

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770149
 研究課題名（和文） ジーンクラスタリング（遺伝子集積）による骨格筋分化制御機構の解明
 研究課題名（英文） The analysis of Genomic re-organization in myogenesis
 研究代表者
 大川 恭行（Ohkawa Yasuyuki）
 九州大学・医学研究院・特任准教授
 研究者番号：80448430

研究成果の概要：

骨格筋分化における遺伝子発現高次制御機構として、遺伝子集積現象について解析を行った。そのために、必要となるゲノムワイドでの遺伝子集積現象の解析系を新たに立ち上げ、その結果、骨格筋分化の極めて初期に染色体の特異的部位が、遺伝子集積を起こすことが明らかとなった。さらに、遺伝子集積を起こす因子群を複数同定し、その機能阻害により骨格筋分化が抑制されたことから遺伝子集積現象が、骨格筋分化の高次制御機構であることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：クロマチン、骨格筋分化、高次制御システム

1. 研究開始当初の背景

細胞の分化は、単一の遺伝子で制御されているのではなく、異なる発現制御をもつ多数の遺伝子がセットになり、大きなプログラムとして動くことで始めて可能になる。個々の遺伝子がプロモーター、エンハンサー領域を持つため、発現制御の研究は単一遺伝子レベルでは飛躍的に進んできた。しかし、分化プログラムが成立するためには、そのさらに上流の複数の遺伝子にまたがる制御メカニズムが必要である。細胞内の特定の遺伝子が発

現するためには、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、という、複数のステップを段階的に経ることが必要である。申請者は、骨格筋分化において、これらのイベントが特定遺伝子のみならず、複数のグループ遺伝子ごとに、まとめて各段階ごとに同調的に制御されていることを見出した(Ohkawa, Y. *EMBOJ* 2006)。このことは、個々の遺伝子をセット

として制御する**高次制御システム**が少なくとも骨格筋分化において存在していることを強く示唆する。

高次制御システムの一つとして考えられているのがジーンクラスタリング(遺伝子集積)である。遺伝子集積現象の解析は、本領域で高次クロマチン構造制御とも言われ欧米でここ数年で極めて活発な研究が行われている(Palstra, R.J. *Nat Genet* 2003, Spilianakis, C.G. *Nature* 2006)。2004年にLopesらにより、細胞分化に伴い、発現する遺伝子数が増大するにも関わらず、核内で転写が行われる場所の数が劇的に減少していく現象が発見され、複数の遺伝子が、核内では同じ場所に集積している可能性が示唆されている(Lopes S *Nat Genet.* 2004)。申請者は、酵母を用いて開発された遺伝子座の高次構造を検出する分子生物学的な解析法(Capturing Chromatin Conformation: 3C)(Dekker, J *Science* 2002)を用いることで体系的な遺伝子集積の解析が可能にする上で適した方法と考え、本法の開発者、Dr. Dekkerの助言のもと、哺乳類細胞での高効率な遺伝子集積検出法の開発に、成功した。この変法に基づきいくつかの重要な知見を得た。

我々は自ら開発した技術をもとに、*in vitro*の培養細胞系のみならず、*in vivo*、つまりマウス胚での骨格筋分化過程で、複数の遺伝子が、遺伝子発現のみならず、その前段階であるヒストン修飾、クロマチン構造制御が同調的に起こっていることを初めて見出した(Ohkawa, Y. *Mol Cell Biol* 2005, Ohkawa, Y *EMBOJ* 2006)。この知見より、骨格筋分化における高次システム制御の存在が明らかになったことから、その構成要素の根幹である遺伝子集積が存在すると予測し、先に述べたの3C解析変法を用いて検討した。その結果、骨格筋分化において確かに遺伝子集積現象が起こることが明らかになった。

