

平成22年 5 月 31日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2009

課題番号：20590275

研究課題名(和文) 鰓弓形成を司るシグナル調節因子とエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Endothelin 1/endothelin type A receptor signaling pathway are regulated by non-coding RNAs and epigenetic alternation in pharyngeal arch development.

研究代表者

栗原 由紀子 (KURIHARA YUKIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80345040

研究成果の概要(和文)：顎顔面の形態形成においてエンドセリン-1(ET-1)/ETA受容体シグナルは上顎・下顎の領域決定を支配する。鰓弓においてはDlx5/6の発現とDlx5/6遺伝子座に含まれるnon-coding RNAであるEvf2の発現はET-1に依存し、Evf2はさらにDlx5/6遺伝子の発現を負に制御する。一方、Dlx5/6遺伝子間領域のmI56エンハンサー活性は、Dlx5/6自身によって正の制御を受ける。これらの結果から、ET-1/ETARシグナルによるDlx5/6の発現誘導は、一部にはEvf2やmI56エンハンサーを介した正負のフィードバックループを介している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Endothelin-1 determines mandibular identity through endothelin-1/endothelin receptor type-A→Dlx5/6→Hand2 signaling pathway. In the branchial arches, the expression of Dlx5/6 and Evf2, a non-coding RNA in the Dlx5/6 locus where negatively regulates Dlx5/6 expression, depends on ET-1. On the other hand, the enhancer activity of the mI56i Dlx5/6 region is positively regulated by Dlx5/6 themselves. These results indicate that the ET-1/ETAR signal induces Dlx5/6 expression at least partly through positive/negative feedback loop via mI56 enhancer and Evf2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：鰓弓形成、エンドセリン-1、Dlx5、Dlx6、non-coding RNA

1. 研究開始当初の背景

卵から出生までの形態は、短期間にダイナミックに変化し、その制御は正確にかつ高度にシステム化されている。脊椎動物の個体発生に共通する基本構造である鰓弓形成においても、その領域決定には Hox 遺伝子や FGF シグナルなどによる分子ネットワークが深く関与している。我々はこれまで、血管作動ペプチドである ET-1 の遺伝子欠損が顎顔面や心大血管異常をきたすこと (Kurihara Y et al. Nature 368:703, 1994; Kurihara Y et al. J. Clin. Invest. 96:293, 1995)、その表現型は「下顎の上顎様形態変化」というホメオティック変異であり、ET-1/ET-A 受容体 (ETAR) シグナル経路がホメオティック遺伝子 Dlx5/Dlx6 の誘導を介して背腹軸に沿った領域決定を制御していることを明らかにしてきた (Ozeki H, Kurihara Y, et al. Mech. Dev. 121:387, 2004; Fukuhara S, Kurihara Y, et al., Mech. Dev. 121:1223, 2004)。さらに最近、我々は、Cre-変異 lox 系を用いたリコンビナーゼ依存性遺伝子交換 (RMCE) によって、ETAR 遺伝子座に外来遺伝子をノックインする実験系を確立した。これにより、マーカー遺伝子のノックインによって神経堤細胞をはじめとする ETAR 陽性細胞を可視化するとともに、ET-1 遺伝子ノックインによって ET-1/ETAR シグナルを異所性に活性化することにより、ET-1 あるいは ETAR 遺伝子欠損とは逆に「上顎の下顎化」が起こることを明らかにした。これにより、ET-1/ETAR シグナルが鰓弓の発生において、上顎・下顎の領域決定を支配する因子であることを証明した。

Dlx5/Dlx6 の発現に関しては、Ottawa 大学の Marc Ekker らにより、タンデムに並ぶ両遺伝子間の mI56i 領域がエンハンサー領域として同定され、mI56i-lacZ マウスにおいて下顎弓における lacZ 発現が示されている (Zerucha T. et al. J. Neurosci. 20:709, 2000)。我々は共同研究により、ET-1 遺伝子ノックインにより lacZ 発現が上顎弓でも誘導され、このエンハンサー領域が Gαq/Gα11 を介した ET-1/ETAR シグナルの標的となっている可能性を明らかにした。

