

令和元年6月4日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21559

研究課題名(和文)脊椎動物におけるBrachyuryの遺伝子重複がもつ進化発生学的意義の解明

研究課題名(英文)Evolutionary developmental study of duplicated Brachyury genes in vertebrates

研究代表者

安岡 有理 (Yasuoka, Yuuri)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：70724954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脊索形成のマスター遺伝子であるBrachyuryの遺伝子レパートリー・初期胚における発現様式・発現制御機構・分子機能について、パラログ間での機能分化に着目した比較解析を行った。その結果、脊椎動物共通祖先における2回の全ゲノム重複によって生じたBrachyuryパラログBra・Ntl・Tbx19のうち、Ntlは繰り返し様々な系統で独立に喪失しており、その理由を初期胚における冗長的な発現に見出した。パラログ間の機能分化をもたらした発現制御機構を明らかにすると同時に、脊索での発現を失ったパラログも一定のコピテンスを備えていることを見出した。これらの結果から重複遺伝子進化の一般原則を導き出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定の遺伝子の数が増加する遺伝子重複は、生命進化の大きな原動力の一つと考えられている。重複した遺伝子群は、祖先的な機能を維持しながら、新規機能の獲得や役割分担を経て、より複雑な仕組みを作り上げる。一方で、遺伝子重複は時に生命維持のバランスを崩すことにもつながり、疾患の原因となることもある。本研究は脊索という我々脊椎動物の初期発生過程に不可欠な組織の形成を担うBrachyury遺伝子の重複遺伝子群の成り立ちや役割を、様々な動物間で比較することで、重複遺伝子の進化原理に迫った。Brachyury遺伝子の重複や変異が原因の一つとなるヒト悪性腫瘍(脊索腫)の理解にもつながる画期的な成果である。

研究成果の概要(英文)：To reveal a part of developmental mechanisms for the notochord, this study focused on gene repertoires, expression patterns in early embryos, gene regulatory mechanisms, and molecular functions of the master regulatory gene for notochord development, Brachyury. Comparative genomics analyses between vertebrate lineages showed that, among three paralogs, Bra, Ntl, and Tbx19, derived from two rounds whole genome duplication in vertebrates, Ntl was repeatedly lost in various vertebrate genomes. Expression patterns in early embryos suggested that Ntl is dispensable for the notochord in tetrapods but not in teleosts. Enhancer analyses identified notochord enhancers responsible for the subfunctionalization of Brachyury paralogs and suggested that some Brachyury paralogs that is not expressed in the notochord maintains the competency for the notochord expression. This study highlights evolutionary principles of duplicated genes.

研究分野：進化発生学

キーワード：発生 進化 ゲノム 遺伝子重複 転写因子 遺伝子発現制御 機能分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊索は幼生尾における液胞化した棒状の正中支持組織として定義され、後生動物の進化の歴史の中で脊索動物だけがもつ特異な形質と考えられている (Sato et al., 2012, *Evol Dev* 14: 56-75)。脊索の進化において最も重要な遺伝子と考えられるのが T-box 転写因子 Brachyury (Bra) である。Bra は、(1) 脊椎動物、尾索動物の脊索の発生に必須である、(2) 脊索特異的に発現し、近傍の外胚葉、内胚葉組織には発現しない、の2つの条件を満たす唯一の転写因子である。しかしながら、脊椎動物の脊索における Bra の発現制御機構と標的遺伝子はほとんど解明されていない。

脊椎動物における Bra の解析を困難にしている要因の一つは、遺伝子重複に伴う機能分化 (subfunctionalization) である。申請者は詳細な遺伝子系統解析と比較ゲノム解析を行い、以下の事実を見出した。(1) 脊索動物共通祖先では1つだった Bra が、脊椎動物では2回のゲノム倍化を経て現在3つのパラログ Bra、Notail (Nt1)、Tbx19 として存在する。(2) Bra はすべての脊椎動物で共通して尾芽に発現し、Nt1 と Tbx19 に比べ進化速度も遅いため、最も祖先的な性質を残した遺伝子と考えられる。(3) 条鰭類では Nt1 が主に脊索で発現しているが、肉鰭類では Nt1 が繰り返し独立に喪失している。(4) 無尾両生類では Bra がゲノム上でタンデムに重複しており、ツメガエル胚では Bra1 が主に尾芽で、Bra2 が主に脊索で発現している。(5) Tbx19 は脳下垂体での発現が主で、ニワトリ胚でのみ脊索及び尾芽での一過的な発現が報告されている。これらの知見は脊椎動物の各系統において、脊索で主に働く Bra パラログが機能分化してきたことを示唆している。