非常に興味あることに、“転写因子”として同定されて以来20年もの間、骨格筋分化に重要であることが示されてきた分子であるMYODが、骨格筋分化を誘導するにも関わらず、発生、成体における*in vivo*での骨格筋分化、そして培養細胞系においてさえも、実際の転写には関わっていなかった。具体的には、MYODは、標的遺伝子の転写が活性化されるかなり以前から、そのプロモーター上に結合しているにも関わらず、実際の転写が活性化される段階には、プロモーター領域から離れていることが分かった。つまりMYODは、ゲノム上で、転写そのものではなく何か別の機構により骨格筋の分化を誘導していることが強く示唆されていた。

2. 研究の目的

成体由来の骨格筋幹細胞、骨格筋前駆細胞、成熟骨格筋組織を用いてどの分化段階で遺伝子集積が起こるかを、3C解析を用いた分子生物学的な解析、及び、*in situ* DNA ハイブリダイゼーションを用いた可視化を伴う細胞生物学的な解析の双方を用いて明らかにする。そして、3Cアッセイを複数のゲノム上で解析することで、遺伝子集積が起こる領域を特定する。また、遺伝子集積が起こる時期の培養細胞や、組織サンプルを用いて、MyoD結合タンパク質の探索をもとに遺伝子集積に関与する分子を生化学的に同定する。同定した分子をRNA干渉法を用いてノックダウンさせ、遺伝子集積への関与を評価することでそのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 遺伝子集積は骨格筋分化のどの段階で起こるか?

骨格筋組織を4-6週齢マウスより単離し、骨格筋幹細胞(筋サテライト細胞を単離し用いる)および、骨格筋前駆細胞、成熟筋組織のそれぞれより核を単離する。(Dacwag CS *Mol Cell Biol.* 2006)単離した核を用いて、骨格筋組織に強く発現が見られ、且つ、同調的に制御されていることが明らかになっている骨格筋クレアチンキナーゼ遺伝子(ckm)、デスミン遺伝子、そしてsk-alphaアクチン遺伝子間について、プロモーター領域のクラスタリングを3C解析により検討する。次に他の遺伝子として、sk-alphaアクチンなどの他の遺伝子についても引き続き解析を試みる。また3C解析のみならず、骨格筋クレアチンキナーゼ、デスミンの遺伝子座についてFluorescent *in situ* DNA hybridization(FISH)を行い、二つの遺伝子座をラベルし、顕微鏡下で可視化する相補的な解析を同時に試みる。両遺伝子座に対するFISH用プローブはすでに得ている。また、他の遺伝子座に対するFISH用プローブはBAC PACより購入し検討を行った。

2. 遺伝子集積は遺伝子座のどこでおこるか?

プロモーター領域に加え、他の領域を検討するために、骨格筋クレアチンキナーゼ遺伝子(ckm)、デスミン遺伝子、sk-alphaアクチン遺伝子などについてプロモーターをふくむ100kbの遺伝子座領域の領域に存在するE-boxについて遺伝子集積が起こる位置を探索する。5kbごとのデータに基づき、遺伝子集積が起こる部位についてさらに絞り込み解析を行う。遺伝子集積に必要な領域が同定された場合、rVISTAやBLASTを用いて、含まれているシスエレメントをピックアップしそこに結合する転写因子を予測した。

3. 遺伝子集積に関与する分子の探索

このMyoDが遺伝子集積に関わっている可能性があることから、 によって骨格筋分化段階

での遺伝子集積時期の同定に基づいて、サンプルを限定し、抗MyoD抗体アフィニティカラムを用いてMyoD結合タンパク質を同定する。20年来作出が困難とされてきた抗MyoD抗体を、申請者はその作出に独自のモノクローナル抗体作出法を用いることで成功した。抗MyoD抗体アフィニティカラム作製は、ハイブリドームにより得られる無制限量の抗体を用いて行われる。一度精製された結合タンパク質群は、多次元タンパク質同定技術(MudPIT法)(Washburn MP *Nat Biotechnol.* 2001)により直接質量分析により同定した。

