

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07258

研究課題名(和文) 上陸時の器官進化の保守と革新を可視化するGCM2 複合体標的遺伝子座の網羅比較解析

研究課題名(英文) Comparative analysis of GCM2 target gene loci visualizing the conservation and innovation of organ evolution during water to land adaptation

研究代表者

岡部 正隆 (Okabe, Masataka)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：10300716

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)：本研究を通じて、種間のGcm2の比較の結果から、マウスGcm2はゼブラフィッシュと異なる転写活性を示すことを明らかにし、また、種間の転写活性化能の違いはGcm2のTADに依存していることを明らかにした。Trans-Activating Domain(TAD)領域に見られる構造の違いが転写活性化能の違いを生み、さらにその違いが異なる下流遺伝子の発現を促すことで、発生する形態の違いをもたらす可能性が考えられた。またATAC-seq、RNA-seqの結果から、Gcm2がパイオニアファクターである可能性が強く示唆され、Gcm2の新たな機能を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水中から陸への進化は自然淘汰圧により急速に行われた可能性があり、変異の蓄積による長い時間をかけた変化だけでは説明できない、より短期的かつ大きな変化の存在が必要であると推察していた。本研究では鰓と副甲状腺の発生起源である咽頭嚢でその両者の発生に重要な役割を果たすGCM2を用いて、どのような変化が進化を勧めたのかを検証した。本研究の結果は転写因子そのものの活性が種間で大きく変化していること、またGCM2が非常に多くの遺伝子発現調節に関わっていることを明らかにし、1つの転写因子の変化がかなり大規模にクロマチンの構造を含め変化させる力を持つことが示され、生物進化の新たな可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Through this study, we revealed that mouse Gcm2 exhibits different transcriptional activity compared to the zebrafish Gcm2 based on the comparative analysis of Gcm2 among species. Additionally, it was clarified that the difference in transcriptional activation abilities among species depends on the Trans-Activating Domain(TAD) of Gcm2. Structural differences observed in the TAD region create differences in transcriptional activation abilities, which may further lead to the expression of different downstream genes, potentially resulting in morphological differences during development. Furthermore, results from ATAC-seq and RNA-seq strongly suggest that Gcm2 may function as a pioneer factor. Through this study, we uncovered new functions of Gcm2.

研究分野：進化発生学、機能形態学

キーワード：副甲状腺 Gcm2 ATAC-seq RNA-seq パイオニアファクター

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

約4億年前、魚のような形をした祖先は長い時間をかけて陸に上がり、四肢動物へと進化しました。しかし、その進化過程でゲノムの機能とその変化をもたらした機構がどのように起こったのかは、まだ十分に明らかになっていない。脊椎動物の陸上進化は化石解析を中心に議論されてきたが、内臓諸器官の進化は化石に残らないため議論は少なく、現生種の魚類と他種との比較研究に依存するしか方法がなかった。共通の機能と形態の比較研究だけで判断することは実際には非常に困難であった。一方で、分子発生学や発生遺伝学、ゲノム研究の発展により、脊椎動物の上陸の過程を知るためには、生物進化の根底にあるゲノムの機能変化の軌跡を辿ることこそが重要であると考えられる。大進化をもたらした内臓器官の機能と形態の進化過程をゲノムワイドに解析する研究はまだ例がほとんどなく、詳細な種間のゲノム変化とそれを可能とする機構の解明が重要である。

### 2. 研究の目的

共通祖先器官から派生した真骨魚類ゼブラフィッシュの鰓と四肢動物マウスの副甲状腺をモデルとし、双方の発生に共通で必須な転写制御因子 GCM2 の機能を比較し、さらにゲノムワイドな転写因子とゲノム構造の変化に関連した解析によりゲノムワイドな基盤データを構築する。これにより、GCM2 がもたらす種間の機能的違いを明らかにし、その結果生じた器官の進化メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

