

細胞分化における高次遺伝子発現制御機構ネットワークの解明

●大川 恭行

九州大学 高等研究機構・医学研究院 SSP 幹細胞ユニット エピジェネティクス分野

<研究の目的と進め方>

細胞内の個々の遺伝子が発現するには、(1) ヒストンの修飾、(2) プロモーター、エンハンサー領域上のクロマチン構造の開放(クロマチンリモデリング)、(3) プロモーター・エンハンサー領域への転写因子の結合(4) 転写開始、それぞれに至るステップを段階的に経ることが必要である。骨格筋分化をモデル系として、個々の遺伝子発現を同調的に制御する高次制御システムの一つとして、核内遺伝子座の再配置に注目した。本研究においては、培養細胞系での骨格筋分化をモデルとして、分化過程の各段階における様々な転写制御現象についてのデータを集積する。骨格筋分化において、これらの各イベントが、複数のグループ遺伝子ごとにまとめて、同調的に制御されていることを既に見出している。興味深い事に、それぞれの遺伝子はゲノム上で離れた場所に位置していた。このことは、これらの遺伝子群を時期特異的に一括して発現調節する高次のクロマチン構造制御システムが細胞内に存在する事を示唆する。この高次制御の仮説として、転写開始前に特定の複数の遺伝子座が一カ所に集積され、その後の複数の転写を同調的かつ効率的に行うという、transcription factories モデルが提唱されている。近年 Dekker らによって開発された Capturing Chromosome conformation(3C) を始めとする解析手法の確立により、ようやく本仮説の本格的な検証が始まりつつある。私たちは、骨格筋分化において近接し合う遺伝子群を、3C-SEQ 技術を用いて複数遺伝子の近接領域の網羅的マッピングを行う。また、同時にそれぞれの領域に結合するタンパク質を大規模質量分析解析することにより、包括的に同定する。本プロジェクトでは、細胞の分化過程の各段階において、同調的に発現誘導される遺伝子群と、それらの遺伝子群の転写を活性化させるタンパク質群の連携ネットワークについて、骨格筋分化をモデル系として解明することを目的とする。得られた情報はデータベース化され、個々のタンパク質(転写因子、クロマチン制御因子)がいつ、どのように、どの遺伝子群を制御しているか、という制御・被制御の関係を解き明かす事に貢献すると考えられる。

<2008 年度の研究の当初計画>

ゲノム上の高次制御機構解明のため、ゲノムワイド 3C の構築を行う。モデルとなる骨格筋前駆細胞を用いて、必要な諸条件の設定を検討する。また、3C が適切に動いていることを検証する他のアッセイ系、DNA-FISH による遺伝子座近接の可視化、及び RNA ポリメラーゼを免疫染色することによる RNA ファクターの可視化を行う。これらのアッセイ系が適切に動いていることを確認されたサンプルを用いて、1) 通常の 3C 解析 2) それを用いた chromosome conformation capture by sequence によるゲノムワイドクラスタリング領域のマッピングを行う。得られた配列情報は、ゲノム上にマッピングされる。それにより、クラスタ

リングの時間的、空間的变化を検証する。特に、高頻度にクラスタリングが検出された領域間では、相同性配列の存在の有無を確認する事で、クラスタリングにおけるコンセンサス配列の抽出を試みる。ChIP-Seq によるヒストン修飾部位のマッピングを並行して行うことによりクラスタリングを制御する可能性のあるヒストン修飾部位の探索を行い、配列情報以外のクラスタリング位置情報について検討を合わせて行う。

<2008 年度の成果>

遺伝子座近接現象のコントロールとなる DNA FISH を用いた可視化の系を立ち上げ検証を行った。その結果①骨格筋特異的遺伝子である、ckm, des、そして alpha sk actin の遺伝子座の近接が骨格筋分化依存的に起こること、②この遺伝子座近接現象が骨格筋芽細胞の分化誘導後 1-4 時間の極めて早い段階で検出されることを確認した。しかしながら、これらの近接現象は、遺伝子の組み合わせによって確認される頻度に大きな隔りがあることから、網羅的なゲノムワイドでの 3C 解析が必要を裏付けるものであった。これをマーカーとして ABI SOLID システムのメイトペアライブラリーシステムを用いた応用したゲノムワイド 3C のシステムの立ち上げを行い、現在解析を進めている。また、遺伝子座近接現象にかかわるヒストン修飾のマッピングを行うためにモノクローナル抗体作成を行い、ラット H3.3,H4K16Ac、に対するクロマチン免疫沈降法に適用可能な抗体の作出に成功し現在通常クロマチン免疫沈降法を用いた条件設定を行い、ChIP-SEQ への準備を進めている段階である。

