

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570256

研究課題名(和文)脊椎動物の発生調節に頑健性を与える機構とその進化的起源

研究課題名(英文)Molecular mechanisms and evolutionary origin of the robustness in vertebrate development

研究代表者

荻野 肇(OGINO, HAJIME)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10273856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脊椎動物の祖先種で起きたゲノム倍化により生じた重複遺伝子(パラログ)に注目して、脊椎動物の発生調節に頑健性を与える機構とその進化的起源の解明を試みた。Nr2fパラログ群については、Nr2f1とNr2f2、Nr2f5、Nr2f6の4つが眼や脳で部分的に重複して発現し、特にNr2f1とNr2f2の間では、ゲノム倍化前の祖先遺伝子に由来する3ペアのエンハンサーが未だに保存されていることを発見した。Pax2とPax5のパラログペアについては、両者の間で発現補完に働くエンハンサーの祖先型配列を、脊椎動物の祖先種に近縁なナメクジウオに同定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to reveal molecular mechanisms that confer robustness to vertebrate development, and its evolutionary origin, by studying the regulation of paralogs generated by ancient whole genome duplications. In case of Nr2f-paralogs, we found that Nr2f1, Nr2f2, Nr2f5 and Nr2f6, show partially overlapping expression in the eye and brain, and three pairs of enhancers generated by the genome duplication are still conserved between Nr2f1 and Nr2f2. Regarding Pax2 and Pax5 paralogs, an ancestral-type sequence of their expression-compensation enhancers was identified in the cephalochordate amphioxus.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化 進化 ゲノム 発現制御 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年、脊椎動物の発生制御プログラムには強い頑健性(ロバストネス)が備わっていることが明らかになってきた。発生制御遺伝子の発現を抑制あるいは遺伝子そのものを破壊すると、失われた遺伝子の機能はしばしば類似遺伝子の発現亢進によって補完される。このような頑健性は、生命システムが外界やシステム内部からの攪乱に対して機能を維持する為に必要不可欠であり、遺伝病はこのような頑健性が破綻したときに発症すると考えられる。頑健性の裏には、しなやか且つダイナミックなゲノム制御ネットワークの働きがあると予想されるが、その実体は未だほとんどわかっていない。

この問題に対して研究代表者は、約5億年前に脊椎動物の祖先種でゲノム倍化により生じたパラログ遺伝子群に注目して研究を進めてきた。その中で、ペアード型の転写因子をコードする *Pax5* 遺伝子は、通常は中脳と後脳の境界で発現し前腎では発現しないにも関わらず、パラログ関係にある *Pax2* の前腎エンハンサーと相同なエンハンサーをもつこと、*Pax2* の発現を阻害するとこの *Pax5* のエンハンサーが活性化して *Pax5* が前腎で発現し、*Pax2* の代わりに下流遺伝子を活性化することを見出した。さらに、この *Pax5* エンハンサーは胚の外部環境の塩濃度が上昇したときにも活性化し、前腎で *Pax5* の発現を誘導する。このとき *Pax5* は *Pax2* と共に浸透圧調節に関連する遺伝子群を活性化し、胚を塩濃度ストレスから防御するのである。本研究に先立ち、以上の発見から、ゲノム倍化の際に祖先遺伝子から *Pax2* と *Pax5* に受け継がれたエンハンサーが、進化の過程で恒常活性型と誘導型に分化し、生体内外からの攪乱に対して胚を防御するフェイルセーフ制御機構を形成したことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、まず *Pax2* と *Pax5* に見出されたような、相同なエンハンサーを介した発現補完の仕組みが他のパラログペアにおいても存在するかどうか調べ、その普遍性を検討する。同様な発現補完の仕組みが見つかった場合は、*Pax5* エンハンサーのように環境ストレス(塩濃度や温度の変化等)によっても活性化されるかどうか調べ、両者の共役機構を明らかにする。

また、パラログ形成のもととなったゲノム倍化は、ナメクジウオやホヤ等の原索動物の祖先種と脊椎動物の祖先種とが分岐した後、脊椎動物の系譜で起きたことが明らかになっている。そこで、これらフェイルセーフ制御に働く相同なエンハンサーペアに対する祖先型エンハンサーを、ナメクジウオあるいはホヤ等の原索動物に同定してその機能を調べ、フェイルセーフ制御機構の進化的起源を解明する。

