

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（アセチル化、メチル化）、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、それぞれにいたるステップを段階的に経ることが必要である。私たちは、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まって同調的に制御されていることを見出した。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 chromosome conformation capture (3C) を始めとする解析手法の確立により、ゲノムレベルでの検証が可能になった。本研究の目的は、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、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、特に、骨格筋分化をモデル系として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が可能となる本手法を用いる事で、あらゆる細胞分化や病態形成の“きっかけ”となる分子の同定をデータベース上で容易に行うことが可能になることが期待された。

<研究開始時の研究計画>

<骨格筋分化における遺伝子集積のデータベースの構築>

私たちはこれまでに、骨格筋分化をモデル系として、分化時に発現が上昇する遺伝子の解析を組織発生及び株化細胞レベルで、行ってきた。特に、クロマチン構造変換による遺伝子発現制御に着目して研究を進めている。種々の抗体作製を行い、ゲノム上でのクロマチンリモデリング因子の遺伝子発現前後の挙動をクロマチン免疫沈降法やクロマチン干渉法を用いて分析してきた結果、以下のことが明らかになった。（１）同一遺伝子であっても分化のタイミングにより、プロモーター・エンハンサー上にリクルートされる転写因子が変化していくこと（２）この際、クロマチンリモデリング因子、ヒストン修飾因子が様々なタイミングでゲノム領域に働きかけること（３）そして、分化時に、クロマチン構造制御段階で発現している遺伝子が高次構造を形成していること。（Ohkawa Y et al 2006 EMBO J, Ohkawa Y et al 2007 J.B.C.）

しかしながら、骨格筋分化において発現が上昇する遺伝子に全

てのマーカを確認することは不可能であり、局所的ダイナミクスの同定にはつながったもののゲノムワイドな解析系が弱く、分化全体を複数の遺伝子発現をととして 俯瞰的に解析するには至っていない。この問題は現在の分化現象におけるクロマチン解析の限界点でもあり、分子メカニズムを追求するとなると解析する遺伝子が絞らざるを得ず、結果的に分化現象を一部のマーカでのみ判断せざるをえないという矛盾に突き当たってしまう。本領域での参加にあたっては、分化研究を高次遺伝子発現制御の観点から、個々の遺伝子発現制御を集約する機構のゲノムワイドな解析を行いたいと考えた。そこで、骨格筋分化のモデルとして用いられる系は様々であるが、今回は均一な集団を用いて確度の高

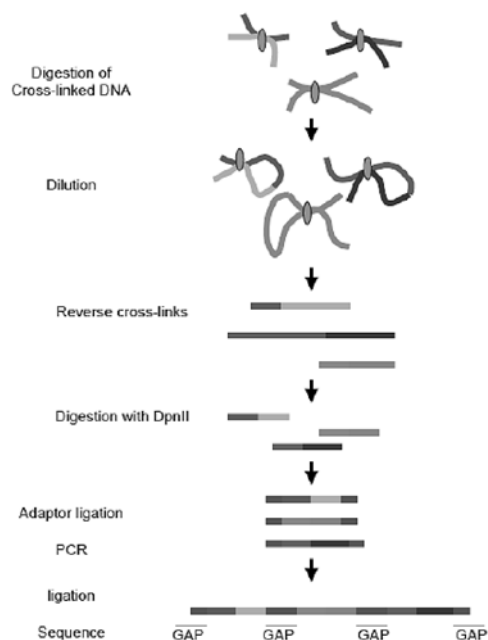


図1 3C-SEQ フローチャート

いデータを得るために、NIH3T3 に MyoD を強制発現させて骨格筋分化を誘導する系と再クローニングを行いより高い効率で骨格筋分化するラインへ純化した C2C12 を用いて解析を行う。細胞に分化刺激を加え、その後経時的に細胞を回収し、5%ホルマリンにて架橋処理を行う。サンプルを従来法の 3C 及び ChIP で検証し、安定した解析結果を提示するサンプルについて 3C by sequence によるクラスタリング領域のマッピング、及び ChIP-Seq による転写因子、コファクターのマッピングを行い、クラスタリングの時間的、空間的変化を検証する。特に高頻度にクラスタリングが検出された領域間では、相同性配列の有無を確認、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。また、可能であれば ChIP-Seq で得られたヒストン修飾との対比により、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の

