

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16072

研究課題名(和文) エンハンサー解析による腎臓BMP7分泌サイトの機能的意義の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of enhancers to dissect differential roles of BMP7 secreted from distinct sites in kidney.

研究代表者

辻村 太郎 (Tsujimura, Taro)

京都大学・高等研究院・特定講師

研究者番号：90741893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Bmp7の腎臓エンハンサーの制御について、(1)通常の腎臓機能に重要なエンハンサーは、おそらくBmp7下流領域には存在しないこと、(2)成体腎臓でのBmp7発現は通常状態では限定的であること、(3)エンハンサー制御においてはCTCF結合サイトが重要な役割を果たすことが確かであること、(4)しかし、腎臓細胞で実際にどのように機能しているのかについては、エンハンサーの場所やエピジェネティクス状態に依存するのでそれらを総合的に検討していく必要があること、を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bmp7の制御という観点からは、より理解を深めていくために、シングルセルレベルでの詳細な解析が必要になってくることを示唆した。エンハンサー制御に関連して得たCTCFの機能およびその調節動態についての知見は、他の遺伝子座においても同様であるはずで、腎臓のみならず広く生体機能をゲノムから探る上での大きな指針となる研究になったと考えている。

研究成果の概要(英文)：Regarding the enhancer regulation for the Bmp7 expression in kidneys, this study shows that i) the downstream region of Bmp7 does not contain enhancers that are critical for the normal kidney development; ii) the Bmp7 expression in the adult kidney is limited to only small population of cells; iii) the CTCF binding sites at the locus for sure critically impinge on the enhancer regulation; iv) however, the role for the CTCF binding sites specifically in the kidney cannot be ensured unless the precise position of the enhancer is identified and the epigenetic states around the region are revealed.

研究分野：エンハンサー制御

キーワード：エンハンサー BMP7 腎臓 CTCF

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

BMP7 は、腎臓発生においてネフロン前駆細胞の維持、増殖、さらには分化誘導を担う。BMP7 は、成体腎臓においても遺伝子が発現し、腎臓の保護的な作用を担うと考えられている。これら分子機能は、腎臓における BMP7 遺伝子の特異的な発現に担保される。これまでの詳細な解析で、マウス発生腎臓では *Bmp7* は後腎間葉および尿管芽上皮という両発生系統で発現し、成体腎臓では尿管、集合管、遠位尿細管、糸球体ポドサイトなどで発現することが示された。しかし、これら発現がどのように制御され、それぞれの細胞種からの発現・分泌にどのような意義があるのかは不明だ。これらプロセスの解明は、腎臓機能の理解に必須であり、また、現在注目されている BMP7 を中心とした腎障害時の治療戦略を検討する上でも重要だ。

重要なことに、BMP7 の種々の組織での発現は、周囲に存在するエンハンサーにより制御されている。従って、BMP7 のこれら腎臓の各種細胞における発現も、それぞれエンハンサー領域により誘導されていると考えられている。そして、そのエンハンサー領域は、腎臓の発生および保護に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、これらエンハンサーはほとんど解明されていない。