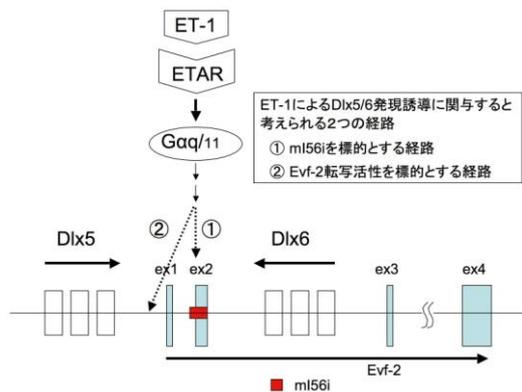
一方、最近発生過程におけるエピジェネティック制御の重要性が注目されている。Dlx5/Dlx6 についても、Dlx5 遺伝子のインプリンティング機構と Rett 症候群におけるその

異常が報告されており (Horike S et al., Nat. Genet. 37:31, 2005)、その発現にエピジェネティック制御が深く関与していると考えられる。さらに、最近 non-coding RNA (ncRNA) のエピジェネティック制御における役割が注目されてきているが、Dlx5/Dlx6 遺伝子間の mI56i 領域近傍には long nc RNA である Evf-2 が存在し、これは頭部形成過程で Dlx2 蛋白と結合して Dlx5/6 の転写を促進することが報告されている (Feng J. et al. Genes Dev. 20:1470, 2006)。最近我々は、ETAR ノックアウトマウス鰓弓において Dlx5, Dlx6 と共に Evf-2 の発現がほぼ消失していることを見いだした。さらに、これまで ETAR はヒストンアセチル化酵素 Tip60 やヒストン脱アセチル化酵素 HDAC7 と結合することが報告されており (Lee HJ et al., J. Biol. Chem. 276:16597, 2001)、ET シグナルとヒストンアセチル化調節との連携機構が示唆されている。以上から、ET-1 → Dlx5/Dlx6 による鰓弓形成の制御において、エピジェネティック機構の重要性が強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究においては、図に示す2つの可能な ET-1 シグナル経路を想定し、以下の流れでその経路とエピジェネティック制御との関係、を明らかにする。

Dlx5/Dlx6 遺伝子およびその下流遺伝子の DNA メチル化およびヒストン修飾が鰓弓領域でどのように変化するかを解析し、その状態が ET-1 シグナルによってどのように制御されているのかを遺伝子改変マウスを用いて明らかにする。さらに、ETAR から Dlx5/Dlx6 遺伝子に至るシグナル経路を同定し、その調節因子を同定するとともにその役割を ETAR 遺伝子座へのノックインシステムを用いて検証する。これまでの実験結果では、遺伝子ノックインにおいて頭部や肢芽などにおける広汎な ET-1 の異所性発現にもかかわらず、mI5/6i-lacZ の異所性発現誘導は、鰓弓背側領域 (上顎弓など) に限られている。この異所性誘導に伴う同領域のエピジェネティック制御状態を他の領域 (肢芽など) と比較することにより、領域特異性決定に関わるエピジェネティック制御因子を明らかにする。



3. 研究の方法

(1) Dlx5/Dlx6 遺伝子座の DNA メチル化およびヒストン修飾状態の解析

Dlx5 と Dlx6 の遺伝子は約 10kb の遺伝子間領域をはさんでタンデムに並んでおり、遺伝子間領域には 2 つの種間で保存されたエンハンサー (mI56i と mI56ii) と Dlx6 遺伝子をまたいで存在する Evf-2 遺伝子のプロモーター領域が存在する。Evf-2 は non-coding RNA で、Dlx2 と結合してこの遺伝子間エンハンサー領域に作用し、Dlx5/Dlx6 遺伝子発現を誘導するというループ機構が報告されている。これらの領域に存在する CpG アイランドを中心に、鰓弓の発生過程での DNA メチル化の状態を、bisulfite 法を用いて解析する。同時に、ヒストン修飾についてもそれぞれの修飾特異的な抗体による ChIP アッセイによって解析する。これと平行して、神経管、肢芽などの領域でも同様の検討を行い、鰓弓特異的なエピジェネティックパターンを抽出する。