Bra の標的遺伝子については、これまでヒトとマウスの ES 細胞 (Bra)、ツメガエル胚 (Bra1)、ゼブラフィッシュ胚 (Nt1) を用いてゲノムワイドな解析が行われてきた。しかし、これらの解析で見出された Bra の共通標的遺伝子は、脊索では発現しない後方中胚葉遺伝子が主であった (Lolas et al., 2014, *PNAS* 111:4478-4483)。これは、ES 細胞は脊索ではなく初期中胚葉や原条に分化させて解析されたこと、ツメガエルは Bra1 のみ解析されたこと、ゼブラフィッシュ Nt1 は原腸胚でのみ解析されたことにより、中胚葉分化マーカーとしての Bra の機能が主として抽出されたためである。したがって、脊椎動物の脊索における Bra の機能を包括的に理解するためには、脊索細胞で発現する Bra に対するゲノムワイド解析が必須である。

申請者はこれまでの研究で、ツメガエル胚における Bra1 と Bra2 の機能比較を行ってきた (図1)。機能阻害実験の結果、Bra2 の機能阻害でのみ脊索の形態形成異常が観察され、Bra1 と Bra2 両方を阻害すると脊索そのものが形成されないことを見出した。機能阻害胚を用いた RNA-seq 解析からは、脊索の分化に必須な分泌経路に関わる遺伝子が Bra2 機能阻害依存的に発現変動することを突き止めた。さらに、Bra1 と Bra2 の転写後調節機構を調べた結果、Bra1 の 3' UTR 配列が、Bra2 の 3' UTR 配列に比べて非常に強い mRNA 不安定化活性を持つことを明らかにした。これらの結果は、ツメガエル胚で Bra1 と Bra2 が機能分化しており、Bra2 が脊索細胞の分化に重要な役割を果たしていることを示している。このツメガエル Bra2 の脊索での発現制御機構および標的遺伝子を、ゼブラフィッシュ Nt1 などと比較することで、脊椎動物の脊索の発生機構における Bra の遺伝子重複の意義を解明できるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

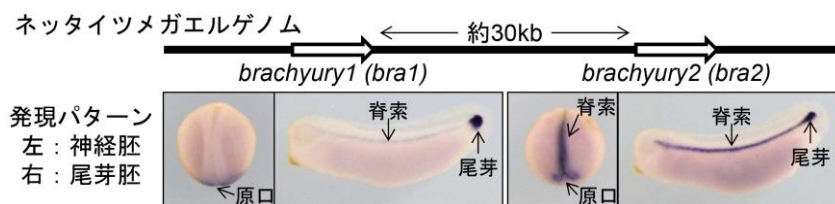


図1 : ツメガエルの二つの bra パラログ

2. 研究の目的

脊索形成のマスター遺伝子である Brachyury の、脊椎動物胚における発現制御機構および分子機能を比較解析し、脊索の発生メカニズムの一端を解き明かす。本研究では、遺伝子重複による Brachyury の機能分化が、脊索の発生において果たす役割に焦点を当てる。まず、無尾両生類で遺伝子重複した二つの Brachyury パラログが、ツメガエル胚で脊索と尾芽で排他的に発現していることに着目し、両者の比較から Brachyury の脊索での発現制御機構と標的遺伝子を解明する。さらに、条鰭類の脊索で主に発現する Brachyury の脊椎動物パラログ Notail についても、同様の解析を行い、Notail を失った無尾両生類での収斂的遺伝子進化を検討する。これらの解析から、脊椎動物で繰り返し起こったと考えられる Brachyury の機能分化がもつ、進化発生的意義を見出す。

