

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770188

研究課題名（和文） ジーンクラスタリング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 myogenic differentiation by gene clustering

研究代表者

大川 恭行 (OHKAWA YASUYUKI)

九州大学・医学研究院・特別准教授

研究者番号：80448430

研究成果の概要（和文）：

私たちは現在までの研究に於いて、個々の遺伝子がグループとして制御される高次システムが骨格筋分化過程に存在し、さらにジーンクラスタリングによる遺伝子座の集積が、ヒストンの修飾や局所的なクロマチン構造変換以前に先行して起こることを見いだした（論文投稿中）。すなわち、ジーンクラスタリングは遺伝子発現制御に於ける最も初期の遺伝子発現制御機構である可能性が考えられる。そこで本研究では、骨格筋分化に於けるジーンクラスタリング形成因子に着目して、遺伝子発現の高次制御システムの解明を行った。

研究成果の概要（英文）：

During skeletal muscle differentiation, the myogenic determinant MyoD binds to target genes upon its induction, promoting activation of genes expressed early in the differentiation process through recruitment of SWI/SNF ATP-dependent chromatin remodeling enzymes. The molecular basis by which late expressed genes remain transcriptionally silent during the early stages of differentiation is not well understood. We show that the regulatory sequences, but not other regions of genes highly expressed at late times of myogenesis, are in close physical proximity in differentiating embryonic tissue as well as in differentiating culture cells, despite these genes being located on different chromosomes. Global analysis of interchromosomal interactions reveals frequent genome-wide associations specifically between genes that are highly expressed in skeletal muscle but only infrequent interactions between housekeeping genes or between the two different classes of genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：エピジェネティクス

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：クロマチン クロマチンリモデリング ジーンクラスタリング 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

細胞内の個々の遺伝子が発現するには、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、それぞれにいたるステップを段階的に経ることが

必要である。私たちは、骨格筋分化の系を用いて、これらのイベントが個々の遺伝子で個別に制御されているのではなく、複数の遺伝子がグループを形成し、それぞれの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)。すなわち、個々の遺伝子がグループとして制御される高次システムが骨格筋分化において存在していることを明らかにした。しかしながら、この高次制御システムの詳細なメカニズムや関与する分子は不明なままである。私たちはこの高次制御システムが、核内での遺伝子座の再配置、つまりジーンクラスタリング (遺伝子集積) ではないかと考えアプローチを試みてきた。遺伝子集積現象の解析は、本領域でここ数年で極めて活発な研究が行われている。特に近年、細胞分化に伴い発現する遺伝子数は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転写制御を受けている可能性が示唆されている (Lopes S *Nat Genet.* 2004)。私たちは現在までの研究で、ジーンクラスタリングによる遺伝子座の集積が、ヒストンの修飾や局所的なクロマチン構造変換以前に先行して起こることを見出した。つまり、ジーンクラスタリングは骨格筋分化における最も初期の遺伝子発現制御機構である可能性が考えられることから、この現象をたどることで遺伝子発現制御の未知の高次制御システムの解明できると考えている。私たちは既に“マウス胚を用いたクロマチン構造解析”に成功し、これを用いて骨格筋分化過程における複数の遺伝子が、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 *in vivo* に於いても同調的になされていることを世界で初めて報告した (Ohkawa, Y. *Mol Cell Biol* 2005, Ohkawa, Y. *EMBOJ* 2006)。実際のクロマチン構造解析でマウス胚を用いて体系的に解析した例はほとんどない。この知見から、私たちは遺伝子発現には”複数の遺伝子発現”を”同調的に制御”する高次遺伝子集積システムが存在することを推測し、実験を行っている。体系的な遺伝子集積の解析のためには、酵母の解析系で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) が最適であると考え、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 (論文投稿中)。(次のページへ続く) その結果、骨格筋分化過程に於いて確かに遺伝子のクラスタリングが確認され、さらにこのジーンクラスタリングは転写やクロマチン制御に先立って、より早期の段階で起こることを見出した。さらに、”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、このジーンクラスタリングが形成の引き金となること、しかも MYOD は転写に関与していないにも関わらず、骨格筋分化を誘導するという非常に興味深い結果が明らかとなった。

2. 研究の目的

現在までに、私たちは、幹細胞、骨格筋前駆細胞、成熟骨格筋にいたる骨格筋分化過程のそれぞれにおけるジーンクラスタリングを系統的に解析している。その結果、ジーンクラスタリングが少なくとも幹細胞より骨格筋前駆細胞に至る段階で既に形成されており、これは骨格筋分化に於けるジーンクラスタリングが骨格筋分化の運命決定に何らかの役割を担っていることを示唆している。そこで本申請課題では、骨格筋分化の各段階ごとにジーンクラスタリング形成メカニズムについて、①ジーンクラスタリングを形成する遺伝子座のマッピングおよび②ジーンクラスタリングに関与する因子の同定を行い、ジーンクラスタリングがどのように骨格筋分化への運命決定を行っているのかについて検討する。

