

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07082

研究課題名(和文) エピジェネティック制御を介した遺伝子転用進化の研究

研究課題名(英文) Analysis of gene co-option mechanisms involving epigenetic regulation

研究代表者

荻野 肇 (OGINO, Hajime)

広島大学・両生類研究センター・教授

研究者番号：10273856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脊椎動物の祖先種がゲノム重複によって新たに獲得したヒストン脱メチル化因子Jmjd3に注目して、神経堤や感覚器プラコードの進化機構の解明を試みた。Jmjd3が活性化する下流遺伝子を探索したところ、感覚器プラコードの誘導に関するnoggin遺伝子や神経堤形成に必要なphox2遺伝子等に加えて、ヒストンアセチル化因子kat5等のクロマチン制御因子群が同定された。また、ナメクジウオHedgehog(Hh)遺伝子のエンハンサー解析から、脊椎動物のIhh遺伝子は、進化の過程で咽頭内胚葉エンハンサーを神経堤・鰓弓エンハンサーに変化させた可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Jmjd3 is the histone H3 demethylase that was acquired in the vertebrate ancestor by an ancient genome duplication event. In this study, we attempted to reveal the evolutionary mechanisms of neural crest and sensory placode by studying gene regulatory networks activated by the Jmjd3. Our search for the downstream genes of Jmjd3 identified not only genes that are involved in neural crest and/or sensory placode formation (noggin, phox2, etc.) but also a variety of chromatin modifiers including the histone acetyltransferase, kat5. We also performed the enhancer analysis of Amphioxus hedgehog gene, which suggested that the vertebrate ortholog, Ihh, innovated the neural crest / branchial arch enhancer by modifying the ancestral pharyngeal endoderm enhancer during the evolution.

研究分野：発生生物学

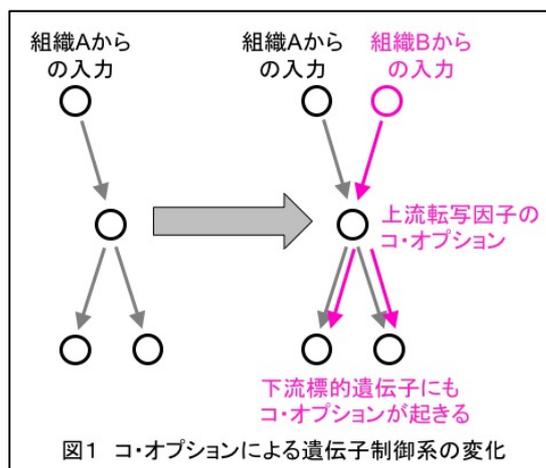
キーワード：発生 進化 感覚器プラコード 神経堤 エピジェネティック制御 ツメガエル ナメクジウオ 遺伝子転用

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の発生において、鼻の嗅上皮や眼のレンズ、内耳、下垂体の原基である感覚器プラコードと、頭部軟骨や末梢神経、色素細胞の原基である神経堤は、いずれも神経板と表皮外胚葉との境界部に形成される。また、感覚器プラコードと神経堤は、脊椎動物の祖先種に近縁な原索動物には存在しないことから、脊椎動物への進化過程で新たに獲得された組織と考えられる。脊椎動物と原索動物の遺伝子発現の比較から、それらの進化には遺伝子の転用(コ・オプシオン)が重要な役割を果たしたと推測されている (Holland, L. Z., *Semin. Cell Dev. Biol.*, 24: 101-109, 2013.)。

例えば脊椎動物の *FoxE3* 遺伝子はレンズプラコードと咽頭部で発現するが、原索動物であるナメクジウオのオーソログはプラコード相同組織(ハチェック窩等)では発現せず、咽頭部のみで発現することから、*FoxE3* はコ・オプシオンによりレンズの獲得進化に参加した遺伝子の1つと考えられる。また、*FoxE3* のような転写因子の遺伝子にコ・オプシオンが起きると、下流の遺伝子プログラム全体が引きずられてコ・オプシオンを起こす可能性がある(図1)。この場合、構造的な変化が起きる遺伝子は上流転写因子の遺伝子のみであり(先導的コ・オプシオン遺伝子)、下流の引きずられた遺伝子群(従属コ・オプシオン遺伝子)は構造変化無しに新たな発現部位を獲得すると考えられる。