3. 研究の方法

脊椎動物 Brachyury パラログの起源を明らかにするため、より詳細な遺伝子系統樹・シグネチャー解析を行う。肉鰭類における Bra と Nt1 の機能分化を検討するため、イモリ胚やカメ胚を用いて Bra パラログの発現解析を行う。Bra の発現制御機構については、ツメガエル Bra1 と Bra2 の詳細なエンハンサー解析を行ったうえで、4C-seq 解析によってプロモーターとエンハンサー

の3次元的な相互作用を明らかにする。さらに、Ntl や Tbx19 についてもエンハンサー解析を行い、脊索エンハンサーを同定する。Bra パラログ間でのタンパク質機能比較として、ツメガエル胚アニマルキャップに Bra パラログを発現させたときの脊索誘導活性を比較する。

4. 研究成果

(1) 脊椎動物 Bra パラログの起源

脊椎動物各系統のゲノムデータを探索し、遺伝子系統樹解析とシンテニー解析を行った結果、Bra と Ntl が 2 回目の全ゲノム重複で重複した遺伝子であることが示唆された。そして、Ntl は哺乳類、鳥類、一部の爬虫類（トカゲ、ヘビ、スッポン）、無尾両生類、軟骨魚類で失われていることが明らかとなった。真骨類の共通祖先ではもう一度全ゲノム重複が起こっているが、現在解読されている真骨類ゲノムには、最近ゲノムがさらに倍化した系統を除き、Bra・Ntl・Tbx19 がそれぞれ1つずつしか存在しないことがわかった。このことは、真骨類の進化の比較的早い段階で、片方の遺伝子はその冗長性もしくは遺伝子量効果によって排除されたことを示唆している。タンデムな遺伝子重複が見られたのはカエルのみであり、カエルは唯一 Tbx19 を失っている。Bra はその保守的な機能ゆえ、Tbx19 は新規機能の獲得（脳下垂体）ゆえに、ほぼすべての脊椎動物ゲノムに保持されているものと考えられる。

(2) Bra パラログの発現解析

イペリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*) 初期胚を用いた発現解析の結果、Bra と Ntl はほぼ同様の発現パターンを持つことが明らかになった。このことは、両生類（おそらく肉鱗類）共通祖先において、Bra と Ntl は初期発生において冗長的な役割を担っており、それゆえ様々な系統で繰り返し Ntl が失われたことを示唆している。カメ (*Trachemys scripta* および *Pelodiscus sinensis*) 胚を用いた発現解析では、Ntl が脊索に局限した非常に弱い発現しか持たないこと、Tbx19 がニワトリ胚同様スッポン胚でも一過的に脊索で発現することを見出した。これらの結果は、羊膜類において Ntl が初期胚での機能を失いかけていること、Tbx19 が補償的に脊索で発現するコンピテンスを備えていることを示唆している。さらにメダカ胚を用いた発現解析を行い、Bra と Ntl の機能分化が真骨類共通であることを見出した。これらの成果によって、脊椎動物各系統において Bra パラログが複雑にその発現を変化させてきたことが明らかとなった（図2）。