(2) ET-1 遺伝子改変マウスにおける Dlx5/Dlx6 遺伝子座エピジェネティック制御状態の解析

これまでの研究で、ET-1 ノックアウトマウス鰓弓では Dlx5/Dlx6 遺伝子の発現が消失、ET-1 ノックインマウスでは逆に上顎弓領域で Dlx5/Dlx6 遺伝子の発現が誘導され、mI56i-lacZ マウスでの lacZ 発現も同じ発現パターンを呈する。ET-1 ノックアウトマウス、ノックインマウス鰓弓で、1 と同様に DNA メチル化、ヒストン修飾の状態を解析し、野生型と比較することによって、ET-1 シグナルによって影響されるエピジェネティックパターンを同定する。

(3) Evf-2 のプロモーター領域と ET-1

による調節機序の解析

これまで、ETAR ノックアウトマウス鰓弓において Dlx5, Dlx6 と共に Evf-2 の発現がほぼ消失していることを見いだしている。このことより、ET-1 シグナルが Evf-2 の転写を活性化していることが予想される。その可能性を調べるため、Evf-2 cDNA の 5' 末端を 5'-RACE により決定し、そのプロモーター領域を同定した後、ルシフェラーゼ遺伝子につないで NIH3T3 細胞、HEK293 細胞、あるいは P19 細胞などの未分化細胞でそのプロモーター活性を比較する。これらと同時に、ETAR 遺伝子を発現させて ET-1 による刺激を行い、プロモーター活性の上昇が見られる細胞、その条件を検討する。ET-1 による活性化が見られた場合、欠失変異、あるいは点変異を導入して ET-1 シグナルの標的となる cis-エレメントを同定する。

(4) in vivo における ETAR シグナルカスケードの解析

mI56i-lacZ マウスに ETARKO、Dlx5/6KO マウスを掛け合わせ、mI56i エンハンサーのカスケードにおいて、図の①の経路か②の経路を明らかにする。また、当研究室で構築した Cre-変異 lox を用いた Recombinase mediated cassette exchange によるノックインの系を用いて ETAR 遺伝子座に Evf2 または Dlx5、Dlx6 遺伝子をノックインし、その表現型や遺伝子発現を解析し各因子の関係を明らかにする。

4. 研究成果

Dlx5/Dlx6 のエンハンサー領域 : mI56i の DNA メチル化状態を ES 細胞、マウス胎生中期胚の鰓弓、頭部、肢芽、尾についてそれぞれ正常胚、ETAR ノックアウト (ETARKO) において検討した。Dlx5/6 の発現のない尾、ES 細胞においてはメチル化されているが、Dlx5/6 の発現のある鰓弓は完全に脱メチル化され、発現のある肢芽も不完全ながら脱メチル化されていた。ホモ接合体の鰓弓では Dlx5/6 の発現がないのでメチル化されていることも予想されたが、肢芽とともに脱メチル化されていた。mI56i のトランスジェニックマウスの mI56i トランスジーンでも正常、ホモで同様の結果が得られた。微量組織 (9.5 日胚の第一鰓弓) の各種 ChIP アッセイは技術的な面から確定的な結果はられなかった。

mI56i に結合する既知の分子としては Dlx2 と Evf2 があげられるが、Dlx2 の発現は正常とホモで大差なく、Evf2 はホモで著減していたことより Evf2 の発現調節が重要と考えら

れた。各種細胞株での Evf2、Dlx6 のプロモーター/エンハンサーアッセイ (Evf2 の 5' 末端は 5' -RACE により決定) では、P19 細胞で Dlx2, 5, 6 蛋白による活性の上昇が見られた。Evf2 の上流約 500bp が Dlx による活性化に重要で、その中の複数の Dlx 応答配列が互いに寄与していることを明らかにした。

さらに、in vivo での ETARKO、Dlx5/6KO、mI56i-LacZ Tg マウスの各種掛け合わせの結果からも mI56i は Dlx5, 6 の影響下にあることが示され、Evf2、Dlx5、Dlx6 ノックインマウスから、下顎の表現型が重篤または軽快したことより、ET-1/ETAR シグナルは mI56 エンハンサーを介して Dlx5/6 の発現を促進するのみならず、Evf2、Dlx5/6、mI56i の間ではポジティブ/ネガティブフィードバックループを形成していることが示された (in preparation)。

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 12 件)