神経堤の場合には、コ・オプシオンにより *Twist* や *AP-2* 等、様々な転写因子の遺伝子はその進化に参加したと考えられている。しかし実際の進化において、どのような遺伝子の変化がきっかけとなって一連のコ・オプシオンが起きたのか、そのメカニズムについては何もわかってはいない。



### 2. 研究の目的

本研究では、コ・オプシオンのメカニズムの解明を目的として、*Jmjd3* というエピジェネティック制御因子に注目した。*Jmjd3* 蛋白質はヒストン H3K27 (ヒストン H3 の 27 番目のリジン) を脱メチル化してクロマチンを弛緩させ、近傍遺伝子の発現を促進する機能をもつ。

これまでに研究代表者は、ツメガエル胚において *Jmjd3* 遺伝子の発現を抑制すると、感覚器プラコードや神経堤に特異的な遺伝子の発現が失われ、両組織の形成が阻害されることを発見した。さらに、ナメクジウオやホヤの全ゲノム解析と、それに基づく遺伝子の系統樹解析から、*Jmjd3* は脊椎動物の祖先種において、もう1つの H3K27 脱メチル化因子 *Utx* から遺伝子重複により派生したこと、そのため原索動物には存在せず、脊椎動物にユニークなことを発見した(未発表データ)。これらの発見は、脊椎動物の祖先種における *Jmjd3* 遺伝子の形成こそが、コ・オプシオンを惹起し、プラコードと神経堤の獲得のきっかけになったことを示唆している。本研究では上記の発見をもとに、*Jmjd3* 蛋白質の標的遺伝子群とその下流の遺伝子ネットワークを同定することにより、コ・オプシオンの分子機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Jmjd3* の下流遺伝子群の探索同定

当初、クロマチン免疫沈降解析(ChIP-seq)によって *Jmjd3* 標的遺伝子群の同定を試みる予定であった。しかし *Myc* タグ付きの *Jmjd3* をツメガエル胚に発現させ、抗 *Myc* 抗体を用いて *Jmjd3* が結合するクロマチン断片を回収したところ、その精製度は、次世代シーケンサー解析に十分ではなかった。クロマチンに対する *Jmjd3* の結合が弱いため、ホルムアルデヒドによるクロスリンクを強くして免疫沈降の回収率を上げる必要があったが、それが精製度を下げる原因になったと考えられる。

そこで代替の実験として、mRNA インジェクション法により *Jmjd3* を腹部で強制発現させた後期神経胚期のツメガエル胚から RNA を回収し、感覚器プラコードや神経堤の形成に関わる遺伝子群の発現解析をおこなった。また、研究代表者は先行研究により、眼形成を制御する7つの転写因子 (*Pax6*, *Otx2*, *Six3*, *Six6*, *Rax*, *ET*, *Tll*) を mRNA インジェクション法によりツメガエル胚の腹部に発現させても、そこに眼は形成されないが、この7つの転写因子に加えて *Jmjd3* を発現させると、異所的な眼形成を誘導できることを発見している(未発表データ)。ナメクジウオには脊椎動物のような発達したカメラ眼は存在せず、これら7つの転写因子のオーソログは主に脳胞で発現している。進化の過程を考えれば、*Jmjd3* が脳胞で発現していた転写因子に作用し、その標的遺伝子の発現を変化させてコ・オプシオンを引き起こした可能性が考えられる。そこで、この実験系においても RNA 発現解析をおこない、*Jmjd3* と頭部神経系の発生を制御する転写因子が協調的に作用したときに活性化する遺伝子群を探索した。

