

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02412

研究課題名(和文) マウス表現型に寄与するアレル発現量バイアスの原因シス制御配列の多型解析

研究課題名(英文) Cis-regulatory polymorphism responsible for allele-expression-bias that contributes to mouse phenotype

研究代表者

城石 俊彦 (Toshihiko, Shiroishi)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90171058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス表現型の系統差の原因となるシス制御配列上のゲノム多型を同定することを目的として、遺伝的に分化した二つの亜種由来のマウス系統を材料に研究を行った。亜種間F1個体や亜種間コンソミック系統を用いて、肝臓、精巣、成長軟骨での両亜種アレルの発現量をゲノムワイドに定量した。次に、ChIP-seq法によるクロマチン修飾部位やATAC-seq法で検出されるオープンクロマチン部位を探索し、アレル発現量との相関解析から発現量の違いの原因となるシス制御配列候補を見出した。さらに、培養細胞やマウス個体を用いたレポーター発現解析を行い、特定の遺伝子においてアレル発現量差の原因となるゲノム多型を同定した。

研究成果の概要(英文)：In order to identify genomic polymorphisms on cis-control sequences, which are responsible for strain differences in mouse phenotype, we conducted a genetic study with mouse strains derived from two genetically differentiated subspecies. We quantified genome-wide expression levels of alleles in liver, testis, and growth cartilage tissues prepared from interspecific F1 cross of the two different subspecies-derived strains and intersubspecific consomic strains. Next, we explored chromatin modification sites by ChIP-seq method and open chromatin sites by ATAC-seq method, and found numerous cis-control sequence candidates, which were correlated with difference in the allele expression level. Furthermore, we identified genomic polymorphisms (SNPs) that cause the allele expression differences in specified genes by reporter expression assays using cultured cells and transgenic mice.

研究分野：遺伝学

キーワード：遺伝学 ゲノム 進化 発生制御 発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト集団のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、体質や疾患の原因の多くは、翻訳配列上の多型ではなく、遺伝子発現を制御するシス配列上の SNP や In/del (挿入/欠失) であることが分かってきた。しかし、広大なゲノムに散在するシス制御配列を効率的に捉えるのは容易ではなく、個別遺伝子の散発的な研究成果を除くと表現型を生むシス多型の報告は限られている。

申請者らは、野生マウス由来の近交系統を対象に全ゲノム多型情報の整備を進め、種としてのマウス (*Mus musculus*) を構成する 3 亜種 (dom, mol, cas と略記) の間に膨大なゲノム多型を検出した。また、表現型情報収集のため、西欧産 dom 亜種由来の C57BL/6J (B6) 系統の各染色体を日本産 mol 亜種由来の MSM/Ms (MSM) 系統の染色体で置換した亜種間コンソミック系統を樹立し、量的形質の表現型解析を行ってきた。また、X 染色体コンソミック系統の発現解析でシス多型による染色体レベルの遺伝子発現量の変化が精子の表現型を導くことを発見し、遺伝子発現量と表現型の関連性を明らかにした。

本研究では、申請者らが整備してきたマウス亜種由来のバイオリソースや最新の実験手法を総動員した解析を行うことで、機能を持ったシス制御配列を探索し、遺伝子発現の亜種間差に寄与する多型を見いだすことを目的として研究を進めた。

## 2. 研究の目的

機能的なシス制御配列多型 (機能シス多型) を体系的に同定する方法は未整備で、表現型多様性を生むシス多型の全体像は未知である。本研究では、マウス表現型多様性の原因となる遺伝子群を抽出するため、マウス亜種間交配 F1 個体や亜種間コンソミック系統を用いて対立遺伝子発現量比の歪み (アレル発現量バイアス) を計測する。次に、発現量バイアスと相関するクロマチン修飾や

ATAC-seq 法で検出されたオープンクロマチンを指標に関連するシス制御配列候補を探索し、培養細胞やマウス個体への遺伝子導入実験により遺伝子発現の亜種間差の原因となるシス多型を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) アレル発現量バイアスを示す遺伝子群の抽出

