

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18589

研究課題名(和文) エンハンサーの共有と遮蔽を支える染色体ダイナミクス

研究課題名(英文) Enhancer-sharing and insulation via chromosomal dynamics

研究代表者

天野 孝紀 (Amano, Takanori)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任研究員

研究者番号：20419849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムは、エンハンサーとプロモーターが密に相互作用するTADという小区画を形成し、遺伝子発現を組織化している。本研究は、Shh遺伝子が存在するTADをモデルとし、エンハンサーが対象遺伝子と適切に相互作用するメカニズムを明らかにする目的で行った。Shhと同じTADに含まれるLmbr1遺伝子のプロモーター周辺60 kbを欠失させたところ、そのノックアウトマウスは指の形態異常を示した。このマウスでは、Shhの発現低下と周辺の別遺伝子であるMnx1の発現上昇が同時に起き、この欠失領域がTADの組織化に関与し、近隣遺伝子の発現を正にも負にも制御する新規シス因子を含むことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Genes and cis-regulatory elements (CREs) are interacted in a cell-type specific manner to achieve precise gene expression. Topologically associating domain (TAD) is a functional compartment in which efficient interactions of genes and CREs are allowed. Genes belonging to an identical TAD sometime share CREs or other time show differential expression. However, molecular mechanisms by which TAD controls gene regulation are still largely unknown. Limb-specific expression of Shh is regulated by an enhancer located in an intron of Lmbr1. We revealed that the upstream region of the Shh limb enhancer functions as an insulator that is involved in the differential expression of Shh and Lmbr1. Deletion of the insulator caused downregulation of Shh and upregulation of Mnx1, and limb abnormalities such as digit number reduction. Our result suggested that the novel CRE fulfills the dual roles as an insulator for Lmbr1 and Mnx1, and a facilitator for Shh expression.

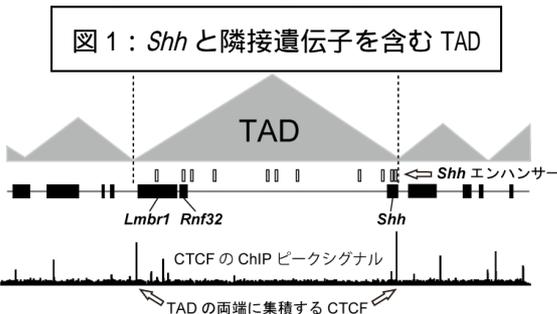
研究分野：遺伝発生学

キーワード：遺伝子発現 エンハンサー マウス 染色体動態 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

染色体上に並ぶ遺伝子は、ループ構造を介して、その発現制御配列であるエンハンサーと相互作用する。近年の全ゲノムインタラクトーム解析により、ゲノムはループを形成して相互作用を密に行う Topologically Associating Domains (TAD) と呼ばれる区画に区切られ、その中で遺伝子の発現制御が組織化されていることが分かってきた^[1]。TADの境界には、ホモ二量体形成能のある転写因子である CCCTC-binding factor (CTCF) が特異的に結合し、CTCF の結合モチーフの配向がループ形成に重要な役割を果たすというモデルが提示されている^[2]。しかし、一般に TAD には発現を異にする複数の遺伝子が含まれ、TAD 内に存在するエンハンサーの効果は同一の TAD に属する全ての遺伝子に等しく及ぶわけではない。CTCF によって括られた TAD 内で、複数のエンハンサーとプロモーターの相互作用を組織化するモデルはまだ存在していない。

研究代表者らは、三次元 FISH 法や 3C 法を駆使して、Sonic hedgehog (*Shh*) 遺伝子と四肢のエンハンサーが発現に相関して接近する染色体構造動態を明らかにしてきた^[3]。また、四肢以外の組織特異的な *Shh* エンハンサーを多数同定してきた^[4, 5]。*Shh* を含む 1 Mb 超の TAD には、*Shh* 以外に二つの遺伝子 (*Rnf32* と *Lmbr1*) が含まれる (図 1)。