以下、すべて査読有り

1. Kawamura Y, Uchijima T, Horike N, Tonami K, Nishiyama K, Amano T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. (2010) Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. *J. Clin. Invest.* (掲載確定)
2. Heude E, Bouhalia K, Kurihara H, Kurihara Y, Coulya G, Janvier P, Levi G. (2010). Jaw muscularization requires Dlx expression by cranial neural crest cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (掲載確定)
3. Gitton Y, Heude E, Vieux-Rochas M, Benouaiche L, Fontaine A, Sato T, Kurihara Y, Kurihara H, Couly G, Levi G. (2010). Evolving maps in craniofacial development. *Semin Cell Dev Biol.* 21:301-308.
4. Kurihara Y, Kawamura Y, Uchijima Y, Amamo T, Kobayashi H, Asano T, Kurihara H. (2008) Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Dev Biol* 313, 335-346.
5. Sato T, Kurihara Y, Asai R, Kawamura Y, Tonami K, Uchijima Y, Heude E, Ekker M, Levi G, Kurihara H. (2008) An endothelin-1 switch specifies maxillo-mandibular identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18806-18811.
6. Sato T, Kawamura Y, Asai R, Amano T, Uchijima Y, Dettlaff-Swiercz DA, Offermanns S, Kurihara Y, Kurihara H. (2008) Recombinase-mediated cassette exchange reveals the selective use of Gq/G11-dependent and -independent endothelin 1/endothelin type A receptor signaling in pharyngeal arch development. *Development* 135, 755-765.
7. Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T., Chen, Q., Takeuchi, T., Mitani, A., Nagase, T., Yatomi, Y., Aburatani, H., Nakagawa, O., Small, E. V., Cobo-Stark, P., Igarashi, P., Murakami, M., Tominaga, J., Sato, T., Asano, T., Kurihara, Y., Kurihara, H. (2008). Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294, 542-553.
8. Horike, N., Sakoda, H., Kushiyama, A., Ono, H., Fujishiro, M., Kamata, H., Nishiyama, K., Uchijima, Y., Kurihara, Y., Kurihara, H., Asano, T. (2008). AMPK activation increases phosphorylation of GSK3beta and thereby reduces CRE transcriptional activity and PEPCK-C gene expression in the liver. *J. Biol. Chem.* 283, 33902-33910.
9. Toda, M., Suzuki, T., Hosono, K., Hayashi, I., Hashiba, S., Onuma, Y., Amano, H., Kurihara, Y., Kurihara, H., Okamoto, H., Hoka, S., Majima, M. (2008). Neuronal system-dependent

facilitation of tumor angiogenesis and tumor growth by calcitonin gene-related peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 13550-13555.

10. Ohno, T., Hattori, Y., Komine, R., Ae, T., Mizuguchi, S., Arai, K., Saeki, T., Suzuki, T., Hosono, K., Hayashi, I., Oh-hash, Y., Kurihara, Y., Kurihara, H., Amagase, K., Okabe, S., Saigenji, K., Majima, M. (2008). Roles of calcitonin gene-related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis. Gastroenterology 134, 215-225.
11. Toda, M., Suzuki, T., Hosono, K., Kurihara, Y., Kurihara, H., Hayashi, I., Kitasato, H., Hoka, S., Majima M. (2008) Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. Biomed. Pharmacother. 62, 352-359.
12. Ohno, T., Hattori, Y., Komine, R., Ae, T., Mizuguchi, S., Arai, K., Saeki, T., Suzuki, T., Hosono, K., Hayashi, I., Oh-hash, Y., Kurihara, Y., Kurihara, H., Amagase, K., Okabe, S., Saigenji, K., Majima, M. (2008). Roles of calcitonin gene-related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis. Gastroenterology 134, 215-225.

[学会発表] (計 16 件)

