

令和 6 年 9 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02488

研究課題名（和文）臓器の左右極性を決定するゲノムネットワークに関する研究

研究課題名（英文）Study on genome network determining the left-right polarity of internal organs

研究代表者

松野 健治（Matsuno, Kenji）

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60318227

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：からだの左右非対称性は動物発生の必須要素であるため、その機構の解明は発生学の重要課題である。研究代表者は、ショウジョウバエnarigoma（nag）と命名した、タンパク質をコードする遺伝子を含まないゲノム領域が、胚の前半部消化管の左右極性の決定に不可欠であることを明らかにしていた。そこで、nag領域を中心とするゲノムネットワークを明らかにすることを目的として研究を実施した。その結果、nag領域を、3.5kbpのゲノム領域に絞り込むことに成功した。また、nag領域によって転写制御を受ける遺伝子の候補を同定した。さらに、nag領域がエンハンサー活性を有することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの器官において、左右非対称性が正常に形成されることは、その正常機能に必要であることから、左右非対称性の形成機構の解明は基礎医学的に重要である。したがって、本研究の成果は、左右非対称性異常に起因するヒト疾患の病態の理解につながる可能性がある。エンハンサーの作用機序には不明な点が多く、特に、その機能を生体内で解析することは難しい。nagエンハンサーは、個体レベルでの明瞭な機能を指標として選別されており、生体内でゲノムネットワークを解析する上でうってつけの実験系である。本研究においてnagエンハンサーの作用機序の一端を解明できたことで、生命科学の進展に貢献できた。

研究成果の概要（英文）： As left-right asymmetry of the body is an essential element of animal development, elucidation of its mechanism is an important issue in embryology. The Principal Investigator had shown that a genomic region named *Drosophila narigoma* (nag), which does not contain protein-coding genes, is essential for determining the left-right polarity of the gastrointestinal tract in the anterior half of the embryo. Therefore, a study was conducted to identify the genomic network centered on the nag region. As a result, the nag region was successfully narrowed down to a 3.5 kb genomic region. In addition, candidate genes that are transcriptionally regulated by the nag region were identified. Furthermore, it was shown that the nag region has enhancer activity.

研究分野：発生生物学

キーワード：左右非対称性 エンハンサー 消化管 転写制御 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

からだの左右非対称性は動物形態の基本的性質の一つである。そのため、左右非対称性の形成機構を明らかにすることは、発生学の重要な課題である。また、ヒトの内臓、脳において、左右非対称性が正常に形成されることは、その正常機能に必要であることから、左右非対称性の形成機構の解明は基礎医学的にも重要である。近年の国内外の研究成果から、左右非対称性の形成機構は進化的に多様であることが明らかになった。左右非対称性の形成機構は脊椎動物で研究が進んでいるが、脱皮動物、冠輪動物ではまだ不明な点が多い。つまり、大多数の動物門において、左右非対称性の形成機構は解明されるべき問題として残っている。

研究代表者は、未知の左右非対称性形成機構の解明を目指して、遺伝学的手法が駆使できるショウジョウバエの左右非対称性形成を世界に先駆けて解析してきた。ショウジョウバエでは、胚消化管などの多くの器官で、明瞭でステレオタイプな左右非対称性が観察される。研究代表者のこれまでの研究から、胚消化管の前半部と後半部では、異なる機構で左右非対称性が形成されることがわかっている。後半部消化管の左右非対称性は、後腸上皮細胞の細胞キラリティによって形成され、これについては、研究代表者をはじめ、国内外のグループによる研究が進展している。これに対して、前半部消化管の左右非対称性については、細胞キラリティとは異なる機構で形成されること、核の移動が重要な機能をはたすことなどを除いて、ほとんど理解されていない(図1)。

