

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 2 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790329
研究課題名（和文） iPS 細胞の多能性を制御するヒストン修飾と高次クロマチン構造の解析
研究課題名（英文） Analysis of Histon modification and higher-order structure that regulate pluripotency of iPS cells
研究代表者
曾根 正光（SONE MASAMITSU）
京都大学・iPS 細胞研究所・研究員
研究者番号：90599771

研究成果の概要（和文）：我々は網羅的な解析手法を用い、特定の遺伝子の発現制御領域のクロマチン構造が、体細胞と iPS 細胞で異なっていることを発見した。それが多分化能をもたらす重要な分子基盤となっている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Using a high-throughput analysis, we revealed that chromatin architectures in the promoter regions of specific genes are different between somatic cells and iPS cells. It may indicate important molecular mechanisms for acquisition of pluripotency.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医科学一般

科研費の分科・細目：その他

キーワード：クロマチン高次構造 ヒストン修飾 iPS 細胞 多能性幹細胞 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

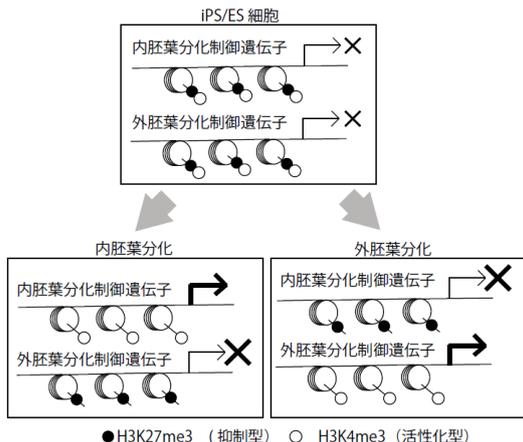
(1) 体細胞に少数の遺伝子を導入することによって得られる iPS 細胞は ES 細胞と同等の多分化能を持ち、再生医療への応用が強く期待されている。

(2) iPS 細胞の多分化能の基盤となっているのが、ES や iPS 細胞といった多能性幹細胞に特徴的なクロマチン構造である。これらの細胞の染色体は全体的にユークロマチン様の開いた構造を取り、広範にわたって転写活性が高い。

(3) 多能性幹細胞においては細胞分化の制御に重要な役割を果たす遺伝子群の発現が選択的に抑制されている事が最近明らかになってきた。クロマチン免疫沈降法(ChIP)に基づく網羅的なエピゲノム解析(ChIP-chip, ChIP-Seq)によれば、これらの遺伝子のプロ

モーター領域のヒストン H3 が、転写活性化に関連するメチル化と転写抑制に関連するメチル化の両方の修飾を受けるバイバレントと呼ばれる状態となり、全体としてはこれらの遺伝子の転写が負に制御されている。これは、外部刺激に応じてバイバレントヒストン H3 の一方の修飾を外す事により、転写を速やかに活性化あるいは完全に不活性化し、多能性幹細胞が分化の方向性を決定するのに重要であると考えられている(図 1)

しかしながら、(2)と(3)の間にはどのような関係性があるか明らかにはなっていない。



● H3K27me3 (抑制型) ○ H3K4me3 (活性化型)
 図1: バイバレントヒストン修飾は多能性幹細胞の分化方向性の決定に重要な役割を果たす。

2. 研究の目的

(1) 核内においてクロマチンは高度に秩序だった折り畳み構造を取っており、遺伝子の発現と密接な関係がある。これまで、電子顕微鏡や抗体染色による観察から iPS 細胞誘導によってその構造が体細胞から大きく変化することが分かっているが、実際にはどういった遺伝子座がどのように変化するのか明らかではない。

(2) 本研究では網羅的なクロマチン構造変化が各遺伝子単位で明らかすることを目的とした。また、それにより iPS 細胞のクロマチン高次構造がバイバレントヒストン修飾や遺伝子発現をどのように制御しているのかについて示唆を得ることができると考えた。

(3) 本研究で得られた結果が、質の高い iPS 細胞の効率的な誘導法や iPS 細胞の多能性評価法の確立など、iPS 細胞の臨床応用に貢献することも視野に入れ、研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサー（高速 DNA 塩基配列決定装置）を用い、異なる DNA 領域が物理的近傍に存在し相互作用をする頻度を計測した (Hi-C 法)。それにより、マウスの繊維芽細胞と多能性幹細胞 (iPS/ES 細胞) の核内におけるクロマチンの立体構造を全ゲノムレベルで解析した。