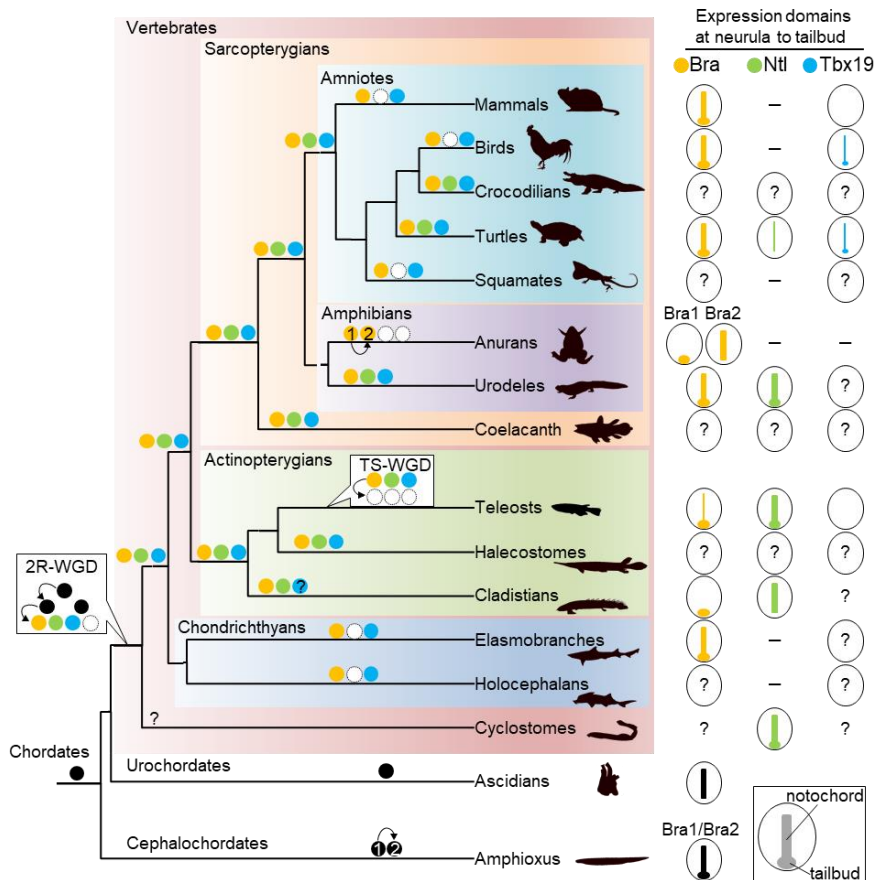


図2：脊椎動物各系統における Brachyury の遺伝子重複と脊索での発現の関係

(3) Bra パラログの発現制御機構の解析

ネットアイツメガエル Bra1 と Bra2 の周辺に存在するシス制御配列をレポーターコンストラクトに組み込み、アフリカツメガエル胚を用いたトランスジェニックレポーター解析によってその

活性を評価した。その結果、Bra2 上流配列に強い脊索エンハンサーがいくつか見つかったものの、Bra1 上流配列には尾芽や体節で強いエンハンサー活性を持つが、脊索では活性がない（もしくは弱い）ものしか見つからなかった。これらの結果は、Bra1 と Bra2 の間にエンハンサー境界が存在して、上流配列がそれぞれ単独の遺伝子に作用することで、異なる発現パターンを作り出していることを示唆している（図3）。これらのエンハンサーとプロモーターの相互作用について、ネッタイツメガエル神経胚を用いた 4C-seq 解析を行ったが、残念ながら Bra1 と Bra2 のプロモーターと相互作用するゲノム領域に大きな違いは見られなかった。

ゼブラフィッシュ Nt1 の上流配列に、条鰭類でのみ保存された配列が 3 か所存在したので、それらをクローニングし、トランスジェニックレポーター解析を行った。その結果、アフリカツメガエル胚で脊索エンハンサーを示す保存配列が一つ見つかった。興味深いことに、この配列はゼブラフィッシュで見つかった Nt1 のエンハンサーとは異なっており、本研究結果は種を越えたエンハンサー活性を示すものが別に存在したことを意味している。このエンハンサーが、条鰭類 Nt1 の脊索での強い発現を支えているものと考えられる。

スッポン Tbx19 についても、同様に上流配列をクローニングしてレポーター解析を行った。その結果、羊膜類全体で保存された配列がツメガエル胚で脊索エンハンサー活性を示した。このことは、Tbx19 が脊索で発現するコンピテンスを担うエンハンサーが広く保存されており、何らかの進化的制約を受けている可能性を示唆している。

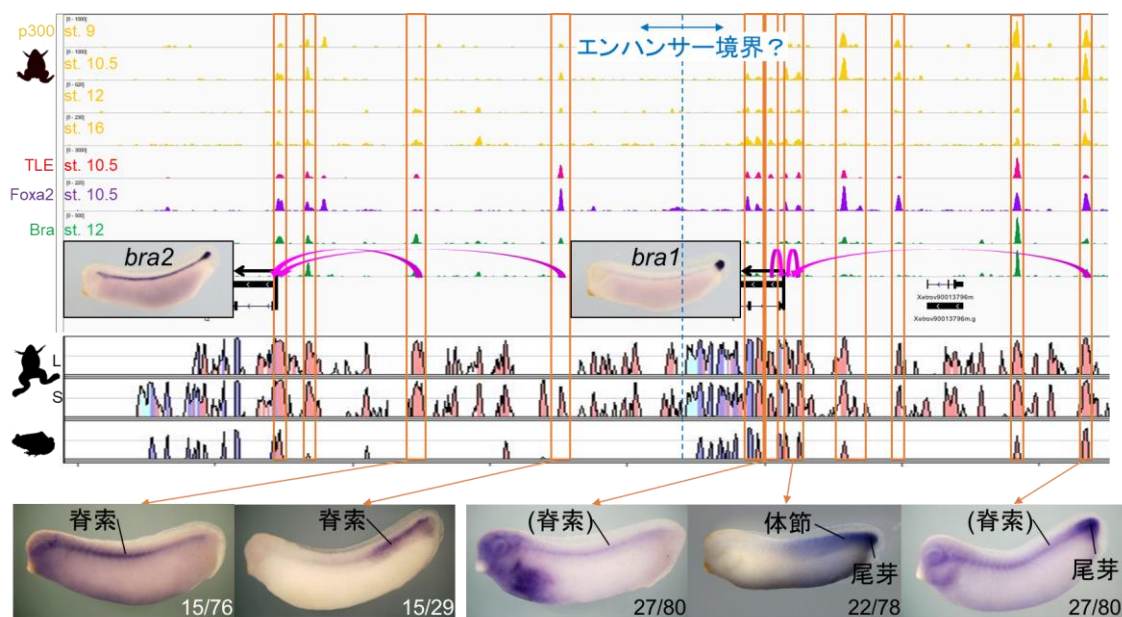


図3：ツメガエル Bra1・Bra2 の発現制御配列を用いたレポーター解析

(4) Bra パラログの脊索誘導活性比較

アフリカツメガエル胚アニマルキャップに Foxa4 と Bra パラログを共発現させ、脊索誘導活性の強さを評価した。その結果、ツメガエル Bra2 は Bra1 よりも強い活性を示し、ゼブラフィッシュ Nt1 は Bra よりも強い活性を示した（図4）。これらの結果は脊索での発現の強さと脊索誘導活性の強さとの相関を示すものである。しかしながら、スッポン Tbx19 は Bra よりも強い活性を、メダカ Bra は Nt1 よりも強い活性を示したため、必ずしもタンパク質機能が機能分化に関わっているわけではないことが示唆された。これらの結果は、機能分化も各 Brachyury パラログは一定の機能的互換性を維持していることを示している。

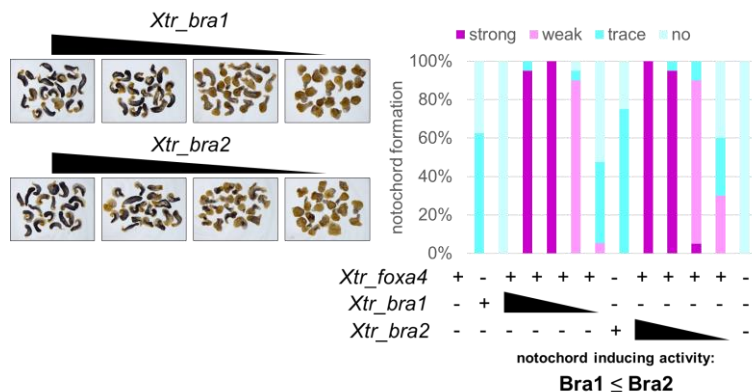


図4：ツメガエル Bra1・Bra2 の脊索誘導活性比較

(5)本研究から導き出される重複遺伝子進化の基本原則

- ・機能分化が進んだパラログは強い進化的拘束を受けて保持される(ツメガエル Bra1 と Bra2、条鰭類の Bra と Nt1)
- ・すでに機能分化が進んだのちに重複した遺伝子は、進化的拘束が弱まり失われやすい(真骨類の全ゲノム重複後の Bra・Nt1・Tbx19 パラログの喪失、脊椎動物の2回目の全ゲノム重複後の Tbx19 パラログの喪失)
- ・シス制御領域やアミノ酸配列の進化はパラログの機能分化と密接に関わっているが、祖先的な発現を失った後も一定のコンピテンスを保持することがある(羊膜類 Tbx19 の脊索エンハンサー、Bra・Nt1・Tbx19 の脊索誘導活性)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Yuuri Yasuoka and Masanori Taira “Microinjection of DNA constructs for gene mis-expression and cis-regulatory module analysis” Cold Spring Harbor Protocols (2019) doi:10.1101/pdb.prot097279 (査読あり)
2. Mariko Kondo, Megumi Matsuo, Kento Igarashi, Yoshikazu Haramoto, Takayoshi Yamamoto, Yuuri Yasuoka, Masanori Taira “de novo transcription of multiple Hox cluster genes takes place simultaneously in early *Xenopus tropicalis* embryos” Biology Open (2019) bio.038422 (査読あり)
3. Yuuri Yasuoka and Masanori Taira “The molecular basis of the gastrula organizer in amphibians and cnidarians.” in Reproductive and Developmental Strategies (Ed. by Kazuya Kobayashi, Takeshi Kitano, Yasuhiro Iwao, and Mariko Kondo), Animal Diversity and Generality series, Springer Japan (2018) pp 667–708 (査読あり)
4. Yumeko Satou, Kohei Minami, Erina Hosono, Hajime Okada, Yuuri Yasuoka, Takashi Shibano, Toshiaki Tanaka, Masanori Taira “Phosphorylation states change Otx2 activity for cell proliferation and patterning in the *Xenopus* embryo” Development (2018) 145: dev159640 (査読あり)
5. Tatsuo Michiue*, Takayoshi Yamamoto*, Yuuri Yasuoka*, Toshiyasu Goto, Takafumi Ikeda, Kei Nagura, Takuya Nakayama, Masanori Taira, and Tsutomu Kinoshita (*, co-first authors) “High variability of expression profiles of homeologous genes for Wnt, Hh, Notch, and Hippo signaling pathways in *Xenopus laevis*” Developmental Biology (2017) 426:270–290 (査読あり)
6. Minoru Watanabe*, Yuuri Yasuoka*, Shuuji Mawaribuchi, Aya Kuretani, Michihiko Ito, Mariko Kondo, Haruki Ochi, Hajime Ogino, Akimasa Fukui, Masanori Taira, and Tsutomu Kinoshita (*, co-first authors) “Conservatism and variability of gene expression profiles among homeologous transcription factors in *Xenopus laevis*” Developmental Biology (2017) 426:301–324. (査読あり)
7. Jun Inoue, Yuuri Yasuoka, Hiroki Takahashi, and Noriyuki Satoh “The chordate ancestor possessed a single copy of the *Brachyury* gene for notochord acquisition.” Zoological Letters (2017) 3:4 (査読あり)
8. Rebekah M. Charney, Elmira Forouzmand, Jin Sun Cho, Jessica Cheung, Kitt D. Paraiso, Yuuri Yasuoka, Shuji Takahashi, Masanori Taira, Ira L. Blitz, Xiaohui Xie, and Ken W. Y. Cho. “Foxh1 Occupies cis-Regulatory Modules Prior to Dynamic Transcription Factor Interactions Controlling the Mesendoderm Gene Program.” Developmental Cell (2017) 40:595–607 (査読あり)
9. Yuuri Yasuoka †, Chuya Shinzato, and Noriyuki Satoh (†, corresponding author) “The mesoderm-forming gene, *brachyury*, regulates ectoderm-endoderm demarcation in a diploblast, the coral, *Acropora digitifera*” Current Biology (2016) 26: 2885–2892 (査読あり)
10. Adam M. Session, Yoshinobu Uno, Taejoon Kwon, …., Yuuri Yasuoka, …., Richard M. Harland, Masanori Taira, Daniel S. Rokhsar (全 74 名中 55 番目) “Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*” Nature (2016) 538:336–343 (査読あり)

[学会発表] (計 13 件)

1. Yuuri Yasuoka and Noriyuki Satoh “Complex evolution of *brachyury* paralogs during vertebrate notochord development” (ポスター発表、査読あり) 第 46 回内藤コンファレンス(札幌)、2018 年 10 月 2–5 日
2. 安岡有理、佐藤矩行「脊椎動物の脊索発生における *Brachyury* パラログの複雑な進化」(口頭発表)、第 20 回日本進化学会年会(東京)、2018 年 8 月 22 日
3. 安岡有理「進化学の視点からプログラム研究にどう貢献できるか?」(ショートトーク) 第 10 回 EvoDevo 青年の会(東京)、2018 年 8 月 20 日

4. **安岡有理** 「ネットアイツメガエル胚発生における転写因子一標的遺伝子関係の揺らぎ測定」(口頭発表) 第12回 XCIJ 首都圏支部会(東京)、2018年7月14日
5. **Yuuri Yasuoka** “Keratan sulfate produces “water bags” in embryos” (英語による口頭発表、査読あり; およびポスター発表) 第51回日本発生生物学会年会(東京)、2018年6月7-8日
6. **Yuuri Yasuoka** and Noriyuki Satoh “Independent subfunctionalization of brachyury paralogs in vertebrate lineages (脊椎動物各系統における brachyury パラログの独立した機能分化)” (ポスター発表) ConBio2017(神戸)、2017年12月7日
7. **Yuuri Yasuoka** and Noriyuki Satoh “Independent subfunctionalization of brachyury paralogs in vertebrate lineages” (ポスター発表) The 29th CDB meeting(神戸)、2017年10月19-20日
8. **安岡有理** 「細胞運動非依存的な脊索の自律的形態形成メカニズムを探る」(口頭発表) 第10回日本ツメガエル研究集会(宮崎)、2017年9月8日
9. **安岡有理** 「年に一度のサンゴ胚を用いた遺伝子機能解析」(口頭発表、査読あり) 第3回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会(岡崎)、2017年8月25日
10. **安岡有理** 「Xenopus 胚で CRISPRi (dCas9)は有効か?」(口頭発表)『第3回次世代両生類研究会』(Session1)(岡崎)2017年8月24日(招待講演)
11. **Yuuri Yasuoka** and Noriyuki Satoh “Independent subfunctionalization of brachyury paralogs in vertebrate lineages (脊椎動物各系統における brachyury パラログの独立した機能分化)” (英語による口頭発表、査読あり; およびポスター発表) 第50回日本発生生物学会年会(東京)、2017年5月10-12日
12. **安岡有理** 「脊椎動物における Brachyury の遺伝子重複がもつ進化的意義」(口頭発表) 第10回日本ツメガエル研究集会(沖縄)、2016年11月19日
13. **Yuuri Yasuoka**, Chuya Shinzato, and Noriyuki Satoh “The mesoderm-forming gene, brachyury, regulates ectoderm-endoderm demarcation in a diploblast, the coral, *Acropora digitifera*” (ポスター発表) 第22回国際動物学会議・第87回日本動物学会合同大会(沖縄)、2016年11月17-18日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

1. “A Day in the Life of a Coral Lab” the Node (2016年11月8日)
(<http://thenode.biologists.com/day-life-coral-lab/lablife/>)
2. “アフリカツメガエルの複雑なゲノムを解読：脊椎動物への進化の原動力「全ゲノム重複」の謎に迫る” 共同プレスリリース (2016年10月20日)
(<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/info/5056/>)。
3. “DNAが2倍になったカエル” OIST ニュースセンター(2016年10月20日)
(<https://www.oist.jp/ja/news-center/news/2016/10/19/27331>)。
4. “サンゴが教えてくれた、私たちの骨や筋肉を作る細胞の起源” OIST プレスリリース (2016年9月30日) 沖縄タイムス (2016年9月30日付) の一面に掲載される。
(<https://www.oist.jp/ja/news-center/press-releases/26945>)。

6. 研究組織

(1) 研究分担者 (0名)

(2) 研究協力者 (0名)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。