研究代表者は、ショウジョウバエの左右非対称性形成で機能する遺伝子を同定するために、胚消化管の左右非対称性に異常を示す突然変異を、全ゲノムの遺伝子をほぼ網羅して(8,700系統)探索した。その結果、前半部胚消化管の左右非対称性に異常を示す突然変異として、*narigoma* (*nag*) (将棋の駒を裏返すことで別のものになった駒のことを成駒と呼び、裏返すと左右も反転することにちなんで命名した)を同定した(図1)。*nag* 突然変異のホモ接合体では、前半部胚消化管は左右非対称性な構造をとるが、その左右極性がランダム化(正常と逆位がそれぞれ50%)する(図1)。*nag* 突然変異のホモ接合体は、正常に成虫まで生存し、生殖できることから、*nag* の機能は左右極性の決定に特異的であると考えられた。

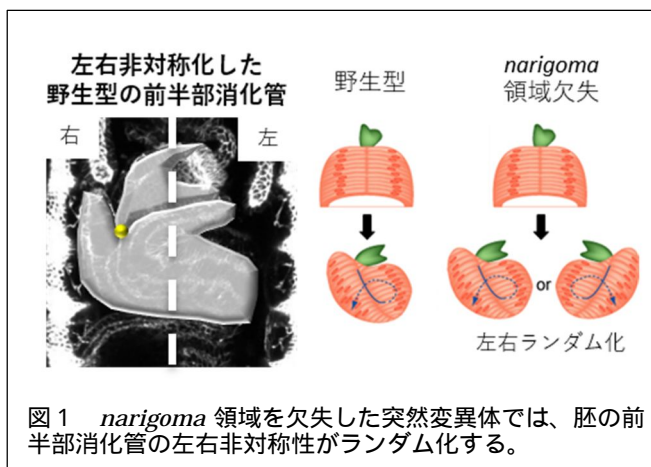


図1 *narigoma* 領域を欠失した突然変異体では、胚の前半部消化管の左右非対称性がランダム化する。

nag 突然変異の責任遺伝子を特定したところ、これを含むことが確定できた 6kbp のゲノム領域には、ショウジョウバエ・データベースの情報に基づけば、タンパク質コード遺伝子、non-coding RNA 遺伝子は含まれていなかった。したがって、この 6kbp のゲノムには、エンハンサーなどの転写制御機能を有する領域が含まれる可能性がある。以下、このゲノム領域に含まれる機能領域を *nag* 領域と呼ぶ。これらの結果にもとづき、研究代表者は、*nag* 領域を中心とするゲノムネットワークが、左右極性決定のような複雑な現象をいかにして制御しているのかという疑問を持つに至った。

2. 研究の目的

研究代表者は、前半部消化管の左右極性の決定において、*nag* 領域を中心とするゲノムネットワークが重要な役割を担っていると考えた。研究開始時点では、*nag* 領域は、6kbp のゲノム領域に絞り込まれていた。DNA 配列の情報から、*nag* 領域に結合する転写因子や、non-coding RNA 遺伝子の候補を推測できる可能性がある。しかし、DNA 配列の情報から *nag* 領域の機能を明らかにするためには、活性を担う DNA 配列をさらに限局する必要がある(図2)。また、*nag* 領域が転写制御に関与する可能性が考えられるが、胚における *nag* 領域のエンハンサー活性の有無はまだ調べられていない。さらに、*nag* 領域が転写活性を制御する下流標的遺伝子(左右極性決定の実行部隊遺伝子)についても現在のところ不明である。そこで、本研究では、*nag* 領域の構造と機能、*nag* 領域を中心とするゲノムネットワークの実体と作用機序を明らかにすることを目的とする。本研究の成果によって、ゲノムネットワークが、如何にして内臓器官の左右極性決定のような複雑なプロセスを制御しているのかを理解できる。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 法で誘発した欠失突然変異を用いた *nag* 領域の絞り込み