3. 研究の方法

主な実験動物としては、遺伝子の強制発現や発現抑制、トランスジェネシスによるエンハンサー解析等が容易なツメガエル(アフリカツメガエルとネッタイツメガエル)を用いた。遺伝子の発現抑制実験は、アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド(アンチセンス MO)を2細胞期胚の片側割球に顕微注入することによりおこなった。トランスジェネシスには、研究代表者が開発改良に取り組んできた I-SceI メガヌクレアーゼ法や精子核移植法を用いた(Ogino, H. & Ochi, H., *Dev. Growth Differ.* 51: 387-401, 2009)。エンハンサー解析用のレポーター遺伝子には、ツメガエル胚においてバックグラウンド活性の低い β -アクトチン基本プロモーターを GFP 遺伝子に連結したものをを用いた。GFP 遺伝子の発現は、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて高感度に検出した。また、ゲノム DNA のクローニングに用いたナメクジウオは、瀬戸内海の播磨灘において採集した。種間及びパラログ間で保存されているエンハンサーの候補配列の同定には、ゲノム配列アライメントツール MultiPipMaker (Schwartz, S. et al., *Genome Research* 10, 577-586, 2000)を用いた。

4. 研究成果

(1) ツメガエル胚におけるパラログペア *Nr2f1* と *Nr2f2* の間での発現補完制御
発現補完の仕組みをもつパラログペアの候補として、*Nr2f1* (*COUP-TFI*) と *Nr2f2* (*COUP-TFII*) に注目した。これらの遺伝子産物は核内レセプター型の転写抑制因子であり、マウスの *Nr2f2* を破壊するとその発現部位(網膜色素上皮)で *Nr2f1* が活性化することが報告されている(Tang, K. et al., *Development* 137, 725-734, 2010)。ツメガエルにおいて、*Nr2f2* に関しては既にその同定と発現解析の報告がある(van der Wees, J. et al., *Mech. Dev.* 54, 173-184, 1996)。しかし *Nr2f1* については報告がなかったので、マウス *Nr2f1* との配列上の相同性とゲノム DNA 上での遺伝子の並びの保存性を指標に、まず全ゲノム配列情報が明らかでマウスと同じく2倍体ゲノムをもつネッタイツメガエルにおいて、*Nr2f1* を同定した。次にネッタイツメガエルの *Nr2f1* との配列上の相同性に基づき、アフリカツメガエルから *Nr2f1* を2つ単離同定した(*Nr2f1.a* 及び *Nr2f1.b*)。アフリカツメガエルは、約5000万年前に交雑ゲノム倍化により偽4倍体ゲノムをもつようになったため、祖先型のネッタイツメガエル遺伝子に対するオーソログをしばしば2つもつことが知られている。これらと *Nr2f2* の尾芽胚における発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べたところ、それぞれマウスの *Nr2f1* や *Nr2f2* と同様に、前脳や中脳、後脳、眼などで良く似た発現パターンを示した(図1)。

次に顕微注射操作の容易なアフリカツメガエル胚において、アンチセンス MO を用いて *Nr2f2* の発現を胚の片側で抑制したところ、*Nr2f2* のノックアウトマウスにおいて報告された結果とは異なり、眼における *Nr2f1.a* あるいは *Nr2f1.b* の発現亢進は認められなかった。逆に、*Nr2f1.a* と *Nr2f1.b* の発現をアンチセンス MO によって同時に抑制したところ、後脳で *Nr2f2* の発現がやや亢進した。これらの結果から、*Nr2f* パラログの間での発現補完の仕組みは、脊椎動物の種によって異なる可能性が示唆された。