研究代表者らの予備的解析では、*Rnf32* は *Shh* に類似した発現を示す一方、*Lmbr1* の発現は全く異なっていた。二つの隣接遺伝子の異なる発現動態は、TAD 内でエンハンサー効果の共有と遮蔽が複雑に制御されていることを示している。また、申請者らの ChIP-Seq 解析では、マウス肢芽において *Shh* を含む TAD の境界に強い CTCF の結合が認められた (図 1)。さらに、マウス肢芽特異的な CTCF 欠損により、*Shh* 発現が消失するという報告もあり^[6]、CTCF による TAD の形成とその内部で起こるゲノム間コミュニケーションの実体を理解するためには、*Shh* 遺伝子座を含む TAD は非常に良いモデルであると考えられた。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーによるゲノムワイドな機能解析によって、エピゲノム状態やゲノム上の相互作用パターンと転写活性状態が強く相関することが明らかになってきた。しかし、特定の遺伝子座を対象にしたゲノム操

作によって発現制御における染色体動態の働きを実証した例は少なく、ゲノム間コミュニケーションを支える基本メカニズムはほとんど明らかになっていない。

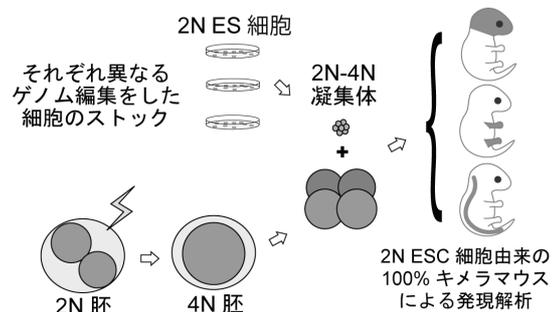
TAD を単位として遺伝子発現制御が組織化されるという新しいパラダイムが提示されている一方で、TAD 内に複数存在する遺伝子の発現が相互に干渉されずに制御される仕組みは全く不明である。本研究では、全ゲノムのエピゲノム解析やインタラクトーム解析などのビッグデータによってモデル化されてきた染色体上の発現制御機構を、*Shh* の TAD に絞ってより深く掘り下げる。この領域は、長距離のエンハンサー・プロモーター相互作用がみられることに加えて、TAD の構成や CTCF の結合パターンが、これまでゲノムワイドな解析によって蓄積されてきた知見と矛盾なく合致する。そのため、ゲノム全体の TAD の組織化の普遍的な理解を目指し、*Shh* の TAD の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。特に、TAD 内において *Shh* と *Rnf32* が類似の発現パターンを示す (エンハンサーの共有) のに対し、*Lmbr1* の発現が *Shh* エンハンサーの影響を受けない (エンハンサー効果の遮蔽) という、一見相反する現象に焦点を当てている。

3. 研究の方法

(1) 四倍体胚 (4N) 凝集法によるキメラマウス胚の作製

シス因子の動態を解明するため、対象ゲノム領域を任意に編集し、ゲノム改変個体を作製する技術が必要であった。研究代表者は、CRISPR/Cas9 系を進展させて、マウス ES 細胞ゲノムにレポーター遺伝子の挿入や長距離の欠失等を導入する系を確立した。ゲノム改変 ES 細胞の機能解析では、発生した個体のすべての組織が ES 細胞由来であることが望ましい。このため、個体発生に寄与しない 4N 胚をキメラ胚作製に用いた。二細胞期の受精卵に電気パルスをかけて融合させ、4N 胚を作製した。改変した ES 細胞と 4N 胚を凝集させ 100% ES 細胞に由来するキメラマウス胚を得た (図 2)。CRISPR/Cas9 と 4N 凝集法を組み合わせることで、ES 細胞のターゲティングから個体の発現解析までを迅速化することが可能になった。

図 2 : 4N 凝集法によるキメラマウス作製



(2) プロモーターの置換

エンハンサーが標的遺伝子に作用する際に、プロモーターの配列がどれほどその認識に寄与するか明らかにするために、プロモーター配列の置換を行った。C57BL/6 由来の ES 細胞に対し、*Lmbr1* のプロモーターと結合した *LacZ* を *Shh* の翻訳配列とプロモーターと置換した。それから同様の手法で *Lmbr1* プロモーターを *Shh* プロモーターに置換した ES 細胞も作製した。樹立した改変 ES 細胞は、4N 凝集法によって発生胚を得て、*LacZ* 発現パターンを解析した。さらに、*LacZ* に対してリアルタイム qPCR 解析を行い、各プロモーターの機能の違いを定量的に評価した