CRISPR/Cas9 法を用いて、*nag* 領域の小さい欠失突然変異を誘発する(図2)。CRISPR-Cas9 法

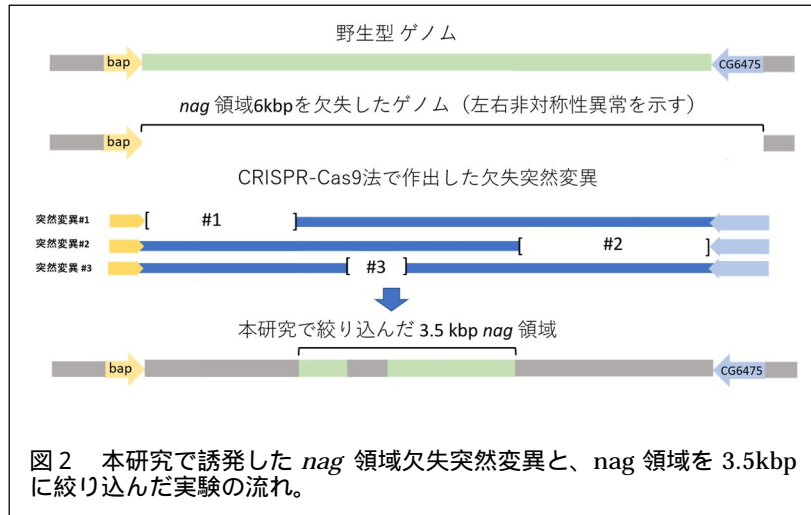
による欠失突然変異は、*nag* 領域内の 2 つの DNA 配列に対するガイド RNA を *in vivo* で合成させ、CRISPR-Cas9 による 2 つの切断箇所の間で欠失 / 修復を起こすことで誘発する。誘発した欠失突然変異において *nag* の機能が喪失しているかどうかは、既存の *nag* 対立遺伝子 (*nag*¹ と *nag*²) との相補性試験によって調べる。得られた欠失突然変異が、*nag*¹ や *nag*² を相補しなければ、この欠失突然変異において欠失させたゲノム領域に *nag* 領域が含まれることになる。CRISPR-Cas9 法による欠失突然変異誘発と相補性試験のサイクルを繰り返すことで、*nag* 領域を絞り込む。

(2) レポーター・アッセイによる *nag* 領域のエンハンサー活性の解析

nag 領域がエンハンサー活性を有するかどうか、エンハンサーであるとすればどの組織、細胞で機能しているのかを調べるために、GFP レポーター遺伝子を用いてエンハンサー活性を *in vivo* で検出する (図 3)。すでに同定されている 6kbp の野生型 *nag* エンハンサー領域 DNA 断片を PCR で増幅し、塩基配列を確認後に、エンハンサー活性を検出するための GFP レポーター遺伝子の 5' 上流に挿入する (図 3)。これらをショウジョウバエに遺伝子導入し、GFP レポーター遺伝子の発現パターンを顕微鏡で解析する (図 3)。

(3) *nag* 領域による転写制御の標的遺伝子の同定

nag 領域による転写制御を受ける標的遺伝子 (群) は、前半部消化管の左右極性決定の実行部隊として機能していると予測している。これらの標的遺伝子を mRNA-seq 解析法を用いて同定する。遺伝的バックグラウンドの違いによる遺伝子発現量の差異を除外するために、*nag* 突然変異体として、*nag*¹ と *nag*² を用いる。前方部消化管が左右非対称化するステージ 13 から 14 の野生型、*nag*¹ ホモ接合体、*nag*² ホモ接合体の胚からそれぞれ mRNA を抽出し、mRNA-seq 解析を行う。野生型と比較して、*nag*¹ と *nag*² 突然変異で共通して発現量が大きく変化する遺伝子を同定する。同定した遺伝子群については、遺伝子機能の解析を実施する。標的遺伝子候補を含むゲノム領域を欠失した染色体欠失突然変異についてホモ接合体の胚を得る。得られた胚の前方部消化管の左右非対称性異常を調べる。もし標的遺伝子候補が左右極性決定の実行部隊として機能しているのであれば、左右非対称性の異常が観察されるはずである。



から 14 の野生型、*nag*¹ ホモ接合体、*nag*² ホモ接合体の胚からそれぞれ mRNA を抽出し、mRNA-seq 解析を行う。野生型と比較して、*nag*¹ と *nag*² 突然変異で共通して発現量が大きく変化する遺伝子を同定する。同定した遺伝子群については、遺伝子機能の解析を実施する。標的遺伝子候補を含むゲノム領域を欠失した染色体欠失突然変異についてホモ接合体の胚を得る。得られた胚の前方部消化管の左右非対称性異常を調べる。もし標的遺伝子候補が左右極性決定の実行部隊として機能しているのであれば、左右非対称性の異常が観察されるはずである。

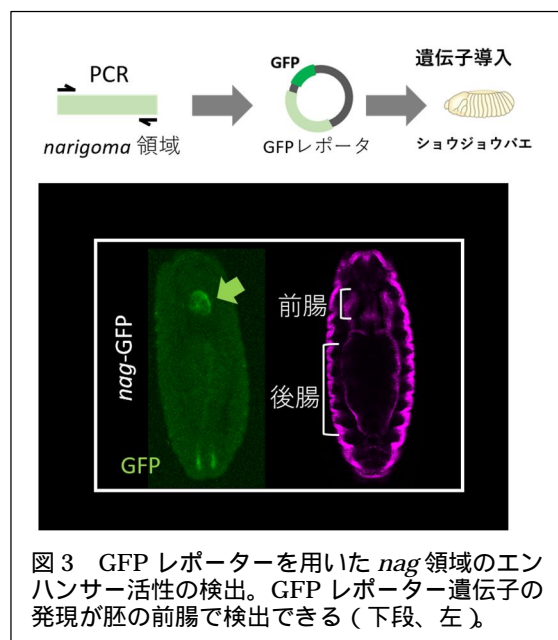
4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 法で誘発した欠失突然変異を用いた *nag* 領域の絞り込み

CRISPR/Cas9 法を用いて、*nag* 領域の小さい欠失突然変異を複数誘発した (図 2)。得られた欠失突然変異と *nag*¹ や *nag*² との相補性試験を実施した。その結果、*nag* 領域を 3.5kbp のゲノム領域に絞り込むことに成功した。しかし、*nag* 領域に結合する転写因子を DNA 塩基配列レベルの情報から予測するためには、まだ領域が広すぎると判断された。

(2) レポーター・アッセイによる *nag* 領域のエンハンサー活性の解析

すでに同定されている 6kbp の野生型 *nag* エンハンサー領域 DNA 断片を PCR で増幅し、エンハンサー活性を検出するための GFP レポーター遺伝子の 5' 上流に挿入し、これらをショウジョウバエに遺伝子導入した (図 3)。この系統における GFP レポーター遺伝子の発現パターンを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した (図 3)。その結果、GFP レポーター遺伝子の発現が、胚の前腸と後腸で特異的に観察された (図 3)。この結果は、*nag* 領域が、胚の前腸と後腸に特異的なエンハンサーとして機能している可能性を示唆している。今後は、*nag* 領域の DNA 断片を短く



て *GFP* レポーター遺伝子上流に挿入し、前腸と後腸に特異的なエンハンサー活性を有する領域を限定する必要がある。もし、*nag* 領域がエンハンサーとして機能しているのであれば、(1)の実験で絞り込んだ *nag* 領域と、(2)の実験で特定したエンハンサー活性を示す領域が一致するはずである。

(3) *nag* 領域による転写制御の標的遺伝子の同定

野生型、*nag*¹ ホモ接合体、*nag*² ホモ接合体の胚からそれぞれ mRNA を抽出し、mRNA-seq 解析を実施した。その結果、野生型と比較して、*nag*¹ と *nag*² 突然変異で共通して、発現量が 2 倍以上に増加する遺伝子、1 / 2 以下に低下する遺伝子を同定することができた。このうち、発現変動が統計的に有意であるものを候補遺伝子とし、それぞれ 15 遺伝子程度について解析を進めることとした。

発現量が減少していた 15 の候補遺伝子については、それを含むゲノム領域を欠失した染色体欠失突然変異についてホモ接合体の胚を作成した。得られたホモ接合体胚の前方部消化管の左右非対称性異常を解析した。その結果、2 つの候補遺伝子において、それぞれを欠失した染色体突然変異体で、左右非対称性の異常が 10-20% の頻度で観察された。これらの候補遺伝子の転写レベルが *nag* 領域のエンハンサー活性によって促進されている可能性が示唆された。しかし、この実験で用いた染色体欠失突然変異では、候補遺伝子の他にも数十の遺伝子が欠失しているため、観察された左右非対称性異常の表現型が、候補遺伝子の機能喪失に起因しているかどうかは不明である。今後、候補遺伝子だけの機能喪失突然変異を得て、そのホモ接合体の表現型を解析する必要がある。

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 Sakamura So, Hsu Fu-Yu, Tsujita Akari, Abubaker Mohammed Bin, Chiang Ann-Shyn, Matsuno Kenji	4. 巻 42
2. 論文標題 Ecdysone signaling determines lateral polarity and remodels neurites to form Drosophila's left-right brain asymmetry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112337 ~ 112337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112337	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 Lai Yi-Ting, Sasamura Takeshi, Kuroda Junpei, Maeda Reo, Nakamura Mitsutoshi, Hatori Ryo, Ishibashi Tomoki, Taniguchi Kiichiro, Ooike Masashi, Taguchi Tomohiro, Nakazawa Naotaka, Hozumi Shunya, Okumura Takashi, Aigaki Toshiro, Inaki Mikiko, Matsuno Kenji	4. 巻 150
2. 論文標題 The Drosophila AWP1 ortholog Doctor No regulates JAK/STAT signaling for left-right asymmetry in the gut by promoting receptor endocytosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.201224	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 Tomoki Ishibashi, Kenji Mstasuno	4. 巻 -
2. 論文標題 extra macrochaetae , encoding Drosophila Id, controls apical cell shape in the hindgut epithelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 MicroPubl Biol .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Shin Dongsun, Nakamura Mitsutoshi, Morishita Yoshitaka, Eiraku Mototsugu, Yamakawa Tomoko, Sasamura Takeshi, Akiyama Masakazu, Inaki Mikiko, Matsuno Kenji	4. 巻 148
2. 論文標題 Collective nuclear behavior shapes bilateral nuclear symmetry for subsequent left-right asymmetric morphogenesis in Drosophila	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.198507	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村 卓矢、Florian Neugebauer、稲木 美紀子、松野 健治
2. 発表標題 胚消化管の左右非対称な構造形成に必要なnarigonomaエンハンサーの機能の解明
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 稲木美紀子、松野 健治
2. 発表標題 細胞外マトリックスはショウジョウバエ後腸の左右非対称な形態形成を制御する
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 Mikiko Inaki, Satoru Okuda, Kenji Matsuno
2. 発表標題 消化管の捻転と伸長は上皮組織のキラルな細胞スライドと収斂伸長により独立に制御される
3. 学会等名 第56回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuya Nomura
2. 発表標題 Genomic and chromatin structure of narigoma enhancer that is required for left-right asymmetric development of embryonic gut
3. 学会等名 第54回 日本発生生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Florian Neugebauer
2. 発表標題 Analysis of genetic regulatory network of the “narigoma” enhancer responsible for left-right asymmetry of the anterior gut in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第54回 日本発生生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Florian Neugebauer
2. 発表標題 Analysis of genetic regulatory network of the “narigoma” enhancer responsible for left-right asymmetry of the anterior gut in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
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

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		
台湾	台湾国立清華大学		