培養細胞(HEK293)を用いて、マウスおよびゼブラフィッシュ GCM2 それぞれの転写活性化能について比較解析を行い、両者の GCM2 に機能的な違いが存在するかを検証した。また、違いが認められた場合、その違いを生み出すドメインを特定するため、両者のキメラ GCM2 や変異を導入した GCM2 を作製し、HEK293 で活性化能の違いを検証した。さらに、GCM2 がクロマチンの構造変化を引き起こすかを検証するために、副甲状腺細胞の培養細胞である PT-r を用いて GCM2 の有無によるクロマチン構造の変化を ATAC-seq および RNA-seq で解析し、GCM2 がクロマチンに与える影響の検証を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス、ゼブラフィッシュの GCM2 の機能解析から見る両種間の機能の違い

転写因子 GCM2 はゼブラフィッシュでは鰓の発生に関与し、マウスでは副甲状腺の発生に重要な役割を果たす。GCM2 の基本的な構造は DNA-binding domain (DBD) と2つの Trans-activating Domain (TAD)、TAD 間に inhibitory domain (CCID) を持つことがヒトやマウスの解析から知られている (Turk et al., 2000, Guan et al., 2016)。それ以外の種では細かなドメイン解析は行われていないが、基本的な構造は非常に似ており、機能的な違いは無いように思われた。ゼブラフィッシュとマウスの GCM2 を発現するベクターと Gcm2 標的配列を有するレポーターベクターを HEK293 培養細胞に共導入する

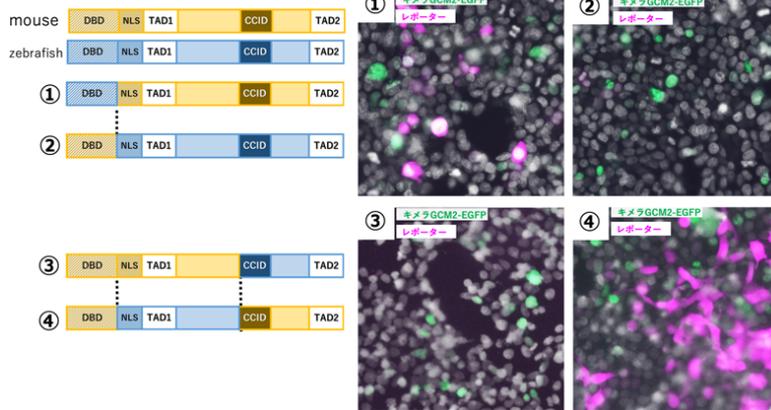
ことにより、2種間の GCM2 転写活性化能に違いがあるのかを解析した結果、マウスはレポーターを活性化させることができたが、ゼブラではレポーターの活性化が弱くことが明らかになった(図1)。この違いが GCM2 のどのドメインに依存す

図1



るかをマウス、ゼブラフィッシュの GCM のドメインそれぞれ入れ替えたキメラ GCM2 ベクターを作製して、転写活性化能を解析した。その結果結果、転写活性化能の違いは DNA 認識配列である DBD 領域では認められず、2 つの TAD に依存することが明らかとなった。とくに3'側の TAD が転写活性化能の違いをもたらすことが明らかとなった(図 2)。TAD は転写に必要なコファクターと結合する部位であることから、種間において、TAD の変化がコファクターの変化を生み、転写活性化能の変化を生み出した可能性が考えられた。

