

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370075

研究課題名(和文) 転写制御ネットワークから見る原口形成と原腸胚オーガナイザーの進化のメカニズム

研究課題名(英文) Evolutionary mechanisms of the gastrula organizer and blastopore formation by focusing on the gene regulatory network

研究代表者

平良 眞規 (Taira, Masanori)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60150083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の胚発生の初期で、基本的なボディプランを定めるのが原腸胚オーガナイザーである。この重要な組織において中心的役割を担う転写因子の役割と、進化的な成り立ちを調べることを目的とし、ツメガエルの原腸胚を用いた免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)解析を行った。その結果、転写因子のOtx2、Lim1/Lhx1、Gsc、Sialは、特定の配列をもつ遺伝子制御領域のDNA上で組み合わさって、数多くの遺伝子を正または負に制御することが示唆された。また脊椎動物の祖先型であるナメクジウオの遺伝子制御領域との比較より、制御領域の機能的進化による脊椎動物の頭部形成の進化の一端が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In early vertebrate development, the basic body plan is established by the gastrula organizer. To examine the role of several transcription factors that play a central role in this important tissue as well as its evolutionary scenario, we carried out chromatin-immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) analysis using *Xenopus* gastrula embryos. The data suggest that transcription factors Otx2, Lim1/Lhx1, Gsc, and Sial combinatorially bind to gene regulatory regions, and positively and negatively regulate several hundreds of genes. In addition, comparative functional analysis of regulatory regions between *Xenopus* and an ancient type of vertebrates, amphioxus, suggest a scenario, in which evolution in activities of regulatory regions of some organizer genes contributed for the vertebrate ancestor to have acquired the head structure.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：クロマチン免疫沈降 原腸胚オーガナイザー ネットアイツメガエル アフリカツメガエル

胚オーガナイザーが形成された。()原腸形成運動への関与が報告されている *lhx1* と *bra* は (Hukriede et al. 2003 Dev Cell 4:83; Conlon et al. 1999 Dev Biol 213:85)、共に原口唇に発現することで真正後生動物の発生様式の根幹である原腸形成の基礎となった。()原口唇での *bra* の発現がコアとなって中胚葉が創出されて三胚葉動物が出現し、脊索動物では *bra* がさらに脊索の形成にも関わり、その結果オーガナイザーは頭部オーガナイザー (*lhx1*) と胴部オーガナイザー (*lhx1* と *bra*) に分離した。

(2) この作業仮説を検証するには、イソギンチャク、ナメクジウオ、脊椎動物におけるオーガナイザー転写因子や *Bra* の標的遺伝子を網羅的に解析し比較検討すればよい。それにより、これまで困難とされてきた進化の分子メカニズムについて、実証的に検討可能になると考えられる。そこで本研究では以下の点に焦点を絞り解析した。(i) ゲノム配列が解読されているネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) の原腸胚を用い、オーガナイザーに発現する転写因子の ChIP-seq 解析を行い、標的遺伝子バッテリーを明らかにする。()ナメクジウオにおけるオーガナイザー転写因子の標的遺伝子のシス制御モジュール (cis-regulatory module: CRM) の機能的差異を *Xenopus* と比較検討する。() *Nematostella* の原腸胚を用いて ChIP-seq 解析を確立する。

3. 研究の方法

(1) 抗体の作成。GST 融合蛋白質を大腸菌で合成し、精製した。得られた GST 融合蛋白質の全体、あるいは GST を取り除いた蛋白質でウサギを免疫した。抗血清から特異抗体をアフィニティ - 精製した。

(2) ChIP-seq 解析。原腸胚オーガナイザーに発現する主要転写因子 *Lhx1*、*Otx2*、*Gsc*、*Sia*、*Mix1*、*VegT* の抗体と、*X. tropicalis* の原腸胚を用いて ChIP-seq 解析を行い、それら転写因子の標的遺伝子バッテリーを網羅的に解析した。また *Nematostella* 胚を用いた解析も行った。