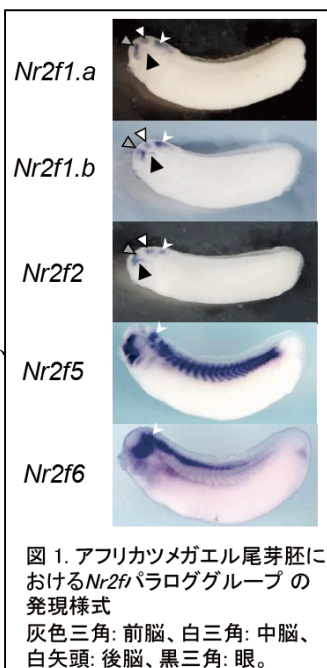


図 1. アフリカツメガエル尾芽胚における *Nr2f* パラロググループの発現様式
灰色三角: 前脳、白三角: 中脳、白矢頭: 後脳、黒三角: 眼。

(2) *Nr2f1* と *Nr2f2* の間で保存されている相同エンハンサーの機能解析

まず、ヒト、マウス、ネッタイツメガエル、フグの *Nr2f1* 及び *Nr2f2* について、各遺伝子座周辺の配列 (300~600 kb) を UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) よりダウンロードし、それらのアライメントを作成することにより、脊椎動物の種間で保存されており且つパラログ間でも保存されている非コード配列 (Conserved Non-coding Element, CNE) を 3 ペア同定した (図 2 上段、Nr2f1-CNE1、Nr2f1-CNE2、Nr2f1-CNE3、Nr2f2-CNE1、Nr2f2-CNE2、Nr2f2-CNE3、それぞれ 300~600 bp)。次に同定した非コード配列をネッタイツメガエルのゲノム DNA よりクローニングし、それぞれエンハンサー解析用レポーター遺伝子に連結した。これらのレポーター遺伝子をトランスジェニック法によりアフリカツメガエル胚に導入し、尾芽胚期に GFP 遺伝子の発現を検出した (図 2 下段)。この実験により、Nr2f1-CNE1 と Nr2f2-CNE1 は、いずれも前脳、中脳、眼、黒矢頭、前腎でエンハンサー活性をもつが、Nr2f1-CNE1 だけがさらに後脳においてもエンハンサー活性を示すことがわかった。また、Nr2f1-CNE2 は前脳と前腎でエンハンサー活性をもち、Nr2f2-CNE2 は前脳と前腎に加えて眼、後脳、眼でエンハンサー活性を示した。Nr2f1-CNE3 と Nr2f2-CNE3 については、共に前脳や中脳、後脳、眼、黒矢頭、前腎においてエンハンサー活性を示すが、Nr2f1-CNE3 の活性に比べ、Nr2f2-CNE3 の活性は全ての組織で顕著に低かった。

(1) で述べたように、アフリカツメガエルにおいては *Nr2f1* (*Nr2f1.a* と *Nr2f1.b*) を抑

制すると、*Nr2f2* の発現が後脳で亢進する。この発現補完制御に関与するエンハンサーの候補として、*Nr2f2* の CNE1 と CNE3 に注目した。*Nr2f1* の CNE1 と CNE3 が後脳で強いエンハンサー活性をもつことから *Nr2f1* の発現を抑制すると *Nr2f2* の CNE1 と CNE3 も強力な後脳エンハンサー活性

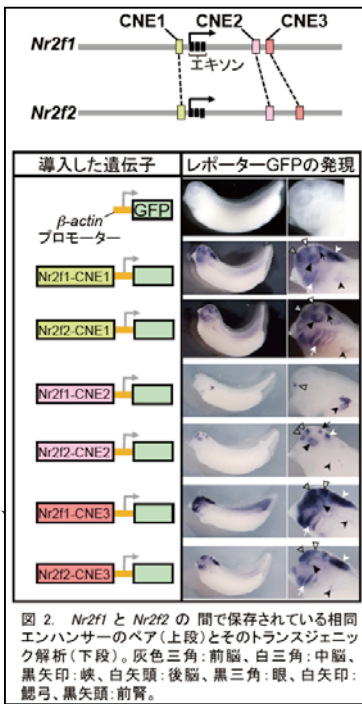


図 2. *Nr2f1* と *Nr2f2* の間で保存されている相同エンハンサーのペア (上段) とそのトランスジェニック解析 (下段)。灰色三角: 前脳、白三角: 中脳、黒矢頭: 後脳、黒三角: 眼、黒矢頭: 前腎。

