

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07248

研究課題名(和文)クロマチン高次構造から捉えるゲノムインプリンティング機構

研究課題名(英文)Genome imprinting mechanism based on the chromatin higher order structure

研究代表者

富川 順子(Tomikawa, Junko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・研究員

研究者番号：80534990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスES細胞を用いて得た、アレル別発現プロファイル、アレル別エピゲノム情報とアレル別クロマチンループ構造を解析したところ、ゲノム全体ではアレル間でのクロマチンループ形成状況に大きな変化はみとめられなかった。しかし、既知のインプリンティング遺伝子であるGrb10遺伝子領域において、発現している母方アレルでGrb10のMajor promoterを含む領域と相互作用する領域を検証したところ、母方アレルでH3K27acとH3K4me1が修飾されている領域が見つかった。この領域を欠損したマウスを作製し、その表現型の検証を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムインプリンティングは哺乳動物の発生や発育に重要な働きをしており、そのエピジェネティック制御機構の破綻はヒトでは先天異常や癌の発生に関与することが知られている。また、インプリント遺伝子はありふれた(罹患率の高い)疾患にも関与することが示唆されている。例えば、近年の全ゲノム関連解析で、複数の糖尿病感受性SNPがインプリント遺伝子クラスター内に同定されている。マウス細胞をモデル系としてインプリント遺伝子発現に関与するシスエレメントを同定することで、このような疾患感受性SNPの機能推定が可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Using mouse ES cell line, we analyzed allele-specific epigenomic profile including gene expression, histone modification and chromatin loop conformation. Comparative analysis of genome-wide chromatin loop formation showed that no marked differentiations were observed between maternal and paternal alleles. However, the locus of already-known imprinting gene, Grb10, showed maternal-specific expression and maternal-specific loop formation between the major promoter and a region in which H3K27ac and H3K4me1 modifications were found. We then made the knockout mice lacking the region with H3K27ac and H3K4me1 modifications and investigated the phenotypes of the knockout mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：アレル特異的ループ形成 Grb10 シスエレメント

## 1. 研究開始当初の背景

われわれ哺乳類では、ほとんどの遺伝子は父母それぞれに由来する2つの対立遺伝子から同等に発現している。しかし、インプリント遺伝子は父親(精子)由来あるいは母親(卵子)由来のどちらかの対立遺伝子からのみ発現するという特徴的な発現パターンを示す。こうしたゲノムインプリンティングは哺乳類の正常な発生や胎児の成長に不可欠であり、リプログラミングを経て樹立されるiPS細胞などにおいても、インプリンティングの異常は細胞の品質低下に直結する重大な課題である (Pick *et al.*, *Stem Cells*, 2009; Kim *et al.*, *Nature*, 2010; Lister *et al.*, *Nature*, 2011)。

インプリント遺伝子座に位置し、雌雄の生殖細胞系列で異なるDNAメチル化パターンが確立されたゲノム領域は *germline differentially methylated region* (gDMR) と定義され、マウスではこれまでに20程度の座位が同定されている (Arnaud, *Reproduction*, 2010)。DMRがインプリント遺伝子のアレル特異的発現制御において中心的な役割を担うという概念はすでに広く受け入れられているが (Thorvaldsen *et al.*, *Genes Dev*, 1998; Hark *et al.*, *Nature*, 2000; Nativio *et al.*, *PLOS Genet*, 2009)、その分子機構の詳細、すなわちDMRが遠位(数十から数千kb)の遺伝子発現を規定する分子メカニズムが明らかにされたケースは少なく、DMR以外のシスエレメント(エンハンサー、インスレーターなど)の情報はさらに乏しい。