(3) RNA-Seq 解析。原腸胚の各領域での発現プロファイルを作成し、ChIP-seq 法で予想された各転写因子の標的遺伝子バッテリーの妥当性を検討した。

(4) CRM のレポーター解析。標的遺伝子候補の CRM について、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚を用いたルシフェラーゼ・レポーター解析により、転写因子に対する反応性を検討する。また領域特異的発現の有無を検討するため、GFP レポーター遺伝子を用いて、トランスジェニックレポーター解析を行った。

4. 研究成果

(1) ChIP 解析のための抗体作成：アフリカツ

メガエルの *Lhx1*、*Otx2*、*Sia*、*Mix1*、*VegT* とイソギンチャクの *Nv_Lhx1* の特異抗体を作成した。*Gsc* の抗体は、共同研究者の Ken W. Cho 博士から供与されたものを用いた。抗体の特異性はウエスタンブロットとアフリカツメガエル胚を用いた免疫染色により確認した。

(2) *X. tropicalis* 胚におけるオーガナイザー転写因子の ChIP-seq 解析と RNA-seq による発現解析。抗 *Lim1*、*Otx2*、*Gs* 抗体と *X. tropicalis* 原腸胚を用いて ChIP-seq 解析を行った。得られた配列タグを *X. tropicalis* ゲノム配列上にマップし、特異的な結合を示す多数のピークを得た。結合領域がエンハンサーかサイレンサーかを識別するため、転写活性化補助因子 (coactivator) の p300 と転写抑制補助因子 (corepressor) の TLE/Groucho について、市販抗体を用いて ChIP-seq 解析を行った。その結果、*Otx2* のピークは *Lim1* ピークあるいは *Gsc* のピークは多くの箇所で重なり、かつ p300 や TLE のピークとも重なった。さらに進化的に保存された配列とも重なることから、これらの領域はシス制御モジュール (CRM) に対応すると考えられた。そこで、*Otx2*、*Lim1*、*Gsc*、p300、TLE のいずれか 2 つあるいはそれ以上のピークが重なった領域を CRM とみなした。これら CRM の活性状態を調べるため、ヒストン修飾の中から、エンハンサーマークの H3K4me1、活性化のマークの H3K27ac について市販抗体を用いて ChIP-seq 解析を行った。抑制マークの H3K27me3 は報告されているデータを用いた。さらに、CRM の網羅的解析のため、RNA-seq 法を用いた原腸胚の領域特異的発現プロファイリングを行った。その結果、14,253 個の *Xtev* 遺伝子モデルを 4,299 個のユビキタス遺伝子と 6,562 個の組織特異的遺伝子の 2 群に分けられ、さらに 83 個の頭部オーガナイザー遺伝子を同定した。

(3) ChIP-seq データの解析。本解析で同定された多数の CRM と、その近傍の遺伝子の発現の組織特性との関係を調べた結果、従来関連性が報告されていた p300 よりも、TLE の方がより組織特異的遺伝子との関連性が強いこと、および遺伝子あたりの TLE 結合 CRM の数が多いほど組織特異的遺伝子との関連性が強まることを見出した。そこで *Otx2* 結合 CRM の中から、TLE も結合している *Otx2*/TLE 結合 CRM (13,443 個) に注目して解析した。*Otx2*/TLE 結合 CRM を近傍に持つ遺伝子には、頭部オーガナイザー遺伝子ばかりでなく、胴部オーガナイザーや腹側に発現する遺伝子も含まれていた。このことは、その中で *Lim1* と結合する CRM は、3,066 個有り、*Otx2*、*Lim1*、*Gsc*、p300、TLE が結合する CRM は多数有り、その中で、*Otx2* が結合する CRM は、数千もの遺伝子周辺に存在し、かつそれらの遺伝子には既知の頭部オーガナイザー遺伝子ばかりではなく、頭部オーガナイザーに発現してい