を示す可能性が考えられる。このことを検討するため、*Nr2f2* の CNE1 あるいは CNE3 を連結したレポーター遺伝子を導入してファウンダートランスジェニック胚を作製し、その卵割期に *Nr2f1.a* と *Nr2f1.b* に対するアンチセンス MO の顕微注射をおこなった。操作した胚が尾芽胚期に達してからレポーター遺伝子の後脳での発現を調べたが、予想とは異なり顕著な変化は見られなかった。

(3) ツメガエルにおける他の *Nr2f* パラログの同定と発現解析

(2) において、*Nr2f1* の発現を抑制したときに *Nr2f2*-CNE1 と *Nr2f2*-CNE3 の後脳エンハンサー活性の亢進が明瞭に認められなかった理由としては、*Nr2f2* の他のエンハンサーの活性が後脳で亢進した、あるいは *Nr2f2* 以外の *Nr2f* 関連遺伝子が後脳で *Nr2f1* の機能を補完した等の可能性が考えられる。(1) において、*Nr2f1* の発現を抑制したときの *Nr2f2* の発現亢進が比較的弱かったことから、特に後者の可能性を考え、ツメガエルやマウス、ゼブラフィッシュ等の全ゲノム配列データベースを用いて *Nr2f* 関連遺伝子を網羅的に探索同定した。その結果、このパラロググループには *Nr2f1* と *Nr2f2* に加えて、*Nr2f5* と *Nr2f6* が存在することが明らかになった。系統樹解析から、まず脊椎動物の祖先種で起きたゲノム倍化により、共通の祖先遺伝子から 2 つのパラログが形成され、次のゲノム倍化により、その片方から *Nr2f1* と *Nr2f2* が、もう片方から *Nr2f5* と *Nr2f6* が形成されたと推測される。これら全てがツメガエルでは保存されているのに対し、マウスでは *Nr2f5* が失われており、ゼブラフィッシュでは *Nr2f6* が失われていた。

次にツメガエルの *Nr2f5* と *Nr2f6* を単離し、尾芽胚における発現を in situ ハイブリダイゼ

ーション法により調べたところ、いずれも後脳で発現しており、*Nr2f1* と冗長的に働く可能性が示唆された (図 1)。また (1) の結果は、*Nr2f* パラログ間での発現補完の仕組みが、マウスとツメガエルで異なることを示すが、そこには以上の解析から明らかになったパラログの保存性の種差も関与すると考えられる。

(4) パラログ間で保存されている相同エンハンサーの起源の同定

(3) までの *Nr2f* 関連遺伝子群の研究からは、当初の予想とは異なり、パラログ間の発現補完の仕組みの種差が明らかになった。一方、研究の背景において述べたように、*Pax2* と *Pax5* の場合は、前腎において、相同なエンハンサーのペアを介した発現補完が起きる。これらのエンハンサーペアに対する祖先型エンハンサーを、原索動物のナメクジウオにおいて探索した。この際、脊椎動物とは進化的な距離が遠すぎて、相同性の高い非コード配列を祖先型エンハンサーとして直接同定するのは困難であったので、遺伝子のコードエキソン配列の保存性とエキソン・イントロン構造の保存性に注目した。*Pax2* と *Pax5* の相同エンハンサーのペアは、*Pax2* と *Pax5* の間で保存されているエキソンのペアに挟まれたイントロンに存在する。まずこのエキソンのペアに相同なナメクジウオのエキソンペアを、フロリダ産ナメクジウオのゲノム配列データベース (UCSC Genome Browser にて公開されている) の上で探索同定した。次にこのフロリダ産ナメクジウオのエキソン配列をもとにプライマーを合成し、日本産ナメクジウオのゲノム DNA から PCR 法によりエキソンペアとその間のイントロンをクローニングし、エンハンサー解析用レポーター遺伝子に連結した。このレポーター遺伝子をトランスジェニック法によりアフリカツメガエル胚に導入したところ、尾芽胚期の前腎で発現した。さらに塩濃度ストレス (0.5% NaCl) を与えると、その発現がさらに亢進した。前述のように *Pax2* のエンハンサーは前腎で恒常的に活性化しており、*Pax5* のエンハンサーは塩濃度ストレスを与えたときのみ前腎で活性化することがわかっている。このことと本実験の結果とを合わせると、祖先型 *Pax* 遺伝子のエンハンサーは 2 つの機能 (恒常的な発現維持と塩濃度応答) を備えていたが、それらがゲノム倍化の後に、*Pax2* と *Pax5* のエンハンサーの間で分担継承されたと考えられる。*Pax2* の発現が低下したときに *Pax5* が活性化する仕組みは、祖先遺伝子に由来する塩濃度応答の機構が進化過程で変化して生じた可能性が高い。