### 2. 研究の目的

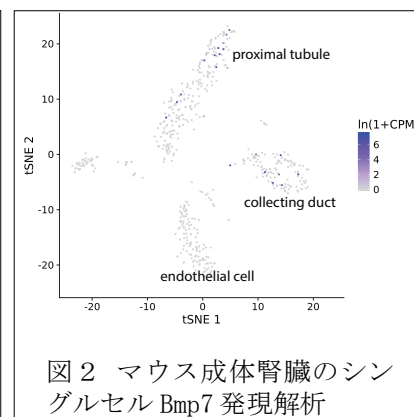
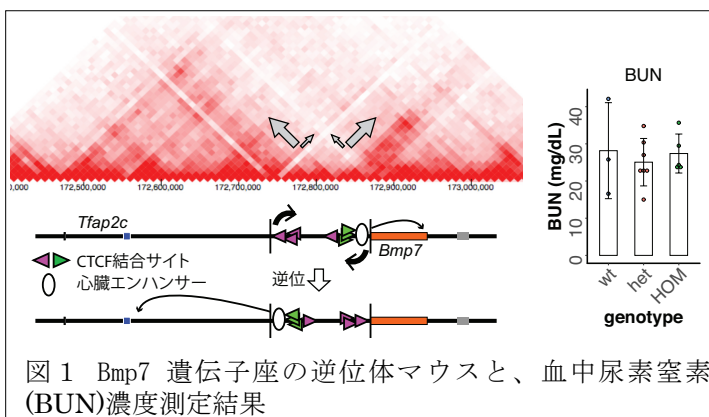
本研究では、BMP7 のエンハンサー制御機構の解明により、BMP7 の腎臓発生および保護における役割を明らかとしていくことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず、すでに保有している BMP7 周辺のゲノム改変マウスを用いて、腎臓に表現型が現れるかを検討した。また、特によくわかっていない腎臓の保護に関する内在 BMP7 の役割について検討するために、成体腎臓での発現を検討した。また、BMP7 遺伝子座のエンハンサー制御について理解を深めるため、遺伝子座周辺で CTCF タンパク質の結合サイトの機能を詳細に解析した。CTCF の結合はエンハンサーと遺伝子との相互作用に極めて重要であることが知られている。

### 4. 研究成果

*Bmp7* 周辺のゲノム変異体マウスとして、*Bmp7* 下流のゲノム領域の逆位体を保持していた (図 1 参照。Tsujimura et al. 2015 *PLoS Genetics*)。この逆位体においては、心臓エンハンサーが、本来の *Bmp7* 遺伝子ではなく *Tfap2c* 遺伝子を標的とする (図 1)。これは、おそらくその逆位領域に含まれる CTCF 結合サイトが、エンハンサー活性をブロックする役割による。そのように考えると、同様に、この *Bmp7* 下流のゲノム領域に *Bmp7* を標的とする腎臓のエンハンサーが含まれるとすれば、そのエンハンサーも、この逆位体マウスにおいては、*Bmp7* を標的とはしなくなるはずである。本逆位体マウスについては、コントロール野生型マウスとともに、血清および尿を採取して、種々の成分分析を行ってきた。特に、血中尿素窒素濃度について、遺伝子型間で比較したところ、おおよそ同等の分布であり、この領域には顕著に腎臓機能に影響を与えるエンハンサー領域は存在しないことが示唆された (図 1)。



次に、内在 BMP7 発現の成体での役割について示唆を得るために、成体腎臓での BMP7 発現について再検討した。*Bmp7* 発現を再現する *LacZ* レポーターマウスにおいて、腎臓での X-gal 染色を一部の領域で認めたが、再検討したところ、野生型でも同様の染色を認めたため、その発現は定かとは言えない。そこで、公開されているシングルセル RNA-seq のデータ (The Tabula Muris Consortium, 2018 *Nature*) を利用して、*Bmp7* 発現を検討した。すると、近位尿細管上皮細胞および集合管上皮細胞のごく一部で発現が検出されるが、大部分の細胞においては発現が検出されないレベルであることがわかった (図 2)。この結果は、*Bmp7* の発現および機能を今後検討し

ていくにはシングルセルレベルでの解析が必要であることを意味すると考えている。これについては、現在、その実験系の検討を進めている。

次に、*Bmp7* 遺伝子座のエンハンサー制御についてより確かなモデルを得るために、*Tfap2c* との間にある CTCF 結合領域の機能について検討を進めた (図 1 参照)。すでに、マウスの ES 細胞において、これら CTCF 結合サイトを含む欠失や逆位を得て、一部 4C-seq 解析を進めていた。これより、本 CTCF 結合サイトが、やはり、エンハンサー制御に重要であろうことは示唆されていた。これについてより理解を深めるために、まずこれら CTCF 結合サイトに本当に CTCF が結合していることをネイティブクロマチン免疫沈降 (nChIP) で確認した。さらに、4C-seq 解析をより詳細に進めた。そして、CTCF 結合の存在により、局所的にコンタクトの方向性にバイアスが生じること、および、それが CTCF 結合サイトを挟んでのコンタクトの阻害に効くことを示唆できた。また、本一群の CTCF 結合サイトはおおよそ 80kb 領域にわたるが (図 1)、この中には、*Bmp7* 側および *Tfap2c* 側の両側領域と等しくコンタクトをとる領域が存在することがわかった。これは、CTCF 結合サイトが単にエンハンサーの活性をブロックするだけでなく、それ以外の機能も有することを示唆しており、上記逆位体の結果の解釈にも注意を要求するものであると言える。これらの結果は、論文としてまとめ、Tsujiura et al. 2018 *Epigenetics & Chromatin* 誌に掲載された。