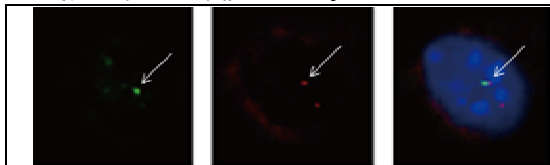
4. 遺伝子集積に関する分子メカニズムの解明

のにて同定された分子について、培養細胞を用いたsRNAiを用いたRNA干渉により細胞レベルでノックダウンすることで、遺伝子集積への関与を評価した。

4. 研究成果

1. 遺伝子集積は骨格筋分化のどの段階でどこで起こるか？

当初想定していた局所的3C解析では、遺伝子集積の全貌を俯瞰的にとらえる点において困難があった。そこで、最近注目されている自制代シーケンサーをもちいてゲノムワイドに遺伝子集積部位を探索する新手法を考案し、これを確立した。そのゲノムワイド3C解析の結果、骨格筋分化に伴い、遺伝子集積が顕著に増大する部位と逆に、減少する部位が見られた。興味深いことに、分化に関わらず一定頻度で常に遺伝子集積を形成している部位も確認できた。今回遺伝子集積が確認された部位につてFluorescent in situ DNA hybridization(FISH)を行い、さらに検証を行った。BACPACより購入したBACクローンよりFISH用プローブの作成を行い、細胞株を用いた実験においてはckmや、sk-alphaアクチンの遺伝子座について二つの遺伝子座をラベルし、顕微鏡下で可視化した。(図1)これら可視化の系によってもゲノムワイド3Cの実験系でえられた遺伝子座の近接が確かに確認された。



FISHによる骨格筋特異的遺伝子座近接の検出例 ckm遺伝子座(緑) des遺伝子座(赤)ヘキスト(青)(左3パネル) C2C12骨格筋芽細胞(分化後)

3. 遺伝子集積に関する分子の探索と分子メカニズムの解明

遺伝子集積に関する因子群を探索するために、MyoD結合因子の網羅的同定を行った。その結果、クロマチンリモデリング因子である、Brg1及びCHD2の2分子は独立して遺伝子集積に関わっていることを見出した。特に、CHD2タンパク質について、抗体を作製しアフィニティ精製を行った後、質量分析により、結合タンパク質の網羅的同定を試みた。その結果、非常に興味深いことにCHD2はヒストンバリエントの一つであるH3.3と複合体を形成していること、さらに質量分析を行うと既知のH3.3とは2アミノ酸異なる、新規ヒストンH3.3バリエントであった。これら新規ヒストンバリエントを中心としたジーンクラスター制御機構が示唆されており、更なる解析を行うことが求められる。

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2件)

- (1) Dacwag CS, Ohkawa Y, Pal S, Sif S, *Imbalzano AN. "The protein arginine methyltransferase Prmt5 is required for myogenesis because it facilitates ATP-dependent chromatin remodeling.", *Mol Cell Biol*, 27, pp.384-pp.394, 2007
- (2) Ohkawa Y, Yoshimura S, Higashi C, Marfella CG, Dacwag CS, Tachibana T, Imbalzano AN. "Myogenin and the SWI/SNF ATPase Brg1 maintain myogenic gene expression at different stages of skeletal myogenesis.", *J Biol Chem*, 282, pp.6564-pp.6570, 2007

[学会発表](計4件)

- (1) Yasuyuki Ohkawa, "High order chromatin remodeling in myogenesis", 日本細胞生物学会年会, 福岡, 2007.5
- (2) Yasuyuki Ohkawa, "High order chromatin remodeling in myogenesis", 核ダイナミクス研究会シンポジウム, 札幌, 2007.9
- (3) 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 神戸, 2008.11

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大川 恭行(Ohkawa Yasuyuki)

九州大学・医学研究院・特任准教授

研究者番号：80448430