(3) CTCF 結合サイトの破壊

Shh 遺伝子座の TAD において発現制御に寄与する CTCF 結合サイトを同定するため、*Shh* と *Lmbr1* 周辺に存在する 5ヶ所の CTCF 結合配列をそれぞれノックアウトした。具体的には、それぞれのサイトを挟むように設計した 2つの sgRNA と Cas9 を組み合わせて、マウス受精卵に注入し、ノックアウトマウス系統を樹立した。5 系統の CTCF 結合サイトのノックアウトマウスは、ホモ化した後に遺伝子発現解析と表現型解析を行った。

(4) 新規インシュレーター領域の探索

ショウジョウバエでは、*Zw5* や *Su(Hw)* など染色体ループ形成に関与するインシュレーターが同定されているが、脊椎動物では CTCF のみが報告されている。

Lmbr1 下流の 60 kb が欠失した変異マウスでは、*Lmbr1* 遺伝子座に挿入した *LacZ* が *Shh* 様の発現を獲得することを発見した。この領域に新規インシュレーターの存在が示唆されたため、BAC トランスジェニックマウスを作製して候補領域の絞り込みを行った。*Lmbr1* 下流の 60 kb を含む BAC DNA に *LacZ* レポーターを挿入し、対象とする 60 kb の部分欠失系統を作製した。関与が推測される配列に関しては、培養細胞系でエンハンサープロッキングアッセイを行い、インシュレーター活性を有する配列の同定を行った。

さらに、CRISPR/Cas9 系を用いて *Lmbr1* プロモーターと下流の 60 kb をノックアウトしたマウスを作製し、ホモ化した後に遺伝子発現と表現型の解析を行った。

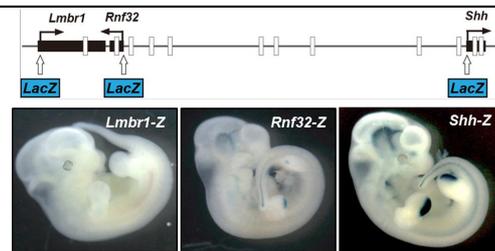
4. 研究成果

(1) *LacZ* ノックインマウスの発現解析

Shh の TAD に存在する *Lmbr1*、*Rnf32*、*Shh* について、*LacZ* ノックイン ES 細胞を作製し、4N 凝集法によってマウス胚を得た。*Shh* に挿入された *LacZ* は、内在性の *Shh* 発現を適切に反映した発現パターンを示した (図 3)。*LacZ* が *Rnf32* に挿入された場合にも多くの組織で *Shh* 様の発現パターンが観察されたものの、脊索や食道など一部の組織では発現が検出されなかった。一方、*Lmbr1* に挿入された

LacZ は、*Shh* 様の発現パターンを全く示さなかった (図 3)。

図 3 : *LacZ* ノックインマウスの発現解析



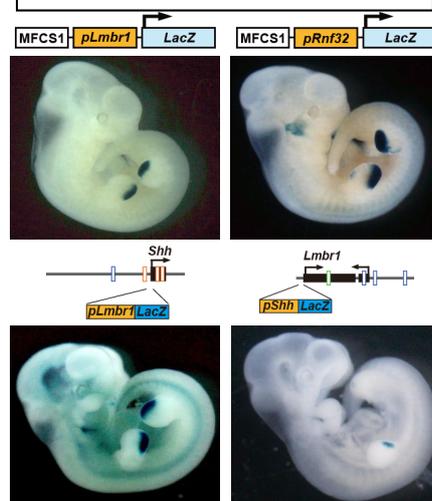
(2) プロモーターの機能解析

Lmbr1 と *Rnf32* のプロモーターが、*Shh* の肢芽エンハンサー (MFCS1) に応答するかどうか調べる目的で、MFCS1 とそれぞれのプロモーターを組み合わせたレポータートランスジェニックマウスを作製した (図 4、上段)。どちらのプロモーターを用いた場合でも肢芽後方の発現ドメインが観察され、*Lmbr1* のプロモーターも *Shh* のエンハンサーに応答可能であった。