検討を合わせて行う。骨格筋分化のモデルとして用いられる系は様々であるが、今回は均一な集団を用いて確度の高いデータを得るために、NIH3T3 に MyoD を強制発現させて、骨格筋分化を誘導する系を用いる。MyoD をレトロウイルスを用いて 3T3 細胞に導入後分化刺激を加え、その後経時的に細胞を回収し、5% ホルマリンにて架橋処理を行う。サンプルはそれぞれ chromosome conformation capture by sequence によるクラスタリング領域のマッピング、及び ChIP-Seq によるヒストン修飾部位のマッピングにそれぞれ用いられる。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、空間的変化を検証する。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ことを考えた。また、ChIP-Seq で得られたヒストン修飾との対比により、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こととした。

＜研究期間の成果＞

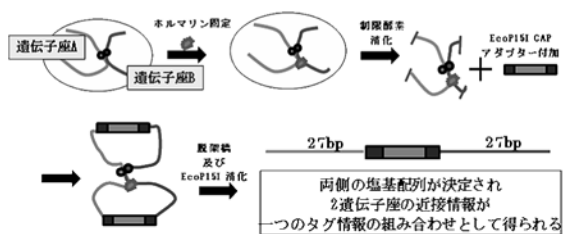


図2 SoLiD メイトペアライブラリーを応用した
ゲノムワイド 3C 概略図

3C-SEQ を通常のシーケンサーを用いた解析に基づき行うことを申請時に計画し、その予備実験を既に開始していた辞典で、ABI 社より SoliD2.0 及びメイトペアライブラリーシステムが発表された。このシステムを応用することで、コスト面を大幅に削減し、かつ、当初予定の 10000 倍の情報量を得ることが可能になることが試算された。そこで、当初の 3C-seq のライブラリーを作製する際に用いたプロトコルを変更し、SoliD のプラットフォームを用いて解析することとした。3C には ChIP assay のような明確なコントロールを設定することが困難である。まず、ポジティブコントロールとして、どのゲノム上の遺伝子座が近接しているのか？どの遺伝子座ならば近接していないのか？また、3C 以外の評価法で検証するにはどのようにすべきなのか？どのような定義で“解像度”を設定するか？以上を個別に解決することで安定したデータを得る系の確立を行った。まず、コントロールとして、クロマチン分画を任意のエンドヌクレアーゼで処理することでどの領域が消化されるのかを適切に評価することからはじめた。3C のオリジナルの手法では強力なタンパク質変性状態を用いて、可能な限りヒストンや他のタンパク質が DNA を乖離させるアプローチを試みるが、この条件ではほとんどのエンドヌクレアーゼが残存の界面活性剤等の影響を強力に受けるため、消化効率が著しく減少した。そこで、3C で通常行う DNA 架橋の条件を詳細に検討を行った。その結果、架橋の条件を弱く設定することで、飛躍的な酵素消化効率を得るだけでなく、後述するように Hi-C や他の類似の手法に比べて極めて低いバックグラウンドを実現することが可能になった。得られたライブラリーは、SoliD メイトペアライブラリーのプロトコルに従って作製することで、容易にライブラリーの作成を行うことが可能であった。

次に、得られた情報解析を進めることとした。まず、両端がユニークにマウスゲノム上にマッピングされたものを解析対象としたところ、全読み取りタグ 1500 万に対し、700-800 万のタグが該当した。これを遺伝子座近接情報として、解析を進めることとした。骨格筋分化サンプルとして、C2C12 細胞を分化刺激し経時的に回収したものと、コントロールとして NIH3T3 を非筋肉細胞として用いた。

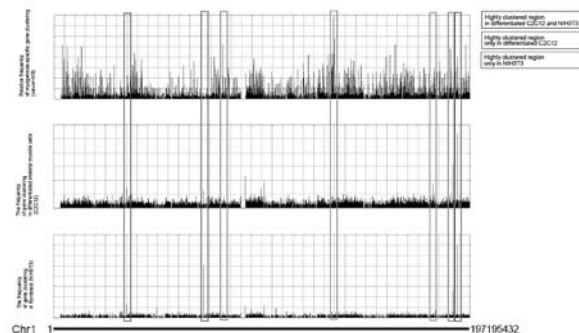
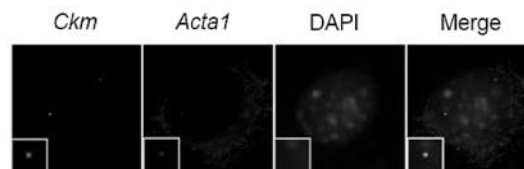
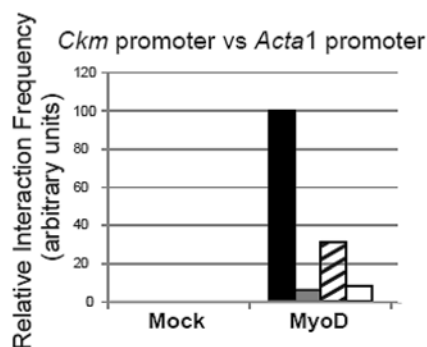