ない遺伝子が多数含まれることを見出した。

(4) 頭部オーガナイザーにおける Otx2、Lim1、Gsc による遺伝子制御機構。Otx2 は Lim1 と共に遺伝子を活性化し、一方 Otx2 は Gsc と共に遺伝子を抑制する、という作業仮説を立て、それを検証した。まず Otx2/TLE/Lim1 結合 CRM と Otx2/TLE/Gsc 結合 CRM の 2 群に分け、それら CRM に特徴的な転写因子結合配列を MIME プログラムにより解析したところ、前者は Lim1 結合配列が、後者には Otx2/Gsc 結合配列が濃縮されていた。そこで Otx2/TLE/Lim1 結合 CRM の中で Lim1 結合配列をもつものを type I (1250 個)、Otx2/TLE/Gsc 結合 CRM のうち Otx2/Gsc 結合配列をもつものを type II (1039 個) について、さらに検討した (図 2)。その結果、type I CRM は頭部オーガナイザー遺伝子の近傍に、type II CRM が非頭部遺伝子の近傍に存在した。これら結果を基に、我々は Otx2 の役割として以下の仮説を提唱した。すなわち、数千の遺伝子が自身の CRM に Otx2 を結合させることで、それを頭部という領域を表す指標として解釈し、頭部オーガナイザー領域での発現を正または負に制御するというものである。Otx2 は、左右相称動物の頭部に共通して発現しているため、この Otx2 を頭部領域の指標として、個々の遺伝子は CRM の多様化を通じて頭部における発現の有無および発現量を選択し、その結果様々な頭部を進化させてきたと想定される。これは、生物進化における可塑性をうまく説明できるものである。

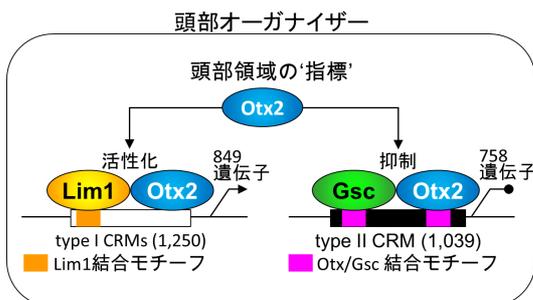


図 2: 頭部オーガナイザーにおける Otx2、Lim1、Gsc による遺伝子制御機構。Otx2 は頭部領域の指標として働き、Lim1 と協調して発現を活性化し、Gsc と協調して発現を抑制する。

(5) レポーターアッセイによる CRM の解析。type I と type II CRM の転写因子に対する反応性を *X. laevis* 胚を用いた DNA 注入レポーターアッセイで検討した。PCR で単離した CRM をプロモーターとレポーター遺伝子につなぎ、Otx2、Lim1 (及び活性化共役因子 Ldb1 と Ssbp3)、Gsc の mRNA の混合液 (頭部オーガナイザー) をレポーター遺伝子と共に胚に注入しレポーター活性を測定した。その結果、同じセットの転写因子に対して、type I は正に反応し、type II は負に反応した。このことは、Otx2 は転写の活性化と抑制を決めるのではなく、Otx2 が発現しているという情報

(つまり頭部領域という情報) を基に、Otx2 と協調して働く転写因子により発現のオンとオフが決められていることが示唆された。

(6) VegT と Mix1 の ChIP-seq 解析。VegT と Mix1 はオーガナイザー領域を含む内胚葉と中胚葉に発現する。これらの ChIP-seq ピークはいずれも多くの CRM で Otx2 や Lim1 と共同在が認められ、4 者の機能的関連性が支持された。それに加えて、VegT は内胚葉系列の組織や器官に後期発生過程で発現する遺伝子周辺の CRM にも結合しており、ヒストン修飾との関連性から、「発生準備エンハンサー」が示唆され、Gene Ontology (GO) 解析の結果からも支持された。