さらに CTCF 結合サイトそのものの機能を確かとするために、上記 CTCF 結合サイトのみを抽出・連結し、人工的 DNA カセットを合成した。それによりエンハンサー活性をブロックできるのかを実験的に確かめることにした (図 3)。検証モデルは、ヒト iPS 細胞における、*MYC* 遺伝子座とした。*MYC* 発現を誘導するエンハンサーを同定し、それと *MYC* との間に本カセットを挿入したところ、*MYC* の発現が顕著に減少することがわかった。これにより、確かに CTCF 結合サイトそれ自体によりエンハンサー活性をブロックできること、そしてそれが細胞種 (さらには生物種) に依らないことを示すことができた。一方で、本 DNA カセットには tetO 配列を挿入していた。tetO と tetR との相互作用を通して、KRAB タンパク質ドメインを本 DNA カセットにリクルートし、ヘテロクロマチンを人為的に導入してみた。すると、本 DNA カセットにおける CTCF の結合

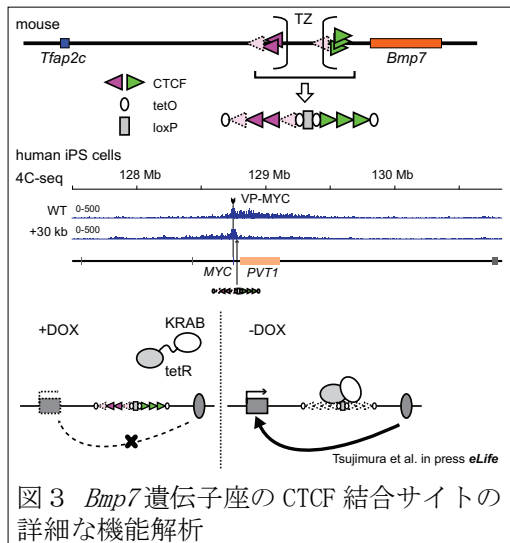


図 3 *Bmp7* 遺伝子座の CTCF 結合サイトの詳細な機能解析

は阻害され、遺伝子とエンハンサーとのコンタクトが戻り、*MYC* 遺伝子の発現は通常レベルに回復した (図 3)。このことから、上述の通り、CTCF 結合サイトの機能は普遍的に様々な細胞種で保存されているはずであるが、そこで本当に CTCF が結合しているかは、その細胞におけるエピジェネティクス状態次第であることがわかった。その意味で、腎臓における CTCF 結合サイトも、やはり各細胞ごとに (理想的にはシングルセルレベルで) 解析を進めていく必要があるだろうと言える。これらの結果は、Tsujiura et al. *eLife* (in press) 誌上で発表される (プレプリントは Tsujiura et al. 2019 *bioRxiv* ですすでに公にしている)。また、上記の CTCF/KRAB による遺伝子発現調節システムは画期的なものであり、特許出願 (特願 2018-154577、PCT/JP2019/032106) を果たした。また、本研究により、CTCF 結合サイトの人為的なエピジェネティクス操作により、クロマチン高次構造、エンハンサー活性、および遺伝子発現を操作する可能性を示すことができた。これは、Tsujiura et al. 2016 *WJSC* で議論した、クロマチン高次構造操作を通じての *Bmp7* の腎臓発現誘導および腎臓再生誘導というアイデアの実現につながり得るものであると考えている。