(2) Hi-C 法と同様に、異なる DNA 領域間の相互作用頻度を計測できるが、特定の領域に絞って解析を行う 3C-Seq という手法を新たに開発し、多能性幹細胞において特徴的なヒストン修飾が見られる遺伝子の発現制御領域のクロマチン立体構造を集中的に解析した。

4. 研究成果

(1) Hi-C 法と呼ばれる手法を用い、マウスの繊維芽細胞と多能性幹細胞 (iPS/ES 細胞) のクロマチン高次構造を全ゲノムレベルで解析した結果、多能性幹細胞の染色体は体細胞に比べ、異なる染色体間での相互作用の頻度が高いことが分かった (図2)。

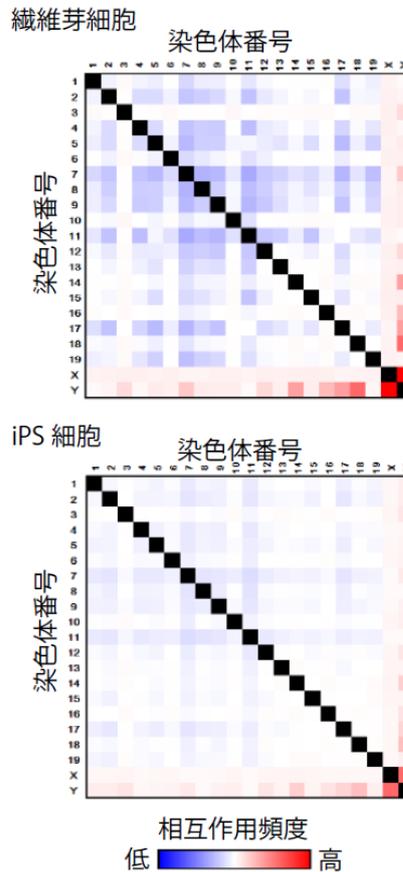


図2 異なる染色体同士の相互作用の頻度を表したものの

また、体細胞、多能性幹細胞とも DNA 領域間の一次配列上の距離が大きくなればなるほど相互作用の頻度が低下するという性質があるが、多能性幹細胞では繊維芽細胞に比べてその性質が弱く、より遠くの領域間でも相互作用をしているということが分かった (図3)。これらの結果は多能性幹細胞の染色体は自由に状態変化することのできる動的な性質を持つことを示唆する。

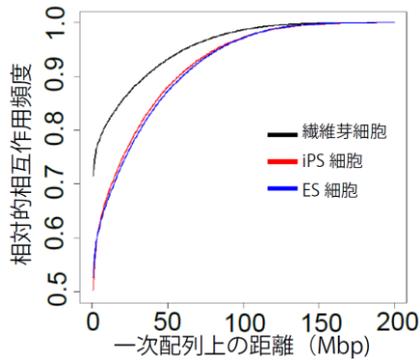


図3 DNA一次配列上の距離と相互作用の頻度をプロットしたもの

一方でそれぞれの染色体内における大まかな折りたたみのパターンは、体細胞と多能性幹細胞の間で非常に似通っていることも分かった(図4)。

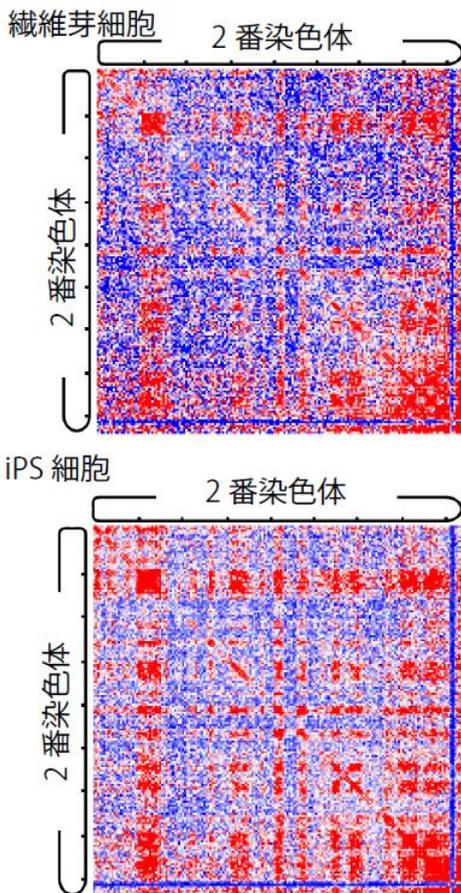


図4 繊維芽細胞と iPS 細胞の染色体内の相互作用の頻度を表したものの(例として2番染色体を挙げている)

こうした事実は、従来の電子顕微鏡観察などでは得られなかったものであり意義深い。しかし、Hi-C法は全ゲノムを解析するため、上記のような大局的な構造を捉えることには優れているが、個別のプロモーター領域など

の局所的な立体構造まで明らかにするには非現実的なデータ量が必要であることが分かった

(2) さらにバイバレント修飾とクロマチン高次構造の関係性についてアプローチするため、特定の染色体領域の構造を集中的に解析することのできる3C-Seqという手法を開発した。本手法では従来広く用いられてきた同様の手法に比べて実験的なバイアスが低く抑えられるよう工夫した。そして、3C-Seqを用いてヒトの繊維芽細胞とiPS細胞の遺伝子プロモーター領域の構造を解析したところ、バイバレント修飾を受けることが知られる遺伝子プロモーターのクロマチン構造が繊維芽細胞とiPS細胞で異なることを示すデータが得られた(図5)。

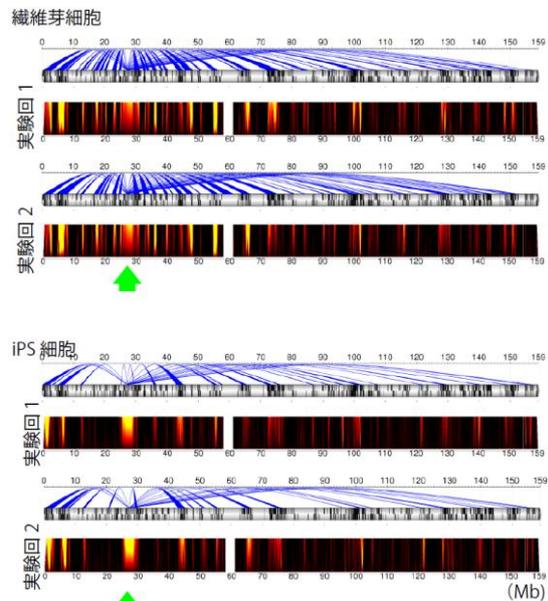


図5 ある遺伝子のプロモーター領域(緑矢印)とその遺伝子の存在する染色体全体との相互作用頻度を図示したもの。ヒートマップにおいて明るい色は相互作用頻度が高いことを示す。

今後、こうした解析を発展させることで多能性を獲得する上で重要なクロマチン高次構造を見出すことが出来るものと期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

① 池田宏輝、曾根正光、山中伸弥、山本拓也

Hi-C Seq を用いた iPS 細胞における染色体高次構造の決定

NGS 現場の会：第 1 回研究会

平成 23 年 5 月 28 日、静岡

② 池田宏輝、曾根正光、山中伸弥、山本拓也

Analysis of Chromosome Conformation in Induced Pluripotent Stem Cells by 3C Method

第 63 回日本細胞生物学会大会

平成 23 年 6 月 15 日、北海道

③ 池田宏輝、曾根正光、山中伸弥、山本拓也

Genome wide analysis of chromosome conformation in pluripotent stem cells by Hi-C

第 34 回 日本分子生物学会

平成 23 年 12 月 13 日、横浜

④ 池田宏輝、曾根正光、山中伸弥、山本拓也

GLOBAL ANALYSIS OF HIGHER-ORDER CHROMATIN STRUCTURE IN PLURIPOTENT STEM CELLS

International Society of Stem Cell

Research 10th Annual Meeting

平成 24 年 6 月 14 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾根 正光 (SONE MASAMITSU)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員

研究者番号：90599771

(2) 研究協力者

池田 宏輝 (IKEDA HIROKI)

京都大学・医学研究科・博士後期課程

蒲田 未央 (KABATA MIO)

京都大学・iPS 細胞研究所・技術補佐員