3. 研究の方法

既に我々が報告した手法により、骨格筋前駆組織をマウス胚より単離し、骨格筋前駆細胞、成熟筋組織のそれぞれより核を単離した (Ohkawa Y. *J.B.C.* 2007)。核の単離には、近年私たちが開発したセルソーターを用いた分離技術を用いる (核ソーティング)。この手法により単離した核は、内部のクロマチン構造や mRNA を損なうことなく採取されており、転写因子などの核内蛋白発現パターンにより核を分別・単離することが可能であった。通常、核構造が正常に保持されている場合、内部の mRNA や核膜、クロマチン構造が保持されていることが知られている。核膜には核膜孔と呼ばれる穴が存在するが、核膜構造が正常に保持されている場合、抗体のような大きな分子は単独で核膜孔を通過できない。そこで、私たちは約50kDa 以下の物質は核膜孔を通過できることに着目し、転写因子に対する抗体を Fab 化し内部の転写因子の蛍光標識を行ったところ、ソーティング効率が上昇し、詳細な解析が可能となった。分画された核は RT-PCR、3C、そしてクロマチン免疫沈降法に用いること出来ることを確認している。本手法により、骨格筋幹細胞の性質をもつ Pax3+/Pax7+ の核をソーティングにより純化し、ジーンクラスタリングを3C解析により検討した。遺伝子座として、骨格筋クレアチンキナーゼ遺伝子 (ckm) や、sk-alpha アクチンなどの分化後期に現れる遺伝子、myogenin、mef2d 遺伝子になど分化の比較的早い段階から発現が確認される遺伝子座についても解析を試みる。また3C解析のみならず、ckm や、sk-alpha アクチ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た。本解析法は既に確立して論文投稿中である。両遺伝子座に対する FISH 用プローブは既に入手しており、他の遺伝子座に対する FISH 用プローブはBACPACより購入した。

私たちすでに、クロマチンリモデリング因子 Brg1 がジーンクラスターに関わっていることを見出している(論文投稿中)。そこで、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 Brg1 抗体アフィニティカラムを用いて Brg1 結合タンパク質として探索を試みた。精製されたタンパク質は米国 University of Massachusetts Medical School の MassSpec Facility に委託し、多次元タンパク質同定技術(MudPIT)により網羅的に構成タンパク質の同定を試みた。

上記方法にて同定された分子について、レンチウイルスを用いたsRNAiにより細胞レベルでノックダウンし、遺伝子集積への関与を評価する。miRNA が導入された細胞は GFP-NLS によりラベルされるため、前述の核ソーティングと組み合わせることでノックダウンされた核のみ評価することが可能である。

4. 研究成果

核ソーティングを用いて単離された核は非常に少量で極めて条件での解析となった。3Cの場合十分な数の組み合わせを得るためには 1 μ g 相当の inputDNA が必要であった。そこで、まず、分離効率を高めるために、再度モノクローナル抗体の網羅的作出から行った。その結果、従来より Kd 値がおおよそ一桁大きい抗体群が得られ、これを発表した。また更にこれまでに開発した 3C-seq では IIS 型制限酵素に依存するために、あらたにニックトランスレーションを応用したアームの長さを 70-150bp まで高めた解析法の構築を行った。サンプルはすべて次世代シーケンサーにより冗長性を確認しながら解析を行った。

その結果、未分化時において、骨格筋特異的遺伝子はそのプロモーターや制御領域が特異的に結合していることが明らかとなった。予期されていたランダムな結合はむしろほとんどなく核内では、ある特定領域の極めて選択的な染色体結合が観測されている。一方で、マウス胚の発生後期で筋の成熟が進むにつれてこれら結合や近接現象は、プロモーター領域では消失する一方で、genebody 領域での結合がクリアに検出された。これは、転写活性化につれて転写領域同士が近接していることを意味している。さらに、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。さらに、現在単離した核を用いた解析により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。

次に、遺伝子集積に関与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。これまでに我々は、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ていたが、特に、CHD2 タンパク質について、更に詳細な複合体同定をめざし解析を進めている。

現在までに CHD2 はヒストンバリエーションの一つである 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 バリエーションであったことを明らかにしている。さらにこれらに特異的な抗体を作出しゲノム上の存在領域を ChIP-seq によりマップしたところ、プロモーター領域選択的な取り込みが検出されている。引き続き本プロジェクトの展開を進めている。

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 16 件)