以上より、*Bmp7* の腎臓エンハンサーの制御について、(1) 通常の腎臓機能に重要なエンハンサーは、おそらく *Bmp7* 下流領域には存在しないこと、(2) 成体腎臓での *Bmp7* 発現は通常状態では限定的であること、(3) エンハンサー制御においては CTCF 結合サイトが重要な役割を果たすことが確かであること、(4) しかし、腎臓細胞で実際にどのように機能しているのかについては、エンハンサーの場所やエピジェネティクス状態に依存するのでそれらを総合的に検討していく必要があること、を示すことができた。従って、*Bmp7* の制御という観点からは、より理解を深めていくために、シングルセルレベルでの解析が必要になってくると考えている。また、今回、腎臓機能に顕著な表現型を見出すことができず、思うように研究が進展しなかったが、これを進めていくためには、より詳細かつ網羅的なゲノム編集と、より緻密な表現型解析を遂行していく必要がある。エンハンサー制御に関連して得た CTCF の知見は、他の遺伝子座においても同様であるはずで、腎臓のみならず広く生体機能をゲノムから探る上での大きな指針となる研究になったと考えている。

以上より、*Bmp7* の腎臓エンハンサーの制御について、(1) 通常の腎臓機能に重要なエンハンサーは、おそらく *Bmp7* 下流領域には存在しないこと、(2) 成体腎臓での *Bmp7* 発現は通常状態では限定的であること、(3) エンハンサー制御においては CTCF 結合サイトが重要な役割を果たすことが確かであること、(4) しかし、腎臓細胞で実際にどのように機能しているのかについては、エンハンサーの場所やエピジェネティクス状態に依存するのでそれらを総合的に検討していく必要があること、を示すことができた。従って、*Bmp7* の制御という観点からは、より理解を深めていくために、シングルセルレベルでの解析が必要になってくると考えている。また、今回、腎臓機能に顕著な表現型を見出すことができず、思うように研究が進展しなかったが、これを進めていくためには、より詳細かつ網羅的なゲノム編集と、より緻密な表現型解析を遂行していく必要がある。エンハンサー制御に関連して得た CTCF の知見は、他の遺伝子座においても同様であるはずで、腎臓のみならず広く生体機能をゲノムから探る上での大きな指針となる研究になったと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsujimura T, Takase O, Yoshikawa M, Sano E, Hayashi M, Takato T, Toyoda A, Okano H, Hishikawa K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Control of Directionality of Chromatin Folding for the Inter- and Intra-Domain Contacts at the Tfp2c-Bmp7 Locus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Epigenetic & Chromatin	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1186/s13072-018-0221-1">https://doi.org/10.1186/s13072-018-0221-1</a>	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 Tsujimura T, Takase O, Yoshikawa M, Sano E, Hayashi M, Hoshi K, Takato T, Toyoda A, Okano H, Hishikawa K	4. 巻 -
2. 論文標題 Controlling gene activation by enhancers through a drug-inducible topological insulator.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1101/534073">https://doi.org/10.1101/534073</a>	査読の有無 無
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 Tsujimura T, Takase O, Yoshikawa M, Sano E, Hayashi M, Hoshi K, Takato T, Toyoda A, Okano H, Hishikawa K	4. 巻 -
2. 論文標題 Controlling gene activation by enhancers through a drug-inducible topological insulator.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) -	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻村太郎
2. 発表標題 クロマチン高次構造から考える遺伝子制御の制約と可塑性
3. 学会等名 第20回日本進化学会大会シンポジウム『表現型の可塑性～ホモ・サピエンスの環境適応のヒントを探る』（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻村太郎、高瀬敦、吉川真弘、佐野悦子、高戸毅、豊田敦、岡野栄之、菱川慶一
2. 発表標題 Tfap2c-Bmp7遺伝子座で互いに反目方向に並ぶ2つのCTCF結合クラスターは、クロマチンの隣接コンタクトドメインを分断し、かつ内部コンタクトパターンに關与する、
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会(ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻村太郎、高瀬敦、吉川真弘、佐野悦子、高戸毅、林松彦、豊田敦、岡野栄之、菱川慶一
2. 発表標題 クロマチン高次ドメイン構造分断機構の解明とiPS細胞におけるその応用
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 エンハンサーブロッカー及びその使用	発明者 辻村太郎、岡野栄之、菱川慶一	権利者 慶應義塾大学
産業財産権の種類、番号 特許、JP-2018-154577	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 エンハンサーブロッカー及びその使用	発明者 辻村太郎、岡野栄之、菱川慶一	権利者 慶應義塾大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/032106	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----