#### (2) 先導的コ・オプシオン遺伝子と従属コ・オプシオン遺伝子を区別する解析系の構築

RNA 発現解析によって同定した *Jmjd3* の下

流遺伝子群には、先導的コ・オプション遺伝子のみならず、その下流で活性化される従属コ・オプション遺伝子も含まれるはずである。これらを区別する方法として、ナメクジウオオーソログのシス調節配列の活性をツメガエル胚で調べる実験を考えた。例えば、もし「1. 研究開始当初の背景」で述べた脊椎動物の FoxE3 遺伝子が、シス調節配列の変化によりレンズプラコードでの発現を獲得した先導的コ・オプション遺伝子であるならば、ナメクジウオオーソログ (Amphi-FoxE 遺伝子) のシス調節配列は、ツメガエルに導入してもレンズで活性を示さないはずである。しかし脊椎動物の FoxE3 遺伝子が、その上流転写因子がレンズで発現を獲得したことにより、引きずられてレンズで発現するようになった従属コ・オプション遺伝子であるならば、Amphi-FoxE 遺伝子のシス調節配列は、ツメガエルにおいてレンズで活性を示すと考えられる。

しかし、ナメクジウオにおけるトランスジェニック技術が一般的に確立されていない為、まずナメクジウオ遺伝子のシス調節配列を同定するのが容易ではない。一方、研究代表者は pax6 遺伝子に関するこれまでの研究から、ナメクジウオと脊椎動物のオーソログ間では、エキソン・イントロン構造及びそれらに対するエンハンサーの相対的位置がおおよそ保存されているらしいことを発見している (未発表データ)。もちろん、この知見が当てはまる場合であっても、脊椎動物の FoxE3 遺伝子のように、遺伝子間領域にエンハンサーを持つ場合は、Amphi-FoxE 遺伝子のエンハンサーの位置を推定することは困難である (Ogino, H. et al., *Development*, 135: 249-258, 2008)。すなわち、そのエンハンサーが第1エキソンからどれだけ上流に離れているか、あるいは最終エキソンからどれだけ下流に離れているかは予測できない。しかしイントロンに含まれるエンハンサーであれば、特定のイントロンペアの間として、比較的簡単に位置を推定することができる。

そこで本研究ではこの知見に基づき、イントロンにエンハンサーを持つと考えられる脊椎動物の遺伝子で、かつ神経堤形成に必要なことが知られている Ihh 遺伝子に注目し、モデル実験をおこなった。具体的には、そのナメクジウオオーソログ (Amphi-Hh 遺伝子) の該当するイントロンを単離同定してレポーター遺伝子 (GFP 遺伝子) に連結し、トランスジェニックツメガエル胚を作製して、レポーター遺伝子の発現部位を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Jmjd3 の下流で活性化する遺伝子ネットワークの解析

まず、Jmjd3 のみをツメガエル胚の腹部で強制発現させた胚から RNA を回収し、RNA 発現解析をおこなった。その結果、感覚器プラコード形成遺伝子の中では、noggin, noggin2, dmrta2, foxi2, pitx1 等の発現が、神経堤形成

遺伝子の中では pax3, phox2, tead1 等の発現が異所的に活性化することが明らかになった。

noggin ファミリーは BMP 阻害因子をコードし、脊椎動物の胚では原腸形成後に神経板の前縁部で発現し、予定感覚器プラコード領域はこの noggin 発現部位と隣接して形成される (Fletcher, R. B. et al., *Gene Expr. Pattern*, 5: 225-230, 2004)。これまでに、ナメクジウオの noggin オーソログは、神経板期に発現しないことが報告されており、それゆえ神経板前縁部における noggin ファミリーの発現は、脊椎動物の祖先種で新たに獲得されたと考えられる (Yu, J. et al., *Nature*, 445: 613-617, 2007)。

またこれまでの研究から、神経板前端部と周囲の表皮外胚葉との境界部位に予定感覚器プラコード領域を形成する為には、表皮外胚葉からもたらされる BMP と、神経板あるいは裏打ちする中軸中胚葉からもたらされる BMP 阻害因子との拮抗作用が必要であることが示されている (Ogino, H. et al., *Dev. Biol.*, 363: 333-347, 2012)。さらに研究代表者は、Jmjd3 が noggin の発現する神経板前端部で発現することを発見している (Kawaguchi, A. et al., *Int. J. Dev. Biol.*, 56: 295-300, 2012)。これらのことを考慮すると、Jmjd3 の獲得により noggin がコ・オプションを起こした可能性は高いと考えられる。