TAD 内での実際の *Lmbr1* プロモーターの活性を評価するため、ゲノム上の *Shh* プロモーターを *Lmbr1* プロモーターに置換したマウス胚と *Lmbr1* プロモーターを *Shh* プロモーターに置換したマウス胚をそれぞれ作製した (図 4、下段)。*Shh* 遺伝子座に挿入されても *Lmbr1* プロモーターは適切に機能していたため、*Shh* の組織特異的エンハンサーと適切に相互作用することが示唆された。このことより、*Shh* の組織特異的な発現パターンは、プロモーター配列の特異性に依存しないと考えられる。

反対に、*Lmbr1* プロモーターを *Shh* プロモーターに置換した場合には、肢芽特異的な弱い *LacZ* 発現が観察された (図 4、下段右)。この結果より、*Shh* プロモーターは自身のエンハンサーに対して比較的高い応答性を有すると推測され、*Shh* のプロモーター配列には一定の機能的特異性がある可能性は否定できない。

図 4 : プロモーターの機能解析



(3) CTCF 結合サイトのノックアウトマウスの解析

Shh の TAD に存在する 5 つの CTCF 結合サイトをノックアウトした (図 5)。5 系統のいずれのノックアウトマウスも外見的な異常を示さず、正常に繁殖可能であった。*Lmbr1* の発現に対する 5 つのサイトのインシュレーター効果を明らかにする目的で、発生過程の *Lmbr1* の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法で検証したところ、いずれのノックアウトマウスも異常な *Lmbr1* の発現を示すことがなかった。現在までに、これらの CTCF 結合サイトが TAD の組織化に寄与する証拠は得られていない。

図 5 : *Shh* 遺伝子座の CTCF 結合サイト



(4) *Lmbr1* プロモーター周辺の長距離欠失マウスの発現解析と表現型解析

Lmbr1 プロモーターとその下流の領域を含む 60 kb のノックアウトマウス (60kb マウス) を作製した。このマウスについて、アリザリンレッド・アルシアンブルーによる染色もしくは X 線 CT 解析により、骨格パターンを評価した。その結果、60kb のホモ個体内、約 7 割の個体に合指症、四分の一の個体に欠指症が観察された (図 6)。

次に、60kb ノックアウトの遺伝子発現への影響を明らかにするために、欠失領域の上流に位置する *Mnx1* と下流に位置する *Shh* の発現レベルをリアルタイム qPCR で定量化した。肢芽における *Shh* の発現は、60kb のヘテロ個体では変化がなかったが、ホモ個体で有意に低下していた (図 7)。また、*Mnx1* は、ヘテロ個体、ホモ個体ともに肢芽での発現が上昇していた。これらの結果より、欠失させたこの 60 kb の領域は、*Shh* の発現に対して正に働く一方で、TAD の外に位置する *Mnx1* に対しては、インシュレーターとして機能することが明らかになった。

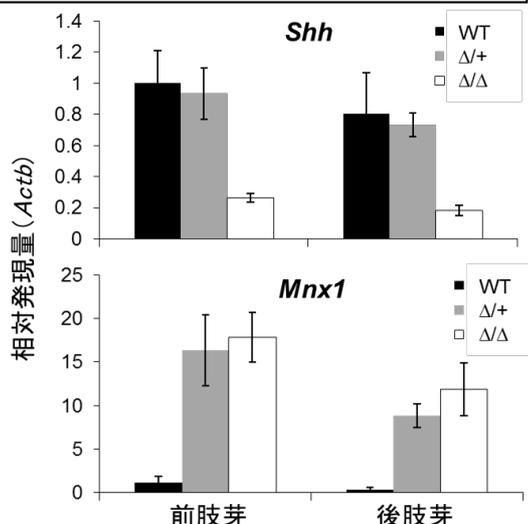
(4) インシュレーター配列の同定

Lmbr1 下流の 60 kb (*Lmbr1* のエクソン 1 からエクソン 4 に相当) に存在するインシュレーターを同定するため、*Lmbr1* 下流の 60 kb を含む BAC DNA に *LacZ* レポーターを挿入したコンストラクトを用いて、トランスジェニ

