

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K06672  
研究課題名(和文)腎尿細管の再生を可能とさせる非コードDNAランドスケープの全容解明  
  
研究課題名(英文)Landscape of enhancer for nephric tubule regeneration  
  
研究代表者  
越智 陽城(Ochi, Haruki)  
  
山形大学・医学部・准教授  
  
研究者番号：00505787  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では両生類の腎尿細管の再生をモデルとして、再生過程をライブイメージングできるトランスジェニック・ツメガエルから抽出した腎管細胞の網羅的オープンクロマチン領域解析とH3K27のアセチル化修飾(H3K27ac)抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンス、再生中の腎尿細管で活性を示すエンハンサーのトランスジェニック・スクリーニングを行い、(1)再生特異的なエンハンサーの同定、(2)再生特異的なエンハンサーを活性化する転写因子の同定、(3)標的遺伝子の同定、に成功した。これから、個体内でのネフロン再生を可能とさせるシス調節メカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
組織・器官の再生では発生過程で使われた遺伝子が再び発現することが知られている。しかしながら、これら発生制御遺伝子の再発現を担うエンハンサーがいずれの転写因子により活性化されるのか全ゲノムレベルでその機能を捉える研究は殆どなされていなかった。本研究は哺乳類と同様に損傷後の残存している細胞から尿細管を再生する両生類をモデルとしてその問の解決に挑み、腎尿細管再生における全ゲノムレベルでの再生エンハンサーと活性化因子を明らかにした。これらエンハンサーや活性化メカニズムは哺乳類においても進化的に保存されていると予想され、将来の再生医療技術の発展に繋がる点において社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：We first collected proximal and intermediate tubules from *Xenopus Pax8:GFP* positive uninjured (day 0), regenerating (day 2), and regenerated (day 5) conditions for ATAC-seq and H3K27ac ChIP-seq, and uninjured (day 0), uninjured (day 2), and regenerating (day 2) conditions for RNA-seq. We then obtained putative enhancers of regeneration based on these data sets. In vivo enhancer activities for putative enhancers were tested using *Xenopus* transgenic system and confirmed that putative enhancers were activated after the injury of nephric tubules. Then, we applied the HOMER tools to identify drivers of the regeneration enhancers. We found a robust enrichment of Pbx, Tead, Klf motifs in regenerating specific open chromatin elements. Transcriptional activities were tested using luciferase reporter system, and Klf functions as an activator for these elements. These results suggest that the transcriptional activator of Klfs is one of the regulators for nephric tubules regeneration enhancers.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：再生エンハンサー 網羅的オープンクロマチン解析 腎再生 転写因子 ゲノム シス調節配列 アフリカツメガエル ネットイツメガエル

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓は生体内の恒常性を維持する上で必須の臓器である。それゆえ、ヒトを含む様々な脊椎動物は、障害を受けた腎組織を完全に、あるいは部分的に再生することができる。両生類の胚は、ほ乳類と同様に腎尿細管が損傷を受けると残存する細胞から再び尿細管が再生する。加えて、両生類は単に尿細管上皮細胞が再生するだけでなく、機能的なネフロンも再構築する。この腎尿細管の再生については細胞の増殖能や幹細胞の存在の有無の視点から研究が進められているが、損傷後のゲノム動態については不明な点が多かった。本研究は、腎尿細管の再生に関わる遺伝子群の非コード DNA 領域の機能を俯瞰的な視点から捉え、個体内でのネフロン再生を可能とさせるシス調節メカニズムの全容解明を目指すものであった。

## 2. 研究の目的

遺伝子の発現は、ON スイッチに相当するエンハンサー配列と OFF スイッチであるサイレンサー配列が制御する。ヒトゲノムの 98% を占める遺伝子をコードしない領域には様々な生体機能に特化したエンハンサーとサイレンサーが存在するが、機能が明らかになっているものはごく一部であり、そのほとんどははいまだ未知である。魚類や両生類は損傷を受けた複雑な組織や器官を再生する高い能力をもつが、それら動物のゲノムには、再生で使う遺伝子の発現を制御するエンハンサーが存在することが予想され、世界中でその探索が続けられてきた。2016 年に Junsu Kang 博士らが初めて、成体小型魚類の再生中の心臓細胞のエピジェネティック修飾情報を利用して「心臓再生エンハンサー」を発見した (Kang, J., Nature, 2016)。一方、我々は、国内外で唯一、両生類の再生中の腎組織でのエンハンサー活性を指標とした *in vivo* スクリーニングにより「腎再生エンハンサー」の同定に成功した (Suzuki, N., eLife, 2019)。しかしながら、この研究では *Lhx1* 遺伝子の近傍の数百 Kbp に存在する保存された進化的に保存された非コード領域(保存非コード DNA 領域)についてのみエンハンサー機能の解析を行っており、全ゲノムレベルでの変化については捉えることができていなかった。そこで本研究は、近年急速に技術的課題が克服された網羅的オープンクロマチン領域解析と網羅的 *in vivo* エンハンサー機能解析の手法を組み合わせ、腎尿細管が再生する過程のゲノム動態の全容の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

網羅的オープンクロマチン解析 (ATAC-seq) とエピジェネティック修飾のクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を目的として、腎尿細管の再生過程をメーキングできるトランスジェニック・ツメガエルから損傷前、再生 2 日目、再生 5 日目の腎臓尿細管をそれぞれ 50 個ずつ摘出した。また網羅的発現解 (RNA-seq) を目的として、損傷前、