Chromosome Conformation Capture (3C) 法は、核内で三次元的に近接したゲノム領域同士を検出するクロマチン構造解析法の一つであり (Dekker, J. *et al.*, *Science*, 2002)、次世代シーケンサーとの併用により、全染色体上での遺伝子座集積状況を網羅的に解析することも可能となった (Lieberman-Aiden *et al.*, *Science*, 2009; Dixon *et al.*, *Nature*, 2012; Dekker *et al.*, *Nat Rev Genet*, 2013; Mifsud *et al.*, *Nat Genet*, 2015)。応募者はこれまでに3C解析法を用いて、マウス視床下部における *Kiss1* 遺伝子発現がエストロゲン刺激に応じて起こる周辺領域のクロマチン構造変換を介して制御されることを見出し報告した (Tomikawa *et al.*, *Proc Natl Acad USA*, 2012; Goto *et al.*, *Mol Endocrinol*, 2014)。また、マウス Embryonic stem (ES) 細胞と Trophoblast stem (TS) 細胞では、*Tead4* 遺伝子のプロモーターを基点として異なるクロマチン構造が構築されており、TS細胞においては、異なる染色体上に位置するエンハンサーが染色体間相互作用を介して *Tead4* 発現に寄与していることを見いだした (Tomikawa *et al.*, *Nucleic Acid Res*, 2020)。これらの成果は、核内において三次元的に近接した配列情報を網羅することが新たな機能的ゲノム配列の同定につながる非常に有効な手段であることを示している。

## 2. 研究の目的

ゲノムプロジェクトの完遂に伴い、ゲノム配列情報のみならず、あらゆる細胞種におけるエピゲノム情報が整備されつつある昨今の状況をふまえ、本研究では、3C法の一つである Capture Hi-C 法を用いてアレル特異的なクロマチン高次構造という観点から検証することにより、ゲノムにおけるインプリント遺伝子と制御領域の網羅的同定、さらにそれらのアレル特異的遺伝子発現を制御するエピジェネティック機構の解明を試みる。

## 3. 研究の方法

解析モデルとしては、C57BL/6 (以下 B6)・JF1 系統マウス間 F1 ハイブリッド胚由来 ES 細胞を用いた (BJ および JB)。応募者らは、独自に JF1 系統のリシーケンシングデータ解析を行い、高精度な SNP 情報を取得していたことから、B6・JF1 系統間の SNP 情報を用いることでアレル別な情報抽出が可能であった。これを利用して、FAIRE-seq によるアレル別オープンクロマチン領域の網羅化および RNA-seq によりアレル別発現プロファイルを取得し、同様に、ChIP-seq (H3K4me3, H3K27ac, H3K4me1, H3K9me3, H3K27me3) の結果から、各アレルのヒストン修飾パターンを検出し、インプリント遺伝子発現に関わる基礎データを収集した。3C解析法には、全ゲノムの1%に満たないインプリント遺伝子座をターゲットとするため、プロモーター領域および DMR の濃縮過程を含む Capture Hi-C 法を新たに確立し用いた。アレル別シーケンスデータの解析には SNPsplite ソフトウェア (Krueger and Andrews, *F1000Res*, 2016) を用い、Capture Hi-C ライブラリのシーケンスデータについては、SNPsplite および CHiCAGO ソフトウェア (Cairns *et al.*, *Genome Biol.*, 2016) を用いて解析した。以上のデータを用いた統合解析を行い、インプリント遺伝子の制御領域と思われるシスエレメント候補領域を決定した。これらの配列については、ゲノム編集技術により、標的領域欠損マウスを作出し、個体レベルでの表現型解析を試みている。

## 4. 研究成果

SNPsplite を用いたアレル別シーケンスデータの解析により、既知のインプリント遺伝子領域の一部で、片アレル型オープンクロマチン領域の存在を確認するとともに、ゲノム全域で、片アレル型のオープンクロマチン領域をそれぞれ 6000 程度、両アレル型オープンクロマチン領域を 3000 程度同定した。片アレル型オープンクロマチン領域には、CTCF、CTCF-L などのイ

