる。申請者は Pax2 遺伝子座周辺ゲノム領域について網羅的なトランスジェニック解析をおこない、この Pax2 のイントロン配列こそが、Pax2 の前腎での発現を制御する主要なエンハンサーであることを発見した。また Pax5 の相同なイントロン配列も、前腎で弱いエンハンサー活性を示した。

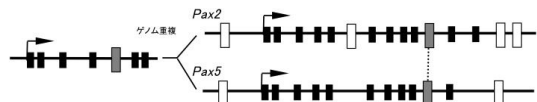


図1 遺伝子重複により生じたPax2とPax5のパラログの間で保存されているシス調節配列  
 黒色のボックスはエキソン、灰色のボックスはパラログ間で保存されているシス調節配列とその祖先型を示す。  
 白色のボックスはPax2とPax5のそれぞれでユニークなシス調節配列を示す。

正常発生において、Pax5 はごく低いレベルで前腎に発現するが、このイントロンエンハンサーがその機能を担っていると考えられる。興味深いことに、この Pax5 のイントロンエンハンサーをレポーター遺伝子に連結したトランスジェニック系統において、アンチセンス法により Pax2 の発現を阻害すると、レポーター遺伝子の発現が強く活性化され、前腎における内在の Pax5 の発現も亢進した (図2)。さらに、ツメガエル胚を高塩濃度にさらしたときにも Pax5 のイントロンエンハンサ

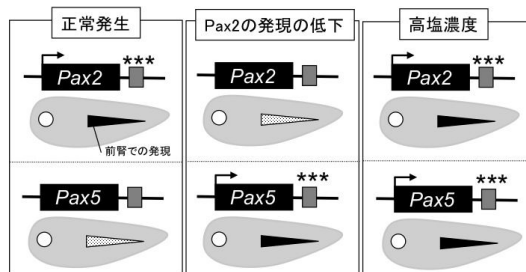


図2 パラログ遺伝子間で進化的に保存されているエンハンサーの活性  
 Pax2の発現が低下すると、Pax5の相同なエンハンサーが活性化してPax5の発現が亢進する。胚を高塩濃度にさらした時もこのエンハンサーは活性化し、Pax5の発現が亢進する。

ーが活性化し、Pax5 の発現が亢進することを

発見した (図 2)。したがって Pax5 の発現誘導は、Pax2 の発現の低下といった遺伝的な攪乱作用だけでなく、環境要因による攪乱作用に対しても、Pax2 の発現を安定化するために起こると考えられる。

#### 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 3 件)

Nanoka Suzuki, Koudai Hirano, Hajime Ogino, Haruki Ochi, Identification of distal enhancers for Six2 expression in pronephros., *Int. J. Dev. Biol.*, 査読有り、2015, in press, doi: 10.1387/ijdb.140263ho

Shinichi Hayashi, Haruki Ochi, Hajime Ogino, Aiko Kawasumi, Yasuhiro Kamei, Koji Tamura, Hitoshi Yokoyama, Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration., 査読有り, *Dev. Biol.*, 2014, 396(1):31-41, doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.018.

Hiroshi Yajima, Makoto Suzuki, Haruki Ochi, Keiko Ikeda, Shigeru Sato, Ken-ichi Yamamura, Hajime Ogino, Naoto Ueno, Kiyoshi Kawakami, Six1 is a key regulator of the developmental and evolutionary architecture of sensory neurons in craniates., 査読有り, *BMC Biol.*, 2014, 12(1):40., doi:10.1186/1741-7007-12-40

[学会発表](計 14 件)

越智陽城、ツメガエルのゲノム情報とトランスジェニック技術を使った再生応答エンハンサーの同定、第 1 回イベリアイモリの会、2014 年 12 月 5 日、鳥取大学 (鳥取県鳥取市)

越智陽城、荻野肇、全ゲノム倍化直後の脊椎動物胚の遺伝子発現動態 第 37 回日本分子生物学会、ワークショップ: 生態進化発生学 (Eco-Evo-Devo) とは言うけども 2014 年 11 月 25 日-27 日、パシフィック横浜 (神奈川県神奈川市)

竹島一仁、平野高大、越智陽城、星島一幸、高山-渡辺絵理子、渡辺明彦、外山史、千葉親文、CRISPR-Cas9 を用いたアカハライモリ・チロシナーゼ遺伝子欠失個体の作製、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 25 日-27 日、パシフィック横浜 (神奈川県神奈川市)