マウス亜種間 F1 雑種個体を用いた抽出

F1 個体の共通なトランス因子環境下で別亜種由来のアレルの発現量比を正確に計測する。西欧産 dom 亜種由来の B6 系統と日本産 mol 亜種由来の MSM 系統の F1 個体の肝臓、精巣、成長軟骨を対象に RNA-seq 解析を行う。その際、亜種間 SNP を指標にアレルを区別して各リード数を計測してアレル発現量バイアスを示す遺伝子群を抽出する。

X 染色体コンソミックマウス精巣でアレル発現バイアスを示す遺伝子群の抽出

B6 系統の X 染色体を MSM 系統の X 染色体と置換した X 染色体コンソミック系統の雄は生殖隔離に似た表現型を示す。この系統の精巣を用いて RNA-seq 解析を行い、B6 系統との比較発現解析を行う。

### (2) アレル発現量バイアスの原因となるシス制御配列候補の探索

ヒストン修飾ゲノム部位の探索

アレル発現量バイアス計測に用いた F1 個体、B6 系統、MSM 系統や X 染色体コンソミック系統を材料にゲノムワイドな H3K4me1 等のヒストン修飾部位のデータを ChIP-seq 解析で取得する。アレル発現量と相関するヒストン修飾ゲノム部位のピーク値のマウス系統差に着目してシス制御配列候補を抽出する。

成長軟骨細胞のオープンクロマチンを指標とするシス制御配列の探索

(B6 x MSM)F1 個体に由来する成長軟骨からサンプルを調製し、ATAC-seq 法によりオープンクロマチン領域を調べる。

### (3) アレル発現バイアスの原因シス多型

( SNP や In/del ) の同定

SNP や In/del 等のシス多型候補を改変した DNA 断片を組み込んだ Luciferase(Luc) レポーター・カセットを肝細胞株や ES 細胞に遺伝子導入し、エンハンサー活性を評価して原因となるシス多型を同定する。次に、候補ゲノム配列を様々に改編したレポーター・カセットを導入したトランスジェニックマウスを作製して、エンハンサー等の遺伝子発現制御活性を個体レベルで評価して、シス多型の遺伝子発現量への効果を検証する。

#### 4. 研究成果

( 1 ) アレル発現量バイアスを示す遺伝子群の抽出 ( 肝臓及び精巣 )

マウス亜種間 F1 雑種個体を用いた抽出

アレル発現量バイアスを示す候補遺伝子群をマウス亜種間 F1 雑種個体の肝臓および精巣の RNA-Seq データから選択した。複数の候補遺伝子のパスウェイ解析を行い、組織の機能に特に重要な役割を持つ遺伝子群を選択した ( 表 1 )。肝臓では MSM アレルが高発

MSM>B6			
Term	Count	%	PValue
mmu00982:Drug metabolism	23	2.145522388	6.48E-10
mmu00830:Retinol metabolism	20	1.865671642	2.39E-08
mmu00980:Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	16	1.492537313	1.22E-05
mmu00983:Drug metabolism	12	1.119402985	1.66E-04
mmu00591:Lipoic acid metabolism	10	0.932835821	0.002156818
mmu00670:One carbon pool by folate	6	0.559701493	0.002526031

B6>MSM			
Term	Count	%	PValue
mmu00980:Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	26	2.541544477	5.89521E-14
mmu00982:Drug metabolism	27	2.639296188	2.123E-13
mmu00830:Retinol metabolism	21	2.052785924	3.7718E-09
mmu04610:Complement and coagulation cascades	22	2.150537634	4.10262E-09
mmu00020:Citrate cycle (TCA cycle)	11	1.075268817	1.33578E-05
mmu00280:Valine, leucine and isoleucine degradation	13	1.270772239	2.09063E-05
mmu00380:Tryptophan metabolism	12	1.173020528	2.70156E-05
mmu00591:Lipoic acid metabolism	12	1.173020528	0.000110045
mmu00120:Primary bile acid biosynthesis	7	0.684261975	0.00020053
mmu00589:Aschidonic acid metabolism	16	1.56402737	0.000203732
mmu00480:Glutathione metabolism	12	1.173020528	0.000352021
mmu03320:PPAR signaling pathway	15	1.46627566	0.000408067
mmu00071:Fatty acid metabolism	11	1.075268817	0.000428649
mmu00140:Steroid hormone biosynthesis	11	1.075268817	0.000428649