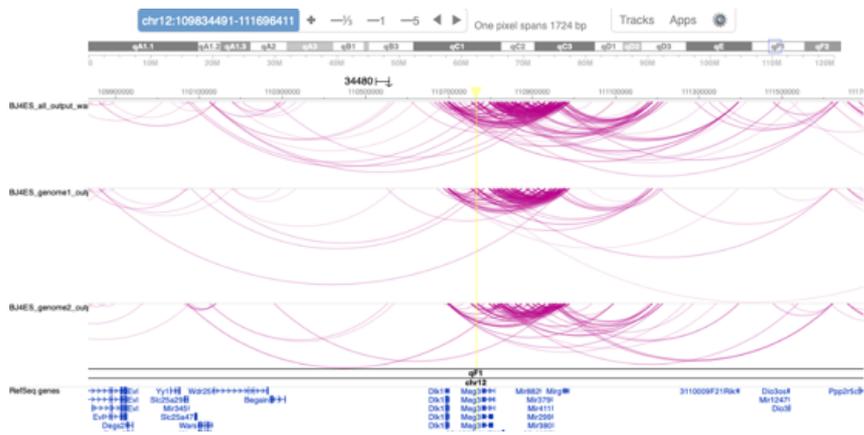


Fig.1 片アレル型クロマチンループの比較  
 最上段は両アレルで検出されたクロマチンループを示した。2段目には母方アレルで検出されたクロマチンループ、3段目には父方アレルで検出されたクロマチンループを示した。

ンスレーターを主とする結合モチーフが集中していたのに対し、両アレル型オープンクロマチン領域にはプロモーターを示すモチーフが集中していた。これは、ChIP-seq データからも同様の傾向がみとめられ、片アレル型オープンクロマチン領域には CTCF が、両アレル型オープンクロマチン領域には H3K4me3 や RNA Pol II がより enrich していた。CEAS ソフトウェア (Ji *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2006) により、各オープンクロマチンのゲノム内分布を解析したところ、片アレル型と両アレル型のオープンクロマチン領域は異なった分布様式を示し、両アレル型オープンクロマチンは活性型のプロモーターを主としているのに対し、片アレル型オープンクロマチンは主に intergenic region あるいはイントロンに分布しており、エンハンサーあるいはインスレーターといった制御領域を形成しているのではないかと考えられた。これにより、既知のインプリント遺伝子を含む片アレル型発現を示す遺伝子の制御領域候補を網羅するに至った。

一方で、Capture Hi-C ライブラリのシークエンスデータの解析に取り組んだ結果、ゲノム全体を通して、アレル間でのクロマチンループ形成状況に大きな変化はみとめられず、上記で網羅した制御領域候補との関係性もほとんど認められなかった (Fig. 1)

そこで次に、既知のインプリンティング遺伝子領域に焦点をあて、これまでに得たエピゲノム情報およびクロマチンループ形成状況を詳細に比較していった。*Grb10* 遺伝子領域では、母方アレルのプロモーターがおそらくメチル化されており、同様に母方アレル特異的に H3K9me3

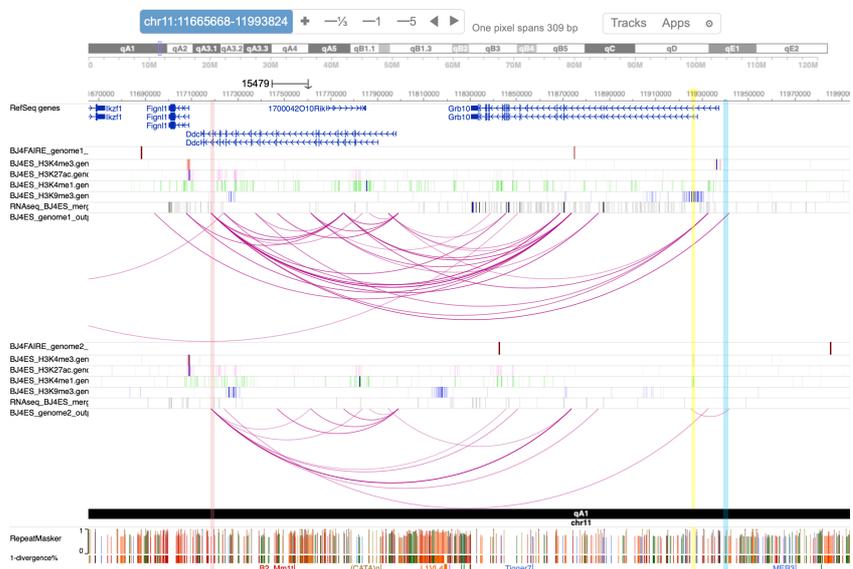


Fig. 2 *Grb10* 遺伝子領域で形成されるクロマチンループの比較  
 Major promoter (青いハイライト)を含む領域と相互作用する領域を検証したところ、両アレルで H3K27ac と H3K4me1 が修飾されている領域 (赤いハイライト)が見つかった。この領域は、父方アレルでもループ形成をしているが、DMR (黄色いハイライト)に結合していると考えられる CTCF の影響か、プロモーターとの相互作用は起こっていない。

