

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26840117

研究課題名(和文)レトロポゾンが関与する脳梁形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Functional analysis of a retroposon involved in corpus callosum development

研究代表者

西原 秀典(Nishihara, Hidenori)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：10450727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム中の反復配列AmnSINE1に由来するAS021配列は、真獣類の脳梁形成に関わるSatb2のエンハンサーであることが知られている。本研究ではAS021エンハンサーの分子機構を解明するとともに、AS021欠損マウスの解析から脳梁形成におけるAS021の役割を明らかにした。さらにゲノム中の多数のAmnSINE1に対する結合因子候補を網羅的に収集した。こうしたAmnSINE1由来配列の機能解明により、哺乳類の発現ネットワークの進化の過程でAmnSINE1の機能獲得が大きなインパクトを与えてきたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that an AmnSINE1-derived sequence, AS021, serves as an enhancer of Satb2 in corpus callosum of mammals. However, its detailed molecular mechanism remains unknown. In this work, function of an AS021 binding protein and the expression pattern of the related genes in the AS021 deficient mice were revealed. These results will be a quite important basis for understanding of the impact of AmnSINE1-derived enhancers on the gene regulatory network during mammalian evolution.

研究分野：進化生物学

キーワード：発現制御 反復配列 脳梁 レトロポゾン

1. 研究開始当初の背景

一般にレトロポゾンの1種である SINE はゲノム中の寄生因子とみなされている。しかし数百コピーの AmnSINE1 は哺乳類特異的な非コード保存領域となり、そのうち複数が大脳皮質形成に関与したことが明らかになってきた。特にその1つである AS021 遺伝子座は獣類特異的に保存されており、Satb2 遺伝子座を大脳新皮質で発現させる遠位エンハンサーであることを先行研究で証明した。Satb2 は真獣類特有の脳構造である脳梁の形成に必須であることが知られている。すなわち AmnSINE1 が転移した後に獣類の共通祖先でエンハンサー機能を獲得し、Satb2 の発現を改変することで真獣類の脳梁の獲得に寄与した可能性が高いと考えられる。しかしその発現制御の詳細な分子機構は全く明らかになっていなかった。先行研究では、酵母ワンハイブリッド法とエンハンサー解析から、AS021 配列に対する結合因子を同定していた。また LacZ をレポーターとして AS021 のエンハンサー活性を評価できるトランスジェニックマウス、および AS021 配列を欠損させたノックアウトマウスを作製してきた。これらを最大限に利用することで、

2. 研究の目的

以上の研究背景を踏まえ、本研究課題では以下の2点を目的とした。

- (1) 脳梁形成に関与するレトロポゾン由来エンハンサーの分子機構の解明
- (2) 転移因子を介した発現制御ネットワークの検証

まず(1)について、AS021 結合因子と AS021 ノックアウトマウスを手がかりとして、そのエンハンサーの分子機構の解明を目的とした。これにより多数の SINE 由来エンハンサーの制御機構を解明するための第一歩となる基盤情報が得られると考えた。また(2)に関して、AS021 結合因子の結合因子は他の AmnSINE1 由来の機能配列にも結合し、発現制御ネットワークを形成している可能性がある。それを証明することで、発現制御システムの新たな獲得機構を提唱するのみならず、真獣類の脳梁進化におけるレトロポゾンの寄与を具体的に明らかにできると考えた。

3. 研究の方法

上記目的の(1)に関して、本課題の先行研究では AS021 配列を用いた酵母ワンハイブリッド実験により、その結合因子の同定に成功している。これを踏まえ本研究では、P0 マウスの大脳新皮質深層におけるこの結合因子の発現パターンを調べるために、免疫染色をおこなった。その際、当該エンハンサーとその制御対象遺伝子である Satb2、さらに Satb2 が抑制因子として制御している Ctip2 の免疫染色も同時におこない、発現強度の相

対比較をおこなった。また、AS021 配列を欠損させたノックアウトマウスを先行研究で作製済みであったため、その個体の大脳新皮質における上記タンパク質の発現も免疫染色にておこなった。また脳梁形成の異常の有無を組織染色により解析した。

目的(2)に関しては、結合因子の抗体を用いた ChIP 実験とゲノムスケールの結合モチーフの分布解析の両面からアプローチした。さらに既知の ChIP-seq データを利用して AmnSINE1 結合因子の解析もおこなった。