表 1 肝臓でアレル発現量バイアスを示す 候補遺伝子群のパスウェイ解析結果

現する遺伝子は、薬剤代謝、ビタミン代謝に関わることが示された。一方、B6 アレルが高発現発現遺伝子は、代謝酵素や脂質代謝などに関わることが示された。この中から脂質代謝に極めて重要な役割を示し、B6 アレルで高発現を示す Pparg 遺伝子に注目した解析を進めた。

成長軟骨については、マウス亜種間 F1 雑種個体を用いて、成長軟骨を含む膝関節領域

を抽出して RNA を精製した。RNA については、骨マーカー遺伝子の発現を確認し、成長軟骨の遺伝子発現が捕捉できていることを確認した。RNA-Seq 解析は、科研費「新学術領域研究」ゲノム支援班の支援を受けた。シス制御配列候補の探索を行うため、アレル発現量バイアスを示す遺伝子群のパスウェイ解析を行い、組織の機能に重要な役割を持つ遺伝子をリスト化した。MSM アレルで発現量の高い遺伝子は、細胞接着や細胞外マトリックスに関わるパスウェイに属していた。一方、B6 アレルで発現量の高い遺伝子は、ホメオスタシスや代謝関連の遺伝子であった。

X 染色体コンソミックマウス精巣でアレル発現バイアスを示す遺伝子群の抽出

X 染色体コンソミック系統の精巣を用いた RNA-seq 解析を科研費「新学術領域研究」のゲノム支援班の支援を受けて行った。発現遺伝子の 8.5%が発現低下し、内 22%が MSM 系統由来の X 染色体に連鎖する遺伝子であった。この結果は、X 染色体連鎖遺伝子のシス多型が、発現低下の一部を担っていることを示している。特に、精子形成に重要な働きを持つ *Taf7l* 遺伝子に顕著な発現低下が認められた。( 2 ) アレル発現量バイアスの原因となるシス制御配列候補の探索

#### ヒストン修飾ゲノム部位の探索

肝臓でのアレル発現量バイアスを示す候補遺伝子群を対象にして、活性型エンハンサーの指標であるヒストン修飾や ATAC-seq のデータと、ENCODE 等のパブリックデータベースを参照して比較解析した。この解析は、科研費「新学術領域研究」ゲノム支援班の支援を受けて行った。得られた塩基配列の計測データは DDBJ に登録した。肝臓を用いた解析結果の一例を図 1 に示す。このデータを ENCODE データと比較したところ、上述の Pparg 遺伝子領域では、B6 アレルで確認できるピークが MSM アレルで観察できない例が判明した。これらの 7 つの配列領域をアレル発

現量バイアスの原因となるエンハンサー配列候補とした。

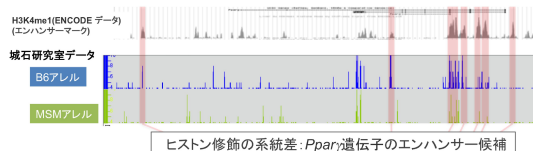


図1 肝臓でアレル発現バイアスの原因となるシス制御配列 補の探索結果

X 染色体コンソミック系統の精巢を対象とした H3K4me1 の ChIP-seq 解析を科研費「新学術領域研究」のゲノム支援班の支援を受けて行った。その結果、*Taf7l* 遺伝子近傍に 14 箇所のピークを検出した。これらをエンハンサー候補領域として、*Taf7l* 遺伝子の発現低下の原因となるシス多型を同定することとした。

成長軟骨細胞の ATAC-seq によるシス制御配列の探索

(B6 x MSM)F1 個体の成長軟骨からサンプルを調製し、ATAC-seq 解析を科研費「新学術領域研究」先進ゲノム支援班の支援を受けて行った。SNP により B6-MSM 両系統のアレルを区別し、ATAC-seq ピークのアレルバイアスを算出した。2 億以上のリード数でデータ取得を行ったところ、50%を超える高マッピング率を得ることができた。プロモーターだけでなくピークの低い遺伝子間領域においても有意なアレルバイアスを検出した。F1 個体の遺伝子発現データも参考にして、ATAC-seq 解析で得られたピークについてプロモーターやエンハンサーなどの機能的な分類を行い、オープンクロマチン領域のアレルバイアスが遺伝子のアレル発現バイアスに寄与する様式を探索することが可能となると考えられる。