(7) Sia の ChIP-seq 解析。Sia は原腸胚オーガナイザーに発現し、頭部オーガナイザー形成に関わり、単独で *Xenopus* 胚に完全二次軸を形成させる活性をもつ。これまで得られた他の転写因子の ChIP-seq ピークデータを用いて相互の共同在を検討した結果、Sia は TLE、Mix1、p300、Otx2 と共同在するシス制御モジュール (CRM) が最も多かった。そこでこれら 5 つのピークが重なった領域を type A CRM として、その特徴を解析した。その結果、type A CRMs は、以前同定した 83 個の頭部オーガナイザー遺伝子の近傍に複数存在し、その存在比率は他の遺伝子に比べて有意に高かった。そこで任意に選んだ 18 個の type A CRMs をクローニングしてレポーター解析を行ったところ、これらは Sia に反応してレポーター遺伝子を活性化し、かつトランスジェニック胚では頭部オーガナイザー領域での発現をもたらした。従って type A CRMs をもつ頭部オーガナイザー遺伝子は Sia の標的遺伝子であることが強く示唆された。

(8) ナメクジウオの gsc の制御領域の解析。脊椎動物と同じ脊索動物門に属するナメクジウオは頭部オーガナイザーをもたないと考えられている。そこで脊椎動物における頭部オーガナイザー獲得に関わる要因を探るべく、脊椎動物の頭部形成に必須なオーガナイザー特異的転写因子 Lhx1 (= Lim1) と Otx2 に注目し、それらに関わる遺伝子制御ネットワークをナメクジウオとアフリカツメガエルで比較した。その結果、Lhx1 の背側への誘導に関わる Nodal 応答エレメントおよび chordin の発現維持に関わる Lhx1 と Otx2 応答エレメントが脊索動物間で保存されているものの、gsc の発現維持に関わる Lhx1 と Otx2 応答エレメントが保存されていないことを見出した。このことは、脊椎動物における gsc のエンハンサー進化が、頭部オーガナイザー獲得に関わる重要なステップであったことを示唆している。

上記解析に多大な時間を要したため、*Nematostella* 胚を用いた Nv_Lhx1 の

ChIP-seq 解析は研究期間内に行うことはできず、今後の課題として残された。

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 4 件)

Yasuoka, Y., Suzuki, Y., Takahashi, S., Sudou, N., Haramoto, Y., Tando, Y., Kubokawa, K., Cho, K. W., Asashima, M., Sugano, S. and Taira, M. (2014). Occupancy of Tissue-Specific cis-Regulatory Modules by Otx2 and TLE/Groucho for Embryonic Head Specification. Nat. Commun. in press (査読有)

Sudou, N., Yamamoto, S., Ogino, H. and Taira, M. (2012). Dynamic in vivo binding of transcription factors to cis-regulatory modules of *cer* and *gsc* in the stepwise formation of the Spemann-Mangold organizer. Development 139, 1651-1661. (査読有) doi: 10.1242/dev.068395

Moriyama, Y., Kawanishi, T., Nakamura, R., Tsukahara, T., Sumiyama, K., Suster, M., Kawakami, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Yasuoka, Y., Nagao, Y., Sawatari, E., Shimikzu, A., Wakamatsu, Y., Hibi, M., Taira, M., Okabe, M., Naruse, K., Hashimoto, H., Shimada, A., Takeda, H. (2012). The medaka enhancer mutant for *zic1/zic4* provides molecular insights into teleost caudal fin evolution. Curr. Biol., 22, 601-607. (査読有) doi: 10.1016/j.cub.2012.01.063

Venegas-Ferrin, M., Sudou, N., Taira, M. and del Pino, E. M. (2010). Comparison of *Lim1* expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. Int. J. Dev. Biol. 54, 195-202. (査読有) doi: 10.1387/ijdb.092870mv.

[学会発表](計 18 件)

本田裕樹、桐ヶ谷嘉章、安岡有理、今井紗綾、鈴木穰、高橋秀治、浅島誠、菅野純夫、平良眞規 “転写因子 *Siamois* の ChIP-seq 解析による頭部オーガナイザー形成機構の研究” (本田、口頭発表) 第 8 回日本ツメガエル研究会首都圏研究集会、横浜市大 (2014 年 3 月 16 日)
Honda, Y., Kirigaya, Y., Yasuoka, Y., Imai, S., Suzuki, Y., Takahashi, S., Asashima, M., Sugano, S. and Taira, M. “ChIP-seq analysis of Transcription factor *Siamois* for mechanisms of head organizer formation” (本田、ポスター

発表) 第 36 回分子生物学会年会、神戸 (2013 年 12 月 3 日 ~ 6 日)

Yasuoka, Y., Suzuki, Y., Takahashi, S., Haramoto, Y., Tando, Y., Kubokawa, K., Ken W. Cho, Asashima, M., Sugano, S. and Taira, M. “Otx2 and TLE/Groucho occupancy marks tissue-specific cis-regulatory modules for head specification” 第 35 回分子生物学会年会、福岡 (2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日)

Yasuoka, Y., Suzuki, Y., Takahashi, S., Sudou, N., Haramoto, Y., Tando, Y., Kubokawa, K., Cho, K. W., Asashima, M., Sugano, S., and Taira, M. “Massively parallel regulation of head and non-head genes by Otx2, *Lim1* and *Gsc* is based on evolution of the head organizer in the chordate” 日本発生生物学会第 45 回大会、神戸 (2012 年 5 月 28 日 ~ 31 日)

Yasuoka, Y., Suzuki, Y., Takahashi, S., Sudou, N., Haramoto, Y., Asashima, M., Sugano, S., and Taira, M. “Direct contributions of Otx2 as a positional tag to global gene regulation in the head organizer in *Xenopus* embryos” International Symposium “Genetic Regulation of Development” Commemorative of 27th International Prize for Biology, 2011, Celebrating Dr. Eric Davidson, 京都ガーデンパレス, 京都 (2011 年 11 月 30 日 ~ 12 月 1 日)

桐ヶ谷嘉章、安岡有理、鈴木穰、高橋秀治、浅島誠、菅野純夫、平良眞規 “ChIP-seq 法を用いた内胚葉と中胚葉形成における *VegT* と *Mix1* の役割の解析” (Role of *VegT* and *Mix1* during endoderm and mesoderm formation as assayed by ChIP-seq analysis) (桐ヶ谷、口頭発表) 第 34 回分子生物学会年会、横浜 (2011 年 12 月 13 日 ~ 16 日)

Yasuoka, Y., Sudou, N., Takahashi, S., Tando, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Kubokawa, K., Asashima, M., and Taira, M. “The molecular entity of positional information revealed by ChIP-sequence analysis for *Lim1* and *Otx2* in the head organizer and its application for evolutionary analysis(頭部オーガナイザーにおける *Lim1* と *Otx2* の ChIP-sequence 解析から明らかになった位置情報の分子実体とその進化解析への応用)” (安岡、口頭発表およびポスター発表) 『日本発生生物学会第 44 回大会』、S08-03(P-1027)、沖縄コンベンションセンター、2011 年 5 月 19 ~ 21 日

安岡有理、須藤則広、鈴木穰、高橋秀治、原本悦和、浅島誠、菅野純夫、平良眞規

“ChIP シーケンス解析で明らかとなった原腸胚オーガナイザーの遺伝子制御ネットワークにおける Lim1/Lhx1 と Otx2 の多機能性 (Versatile functions of Lim1/Lhx1 and Otx2 in the gastrula organizer gene regulatory network revealed by ChIP-sequence analysis)” (平良、ポスター発表) 第 33 回分子生物学会年会、神戸 (2010 年 12 月 7 日 ~ 10 日)

Yasuoka, Y., Sudou, N., Suzuki, Y., Takahashi, S., Haramoto, Y., Asashima, M., Sugano, S., and Taira, M. “ChIP-sequence analysis for Lim1 and Otx2 in the Spemann-Mangold organizer” (安岡、口頭発表) OIST Winter Course “Evolution of Complex Systems” (OWECS2010) OIST Seaside House (沖縄、恩納村) (2010 年 12 月 5 日 ~ 12 日)