鈴木菜花、星島一幸、荻野肇、越智陽城、ゲノム編集技術 TALEN と CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子発現調節領域のゲノムワイドな機能解析 第 22 回山形分子生物学セミナー 2014 年 11 月 8 日、山形大学 (山形県山形市)

平野 高大、越智陽城、星島一幸、竹島一仁、星島一幸、渡辺-高山絵理子、渡辺明彦、ゲノム編集技術 TALEN を用いたアカハライモリのチロシナーゼ遺伝子の破壊、第 22 回山形分子生物学セミナー 2014 年 11 月 8 日、山形大学 (山形県山形市)

越智陽城、Gene expression dynamics in the artificially genome duplicated vertebrate embryo、第 86 回日本遺伝学会、ワークショップ: ゲノム編集技術と両生類遺伝学の最先端 2014 年 9 月 17 日-19 日、長浜バイオ大学 (滋賀県長浜市)

Hajime Ogino, Sudo Norihiro, Akane Kawaguchi, Haruki Ochi, Modification of cell differentiation competence by histone H3K27 demethylase., 第 85 回日本動物学会、ワークショップ: ナショナルバイオリソース、2014 年 9 月 11 日- 13 日、東北大学 (宮城県仙台市)

Nanoka Suzuki, Kazuhuki Hoshijima, Hajime Ogino, Haruki Ochi, Identification of a cis-regulatory module for glomerular regeneration using comparative genomics and transgenesis techniques for amphibian., 第 85 回日本動物学会 ワークショップ: ゲノム情報と胚誘導・形態形成研究のクロストーク、2014 年 9 月 11 日- 13 日、東北大学 (宮城県仙台市)

林 真一、越智陽城、荻野肇、川住 愛子、亀井 保博、田村 宏治、横山 仁、Transcriptional regulators in hippo pathway control organ growth during tail regeneration in *Xenopus* tadpoles、第 85 回日本動物学会 2、2014 年 9 月 11 日- 13 日、東北大学 (宮城県仙台市)

Nanoka Suzuki, Kazuhuki Hoshijima, Hajime Ogino, Haruki Ochi, Identification of cis-regulatory module for the glomerular regeneration using comparative genomics and transgenesis techniques for amphibian. International Workshop on Developmental and Regeneration Biology in Yamagata, 2014 年 9 月 10 日、山形大学 (山形県山形市)

Koudai Hirano, Haruki Ochi, Kazuuki Hoshijima, Kazuhito Takeshima, Eriko Watanabe, Akihito Watanabe, Tyrosinase

gene knockout by TALEN technology in the red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. International Workshop on Developmental and Regeneration Biology in Yamagata, 2014年9月10日、山形大学(山形県山形市)

Nanoka Suzuki, Hajime Ogino, Haruki Ochi, The impact of whole genome duplication on vertebrate evolution: Lessons from theartificially tetraploidized embryo, 47th Japanese Society of Developmental Biologist/Asia-Pacific Developmental Biology Network, 2014年5月27-30、Winc Aich (愛知県名古屋市)

Yuuko Sasaki, Yuka Tamura, Kazuuki Hoshijima, Hajime Ogino, Haruki Ochi, Identification of a cis-regulatory module for glomerular regeneration, 47th Japanese Society of Developmental Biologist/Asia-Pacific Developmental Biology Network, 2014年5月27-30、Winc Aich (愛知県名古屋市)

Akane Kawaguchi, Haruki Ochi, Norihiro Sudou, Hajime Ogino, Activation of H3K27 methyltransferase and demethylase genes during *Xenopus* tail regeneration, 47th Japanese Society of Developmental Biologist/Asia-Pacific Developmental Biology Network, 2014年5月27-30、Winc Aich (愛知県名古屋市)

〔図書〕(計2件)

川口茜、越智陽城、須藤則広、荻野肇、ヒストン脱メチル化因子 Jmjd3 による眼形成遺伝子 Pax6 の発現制御、21世紀の遺伝学(XI) GSJ コミュニケーションズ 日本遺伝学会幹事会編集、2015、89巻4号 p8

Haruki Ochi, Aakane Kawaguchi, Hajime Ogino, Differential use of paralogous genes via evolution of cis-regulatory elements for divergent expression specificities, New Principles in Developmental Processes, Eds. Hisato Kondoh and Atsushi Kuroiwa, Springer, 2014, Chapter 21, p279-289,

〔産業財産権〕

出願状況(計0)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越智 陽城 (HARUKI Ochi)

山形大学医学部メディカルサイエンス推進  
研究所 助教

研究者番号：00505787