(3) 原因シス多型 (SNP や In/del) の同定

肝臓において B6 と MSM で発現バイアスを示す遺伝子群には、脂質代謝に主要な役割を果たす *Pparg* が含まれていた。この遺伝子の 7 つのエンハンサー候補配列 (*Pparg* liver enhancer: PLE1-7) を B6 ゲノムからクローニ

ングし、ヒト肝ガン由来の HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、*Pparg* の最終イントロンに位置する PLE5 と下流に存在する PLE6 が有意な発現活性化能を有することが確認された。さらに、B6 と MSM の配列比較により、PLE5 と PLE6 は、それぞれ 9 つの多型を有していた。MSM ゲノムから PLE5 と PLE6 をクローニングし、HepG2 細胞でルシフェラーゼアッセイを行った結果、B6 と MSM の間では有意な発現活性の差が認められず、*Pparg* 発現の亜種間差を説明することはできなかった。

ES 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより、*Taf7l* 遺伝子近傍の 3 箇所にエンハンサー活性を確認した。この内、遺伝子上流 20kb にあるエンハンサー (En2) は、dom 亜種由来の B6 系統アレルにのみ高いエンハンサー活性が認められ、MSM 系統アレルは活性が示されなかった。En2 には、B6 系統と MSM 系統の間に 2 箇所の In/del と 6 箇所の SNP が存在する。ルシフェラーゼアッセイにより、2 箇所の In/del 多型と 2 箇所の SNP が、B6 系統と MSM 系統のエンハンサー活性の違いの原因であることが示された。En2 のエンハンサー活性は、B6 系統と同じ dom 亜種由来の BFM 系統や PGN 系統アレルでも認められた。一方、MSM 系統を含む mol 亜種、それに近い *musculus* 亜種のアレルでは En2 の活性は認められなかった。これらの結果から、En2 のエンハンサー活性は、亜種の違いを反映しており、*Taf7l* 遺伝子のエンハンサー活性の違いが dom 亜種と mol 亜種の生殖隔離に関わっていることが示唆された (図 2)。

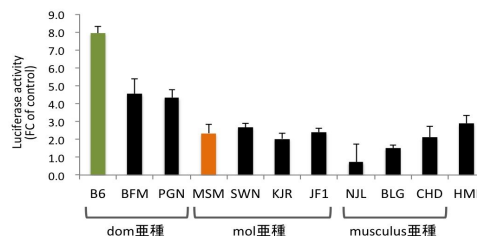


図2 *Taf7l*遺伝子の3亜種アレル由来のエンハンサーEn2の発現活性

次に、個体レベルでの検証実験を行った。

肝細胞のルシフェラーゼアッセイで活性の認められた二つの *Pparg* エンハンサー PLE5 と PLE6 について、CRISPR/Cas9 系を用いて B6 の遺伝的背景をもつノックアウトマウスを作製した。*Pparg* のコーディング配列のノックアウトマウスは致死であることが報告されているが、PLE5 と PLE6 のノックアウトマウスには、外見上顕著な表現型が認められなかった。そこで、通常食と高脂肪食の二条件下で飼育したマウスで定量的リアルタイム PCR 解析を行った。通常食で飼育したマウスでは、*Pparg* 発現に対する PLE5、PLE6 の欠損の影響はほとんど認められなかった。一方で、高脂肪食を与えた PLE5 マウスでは、野生型に比べて *Pparg* の発現が低下していた。発現の低減は限定的であり、他のエンハンサーが *Pparg* の発現制御に複合的に関与することが示唆された。

また、PLE5 と PLE6 をそれぞれ LacZ につなげたレポーターコンストラクトを用いて、トランスジェニックマウスを作製した。6 週齢の肝臓で LacZ の発現を調べたところ、複数の個体で LacZ 陽性の肝細胞が観察され、PLE5 と PLE6 のどちらもマウス個体内での転写活性を有することが確認された。

次に、ES 細胞によるルシフェラーゼアッセイで、エンハンサー活性が認められた *Taf7l* 遺伝子のエンハンサー En2 を、CAS9/CRISPR ゲノム編集により欠失させた。この欠失変異個体の精巢では、*Taf7l* 遺伝子の発現が低下することから、En2 が *Taf7l* 遺伝子のエンハンサー機能を担っていることが示された。

#### <引用文献>

Maurano M. T. et al. Systematic localization of common diseases-associated variation in regulatory DNA. *Science* 337, 1190, 2012.

Takada T. et al. The ancestor of extant Japanese fancy mice contributed to the mosaic genomes of classical inbred strains. *Genome Res* 23, 1329, 2013.

Oka A. et al. Evolutionarily diverged regulation of X-chromosomal genes as a

primal event in mouse reproductive isolation. *PLoS Genet.* 10, e1004301 (2014).

#### 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4件)

Takada T, Yoshiki A, Obata Y, Yamazaki Y and Shiroishi T. NiG\_MoG: a mouse genome navigator for exploring intersubspecific genetic polymorphisms. *Mamm. Genome*, 26, 331-337, 2015. 査読有。

Kawano S, Fujisawa H, Takada T, Shiroishi T. Sparse principal component regression for generalized linear models. *Computational Statistics & Data Analysis* 124, 180-196, 2018. 査読有。

Simecek P, Forejt J, Williams RW, Shiroishi T, Takada T, Lu L, Johnson TE, Bennett B, Deschepper CF, Scott-Boyer MP, Pardo-Manuel de Villena F, Churchill GA. High-Resolution Maps of Mouse Reference Populations. *G3 (Bethesda)* 7, 3427-3434, 2017. 査読有。

Kataoka T, Tamura M, Maeno A, Wakana S, Shiroishi T. Genetic Dissection of Trabecular Bone Structure with Mouse Intersubspecific Consomic Strains. *G3 (Bethesda)* 7, 3449-3457, 2017. 査読有。

[学会発表](計9件)

高田豊行, ゲノム機能学推進のための多因子形質データ解析, 研究集会「遺伝学と統計学における数理とモデリング」2016年1月25日、東京

Takada T, Fukuta K, Noguchi H, Toyoda A, Fujiyama A and Shiroishi T. Genome resequencing of wild-derived inbred strains originated from four *Mus musculus* subspecies. *IMGC* 2015, Nov. 8-11, Yokohama.

Takada T & Shiroishi T, Natural history of Asian wild mice and origin of the laboratory inbred strains, inferred from whole-genome-resequencing. *IWMC* 2015, July 25 -30, Sapporo.

高田豊行, 近藤伸二, 阿部貴志, 清澤秀孔, 豊田 敦, 藤山秋佐夫, 城石俊彦. マウス亜種間表現型多様性を生むアレル発現量差のゲノムワイド解析, 第 62 回日本実験動物学会総会 2015年5月28-30日 京都

高田豊行, NiG\_MoG: マウス亜種間多型を探索するゲノムナビゲーター, 第 29 回モロ

シヌス研究会，2015年7月3-4日 神戸

高田豊行、城石俊彦、日本産野生由来マウス系統 MSM/Ms を用いた多因子肥満症の遺伝解析、第31回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2017年2月10-11日、横浜

岡彩子、城石俊彦、シヌ調節領域内の系統間多型と生殖隔離の関連、日本遺伝学会第88回大会、2016年9月7-10日、三島

高田豊行、福多賢太郎、野口英樹、豊田敦、山崎由紀子、藤山秋佐夫、城石俊彦、マウス野生由来系統群「ミシマバッテリー」のゲノム解読と体質関連遺伝子探索への利用、第63回日本実験動物学会総会、2016年5月18-20日、川崎

岡彩子、城石俊彦、X染色体連鎖遺伝子のエンハンサー多型がマウス亜種間の生殖隔離に及ぼす影響、日本遺伝学会第89回大会、2017年9月13-16日、岡山

〔図書〕(計1件)

真下知士・城石俊彦編「進化するゲノム編集技術」株式会社エヌ・ティー・エス 2015年10月刊 341頁

〔その他〕

ホームページ等

マウゲノム多型データベース「NIG\_MoG」  
<http://molossinus.nig.ac.jp/msmdb/index.jsp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

城石俊彦 (SHIROISHI, Toshihiko)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90171058

### (2) 連携研究者

高田豊行 (TAKADA, Toyoyuki)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：20356257

天野孝紀 (AMANO, Takanori)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：20419849

木曾(岡)彩子 (KISO-OKA, Ayako)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・博士研究員