安岡有理、須藤則広、高橋秀治、鈴木穰、丹藤由希子、窪川かおる、菅野純夫、浅島誠、平良真規 “脊椎動物原腸胚オーガナイザーにおける転写制御ネットワークとその進化 (The overview of transcriptional networks in the vertebrate gastrula organizer and its evolution)” (安岡、口頭発表) 日本動物学会第 81 回東京大会、東京大学 (駒場) (2010 年 9 月 23 日)

Yasuoka, Y., Sudou, N., Suzuki, Y., Takahashi, S., Haramoto, Y., Asashima, M., Sugano, S., and Taira, M. “Versatile functions of Lim1/Lhx1 and Otx2 in the gastrula organizer gene regulatory network revealed by ChIP-sequence analysis” (安岡、ポスター発表) 13th International Xenopus Conference、Lake Louise (Canada) (2010 年 9 月 12 日 ~ 16 日)

Taira, M. “ChIP-sequence analysis for Lim1 and Otx2 in the Spemann-Mangold organizer” (平良、口頭発表) 13th International Xenopus Conference、Lake Louise (Canada) (2010 年 9 月 12 日 ~ 16 日)

安岡有理、丹藤由希子、窪川かおる、平良真規 “脊椎動物の頭部オーガナイザー獲得に関わるエンハンサー進化” (安岡、口頭発表) 第 12 回日本進化学会年大会、東京工業大学 (2010 年 8 月 3 日)

Sudou, N. and Taira, M. “The integrated regulation of the cerberus gene by transcription factors downstream of Nodal, Wnt, and BMP in the Xenopus gastrula organizer (Xenopus 原腸胚オーガナイザーの Nodal、Wnt、BMP の下流転写因子群による cerberus 遺伝子の統合的な発現制御

機構の解析)” (須藤、ポスター発表) 日本発生生物学会第 43 回大会、京都 (2010 年 6 月 20 日 ~ 23 日)

Yasuoka, Y., Sudou, N., Takahashi, S., Tando, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Kubokawa, K., Asashima, M., and Taira, M. “Evolutionary comparison of Lhx1 and Otx2 transcriptional regulatory networks in the gastrula organizer using chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis (原腸胚オーガナイザーにおける Lhx1 と Otx2 の転写制御ネットワークの ChIP 解析を用いた進化的比較)” (安岡、ポスター発表) 日本発生生物学会第 43 回大会、京都 (2010 年 6 月 20 日 ~ 23 日)

Taira, M. “Evolution of the gastrula organizer of vertebrates and its transcriptional regulatory networks (脊椎動物原腸胚オーガナイザーと転写制御ネットワークの進化)” (平良、シンポジウム発表) 日本発生生物学会第 43 回大会、京都 (2010 年 6 月 20 日 ~ 23 日)

Shibano, T., Mamada, H., Sudou, N., Hakuno, F., Takahashi, S.-I. and Taira, M. “Molecular mechanisms of the regulation of rax expression by the inner nuclear membrane protein Nemp1 in vertebrate eye development” (柴野、ポスター発表) The 2010 CSHL Symposium on Nuclear Organization & Function, Cold Spring Harbor, U.S.A. (2010 年 6 月 2 日 ~ 7 日)

須藤則広、平良真規 “Xenopus 原腸胚オーガナイザーの Nodal、Wnt、BMP の下流転写因子群による cerberus 遺伝子の統合的な発現制御機構の解析” (須藤、口頭発表) Xenopus 若手ワークショップ (第 4 回日本ツメガエル研究集会) 日本発生生物学会第 43 回大会サテライトミーティング、京都 (2010 年 6 月 19 日)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/lmb/public_html/index.php?Home

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平良 真規 (TAIRA, Masanori)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：60150083