図3 遺伝子座近接分布図例

その結果、骨格筋分化段階特異的な遺伝子座近接部位がゲノム上に存在すること、その多くが遺伝子のプロモーターもしくは他の制御領域に位置していることが明らかとなった。また、逆に細胞を問わず、常に他の遺伝子と近接している領域が存在しておりこれら領域がさまざまな遺伝子群の発現制御に関わっていることが示唆された。また興味部会ことに現在アノテーション情報が付与されていない一方で、他の動物種であるヒト、ラットで保存性が高い領域が多く同定された。現在、九州大学情報工學坂内英夫先生を共同研究者として参加を仰ぎさらに情報解析をすすめている。



また、得られた情報について、別のアプローチによる解析を進めた。まず、可視化による検討として DNA-FISH により遺伝子座近接の検証を行った。予備実験の結果近接が 3C によって確認された筋クレアチンキナーゼ遺伝子座と筋アクチン 1 の遺伝子座の近接について評価した。その結果、骨格筋細胞のみ、両遺伝子座の近接が 2-4% の割合で確認できたのに対し、非筋系ではゼロであった。



次にこの形成にかかわる因子を探索したところ、Brg1 クロマチンリモデリング因子の活性化を抑制した細胞では遺伝子近接現象が消失し、且つ骨格筋分化も抑制された。

以上のことから、遺伝子座近接現象がクロマチン構造変換と密接に関わりながら骨格筋分化を制御していることが示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

現在までに本課題と同様の研究アプローチや報告は乏しい。現在のところ唯一の分子生物学的なアプローチとして3C解析を含めほとんどのアプローチは過去5年以内に発表されているものの安定的に受けいれている状況ではない。その原因は、特定の遺伝子に限った解析しかできないため、遺伝子群全体がジーンクラスタリングを起こしているか否かを判断することが困難であるからである。そこで、申請者はギガシークエンサーを応用した新たなアプローチを考案し樹立した。その結果、バイアスなしにゲノムワイドなジーンクラスタリング現象の把握が可能となった。これにより、新たな分化マーカーとして遺伝子座の集積情報を用いることが可能となる。一方、本研究の生化学的解析の基盤は、安定かつ、高速なモノクローナル抗体作成にある。ジーンクラスタリング制御因子の生化学的同定を容易にすることだけでなく、ゲノム上にリクルートされる、マッピングなど、機能解析に至るまでに優位に進めることが可能である。今年に入り、ゲノムワイドに細胞内の遺伝子座の隣接現象を解析する研究開発は世界の他の機関(Hi-C;Dekker_J, ChiA-PET; シンガポール)でも進められてきた。私たちのデータ公開は、諸先生方のアドバイスや支援班の全面的なサポートを受け現在公開準備中である。得られた知見は単に、骨格筋分化という枠組みに囚われず、生体内でのあらゆる細胞分化現象の研究分野に大きなインパクトを与えることができると考えており、従来なされてきた、局所的な個々の分化特異的な遺伝子発現の理解にとどまらず、大局的な分化現象の把握が可能になり、いままでにない遺伝子集積現象に基づいたアプローチで、それぞれの分化系に関わる因子の同定につながる事が予想される。そして、これらは、現在ES細胞、iPS細胞研究が抱える分化誘導法の確立という課題を別の角度で開く可能性を秘めている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

得られた情報解析を進める上で、3Cが必ずしも、常に同一の遺伝子座近接を検出できるわけではなく、複数の遺伝子座の近接の場合、任意の2点を検出しているに過ぎないことを確認させる結果でもあった。また、遺伝子座近接現象を更に深く解析するためにはより多くのサンプルを読む必要がある。また、3次元的な情報をどのようにまとめていくかは、トライアンドエラーの連続であり、他の同様の研究プロジェクトでも未だにアアウトプットが整っていない。私たちもまた情報解析の部分は当初本研究開始時の想定をはるかに上回る形になり、プロジェクト2年目から情報学の先生方のご支援を仰ぎ進めている。本研究を辛抱強くご支援いただいた先生方に厚く御礼申し上げる次第である。