図 6 : 60kb マウスの四肢形態異常



図 7 : 60kb 欠失の周辺遺伝子への影響



ックマウスを作製した。この BAC トランスジェニックマウスは、肢芽での *LacZ* 発現を示さなかったが、*Lmbr1* のイントロン 1、2、3 の部分欠失系統では、肢芽後方での *LacZ* 発現が確認され、インシュレーションが解除されていることが分かった。一方、イントロン 4 の部分欠失系統は、肢芽特異的な *LacZ* 発現を示さなかった。

Lmbr1 のイントロン 1-3 領域のインシュレーター活性を評価するために、培養細胞を用いたエンハンサープロッキングアッセイを行った。MFCS1 エンハンサーとルシフェラーゼ遺伝子の間に候補配列を挿入したコンストラクトを作製し、Caco2 細胞株に導入してルシフェラーゼ活性を低下させる配列のスクリーニングを行った。その結果、イントロン 3 に存在する 1.6 kb の配列が新規インシュレーターとして同定された。

この配列に結合する転写因子を同定するため、パブリックデータベースの情報を基に結合因子の候補をリストアップした。これらの候補因子に関して *in vitro* での結合能をゲルシフトアッセイで評価し、候補因子の一つとして PRDM1 を同定した。

< 引用文献 >

- [1] Dixon et al., 2012, Nature 485, 376-380.
- [2] Guo et al., 2015, Cell 162, 900-910.
- [3] Amano et al., 2009, Dev Cell 16, 47-57.
- [4] Sagai et al., 2009, Development 136, 1665-1674.
- [5] Tsukiji, et al., 2013, Mech Dev 131, 127-136.
- [6] Soshnikova et al., 2010, Dev Cell 19, 819-830.

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 5 件)

Seo H+, Amano T+, Seki R, Sagai T, Kim J, Cho SW and Shiroishi T. Upstream Enhancer Elements of Shh Regulate Oral and Dental Patterning. (2018) J. Dent. Res. in press, doi: 10.1177/0022034518758642. Peer-reviewed. +These two authors equally contributed.

Mouri K, Sagai T, Maeno A, Amano T, Toyoda A and Shiroishi T. Enhancer adoption caused by genomic insertion elicits interdigital Shh expression and syndactyly in mouse. (2018) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, 1021-1026. Peer-reviewed.

Sagai T+, Amano T+, Maeno A, Kiyonari H, Seo H, Cho SW and Shiroishi T. SHH signaling directed by two oral epithelium-specific enhancers controls tooth and oral development. (2017) Sci. Rep. 7, 13004. Peer-reviewed. +These two authors equally contributed.

Amano T, Sagai T, Seki R and Shiroishi T. Two Types of Etiological Mutation in the Limb-Specific Enhancer of Shh. (2017) G3, 7, 2991-2998. Peer-reviewed.

Sagai T, Amano T, Maeno A, Kimura T, Nakanoto M, Takehana Y, Naruse K, Okada N, Kiyonari H and Shiroishi T. Evolution of Shh endoderm enhancers during morphological transition from ventral lungs to dorsal gas bladder. (2017) Nat. Commun. 3; 8:14300. Peer-reviewed.

〔学会発表〕(計1件)

天野孝紀、"A novel CRE positively and negatively influences the expression of Shh and its bystander genes"、第50回日本発生生物学学会、2017年5月10-13日、東京

〔図書〕(計1件)

天野孝紀 他、株式会社エヌ・ティー・エス、遺伝学用語集 遺伝単「遺伝子の発現制御はどこから」、2017、pp104-107、分担執筆。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 孝紀 (Amano, Takanori)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センタ

ー・特任研究員

研究者番号：20419849