図 2

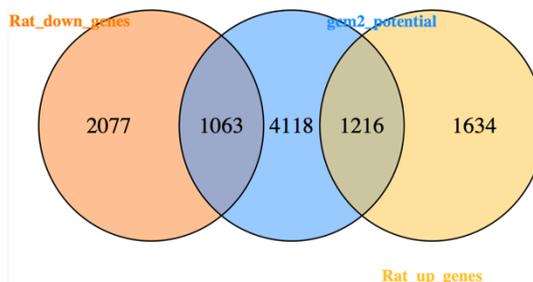


### (2) Gcm2 によるクロマチン構造変化についての解析

Gcm2 がどのようなクロマチンの構造変化を引き起こすのかを明らかにするために、ラット由来の副甲状腺培養細胞 (PT-r) を用いて、Gcm2KO 細胞と control 細胞の RNA-seq と ATAC-seq 解析を行った。驚くことに control 細胞と KO 細胞間で発現に差がある遺伝子数が 8000 以上もあり、その変化のほとんどが Gcm2KO による影響であった。1 つの転写因子の欠損がこれほど多くの遺伝子発現変化を引き起こす例はなく、Gcm2 が遺伝子発現を誘導するだけでなく、抑制する機能も持ち合わせている可能性が示唆された。この結果は Gcm2 がクロマチンの構造そのものを変化させている可能性、TAD に結合する因子を介して、様々な転写調節を行う可能性を示唆した。この結果はこれまで考えていた以上に Gcm2 は副甲状腺細胞の維持に重要であり、その欠損はさまざまな細胞活動に広く影響を与える可能性が明らかとなった。さらに本研究の ATAC-seq, RNA-seq の結果と既報の chip-seq の結果 (Jung et al., 2024) から、Gcm2 のターゲットとなりうる転写因子の抽出を試みた (図 3)。その結果、多くの転写関連因子が KO によって減少することが明らかとなった。この結果は Gcm2 がパイオニアファクターとして働いていることを強く示唆させた。また、KO によって発現が増加する転写因子も多くあり、この中には Gata3 や Ring1 といったパイオニアファクターや polycomb 複合体の構成因子があり、クロマチンの構造を大きく変化させて多くの遺伝子の転写抑制を行っている可能性に迫る結果が得られた。

本研究を通じて、種間の GCM2 の比較の結果から、マウス Gcm2 はゼブラフィッシュと異なる転写活性を示すことを明らかにし、また、種間の転写活性化能の違いは GCM2 の TAD に依存していることを明らかにした。TAD 領域に見られる構造の違いが転写活性化能の違いを生み、さらにその違いが異なる下流遺伝子の発現を促すことで、発生する形態の違いをもたらす可能性が考えられた。また ATAC-seq, RNA-seq の結果から、Gcm2 がパイオニアファクターである可能性が強く示唆され、Gcm2 の新たな機能を明らかにすることができた。

図 3



<引用文献>

Tuerk EE, Schreiber J, Wegner M. *J Biol Chem.*275(7):4774-82. 2000.

Guan B, Welch JM, Sapp JC, et al. *Am J Hum Genet.*99(5):1034-44. 2016.

Jung YL, Zhao W, Li I, et al. *Nat Commun.*15(1):2106. 2024.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高村穂, 辰巳徳史, 庄野孝範, 岡部正隆
2. 発表標題 GCM2の機能を紐解く多種間比較解析
3. 学会等名 第138 回成医会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高村穂, 辰巳徳史, 庄野孝範, 岡部正隆
2. 発表標題 マウスとゼブラフィッシュ2種間におけるGCM2の比較機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高村穂, 辰巳徳史, 庄野孝範, 岡部正隆
2. 発表標題 マウスとゼブラフィッシュ2種間におけるGCM2の比較機能解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部正隆
2. 発表標題 鰓と副甲状腺
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高村穂, 辰巳徳史, 庄野孝範, 岡部正隆
2. 発表標題 魚類 - 四肢動物間におけるGcm2タンパク質の転写活性化能の違いの検証
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2021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
研究協力者	辰巳 徳史  (Norifumi Tatsumi)		実験全般
研究協力者	庄野 孝範  (Shono Takanori)		実験補助
研究協力者	薬師寺 那由他  (Yakushiji-Kaminatsui Nayuta)		実験指導
研究協力者	高村 穂  (Takamura Minori)		細胞実験

#### 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
---------	---------