<国内外での成果の位置づけ>

骨格筋分化では、プロモーター上で転写因子やクロマチンリモデリング因子がめまぐるしく置き換わり、そのタイミングごとに、様々なクロマチン制御が段階的に起こり転写に至る。非常に興味深いことに、骨格筋分化に伴って発現するこれらの遺伝子群はほぼ同じタイミングで、ヒストンのアセチル化、クロマチンリモデリング、転写活性化が起こっている。この現象は、これらの遺伝子座が近接しているために、同調的な制御をうけているのではないかと考え、transcription factories モデルに注目した。元々、細胞の核内部で染色体 DNA が、複製、転写、不活性化に伴って、ループ構造などの高次構造を形成するという事は、原核生物、真核生物の双方において以前より示唆されている。Cook らは、遺伝子の転写メカニズムとして、transcription factories と呼ばれる染色体の高次構造形成による転写機構のモデルを提唱したが、分子機序を解析する手段に乏しく、長く不明のままであった。2002 年に Dekker らにより、任意の二つの遺伝子座の近接を分子生物学的に検出する Capturing Chromosome conformation(3C) が開発され、以来、精力的にクロマチン高次構造解析が行われてい

る。特に最近では1:1の二つの遺伝子座間の位置解析法であった3Cから、マイクロアレイを用いた、1対複数の genome wide な遺伝子座近接の領域決定が可能となっている(4C)。ここ数年、革新的な解析法の開発がすすんでいるにも関わらず、実際にこの高次構造形成に関わる分子、及びその形成機序については明らかになっていない。以下、未発表の知見について説明する。申請者は、これまでに骨格筋特異的遺伝子群のプロモーター/エンハンサー領域の網羅的クロマチン構造制御の解析を行い、少なくとも40以上の遺伝子群のプロモーター/エンハンサー領域が同時期に、ヒストンのアセチル化、クロマチンリモデリング、そして転写のタイミングまでもが同調的に制御されていることを発見した。また、これらの遺伝子が骨格筋の分化が進むに伴ってクラスターリングを形成していることを確認した。

さらに興味深い事に、これらクラスターリングの形成時期は、ヒストンのアセチル化、クロマチンリモデリングのいずれの現象よりも早く起こることが示唆された。また、この時期は、プロモーターもしくは、エンハンサー上には、転写活性化が認められない時期にも関わらず、MyoD が結合していることから、MyoD がなんらかの形でこのクラスターリング形成に関与している可能性がある。また、このクラスターリングがいずれの場合も SWI/SNF クロマチンリモデリング因子の活性に依存的であったことから、従来、局所的なクロマチンリモデリングに関わるとされてきた SWI/SNF が直接的もしくは間接的にクラスターリングに関わっている事が示唆されている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ゲノムワイド3Cを行うに当たり当初は、SAGEをヒントとした従来のシーケンスを用いた方法を想定していたが、予想以上に次世代シーケンサーパフォーマンスが優れており、同じタグプロファイリングを行うことから、システムの変更自体を余儀なくされた。結果的に解析できるタグの数が飛躍的に増大した利点を得たが、逆に系の立ち上げに時間を有する結果となった。これは、SOLIDのメイトペアライブラリー作成のプロトコルをゲノムワイド3Cにあわせてプロトコルの見直しを行う必要性に起因している。3C解析そのものがコントロールの設定が多く必要である。また、解析データを3C以外の方法でも多角的に検討しながら慎重に解析系が動いているかどうか判断をせざるを得ない。そのため、3Cと平行してDNA FISHによる遺伝子座の可視化やRNAファクトリーの形成能を検証しながら解析系を慎重に構築している段階である。また、ヒストン修飾のChIPを行うための予備実験の結果、市販の抗体の多くがバックグラウンドが高く有意なS/N比が得られないことが判明し、自ら抗体を作成する必要性に迫られた。幸い、腸骨リンパ節法を用いた短期間での抗体作成法の導入のため、これを容易に作成することが可能であった。本プロジェクトは新規ラボの立ち上げと並行して行っているため、時間的な制約を受けている。

<今後の課題>

現在解析を終えつつあるデータをデータベース化することを検討する上で専門分野の先生方との連携を深める必要があると考えている。

<成果公表リスト>

なし