次に眼形成を制御する7つの転写因子

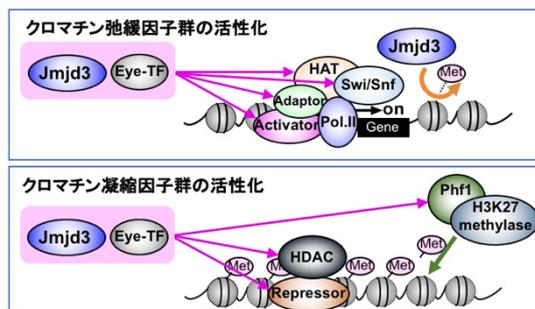


図2 Jmjd3と眼形成転写因子との相互作用によるクロマチン制御因子群の活性化

(Pax6, Otx2, Six3, Six6, Rax, ET, Tll) と一緒に Jmjd3 をツメガエル胚の腹部で強制発現させた胚から RNA を回収し、RNA 発現解析をおこなった。その結果、遺伝子の活性化に作用するクロマチン制御因子群 (Six ファミリー転写因子の共役活性化因子 Eya3 やクロマチン再構成因子 Ruvbl1、ヒストンアセチル化因子 Kat5 等) や、遺伝子の抑制に作用するクロマチン制御因子群 (ヒストン H3K27 メチル化に関わる共役抑制因子 Ctbpl、ヒストン脱アセチル化因子 Hdac7 等) が、特異的に活性化されることを発見した (図2)。この結果は、Jmjd3 がクロマチン制御の連鎖を引き起こし、プラコードや神経堤の形成に必要な多くの遺伝子の発現を誘導する可能性を示すものである。

##### (2) Hedgehog (Hh) 遺伝子をモデルに用いたコ・オプション機構の解析

Amphi-Hh 遺伝子は脊索の前端部と神経管、

咽頭内胚葉で発現する (Shimeld, SM, *Dev. Genes Evol.*, 209: 40-47, 1999)。脊椎動物ではゲノム重複により、Shh 遺伝子、Ihh 遺伝子、Dhh 遺伝子の 3 つのパラログが生じており、このうち Ihh は神経堤 (と由来する鰓弓) 及び眼で発現する (Aguero, T. H. et al., *Dev. Biol.*, 364: 99-113, 2012)。また Shh は第 1 及び第 2 イントロンに、中脳、後脳、脊索で活性化するエンハンサーを持つ (Muller, F. et al., *Development*, 126: 2103-2116, 1999; Ertzer, R. et al., *Dev. Biol.*, 301: 578-589, 2007)。Amphi-Hh が祖先型エンハンサーを Shh と同じく第 1 及び第 2 イントロンに持つ可能性を考え、該当領域クローニングし、それぞれを GFP 遺伝子に連結してトランスジェニックツメガエル胚を作製した。これらの GFP の発現を解析したところ、いずれも眼と鰓弓、中脳と後脳においてエンハンサー活性を示すことがわかった。この結果は、Ihh と Shh が共に先導的コ・オプション遺伝子であり、ゲノム重複後にそれぞれ神経堤エンハンサーと全脊索エンハンサーを獲得したことを示唆している。

### (3) その他の関連する成果

(1) の RNA 発現解析をおこなうにあたり、アフリカツメガエルの全遺伝子配列の情報が必要になった為、日米欧の共同研究グループの一員として、アフリカツメガエルの全ゲノム解読プロジェクトを実施した (雑誌論文②, ③, ④)。このプロジェクトの中では、特に遺伝子モデルの検討、及び哺乳類遺伝子との塩基配列の相同性や染色体レベルでのシンテニーの保存性に基づく遺伝子名の確定作業等を担当した。アフリカツメガエルは、ゲノム重複により 4 倍体ゲノムを獲得した種であるが、本研究によりそのゲノム重複が、進化的には最近の 1700 万年前に起きたことが明らかになった。このような若い重複ゲノムの研究からコ・オプションへ至る進化の初期過程を捉えられる可能性を考え、その倍加遺伝子ペアの発現の違いや変異蓄積についても解析を実施した。特に網膜形成に必要なホメオボックス遺伝子 *six6* の倍加ペアについて解析し、片方の遺伝子コピーのエンハンサーに変異が生じて発現量が低下すると、そのコピーのコード領域に非同義置換変異が蓄積することを発見した。またこの結果に基づき、エンハンサー減衰進化モデルと名付けた新しい遺伝子進化モデルを提唱した (雑誌論文①)。