1. Shiota M, Saiwai H, Mun S, Harada A, Okada S, Odawara J, Tanaka M, Iwao H, Ohkawa Y. Generation of a rat monoclonal antibody specific for heat shock cognate protein 70. *Hybridoma*. 2010 Oct;29(5):453-6.
2. Okada S, Maeda T, Saiwai H, Ohkawa Y, Shiba K, Iwamoto Y. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the lumbar spine: a case series. *Neurosurgery*. 2010 Nov;67(5):1311-8; discussion 1318.
3. Okada S, Saiwai H, Kumamaru H, Kubota K, Harada A, Yamaguchi M, Iwamoto Y, Ohkawa Y. Flow cytometric sorting of neuronal and glial nuclei from central nervous system tissue. *J Cell Physiol*. 2011 Feb;226(2):552-8.
4. Xiao H, Leblanc SE, Wu Q, Konda S, Salma N, Marfella CG, Ohkawa Y, Imbalzano AN. Chromatin accessibility and transcription factor binding at the PPAR γ 2 promoter during adipogenesis is protein kinase A-dependent. *J Cell Physiol*. 2011 Jan;226(1):86-93.
5. Kotani M, Harada A, Odawara J, Azuma M, Okada S, Nishiyama Y, Nakamura M, Tachibana T, Ohkawa Y. Monoclonal

- antibody specific for Dhx9/NDHII/RHA. Hybridoma. 2010 Jun;29(3):259-61.
6. Harada A, Ohkawa Y, Ao S, Odawara J, Okada S, Azuma M, Nishiyama Y, Nakamura M, Tachibana T. Rat monoclonal antibody specific for MyoD. Hybridoma. 2010 Jun;29(3):255-8.
 7. Yoshimura S, Harada A, Odawara J, Azuma M, Okada S, Nakamura M, Ohkawa Y, Tachibana T. Rat monoclonal antibody specific for the chromatin remodeling factor, CHD1. Hybridoma. 2010 Jun;29(3):237-40.
 8. Harada A, Yoshimura S, Odawara J, Azuma M, Okada S, Nakamura M, Tachibana T, Ohkawa Y. Generation of a rat monoclonal antibody specific for CHD2. Hybridoma. 2010 Apr;29(2):173-7.
 9. Mallappa C, Nasipak BT, Etheridge L, Androphy EJ, Jones SN, Sagerström CG, Ohkawa Y, Imbalzano AN. Myogenic microRNA expression requires ATP-dependent chromatin remodeling enzyme function. Mol Cell Biol. 2010 Jul;30(13):3176-86.
 10. Saiwai H, Ohkawa Y, Yamada H, Kumamaru H, Harada A, Okano H, Yokomizo T, Iwamoto Y, Okada S. The LTB4-BLT1 axis mediates neutrophil infiltration and secondary injury in experimental spinal cord injury. Am J Pathol. 2010 May;176(5):2352-66.
 11. Yoshimura S, Yoshimi T, Ohkawa Y, Azuma M, Tachibana T. A rat monoclonal antibody against the chromatin remodeling factor CHD5. Hybridoma. 2010 Feb;29(1):63-6.
 12. Harada A, Okada S, Odawara J, Kumamaru H, Saiwai H, Aoki M, Nakamura M, Nishiyama Y, Ohkawa Y. Production of a rat monoclonal antibody specific for Myf5. Hybridoma. 2010 Feb;29(1):59-62.
 13. Ohkawa Y, Harada A, Nakamura M, Yoshimura S, Tachibana T. Production of a rat monoclonal antibody against Brg1. Hybridoma. 2009 Dec;28(6):463-6.
 14. Okada S, Harada A, Saiwai H, Nakamura M, Ohkawa Y. Generation of a rat monoclonal antibody specific for Brm. Hybridoma. 2009 Dec;28(6):455-8.
 15. Harada A, Okada S, Saiwai H, Aoki M, Nakamura M, Ohkawa Y. Generation of a rat monoclonal antibody specific for Pax7. Hybridoma. 2009 Dec;28(6):451-3.
 16. Okada S, Maeda T, Ohkawa Y, Harimaya K, Saiwai H, Kumamaru H, Matsumoto Y, Doi T, Ueta T, Shiba K, Iwamoto Y. Does

ossification of the posterior longitudinal ligament affect the neurological outcome after traumatic cervical cord injury? Spine. 2009 May 15;34(11):1148-52.

[学会発表] (計 5 件)

1. 大川 恭行 「Spatial re-organization of regulatory sequences temporally controls gene expression」BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010. 12. 9. 神戸ポートアイランド
 2. 原田 哲仁・大川 恭行 「Chd2 interacts with H3.3 to determine cell fate in myogenesis.」BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010. 12. 9. 神戸ポートアイランド
 3. 小田原 淳・大川 恭行 「ES specific transcription factors functions with the SWI/SNF chromatin remodeling factor CHD2 in Embryonic stem cells.」BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010. 12. 9. 神戸ポートアイランド
 4. 原田哲仁, 大川恭行 「CHD2は骨格筋分化運命決定する」第61回 日本細胞生物学会大会2009. 6. 3. 名古屋国際会議場
 5. Yasuyuki Ohkawa, Akihito Harada and Anthony Imbalzano. 「Spatial re-organization of regulatory sequences in myogenesis.」第32回 日本分子生物学会年会2009. 12. 10. パシフィコ横浜
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・特別准教授
研究者番号 : 8 0 4 4 8 4 3 0