<今後の課題、展望>

クロマチン分野やエピジェネティクス分野の進展に伴い、細胞分化における特徴的な遺伝子発現や比較的形状に影響を及ぼしやすい遺伝子は個別に、DNAのメチル化、クロマチン構造変化、ヒストン修飾に至るまで詳細に解析されてきた。一方で、一群の解析はアプローチの制限からも殆どなされていない。エピジェネティクスの新たな領域の一つとして本研究分野が拡大することでiPS細胞やES細胞を起点とした実用化が可能なレベルの様々な

組織の人工分化誘導法への道を開くことが期待される。それは、基礎研究がもたらす再生医療への応用につながる。さらに、経済的にも、iPS細胞やES細胞の実用化の加速は、新規バイオ産業の育成や、医療技術の向上による医療コスト軽減につながると考えられる。また、細胞分化研究の大きな命題である、分化の”はじまり”“探しについても、様々なヒストン修飾や、転写因子の制御領域へのリクルート、クロマチン構造変換、RNAポリメラーゼによる転写開始イベントに加えた新たなエピジェネティクス解析の手法を加え、幅広い学問分野で大きな波及効果が得られることが期待される。

<研究期間の全成果公表リスト>

- 1) 論文発表
 1. Harada A, Okada S, Saiwai H, Aoki M, Nakamura M and **Ohkawa Y**: Generation of a Rat Monoclonal Antibody Specific for Pax7 *Hybridoma*. 2009 *In press*.
 2. Yoshimura S, Yoshimi T, **Ohkawa Y**, Azuma M and Tachibana T: A Rat Monoclonal Antibody against the Chromatin Remodeling Factor, CHD5 *Hybridoma*. 2009 *In press*
 3. Okada S, Maeda T, **Ohkawa Y**, et al. Does ossification of the posterior longitudinal ligament affect the neurological outcome following traumatic cervical cord injury? *Spine*. *In press*, 2009
 4. **Ohkawa Y**#, Harada A, Nakamura M, Yoshimura S and Tachibana T# Production of a Rat Monoclonal Antibody against BRG1 *Hybridoma*. 2009 *In press* (#=equal corresponding author)
 5. Harada A, Azuma M, Tachibana T and **Ohkawa Y**: Generation of a Rat Monoclonal Antibody Specific for CHD2 *Hybridoma*. 2009 *In press*
 6. Okada S*, Harada A*, Saiwai H, Nakamura M and **Ohkawa Y**: Generation of a Rat Monoclonal Antibody Specific for Brm *Hybridoma*. 2009 *In press*
 7. Harada A, Yoshimura S, Azuma M, Mako Nakamura, Tachibana T and **Ohkawa Y**: Generation of a Rat Monoclonal Antibody Specific for CHD1 *Hybridoma*. 2009 *In press*
 8. Harada A, Okada S, Kumamaru H, Saiwai H, Aoki M, Nakamura M, Nishiyama Y and **Ohkawa Y**: Production of a Rat Monoclonal Antibody Specific for Myf5 *Hybridoma*. 2009 *In press*
- 2) 学会発表
 1. **Yasuyuki Ohkawa**: “Genomic clustering accompanies cellular differentiation to temporally control gene expression” The 8th International Workshop on advanced Genomics [Expansion of Genome Science] June 16-18, 2009, Tokyo, Japan.
 2. 原田哲仁, **大川恭行**, 「CHD2は骨格筋分化運命決定する」, 第61回日本細胞生物学会大会, 2009.6, 名古屋
 3. **大川恭行**, 原田哲人, Anthony Imbalzano, 「骨格筋分化における高次クロマチン構造制御の解析」, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008.12, 神戸
 4. Saori Yoshimura1, 原田哲人, **大川恭行**, 東雅之, 立花太郎, 「CHDファミリーに対するモノクローナル抗体の作製と性状解析」, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008.12, 神戸
 5. 原田哲仁, 吉村小緒利, 立花太郎, **大川恭行**, 「筋形成におけるCHD2の機能解析」, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008.12, 神戸

6. 大川恭行, 「骨格筋分化における高次クロマチン構造制御の解析」, 日本分子生物学会合同年会, 2008.11, 神戸
- 3) データベース / ソフトウェア
- 1.0602082046 (データベース)
- 3C-SEQ browser, 遺伝子座近接現象の可視化
公開準備中