### 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 7 件)

- ① Ochi, H., Kawaguchi, A., Tanouchi, M., Suzuki, N., Kumada, T., Iwata, Y. and Ogino, H. Co-accumulation of cis-regulatory and coding mutations during the pseudogenization of the *Xenopus laevis* homeologs *six6.L* and *six6.S*.

*Dev. Biol.*, 427: 84-92, 2017, doi: 10.1016/j.ydbio.2017.05.004, 査読有。

- ② Ochi, H., Suzuki, N., Kawaguchi, A. and Ogino, H. Asymmetrically reduced expression of *hand1* homeologs involving a single nucleotide substitution in a cis-regulatory element. *Dev. Biol.*, 425: 152-160, 2017, doi: 10.1016/j.ydbio.2017.03.021, 査読有。
- ③ Watanabe, M., Yasuoka, Y., Mawaribuchi, S., Kuretani, A., Ito, M., Kondo, M., Ochi, H., Ogino, H., Fukui, A., Taira, M. and Kinoshita, T. Conservatism and variability of gene expression profiles among homeologous transcription factors in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 426: 301-324, 2017, doi: 10.1016/j.ydbio.2016.09.017, 査読有。
- ④ Session, M. A., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J. A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., van Heeringen, S. J., Quigley, I., Heinz, S., Ogino, H. et al. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538: 336-343, 2016, doi: 10.1038/nature19840, 査読有。
- ⑤ Aoki, H., Ogino, H., Tomita, H., Hara, A. and Kunisada, T. Disruption of Rest leads to the early onset of cataracts with the aberrant terminal differentiation of lens fiber cells. *PLoS One*. 11: e0163042, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0163042, 査読有。
- ⑥ Hayashi, S., Kawaguchi, A., Uchiyama, I., Kawasumi-Kita, A., Kobayashi, T., Nishide, H., Tsutsumi, R., Tsuru, K., Inoue, T., Ogino, H., Agata, K., Tamura, K. and Yokoyama, H. Epigenetic modification maintains intrinsic limb-cell identity in *Xenopus* limb bud regeneration. *Dev. Biol.*, 406: 271-282, 2015, doi:10.1016/j.ydbio.2015.08.013, 査読有。
- ⑦ 荻野 肇, 全ゲノム重複に伴うシス調節配列の進化. 生体の科学 66: 256-260, 2015, doi:https://doi.org/10.11477/mf.2425200165, 査読無し。

[学会発表] (計 20 件)

- ① Ogino, H. Cis-regulatory Evolution Following "Ancient" and "Recent" Genome Duplication Events in Vertebrates. (International Symposium at Hiroshima University: Amphibian development, regeneration, evolution and beyond, 広島大学, 広島県東広島市, 2018.3.14)
- ② 荻野 肇. ツメガエルを用いたゲノム研究とリソース事業について. (第 2 回イベリアトゲイモリ研究会, 鳥取大学医学部, 鳥取県米子市, 2017.12.19)
- ③ Tanouchi, M. et al. The hypomorphic mutations hidden in the allotetraploid genome of *Xenopus laevis*. (International Symposium at Hiroshima University: Amphibian development, regeneration, evolution and beyond, 広島大学, 広島県東広島市, 2018.3.13)