1. Satoshi Arima, Koichi Nishiyama, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara 「Complex and Heterogeneous cell behaviour during angiogenesis revealed by real-time live imaging」 The 14th annual scientific session of the society of cardiovascular endocrinology and metabolism 2010, 3/31-4/1 奈良市・奈良県新公会堂
2. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, Hiroki Kurihara 「Id1 may regulate angiogenesis by dynamically controlling Notch signaling in vascular endothelial cells」 The 14th annual scientific session of the society of cardiovascular endocrinology and metabolism 2010, 3/31-4/1 奈良市・奈良県新公会堂
3. 内島 泰信, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 藤澤 興, 榊山 櫻, 栗原 裕基 「Role of non-coding RNA Evf2 in the Endothelin-1/Dlx5/Dlx6 pathway regulation jaw morphogenesis」 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日 横浜市・パシフィコ横浜
4. 藤澤 興, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 榊山 櫻, 河村 悠美子, 浅井 理恵子, 内島 泰信, 栗原 裕基 「In vivo analysis of subtype-specific domain functions of endothelin receptors in craniofacial development」 第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 10 日 横浜市・パシフィコ横浜
5. 礪波 一夫, 栗原 由紀子, 内島 泰信, 浅野 知一郎, 栗原 裕基 「活性中心欠失型カルパインによる低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性制御機構の同定」 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日 横浜市・パシフィコ横浜
6. 浅井 理恵子, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 河村 悠美子, 小久保 博樹, 相賀 裕美子, 宮川-富田 幸子, 栗原 裕基 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subdomain within the first heart field contributing to chamber myocardium」 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日 横浜市・パシフィコ横浜
7. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara 「Id1 regulates angiogenesis by determining the specification and the timing of Notch signaling」 American Heart Association, scientific session 2009, 11/8-12 Orland, USA

8. 礪波 一夫, 栗原 由紀子, 内島 泰信, 浅野 知一郎, 栗原 裕基 「活性中心欠失型カルパインによる新しい細胞骨格制御機構の同定」 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 神戸・神戸ポートアイランド
9. 藤澤 興, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 榎山 櫻, 河村 悠美子, 浅井 理恵子, 内島 泰信, 栗原 裕基 「顎顔面の形態形成におけるエンドセリン受容体の in vivo ドメイン機能解析」 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 神戸市・神戸ポートアイランド
10. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara 「Id1 may control the specification and the timing of Notch signaling in vascular endothelial cells during angiogenesis」 第 82 回日本生化学会大会 2009, 10/21-24 神戸, 神戸ポートアイランド
11. 有馬 聡, 西山 功一, 候 聡志, 小関 宏明, 内島 泰信, 栗原 由紀子, 栗原 裕基 「Modular analysis of angiogenic cell movement by real-time live imaging」 第 17 回日本血管生物医学学会大会 2009, 10/8-9 東京, 東京大学
12. Koichi Nishiyama, Satoshi Arima, Toshiyuki Ko, Hiroaki Koseki, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Yukiko Kurihara, Hisao Ogawa*, and Hiroki Kurihara. 「Id1-mediated dynamic regulation of Notch signaling in vascular endothelial cells during angiogenesis」 第 17 回日本血管生物医学学会大会, 2009, 10/8-9, 東京, 東京大学
13. 藤澤 興, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 榎山 櫻, 河村 悠美子, 浅井 理恵子, 内島 泰信, 栗原 裕基 「Functional analysis of subtype-specific domains of endothelin receptor type A in craniofacial development」 第 42 回日本発生物学会大会 2009 年 5 月 31 日 新潟市・朱鷺メッセ
14. 浅井 理恵子, 栗原 由紀子, 佐藤 崇裕, 河村 悠美子, 小久保 博樹, 宮川-

富田 幸子, 栗原 裕基 「Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subpopulation within the first heart field contributing to chamber myocardium」 日本発生物学会第 42 回大会 2009 年 5 月 28・30 日 新潟市・朱鷺メッセ

15. Yukiko Kurihara, Yumiko Kawamura, Yasunobu Uchijima, Hiroshi Kobayashi, Tomoichirou Asano, Hiroki Kurihara 「Maintenance of genomic methylation during preimplantation development is regulated by the somatic form of DNA methyltransferase 1」 日本発生物学会第 41 回 2008 年 5 月 28 日 徳島・徳島県郷土文化会館

16. Yukiko Kurihara, Yumiko Kawamura, Yasunobu Uchijima, Hiroshi Kobayashi, Tomoichirou Asano, Hiroki Kurihara 「Maintenance of genomic methylation during preimplantation development is regulated by the somatic form of DNA methyltransferase 1」 "Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Mouse Genetics & Genomics: Development & Disease" 2008, 10/29-11/2 New York, USA

[その他]

ホームページ

<http://bio.m.u-tokyo.ac.jp/home-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 由紀子 (KURIHARA YUKIKO)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 80345040

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし