

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02543

研究課題名(和文)パラログ遺伝子サブ機能化進化仮説のエンハンサー移植実験による検証

研究課題名(英文)Verification of the subfunctionalization hypothesis in paralogous genes by engrafting cis-regulatory elements

研究代表者

隅山 健太 (Sumiyama, Kenta)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：00370114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集によりDlx5-6遺伝子クラスターの鰓弓エンハンサーを欠損させたマウスでは下顎が上顎化する表現型が観察された。これによりDlx56鰓弓エンハンサーは下顎の発達に必須の役割を持っていることが明らかとなった。またDlx3-4クラスターへのDlx56鰓弓エンハンサーノックインにより、Dlx3発現量が2倍程度上昇することが確認された。Dlx56鰓弓エンハンサー欠損マウスとDlx56鰓弓エンハンサーをDlx3-4遺伝子クラスターにノックインしたマウスの交配を行い、両ホモ接合のマウスを得た。このマウスでは下顎が上顎化するDlx5-6鰓弓エンハンサー欠損マウスの表現型がレスキューされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンハンサーのノックインにより、内在性遺伝子の既存エンハンサー機能に影響を与えることなく、新しいエンハンサー機能を遺伝子に追加することが可能であることを示すことができた。このことにより複数の異種エンハンサーを一遺伝子に統合することが可能であるということを明らかにした。エンハンサーを移植するというこの手法は、エンハンサー主導の進化メカニズムの理解に役立つだけでなく、家畜などの有用動物の開発や、ヒトの遺伝子治療などに応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mice lacking the pharyngeal arch enhancer of the Dlx5-6 gene cluster by genome editing exhibit a phenotype in which the mandible is transformed into an upper jaw. This result indicates that the Dlx5-6 pharyngeal arch enhancer plays an essential role in mandible development. knock-in of the Dlx5-6 pharyngeal enhancer resulted in an approximately 2-fold increase in Dlx3 expression. mice lacking the Dlx5-6 pharyngeal enhancer were transfected with the Dlx3-4 gene cluster. Crossing the Dlx5-6 pharyngeal enhancer knock-in to the Dlx3-4 gene cluster resulted in mice in which both were homozygous; the phenotype of mice lacking the Dlx5-6 pharyngeal arch enhancer, in which the mandible becomes maxillary and postnatal lethality occurs, was rescued in these mice. These results indicate that paralogous gene function can be transferred to another paralogous gene by enhancer integration.

研究分野：進化発生遺伝学

キーワード：発現制御進化 ゲノム編集 cis-element Dlx遺伝子群 エンハンサーノックイン

1. 研究開始当初の背景

遺伝子重複後本来の機能を維持するオリジナルのコピーの他に、もう一つのコピーが失われずに維持されさらに新しい機能を獲得すること(neofunctionalization)が表現型進化につながるが、そのためには新機能を獲得するまでの比較的長い時間、冗長な遺伝子コピーを維持するメカニズムが必要である(さもなくば直ちに冗長なコピーはゲノムから失われる)。Allan Forceらによる DDC (Duplication, Degeneration, Complementation)モデルが 1999 年に発表された (Genetics 151: 1531-45)。このモデルでは、サブ機能に分かれているエンハンサーが重複後に冗長なエンハンサーの一方を失うことで、重複遺伝子コピーがそれぞれに組織特異性を持つようになり、どちらも失うことができなくなるために維持される。このモデルに合致するエンハンサーの実体探しが行われたが、モデルに合致するシスエレメント分配の例は配列相同性レベルではほとんど発見されることがなかった。私たちは代表的発生制御ツールキット遺伝子である *Dlx* 遺伝子群について、鰓弓由来の頭顔面形態発生時に示す *Dlx* コードと呼ばれる独特のパラログ発現パターンが形態発生と進化において重要な役割をしており、この *Dlx* コードが脊椎動物全ゲノム重複後のサブ機能化進化によって生じていることに注目し、その責任エンハンサーの解析を進めてきた。*Dlx* 遺伝子の活性化はスーパーエンハンサーによるものであるが、その最初の活性化に関わると考えられる、鰓弓特異的で *Dlx* コードと一致する活性を示す複数のリーディングエンハンサーをこれまでに同定してきた。これらのリーディングエンハンサーは、エンハンサーのサブ機能化モデルに矛盾なく当てはまるような、機能の独立性、相加性を示すのだろうかという問いを立て、私たちは進化を逆向きに再現すること、すなわちパラログ重複前の祖先遺伝子を想定し、パラログのサブ機能エンハンサーを共存させた場合、それらの機能が損なわれることなく統合されるかを、ゲノム編集によるエンハンサー挿入実験(移植実験)によって検証することを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、重複パラログ遺伝子の維持に重要な役割を果たすエンハンサーが、サブ機能化モデルから予測されるとおりに独立性と相加性を有すること、すなわち混在することで機能統合できたり、あるいは機能分離できたりすることを実験によって示し、進化モデルの検証を行うことと同時に、こうしたエンハンサーの性質を利用して遺伝子に新しい機能を付加する、すなわち neofunctionalization を人工的に行う方法の可能性を追求する。自然のゲノム進化で繰り返されてきた、新奇エンハンサー獲得による遺伝子発現進化とその結果としての個体発生進化の基盤となる具体的なメカニズムを実験検証によって理解し、応用することを目指す。ゲノム編集ツールによるマウス遺伝子工学を用いて、スーパーエンハンサーモデルから推定した機能領域を改変することによりパラログ間でサブ機能シス因子を移植する実験を行い、パラログ間でのサブ機能の移転が可能であるか、形態発生等の形質が制御可能であるかを検証する。これによりシス調節因子駆動型の形態発生進化のメカニズムを理解することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 動物実験

マウス実験は理化学研究所の動物実験審査委員会および遺伝子組換え実験安全委員会に承認された動物実験計画に基づいて行った。

2) ゲノム編集マウスの作製

マウス受精卵のゲノム編集により、*Dlx3* または *Dlx5* 遺伝子上に同義置換の SNP を持つノックインマウスを作製した。さらに *Dlx3-4* 遺伝子クラスターまたは *Dlx5-6* 遺伝子クラスターのエンハンサー領域を欠損させたマウスを作製した。

3) 遺伝子発現解析

Accu-cis 法のため上記で作成した SNP ノックインマウスとエンハンサー欠損マウスを交配し、胎児から抽出したトータル RNA を受託により RNA-seq 解析を行った。*Dlx3* または *Dlx5* 遺伝子のトータル発現量を上記のノックイン SNP を含むリード数の割合で換算し、それぞれのアレルの発現量を算出した。比較用のコントロールとして SNP ノックインマウスと野生型のマウスを交配して得られた胎児の RNA でも同様の実験を行った。

4) エピゲノムデータ解析によるエンハンサー領域の同定

公開データベースから Micro-C、ChIA-PET、ATAC-seq、ChIP-seq 等の情報を収集し、*Dlx3-4* クラスター領域における各種エンハンサー候補領域を探索した。鋤鼻器の ATAC-seq は公開されたデータがなかったため、野生型マウスの鋤鼻器を受託解析することで作製した。Micro-

CとChIA-PETデータから *Dlx3-4* 遺伝子クラスターの TAD 領域を推定した。この範囲内で CTCF ピークと ATAC-seq ピークを含む領域をエンハンサーの候補として同定した。

5) レポーター導入マウスの解析

上記の実験から得られた候補領域を hsp68 最小プロモーターと *lacZ* レポーター遺伝子の上流にクローニングし、*To12* トランスポゾンシステムによるマウス受精卵でのトランスジェネシスを行い、エンハンサーレポーター導入 Tg マウスを作製した。このマウスを用いて X-gal 染色を行い *lacZ* 発現の有無から *in vivo* エンハンサー活性を確認した。

4. 研究成果

1) アレル特異的発現解析システム Accu-cis 法による変異体アレル発現解析

Dlx3 遺伝子 SNP ノックインヘテロ接合体の E10.5 胎児の下顎弓で RNA-seq 解析を行った。コントロールの野生型アレルとの SNP ノックインアレルの発現比は母方由来および父方由来に関わらずおよそ 1:1 で定量され、インプリンティングなどの効果はないことが確認できた。そこで SNP ノックインアレルと様々なエンハンサー欠損アレルのヘテロ接合体の胎児を作成し解析を行った結果、下顎弓エンハンサー欠損アレルに顕著な発現低下が観察された。また複数の下顎弓エンハンサーを含む領域を欠損させた場合、単純な相加的効果以上の発現低下が観察され、これらのエンハンサー間で複雑な相互作用が存在することが示された。

2) 下顎弓エンハンサー移植遺伝子の発現解析

ゲノム編集により *Dlx5-6* 遺伝子クラスターの下顎弓エンハンサー *Dlx56p* を *Dlx3-4* 遺伝子クラスターの下顎弓エンハンサー *m4U-Tad3* 近傍にノックインした。このノックインアレルの Accu-cis 法による解析の結果、E10.5 胎児の下顎弓で顕著な発現の増加が確認できた (図 1 A)。この発現増加は少なくとも G3 世代から G6 世代まで維持されており、独立に樹立された別系統ノックインマウスでも同様の結果が確認できた。一方で鋤鼻器での発現は変化しておらず、エンハンサーノックインによる組織特異的発現増加効果が明らかとなった。さらに Accu-cis 法による 1 細胞発現解析を行った結果、エンハンサーノックイン細胞群は野生型の細胞群よりも幅広いクラスターで発現していた (図 1 B)。このことにより、*Dlx3* 遺伝子の発現パターンがエンハンサーノックインにより *Dlx5* に近づいた発現パターンに変化していることが示された。

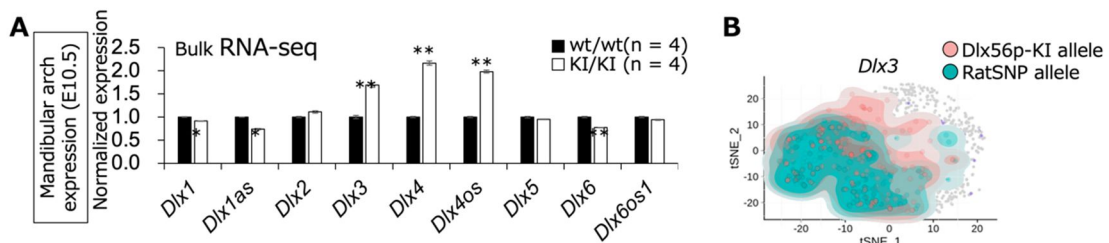


図1 エンハンサーKIによる内在性遺伝子発現制御

3) *Dlx5-6* 遺伝子クラスターの下顎弓エンハンサー *Dlx56p* の機能解析

ゲノム編集により *Dlx5-6* 遺伝子の下顎弓エンハンサー *Dlx56p* を欠損させた結果、欠損ホモ接合体マウスでは下顎が上顎化し産後致死となった (図 2 A)。同様の表現型が *Dlx5/Dlx6* 遺伝子下流の経路にある *dHAND* の変異マウスでも観察されている。さらに Accu-cis 法による解析の結果、*Dlx56p* エンハンサーアレルの発現は野生型と比べ約 45%低下していた (図 2 B)。また RNA-seq 解析の結果、*Dlx56p* 欠損ホモ接合体では *Dlx5* および *Dlx6* 遺伝子の発現が野生

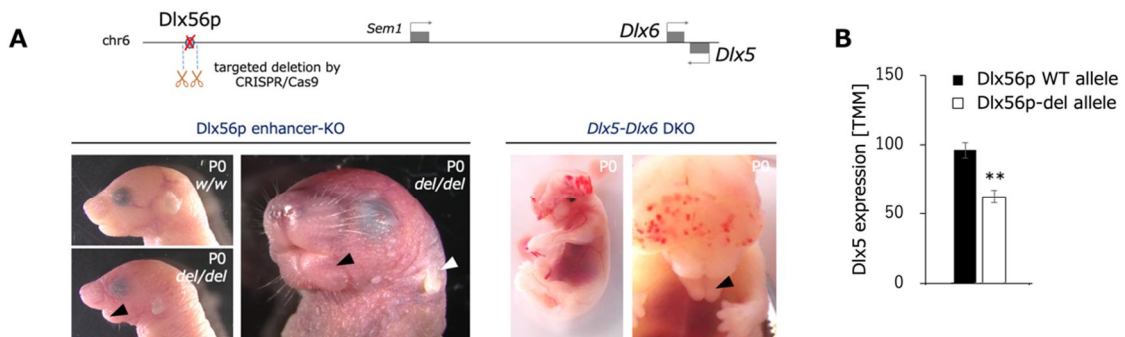


図2 *Dlx56p* エンハンサー欠損は下顎の上顎化を特異的に引き起こす

型と比べ約 75%低下し、*Pitx1* や *dHand* などの下顎の発達に重要な遺伝子の発現も有意に低下していた。さらに *Dlx3/Dlx4* 遺伝子の発現が野生型の 10%以下にまで低下していた。これら

の結果から、Dlx56p エンハンサーは下顎の発生運命決定に必須であることが明らかとなった。

4) エンハンサー移植パラログ遺伝子による下顎形態異常の表現型レスキュー

2)のDlx56p エンハンサーノックインマウスと3)のDlx56p エンハンサー欠損マウスを交配しDlx56p 欠損ホモ接合体群のマウスを解析した結果、Dlx56p エンハンサーノックインヘテロ接合体およびホモ接合体で下顎の上顎化がレスキューされた。さらに2)のDlx56p エンハンサーノックインマウスの *Dlx5/Dlx6* 遺伝子をダブルノックアウトしたマウスを作成した場合も、下顎の上顎化がレスキューされた(図3 A)。Dlx56p 欠損ホモ接合体群を RNA-seq で解析した結果、Dlx56p エンハンサーノックインアレルの効果により *Dlx3/Dlx4* および *Dlx5/Dlx6* の発現が有意に増加した(図3 B)。さらにレスキューされたマウスでは *Dlx3/Dlx4* と *Dlx5/Dlx6* の発現量を合算した値が両遺伝子の野生型と同程度まで回復している。これらの結果は、下顎弓内における *Dlx3/Dlx4* 遺伝子は *Dlx5/Dlx6* 遺伝子の発現パターンを獲得することで、*Dlx5/Dlx6* 遺伝子の機能を補償できることを示している。

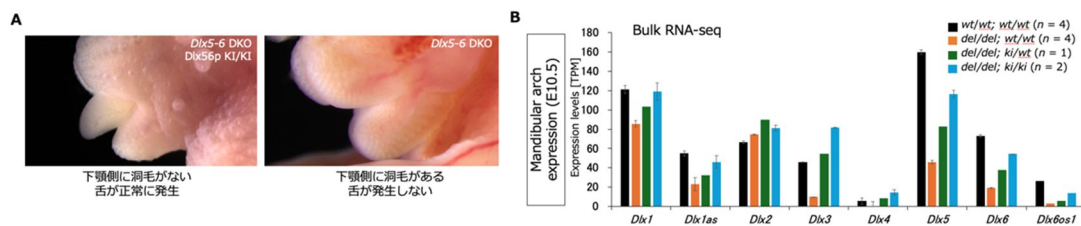


図3 Dlx56pエンハンサーノックインによるDlx5/6KOホメオティック変異のレスキュー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Murai Shin, Takakura Kanako, Sumiyama Kenta, Moriwaki Kenta, Terai Kenta, Komazawa-Sakon Sachiko, Seki Takao, Yamaguchi Yoshifumi, Mikami Tetuo, Araki Kimi, Ohmuraya Masaki, Matsuda Michiyuki, Nakano Hiroyasu	4. 巻 5
2. 論文標題 Generation of transgenic mice expressing a FRET biosensor, SMART, that responds to necroptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-04300-0	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 Daisuke Tone, Koji L. Ode, Qianhui Zhang, Hiroshi Fujishima, Rikuhiro G. Yamada, Yoshiki Nagashima, Katsuhiko Matsumoto, Zhiqing Wen, Shota Y. Yoshida, Tomoki T. Mitani, Yuki Arisato, Rei-ichiro Ohno, Maki Ukai-Tadenuma, Junko Yoshida Garcon, Mari Kaneko, Shoi Shi, Hideki Ukai, Kazunari Miyamichi, Kenta Sumiyama et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Distinct phosphorylation states of mammalian CaMKII control the induction and maintenance of sleep	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3001813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3001813	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 Millius Arthur, Yamada Rikuhiro G., Fujishima Hiroshi, Maeda Kazuhiko, Standley Daron M., Sumiyama Kenta, Perrin Dimitri, Ueda Hiroki R.	4. 巻 120
2. 論文標題 Circadian ribosome profiling reveals a role for the Period2 upstream open reading frame in sleep	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2214636120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2214636120	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 隅山健太、田邊彰
2. 発表標題 哺乳類Dlx5-6遺伝子クラスターの転写制御機構と進化
3. 学会等名 日本進化学会大会第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akira Tanave, Kenta Sumiyama
2. 発表標題 Conditional gene knockout by enhancer cluster elimination in the Dlx3-4 bigene system
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (IMGC2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 隅山 健太、田邊 彰
2. 発表標題 脊椎動物祖先まで遡る起源の古いcis-element機能の哺乳類個体でのin vivo 定量評価
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会(オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 隅山 健太
2. 発表標題 頭顔面形態発生を司るDlx遺伝子の発現調節機構とその進化
3. 学会等名 広島大学医学系研究科・発生・発達・成長期医療研究グループ会議(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 隅山 健太
2. 発表標題 Dlx5-6 遺伝子機能欠損により引き起こされる下顎ホメオティック変異は、Dlx3-4 遺伝子の異所的発現によりレスキュー可能である
3. 学会等名 第33回モロシヌス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田邊 彰, 隅山 健太
2. 発表標題 エンハンサー欠損による鋤鼻器のDlx3-4 コンディショナルノックアウトマウスの開発
3. 学会等名 日本遺伝学会第95回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 斎藤 成也, 海部 陽介, 米田 穰, 隅山 健太	4. 発行年 2021年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 272
3. 書名 図解 人類の進化 猿人から原人、旧人、現生人類へ	

〔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
---------	---------