

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770235

研究課題名（和文） マウス初期胚発生に伴うヘテロクロマチン形成の分子基盤

研究課題名（英文） Mechanism of heterochromatin formation during early mouse development

研究代表者

平谷 伊智朗（HIRATANI ICHIRO）

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究者番号：40583753

研究成果の概要（和文）：

受精数日後、マウス胚が子宮に着床した直後の時期にゲノム（染色体）上の広範囲にヘテロクロマチンが形成されることが先行研究により示唆された（ヘテロクロマチン=遺伝子発現が不活性化されて染色体が凝縮した領域）。本研究ではこの現象を司る遺伝子を同定し、その意義を解明しようと試みた。候補遺伝子をリストアップし、それらの機能阻害によりヘテロクロマチン形成への関与を調べた所、強い活性を示す未知の遺伝子を4つ見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Earlier studies suggested that an extensive heterochromatin formation takes place throughout the genome in post-implantation mouse embryos (heterochromatin: condensed chromosome regions with transcriptionally inactive genes). To explore its significance, we set out to identify genes involved in this heterochromatinization process. A list of candidate genes was generated and we asked whether suppression of any of these candidate genes could disrupt heterochromatin formation. This led to the identification of four novel genes involved in this process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：核構造、クロマチン

1. 研究開始当初の背景

私の大きな研究目標は、発生過程における細胞の未分化状態から分化状態へのグローバルな核内染色体構造変化の分子基盤の解明である。これまでの研究により、私はこのような大きな構造変化の時期、即ち大規模にヘテロクロマチンが形成されるマウス初期胚発生時期が post-implantation epiblast の時期であることを明らかにした。さらに、この時期に常染色体上に広く形成される条件的ヘテロクロマチンはその形成時期及び様

式が雌X染色体不活性化と類似しており、両者の分子基盤が一部重複する可能性が示唆された。X染色体不活性化は検出の簡便性が大きな利点である。本研究ではこの利点を生かすために、この分子基盤重複仮説の検証という形を取りながら、post-implantation epiblast の時期に起きる条件的ヘテロクロマチン形成とその安定的維持の分子基盤を明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

本研究の大きな目的は、post-implantation epiblast の時期に起きる条件的ヘテロクロマチン形成とその安定的維持の分子基盤と生物学的意義を明らかにすることである。その第一歩として、その分子基盤を規定する因子のスクリーニングを行う。しかし、常染色体上で起きる条件的ヘテロクロマチン形成は可視化に手間がかかり、スクリーニングの指標としては適当でない。一方、雌X染色体不活性化は、その表現型の実験的可視化が容易である。そこで前述の仮説に立脚して、この分子基盤を解明するための足がかりとして雌X染色体不活性化を用いる。具体的には、まず、(1) ゲノムワイド shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングによって雌X染色体不活性化に関与する遺伝子群を網羅的に同定する。その上で、(2) 得られた遺伝子群を (i) X染色体不活性化に特異的に機能する因子と (ii) X染色体不活性化と常染色体上に点在する条件的ヘテロクロマチン形成の両方に機能する因子、の2種類に分類し、(3) 分類結果や得られた個々の遺伝子の機能解析から、常染色体上に点在するヘテロクロマチン領域と不活性X染色体の維持・形成の分子基盤の共通性と特異性を包括的に理解する。

3. 研究の方法

(1) ゲノムワイド shRNA ライブラリーを用いた雌X染色体不活性化に関与する遺伝子群の網羅的同定
まず前述の通り、雌X染色体不活性化に関与する遺伝子群の網羅的同定を本研究の起点とする。本研究では不活性X染色体を持つ雌EC (Embryonic Carcinoma) 細胞株MC 1 2 を shRNA スクリーニングの材料に用いる。EC 細胞は多能性を持つ細胞でありながら不活性X染色体を持つ点で三胚葉に分岐する直前のEpiSC細胞によく似ており、不活性X染色体を形成して間もない発生段階のよいモデルとなる。都合のよいことに、MC 1 2 細胞はその不活性X染色体にのみ機能的なHprtを持つことから薬剤スクリーニングが可能となる。即ち、MC 1 2 細胞の不活性X染色体が再活性化された場合はHprt 遺伝子が発現開始し、HAT (Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine) 存在下で薬剤耐性となるため生存可能となる。一方、不活性X染色体を維持したMC 1 2 細胞はHprt 遺伝子のみを発現するためHAT 存在下で薬剤致死となる。スクリーニングにはマウス全1万6千遺伝子を約8万 shRNA クローンで網羅する

レンチウイルスのゲノムワイド shRNA ライブラリー [Sigma MISSION® LentiPlex™ Mouse Pooled shRNA Library] を用いる。この shRNA ライブラリーをMC 1 2 細胞に導入し、HAT 存在下で生存・増殖する薬剤耐性細胞クローン (=不活性X染色体が再活性化されている) を回収する。これらのクローンのゲノムDNAを抽出して shRNA 両端の共通配列を用いたPCRによる増幅DNA断片をシーケンシングすることで各クローンに導入されていた shRNA を同定する。この一連の操作により雌X染色体不活性化に関与する遺伝子群の網羅的同定を行う。陽性及び偽陽性クローンが多い場合は、最終的なシーケンシングをハイスループット (=次世代シーケンサーやマイクロアレイを用いる) に行うことでスクリーニングの効率化を計る。

(2) 得られた遺伝子群の分類と各遺伝子の機能解析

得られた候補遺伝子群に関しては、MC 1 2 細胞を用いてまずHprtの発現以外のX染色体再活性化の指標 (X染色体の複製タイミング、H3K27me3 免疫染色、Xist RNA FISH) でX染色体再活性化を再確認する。確認できた遺伝子群に関しては次にMC 1 2 細胞の常染色体への影響を調べる。即ち、常染色体上で不活性X染色体同様の複製タイミング制御を受けるいくつかの領域について、siRNA 発現に伴いその複製タイミングがlate Sからearly Sにリセットされているか、あるいはFISHによりその核内配置が核膜周辺から核内部へと移動しているかを調べる。これにより、常染色体上の条件的ヘテロクロマチン領域の「維持」に対する影響を明らかにする。また、siRNAにより各遺伝子をノックダウンしたES細胞を分化誘導することで、それらの遺伝子産物が不活性X染色体と常染色体上の条件的ヘテロクロマチンの「形成」に関与しているか否かを調べる。この一連の解析により、候補遺伝子群を (i) X染色体不活性化に特異的に機能する因子と (ii) X染色体不活性化と常染色体上に点在する条件的ヘテロクロマチン形成の両方に機能する因子、の2種類に分類する。さらに、条件的ヘテロクロマチンの「形成」と「維持」の両方に関与する遺伝子群と片方のみに関与する遺伝子群を明らかにしていくことで、最終的には常染色体上に点在する条件的ヘテロクロマチン領域と不活性X染色体の維持・形成の分子基盤の共通性と特異性を包括的に理解する。

4. 研究成果

(1) ゲノムスケール shRNA ライブラリーを用いた雌 X 染色体不活性化に関与する遺伝子群の網羅的同定
方法欄に書いた通り、当初は Sigma 社製の MISSION® LentiPlex™ Mouse Pooled shRNA Library の利用を考えていた。他に選択肢が無いと思っていたからである。しかし、その後 Collecta 社製のレンチウイルス型マウス shRNA ライブラリーの存在を知り、これを利用することを思い立った [Collecta Custom DECIPHER 27K Lentiviral shRNA Library Plasmid, Mouse Module 1 および Module 2]。Module 1 と Module 2 は共に 27,500 種類の shRNA から構成され、それぞれ 4625、4520 種類の遺伝子を標的とするため (≒ 約 6 shRNA/遺伝子)、合計 9145 個のマウス遺伝子の shRNA をスクリーニングすることになる。多少時間を要したものの、このライブラリーを用いたスクリーニングの実験系を確立した。何よりも次世代シーケンサーを用いてハイスループットにスクリーニングが可能となったことは大きなブレイクスルーであった。実際にまず Module 1 ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。MC 1 2 細胞に感染させて 4 日後から 1 週間 HAT 選択を行い、HAT 耐性を獲得した細胞をプールとして得た (≒ 独立した 2 つの実験群を得た)。これと 4 日目 (≒ HAT 選択直前) に回収したコントロール群の合計 3 群それぞれからゲノム DNA を抽出し、各 shRNA 配列特異的なバーコード配列の両端にある共通配列をプライマーとして PCR を行い、その PCR 産物を次世代シーケンサーにより大規模配列解析した。その結果、実験群 2 群に共通して多く含まれている導入 shRNA 配列を数多く同定し、統計処理によりランク付けを行い、これらの遺伝子をリストアップした。一方、Module 1 には Hprt shRNA が含まれていた。このうち 3 つがリストの最後尾 100 位以内に 3 つも入っており、Hprt は Module 1 に含まれる遺伝子の中で最も低いランクの遺伝子であると言えた。Hprt をノックダウンすると HAT 耐性獲得の可能性はゼロになる。従って、Hprt が最低ランクであることは極めて reasonable であり、スクリーニング結果の信頼性が高いことが示唆された。今後はリスト上位の遺伝子群について解析を進めていく。

(2) 候補遺伝子の siRNA スクリーニングによる雌 X 染色体不活性化に関与する遺伝子群の同定

ゲノムスケール shRNA ライブラリーの選択とこれを用いた実験系の確立に当初の予想以上に時間がかかった。そこで、候補遺伝子の siRNA スクリーニングも並行して行った。ま

ず、遺伝子発現プロファイルから候補遺伝子をリストアップした。即ち、MC 1 2 が稀に自発的に不活性 X を再活性化し HAT 耐性を獲得する特性を生かし [Yoshida, 2002 Cytogenet Genome Res]、X 染色体再活性化後の状態を安定維持するクローン (= HAT 耐性 MC 1 2 クローン) を複数単離した。不活性化状態を維持するクローン (= 6 TG 耐性 MC 1 2 クローン) も複数単離した。不活性 X を維持する 6 TG 耐性 MC 1 2 クローンにおいて、HAT 耐性 MC 1 2 クローン (= 不活性 X 再活性化) と比べて 2 倍以上発現レベルの高い遺伝子を不活性 X 維持に関与する候補遺伝子とみなし、候補のリスト最上位 6 8 個の遺伝子について、不活性 X の解除を指標に siRNA スクリーニングを行った。いくつかの試行錯誤ののち、弱いながらも HAT 存在下での細胞生存率を上昇させる (= HAT 耐性獲得促進 = 不活性 X 上の Hprt 再活性化) 1 2 個の候補遺伝子 siRNA を得た。

(3) 不活性 X 染色体維持に必要な 4 つの候補遺伝子の同定

前述 (2) の 1 2 個の siRNA が MC 1 2 の不活性 X の S 期後期複製の解除を引き起こすか否かを細胞遺伝学的 (cytogenetic) に解析した。不活性 X の S 期後期複製の割合を調べた所、コントロール siRNA の時にはほぼ 100% だった S 期後期複製の割合を顕著に低下させる siRNA を 4 つ同定した。4 つの siRNA はいずれも不活性 X の S 期後期複製の割合を 60% 以下に低下させるため、その活性はかなり強いと考えている。実はこれまで文献的にこのような因子は一つも見つかっていない。それが一度に 4 つも同定出来たことはかなり上出来である。いずれも X 染色体不活性化への関与どころか分子機能のほとんど分かっていない因子であり、今後の展開にとっても期待が持てる。

(4) 不活性 X 染色体と常染色体の一部が協調制御される可能性

先に挙げた 4 つの因子について、これらの siRNA によって常染色体上の条件的ヘテロクロマチンが解除されるか否かを検討した。常染色体上の条件的ヘテロクロマチンドメインの核内配置を調べた所、驚くべきことに MC 1 2 への siRNA 導入によってドメインは核膜周辺から核内部へと移行した。この結果は siRNA による条件的ヘテロクロマチン解除を示唆しており、不活性 X 染色体と常染色体の一部が協調制御されるとする仮説を支持した。

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4件)

(1)

著者名: Shang WH, Hori T, Martins NM, Toyoda A, Misu S, Monma N, Hiratani I, Maeshima K, Ikeo K, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw WC, Fukagawa T

論文標題: Chromosome engineering allows the efficient isolation of vertebrate neocentromeres

雑誌名: *Developmental Cell*

査読の有無: 有

巻: 24

発行年: 2013

頁: 635-648

DOI: 10.1016/j.devcel.2013.02.009

(2)

著者名: Pope BD, Tsumagari K, Battaglia D, Ryba T, Hiratani I, Ehrlich M, Gilbert DM
論文標題: DNA replication timing is maintained genome-wide in primary human myoblasts independent of D4Z4 contraction in FSH muscular dystrophy

雑誌名: *PLoS One*

査読の有無: 有

巻: 6

発行年: 2011

頁: e27413

DOI: 10.1371/journal.pone.0027413

(3)

著者名: Ryba T, Hiratani I, Sasaki T, Battaglia D, Kulik M, Zhang J, Dalton S, Gilbert DM

論文標題: Replication timing: a fingerprint for cell identity and pluripotency

雑誌名: *PLoS Computational Biology*

査読の有無: 有

巻: 7

発行年: 2011

頁: e1002225

10.1371/journal.pcbi.1002225

(4)

著者名: Ryba T, Battaglia D, Pope BD, Hiratani I, Gilbert DM

論文標題: Genome-scale analysis of replication timing: from bench to bioinformatics

雑誌名: *Nature Protocols*

査読の有無: 有

巻: 6

発行年: 2011

頁: 870-895

DOI: 10.1038/nprot.2011.328

[学会発表] (計3件)

(1)

発表者名: 平谷 伊智朗

発表標題: Developmental regulation of nuclear genome organization

学会等名: RSC Publishing-iCeMS Joint International Symposium "*Cell-Material Integration and Biomaterials Science*"

(国際シンポジウム)

発表年月日: 2013年3月18日~3月19日

発表場所: 京都 (京都大学医学部芝蘭会館)

(2)

発表者名: 平谷 伊智朗

発表標題: Developmental regulation of nuclear genome organization

学会等名: 第35回 日本分子生物学会年会

発表年月日: 2012年12月11日~12月14日

発表場所: 福岡 (福岡国際会議場・マリメッセ福岡)

(3)

発表者名: 平谷 伊智朗

発表標題: Global genome reorganization revealed by genome-wide DNA replication timing analysis: exploring its significance during early stages of mouse development

学会等名: 第34回 日本分子生物学会年会

発表年月日: 2011年12月13日~12月16日

発表場所: 横浜 (パシフィコ横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平谷 伊智朗 (HIRATANI ICHIRO)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究者番号: 40583753