修飾が入っているのにも関わらず、母方発現をしていた。しかし、母方発現する *Grb10* の Major promoter を含む領域と相互作用する領域を検証したところ、両アレルで H3K27ac と H3K4me1 が修飾されている領域が見つかった。この領域は、父方アレルでも複数の領域とループ形成をしているが、DMR に結合していると考えられる CTCF の影響か、Major promoter との相互作用は検出されなかった (Fig. 2)。このように *Grb10* 遺伝子領域において見出された特徴的なエピゲノム状態を有する領域 (赤いハイライト) がシスエレメントとして働き、*Grb10* 遺伝子の片親性発現を規定している可能性が考えられた。そこで、この領域をゲノム編集技術によって欠如させたノックアウトマウスを作製しており、産仔が得られ次第、その表現型の検証を試みる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 6. Katoh N, Kuroda K, Tomikawa J, Ogata-Kawata H, Ozaki R, Ochiai A, Kitade M, Takeda S, Nakabayashi K, Hata K	4. 巻 10
2. 論文標題 Reciprocal Changes of H3K27ac and H3K27me3 at the Promoter Regions of the Critical Genes for Endometrial Decidualization.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Epigenomics	6. 最初と最後の頁 1243-1257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2217/epi-2018-0006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Y, Tayama C, Tomikawa J, Akaishi R, Kamura H, Matsuoka K, Wake N, Minakami H, Kato K, Yamada T, Nakabayashi K, Hata K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Placenta-specific Epimutation at H19-DMR Among Common Pregnancy Complications: Its Frequency and Effect on the Expression Patterns of H19 and IGF2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Epigenetics	6. 最初と最後の頁 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-019-0712-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomikawa J, Takada S, Okamura K, Terao M, Ogata-Kawata H, Akutsu H, Tanaka S, Hata K, Nakabayashi K	4. 巻 48
2. 論文標題 Exploring trophoblast-specific Tead4 enhancers through chromatin conformation capture assays followed by functional screening.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 278-289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkz1034.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Taniguchi K, Kawai T, Kitawaki J, Tomikawa J, Nakabayashi K, Okamura K, Sago H, Hata K.	4. 巻 34
2. 論文標題 Epitranscriptomic profiling in human placenta: N6-methyladenosine modification at the 5'-untranslated region is related to fetal growth and preeclampsia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 494-512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201900619RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikegami K, Goto T, Nakamura S, Watanabe Y, Sugimoto A, Majorune S, Horihata K, Nagae M, Tomikawa J, Imamura T, Sanbo M, Hirabayashi M, Inoue N, Maeda KI, Tsukamura H, Uenoyama Y.	4. 巻 66
2. 論文標題 Conditional kisspeptin neuron-specific Kiss1 knockout with newly generated Kiss1-floxed and Kiss1-Cre mice replicates a hypogonadal phenotype of global Kiss1 knockout mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 359-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minabe S, Nakamura S, Fukushima E, Sato M, Ikegami K, Goto T, Sanbo M, Hirabayashi M, Tomikawa J, Imamura T, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI, Matsuda F.	4. 巻 66
2. 論文標題 Inducible Kiss1 knockdown in the hypothalamic arcuate nucleus suppressed pulsatile secretion of luteinizing hormone in male mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 369-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-164.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 富川順子、高田修治、岡村浩司、阿久津英憲、田中智、秦健一郎、中林一彦
2. 発表標題 染色体間相互作用を介した細胞系列特異的Tead4発現制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富川順子、西園啓文、秦健一郎、中林一彦
2. 発表標題 発生段階特異的な機能的ゲノム高次構造の探索
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中林 一彦  (Nakabayashi Kazuhiko)		
研究協力者	岡村 浩司  (Okamura Kohji)		
研究協力者	高田 修治  (Takada Shuji)		
研究協力者	田山 千春  (Tayama Chiharu)		