再生 2 日目、損傷を与えずに 2 日飼育した個体の腎尿細管からそれぞれ 50 個ずつ摘出した。ATAC-seq については、新学術領域「学術研究支援基盤形成 先進ゲノム支援」の支援によりデータを得た。クロマチン免疫沈降シーケンスについては、マイクロコッカスヌクレアーゼ (MNase) でゲノム DNA を切断後、H3K27 のアセチル化修飾(H3K27ac)抗体と H3K9me3 抗体を用いて免疫沈降を行い、ThruPLEX DNA-seq Kit (Takara Bio In., Cat# R400674)によりライブラリー作製ならびにシーケンスを行い、データを入手した。発現解析については、total RNA を精製後、Ion AmpliSeq Library Kit Plus(Thermo Fisher Scientific, Cat#4488990)を用いてライブラリーを作製後、シーケンスを行い、データを得た。再生時に特異的にオープンになるゲノム領域を抽出後、HOMER tools を用いて、*de novo* の転写因子の結合モチーフを探索した。候補転写因子に絞り込みについては、再生時に特異的にオープンになる領域とルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターと候補転写因子をヒト胎児腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney cells 293)に共導入し、その活性を測定した。また候補転写因子の DNA 結合ドメインに Engrailed repressor domain (EnR)を融合した後、熱ショック依存的にそれら融合遺伝子の発現を誘導できるトランスジェニック・ツメガエルを作製し、候補転写因子の腎尿細管再生における役割について検討した。

#### 4. 研究成果

損傷後の再生時に特異的にクロマチンがオープンになる領域は、1,020 箇所あった。それらオープン領域にエンリッチしている転写因子の結合モチーフを探索したところ、Krüppel-like factors (Klf)ファミリーのモチーフが有意に認められることがわかった。RNA-seq のデータを調べると、再生中の腎尿細管では Klf4、Klf6、Klf15、SP1、SP4、SP8 が発現することがわかった。これらは再生を制御する遺伝子の発現を誘導する候補である。そこで、まずネットアイツメガエルの cDNA から Klf4、Klf6、Klf15、SP1、SP4 の全長をクローニングした。次に、ChIPpeakAnno を用いて再生特異的に発現が亢進する遺伝子の中で再生時に特異的にクロマチンがオープンになる領域を抽出し、それら領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーター遺伝子を構築した。これらレポーター遺伝子と Klf4、Klf6、Klf15、SP1、SP4 を HEK293T 細胞に共導入し、レポーター活性を測定した。これにより、Klf6 と Klf15 が再生時に特異的にクロマチンがオープンになる領域に対して、転写活性化能を示すことがわかった。損傷後 24 時間、48 時間の腎尿細管について定量 PCR (quantitative PCR) を行ったところ Klf6 と Klf15 のいずれも、損傷後 48 時間での発現誘導が認められたが、24 時間においては Klf15 のみ発現の誘導が認められた。次に Klf15 の DNA 結合ドメインと EnR を融合し、熱ショック依存的にそれら融合遺伝子の発現を誘導できるトランスジェニック・ツメガエルを作製した。それら個体に対して、熱ショックにより EnR-Klf15 を誘導後に損傷を与えたところ、再生が阻害されることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki M, Igawa T, Suzuki N, Ogino H	4. 巻 10
2. 論文標題 Spontaneous neoplasia in the western clawed frog <i>Xenopus tropicalis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 microPublicationBiology	6. 最初と最後の頁 294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17912/micropub.biology.000294.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki N, Ochi H	4. 巻 62
2. 論文標題 Regeneration enhancers: A clue to reactivation of developmental genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 343-354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rosenburg Cordeiro, I, KabashimaK, Ochi H, Munakata K, Nishimori X, Laslo M, Hanken J,	4. 巻 50
2. 論文標題 Environmental oxygen levels promoted the appearance of interdigital cell death during tetrapod evolution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 155-166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2019.05.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamashita S, Kataoka K, Yamamoto H, Kato T, Hara S, Yamaguchi K, Renard-Guillet C, Katou Y, Shirahige K, Ochi H, Ogino H, Uchida T, Inui M, Takada S, Shigenobu S, Asahara H	4. 巻 9
2. 論文標題 Comparative analysis demonstrates cell type-specific conservation of SOX9 targets between mouse and chicken	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48979-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木菜花, 荻野肇, 越智陽城
2. 発表標題 クロマチンダイナミクスの解析から再生特異的なエンハンサーの活性化メカニズムに迫る
3. 学会等名 第90回日本動物学会 シンポジウム: テクノロジーが切り開く「シン・再生研究」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 越智陽城
2. 発表標題 ネットアイツメガエルが教えてくれる3次元組織再生
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 特別シンポジウム 「NBRPが支える生命科学研究最前線」第4期中間年度成果報告会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ochi H
2. 発表標題 The regulation of kidney regeneration: mechanisms of regeneration signal-response enhancer action
3. 学会等名 Xenopus Resources and Emerging Technologies Meeting 2019(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki N, Hirano H, Ogino H, Ochi H
2. 発表標題 Arid3a regulates nephric tubule regeneration through the evolutionarily conserved regeneration signal-response enhancer
3. 学会等名 52th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------