- ④ Suzuki, N. et al. Arid3a, a component of H3K9me3 demethylases, regulates the regeneration of the nephric duct through the evolutionary conserved regeneration signal response enhancer. (International Symposium at Hiroshima University: Amphibian development, regeneration, evolution and beyond, 広島大学, 広島県東広島市, 2018.3.13)
- ⑤ 越智 陽城 他. ゲノム倍加に伴うエンハンサー減衰変異と機能低下型コード変異の共蓄積. (生命科学系学会合同年次大会, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市, 2017.12.7)
- ⑥ 鈴木 菜花 他. 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. (第 88 回日本動物学会大会, 富山県民会館, 富山市, 2017.9.21)
- ⑦ 田内 幹大 他. アフリカツメガエルにおける Crispr/Cas システムの条件検討. (第 11 回日本ツメガエル研究集会, えびの高原荘, 宮崎県えびの市, 2017.9.7)
- ⑧ 荻野 肇 他. ゲノム倍加後のコード配列進化におけるエンハンサー減衰変異の促進的役割. (第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム「ゲノミクス、エピゲノミクス、インフォマティクスによるシス配列制御とその進化過程の解明」, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市, 2016.12.1)
- ⑨ Ogino, H. et al., Modification of cell differentiation competence by histone H3K27 demethylases and their involvement in tissue regeneration in *Xenopus*. (The joint meeting of the 22nd international congress of zoology & the 87th meeting of the zoological society of Japan, symposium “Regeneration in Zoology”, 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄県国頭郡恩納村, 2016.11.15)
- ⑩ 荻野 肇 他. モデル両生類の飼育方法の標準化と実験材料の共有化について. (第 2 回次世代両生類研究会「ゲノム・エピゲノムからリプログラミング・器官再生まで」, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県岡崎市, 2016.8.9)
- ⑪ Ogino, H. *Xenopus* as a useful resource for studying gene evolution and disease-causing mutations. (International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research, 基礎生物学研究所, 愛知県岡崎市, 2016.3.18)
- ⑫ 川口 茜 他. ツメガエルの尾部再生における H3K27 メチル化因子と脱メチル化因子の異なる役割. (第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市, 2015.12.3)
- ⑬ 荻野 肇 他. ゲノム重複に伴うシス調節配列の進化-ネッタイツメガエルとアフリカツメガエルを用いたアプローチ-. (第 1 回次世代両生類研究会「両生類研究の将来を考える-ゲノム科学による有尾・無尾両生類研究の橋渡し」, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県岡崎市, 2015.8.24)
- ⑭ 荻野 肇 他. *Xenopus laevis* 全ゲノム解析: 同祖遺伝子の進化過程におけるシス変異とコード変異の相互作用. (第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市, 2015.12.1)
- ⑮ 渡部 稔 他. *Xenopus laevis* 全ゲノム解析: 転写因子をコードする遺伝子群の初期発生および成体器官における発現パターンの解析. (第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市, 2015.12.1)
- ⑯ 越智 陽城 他. *Xenopus laevis* 全ゲノム解析: 異質四倍体アフリカツメガエルにおける Hand と Twist の発現の共進化. (第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市, 2015.12.1)
- ⑰ 川口 茜 他. 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. (日本遺伝学会第 87 回大会プレナリワークショップ, 東北大学 川内北キャンパス, 宮城県仙台市, 2015.9.24)
- ⑱ 川口 茜 他. ツメガエル再生細胞の増殖分化制御におけるエピジェネティック制御因子群の機能分担. (第 1 回次世代両生類研究会「両生類研究の将来を考える-ゲノム科学による有尾・無尾両生類研究の橋渡し」, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県岡崎市, 2015.8.24)
- ⑲ Kawaguchi, A. and Ogino, H.: Differential roles for the H3K27 methylase and demethylases in *Xenopus* tail regeneration. (第 48 回日本発生物学会大会, つくば国際会議場, 茨城県つくば市, 2015.6.3)
- ⑳ Suzuki, N. et al. Identification and characterization of regeneration signal response enhancers in *Xenopus* pronephros. (第 48 回日本発生物学会大会, つくば国際会議場, 茨城県つくば市, 2015.6.3)

[その他]

ホームページ等

<http://amphibian.hiroshima-u.ac.jp/members/bioresource/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荻野 肇 (OGINO, Hajime)

広島大学・両生類研究センター・教授

研究者番号: 10273856

### (2) 連携研究者

和田 修一 (WADA, Shuichi)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号: 20378607