4. 研究成果

(1) 免疫染色による AS021 エンハンサーの機能解析

AS021 エンハンサーは、大脳新皮質の深層に存在する脳梁投射ニューロンで Satb2 のエンハンサーとして活性を示す。また Satb2 は Ctip2 のリプレッサーであることが知られている。そこで本研究では AS021 エンハンサー結合因子の機能を明らかにするため、免疫染色を用いて野生型マウスの大脳新皮質における Satb2、Ctip2、AS021 結合因子の発現パターンの比較をおこなった。研究開始当初は AS021 結合因子が結合することでエンハンサーを活性化させ、それが Satb2 の発現上昇を促すと予想していた。しかし本研究の結果、Satb2 との発現パターンに逆相関を示したことから、この結合因子が抑制的作用を示すことが明らかになった(図1)。実際、この結合因子と Ctip2 の発現量に正の相関が見られたこともこの結論を支持する結果となった。したがって大脳新皮質の深層において脳梁投射ニューロンとなる細胞運命の決定には、AS021 結合因子がエンハンサーに対して抑制作用を起こさないこと、またそうして発現上昇した Satb2 が Ctip2 を抑制することが必要条件となっている可能性が考えられる。このように本研究を通して、AS021 エンハンサーに対するタンパク質結合の有無がエンハンサーの活性化状態を決定し、それが Satb2 の発現を通して脳梁形成に寄与するといった作用機序が明らかになった。

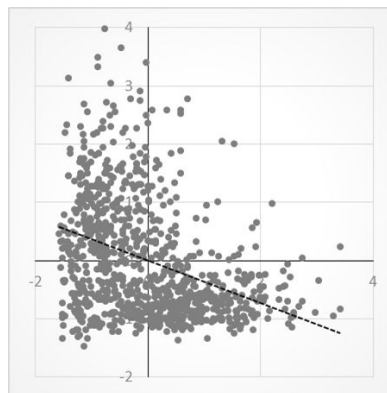


図1: 免疫染色の解析

(2) Chip 解析

AS021 結合因子の抗体を用いた ChIP をおこなうことを試みた。これにより、AS021 エンハンサーに対する当該因子の結合の証明、さらに他の AmnSINE1 由来配列に対する結合の有無を検証することができると期待された。当初はマウスの脳から得られた初代培養細胞を用いた ChIP 実験を試みたが、唯一入手可能であった抗体ではクロマチンの回収効率が非常に悪く、本実験は困難を極めた。そこで代替案としてマウス神経由来の Neuro-2a 細胞の使用も試みたが、それでも十分な成果は得られなかった。

そこでこの問題については研究方針を転換し、AS021 の結合因子ではなく、他の様々な既知の転写因子の結合モチーフ分布データから AmnSINE1 に結合するものを *in silico* で探索することとした。すなわち、結合因子の種類に拘らずに AmnSINE1 を介した発現制御ネットワークを探索することを新たな目的とした。解析の結果、複数の種類の転写因子結合予測サイトが数十コピーの AmnSINE1 上に結合することが明らかになった(図2)。さらに Encode プロジェクト等で明らかになっている様々な転写活性化因子の ChIP-seq データを用いて AmnSINE1 結合因子を探索した。その結果、これとは別に少なくとも 1 種類の転写因子が AmnSINE1 に偏って結合していることが示された。以上の結果は、AmnSINE1 が様々なタンパク質を結合させることにより発現制御配列となっている可能性を示唆するものである。この知見は脳梁形成に関わる AS021 エンハンサーで明らかにしたことと類似の現象が他の形態形成でも起こっている可能性を意味しており、この発見を基盤とすることで将来的に大きな展開が期待できる結果となった。

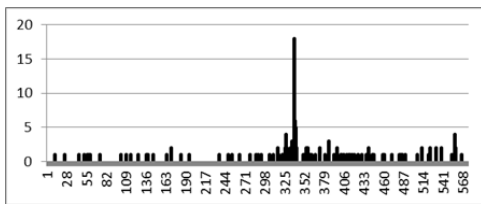


図2：AmnSINE1 配列上のモチーフ分布

(3) KO マウスの解析

AS021 を欠損させたノックアウトマウスを用いて免疫染色をおこない、AS021 結合因子と Satb2 との発現パターンを比較した。その結果、Satb2 発現細胞における AS021 結合因子発現細胞の割合がノックアウトマウスにおいて上昇していることが明らかになった(図3)。すなわち、野生型の大脳新皮質において AS021 結合因子の発現細胞では AS021 エンハンサー活性の抑制により Satb2 の発現が低下するのに対し、AS021 欠損体においては Satb2 の発現が AS021 結合因子の有無に依存しないことを意味してい

る。一方でこのノックアウトマウスでは野生型と比較して顕著な脳梁形成異常は見られなかった。以上の結果から、AS021 は Satb2 の重要なシス調節配列である一方で、Satb2 の発現は他のシス調節領域も複合的に作用することで維持されており、その機構が脳梁形成の頑健性を保っている可能性が示唆された。