なお、ホヤの祖先型 *Pax* 遺伝子のエキソン・イントロン構造は、脊椎動物やナメクジウオのオーソログのものとはやや異なっていたため、目的の祖先型エンハンサーを同定することができなかった。一方、ナメクジウ

オでは、エキソン・イントロン構造の保存性から、脊椎動物の眼形成遺伝子 *Pax6* についても、そのイントロンエンハンサーに対する祖先型エンハンサーを同定することができた。従来、ナメクジウオと脊椎動物との間では、その進化的距離から相同なエンハンサーのペアを同定するのは極めて困難とされてきた。しかし本研究の結果から、少なくともイントロンエンハンサーに限っては、遺伝子構造上の位置から相同なペアを同定することが可能であり、これはエンハンサーの進化過程を解明するにあたって極めて有効なアプローチになると期待される。

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 6 件)

- ① Omori, A., Miyagawa, S., Ogino, Y., Harada, M., Ishii, K., Sugimura, Y., Ogino, H., Nakagata, N. and Yamada, G. Essential roles of epithelial bone morphogenetic protein signaling during prostatic development. *Endocrinology*, in press (doi: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2013-2054>), 査読有。
- ② Nabeshima, A., Nishibayashi, C., Ueda, Y., Ogino, H., Araki, M. Loss of cell-extracellular matrix interaction triggers retinal regeneration accompanied by *Rax* and *Pax6* activation. *Genesis* 51: 410-419, 2013 (doi: 10.1002/dvg.22378), 査読有。
- ③ Ochi, H., Tamai, T., Nagano, H., Kawaguchi, A., Sudou, N. and Ogino, H. Evolution of a tissue-specific silencer underlies divergence in the expression of *pax2* and *pax8* paralogues. *Nature Commun.* 3: 848, 2012 (doi: 10.1038/ncomms1851), 査読有。
- ④ Kawaguchi, A., Ochi, H., Sudou, N. and Ogino, H. Comparative expression analysis of the H3K27 demethylases, JMJD3 and UTX, with the H3K27 methylase, EZH2, in *Xenopus*. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 295-300, 2012 (doi: 10.1387/ijdb.113360ak), 査読有。
- ⑤ Yokoyama, Y., Maruoka, T., Ochi, H., Aruga, A., Ohgo, S., Ogino, H. and Tamura, K. Different requirement for Wnt/ β -catenin signaling in limb regeneration of larval and adult *Xenopus*. *PLoS ONE* 6: e21721, 2011 (doi: 10.1371/journal.pone.0021721), 査読有。
- ⑥ Ogino, H., Ochi, H., Reza, H. M. and Yasuda, K. Transcription factors involved in lens development from the preplacodal ectoderm. *Dev. Biol.* 363: 333-347, 2012 (doi: 10.1016/j.ydbio.2012.01.006), 査読有。

[学会発表] (計 16 件)

- ① Ogino, H. Evolution of a tissue-specific silencer underlies divergence in the