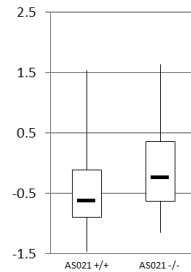


図3：AS021 欠損マウスを用いた発現解析

一般に、SINE の挿入は通常の点突然変異とは異なりゲノム構造自体に影響を及ぼし得るものである。そのため SINE が獲得したシス制御機能は遺伝子発現を大きく改変させる可能性があると考えられてきたが、これまでその具体的な分子機構を明らかにできた例がなかったことから、SINE 由来のエンハンサーがどのような発現制御をもたらしたのかを明らかにするための具体的な手がかりが得られずにいた。本研究では上述のように当初の目的である AmnSINE1 に由来する Satb2 遺伝子のエンハンサーの制御機構の解明についてはほぼ達成できたと言える。さらには ChIP データとゲノムスケールの結合モチーフ解析によって転写因子が結合する AmnSINE1 を網羅的にスクリーニングし、多数の候補を得ることができた。これらの成果は、SINE が生物進化の過程で新規機能を獲得した現象を明らかにするための最も重要かつ最先端の知見となるものである。本研究によって、今後は SINE によるエンハンサー機能獲得とそれがもたらした細胞分化と形態形成の多様性の解明に向けて大きく前進したと言える。

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 6 件)

西原秀典、岡田典弘 “SINE に由来するエンハンサーが寄与した哺乳類の進化” *生物科学* 67:2-9、2015年、査読有
Nishihara, H., Plazzi, F., Passamonti, M. and Okada, N. MetaSINEs: Broad Distribution of a Novel SINE Superfamily in Animals. *Genome Biology*

and Evolution. 8: 528-539, 2016, 査読有
Takezaki, N. and Nishihara, H. Resolving the Phylogenetic Position of Coelacanth: The Closest Relative Is Not Always the Most Appropriate Outgroup. *Genome Biology and Evolution*. 8: 1208-1221, 2016, 査読有
Nishihara, H., Kobayashi, N., Kimura-Yoshida, C., Yan, K., Bormuth, O., Ding, Q., Nakanishi, A., Sasaki, T., Hirakawa, M., Sumiyama, K., Furuta, Y., Tarabykin, V., Matsuo, I., Okada, N. Coordinately Co-opted Multiple Transposable Elements Constitute an Enhancer for *wnt5a* Expression in the Mammalian Secondary Palate. *PLoS Genetics*. 12: e1006380, 2016, 査読有
Takezaki, N. and Nishihara, H. Support for Lungfish as the Closest Relative of Tetrapods by Using Slowly Evolving Ray-finned fish as the Outgroup. *Genome Biology and Evolution*. 9:93-101, 2017, 査読有
Nishihara H., Stanyon R, Kusumi J, Hirai H, Koga A. Evolutionary Origin of OwlRep, a Megasatellite DNA Associated with Adaptation of Owl Monkeys to Nocturnal Lifestyle. *Genome Biology and Evolution*. 10: 157-165, 2018, 査読有

[学会発表](計 11 件)

西原秀典, 小林直樹, 岡田典弘 “転移因子が関与したエンハンサーの段階的進化” 日本進化学会第16回大阪大会 2014年08月21日~24日、高槻現代劇場
西原秀典, 小林直樹, 岡田典弘 “哺乳類における転移因子からシス制御配列への進化” 日本遺伝学会第86回大会(招待講演) 2014年09月17日~19日、長浜バイオ大学
西原秀典 “哺乳類における転移因子由来のエンハンサーの進化” 研究集会「転移因子と宿主の相互作用による生命進化」(招待講演) 2015年02月26日~27日、国立遺伝学研究所
西原秀典 “乳腺細胞における転移因子由来のシス制御配列の進化的解析” 日本進化学会第17回大会、2015年08月20日~22日、中央大学
西原秀典 “乳腺由来細胞でシス制御機能を持つ転移因子群” 日本遺伝学会第87回大会、2015年09月26日、東北大学
西原秀典 “転移因子を利用した哺乳類のシス調節配列の進化” 内在性ウイルス様エレメント研究会(招待講演) 2016年12月16日、京都大学

Hidenori Nishihara “Transposable elements spread potential cis regulatory sources for mammary gland evolution” FASEB “Mobile DNA in Mammalian Genomes”, 2017
西原秀典 “レトロトランスポソンの増幅がもたらしたシス制御システムの多様性” 日本進化学会第19回大会、2017年8月、京都大学
西原秀典 “シス制御システムの進化をもたらした転移因子の重要性” 日本遺伝学会第89回大会、2017年9月、岡山大学
西原秀典 “転移因子がもたらした遺伝子発現制御システムの進化多様性” 遺伝学研究集会「進化遺伝学における実験的研究と理論的研究の融合」(招待講演) 2017年10月14日~15日、国立遺伝学研究所
西原秀典 “転移因子レトロトランスポソンが拡大させたシス制御配列の多様性” ConBio2017、2017年12月、パシフィック横浜

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

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:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西原 秀典 (NISHIHARA, Hidenori)
東京工業大学・生命理工学院・助教
研究者番号: 10450727