- expression of paralogues. International symposium: Frontiers in Amphibian biology: Endangered species conservation and genome editing, 2014.3.27, 東広島市 広島大学.
- ② 佐々木裕子. *Six2* と *Lhx1* の腎幹細胞での発現を調節するシス配列の探索. 第7回日本ツメガエル研究集会, 2013.9.24, 山口県美祢市.
- ③ 荻野 肇. パラログ形成に伴うシス調節配列の進化. 国立遺伝学研究所 研究集会「新機能獲得の分子進化」, 2013.8.17, 三島市.
- ④ 荻野 肇. パラログ形成に伴うシス調節配列の進化. 第3回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting, 2013.8.10, 東京都 慈恵医科大学.
- ⑤ Kawakami, K. Role of *Six1* in evolution of vertebrate primary sensory system. 第46回日本発生生物学学会大会, 2013.5.29, 松江市.
- ⑥ Ochi, H. The cis-regulatory evolution for developmental robustness and stress response. 第46回日本発生生物学学会大会, 2013.5.29, 松江市.
- ⑦ 荻野 肇. 組織特異的なサイレンサーの獲得によるパラログの発現パターンの多様化. 第35回日本分子生物学学会年会, 2012.12.11, 福岡市.
- ⑧ 荻野 肇. ゲノム倍化が引き起こす遺伝子発現調節機構の進化. 第24回高遠・分子細胞生物学シンポジウム, 2012.8.23, 長野県伊那市.
- ⑨ 越智陽城. パラログ形成にともなうシス調節機構の進化. 日本進化学会 14 回大会, 2012.8.23, 東京都八王子市.
- ⑩ Ogin, H. Evolution of a tissue-specific silencer underlies divergence in the expression of paralogues. 第45回日本発生生物学学会・第64回日本細胞生物学学会合同大会, 2012.5.31, 兵庫県神戸市.
- ⑪ Ochi, H. Paralogous enhancers: a crossover point between developmental robustness and stress response. 第45回日本発生生物学学会・第64回日本細胞生物学学会合同大会, 2012.5.29, 兵庫県神戸市.
- ⑫ Ochi, H. Conservation and diversification of cis-regulatory mechanisms of the *pax2/5/8* paralog group in chordates. American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2011.12.4, Denver, Colorado, USA.
- ⑬ 越智陽城. 組織特異的なサイレンサーの獲得によるパラログ遺伝子の発現の多様化. 第5回日本ツメガエル研究集会, 2011.10.6, 静岡県熱海市.
- ⑭ Ochi, H., A pair of duplicated enhancers controls both a fail-safe regulation for development and adaptation to environmental stress. 日本発生生物学学会第44回大会, 2011.5.20, 沖縄県宜野湾市.
- ⑮ Yokoyama, H. Scarless wound healing of *Xenopus laevis* -as a prerequisite for epimorphic regeneration. 日本発生生物学

会第44回大会, 2011.5.19, 沖縄県宜野湾市.

- ⑯ Kawaguchi, A. A H3K27 demethylase, *Jmjd3*, is essential for *Xenopus* eye development. 日本発生生物学学会第44回大会, 2011.5.18, 沖縄県宜野湾市.

[図書] (計2件)

- ① Ochi, H., Kawaguchi, A. and Ogin, H. Differential use of paralogous genes via evolution of cis-regulatory elements for divergent expression specificities. *New Principles in Developmental Processes*, Kondoh, H. and Kuroiwa, A. (ed), Chapter 21: 279-290, Springer, 2014 (ISBN 978-4-431-54634-4).
- ② Ogin, H., Ochi, H., Uchiyama, C., Louie, S. and Grainger, R. M. Comparative genomics-based identification and analysis of cis-regulatory elements. *Methods in Molecular Biology, Xenopus Protocols, 2nd edition: Post-Genomic Approaches*, Chapter 17: 245-263, Humana press, 2012 (ISBN-10: 1617799912; ISBN-13: 978-1617799914).

[その他]

- (1) ホームページ等
長浜バイオ大学教員の紹介 (荻野 肇)
<http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/guide/kyoin/detail/post-10.html>
- (2) 報道関連情報
雑誌論文③ (*Nature Communications* 誌に発表したゲノム倍化と遺伝子進化の研究)の意義を伝えた記事
2012年5月23日 毎日新聞 朝刊
2012年5月23日 産経新聞 朝刊
2012年5月23日 奈良新聞 朝刊
2012年5月25日 日経産業新聞 朝刊
2012年6月2日 日刊工業新聞 朝刊
2012年5月25日 MSN産経west
(http://sankei.jp.msn.com/west/west_life/news/120525/wlf12052516310018-n1.htm)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
荻野 肇 (OGINO HAJIME)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
アニマルバイオサイエンス学科・教授
研究者番号: 10273856
- (2) 連携研究者
越智 陽城 (OCHI HARUKI)
山形大学医学部教育研究支援センター・助教
研究者番号: 00505787