

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24247002

研究課題名(和文)クロマチンループ構造変換による組織特異的 Shh 発現制御システム

研究課題名(英文)Transcriptional regulation of Shh via chromosomal dynamics

研究代表者

城石 俊彦(Shiroishi, Toshihio)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90171058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：Shh遺伝子座をモデルとして組織特異的エンハンサーによる発現制御機構の解析を行った。次世代シーケンサーによる解析では、染色体相互作用の土台となりうる分子の結合分布パターンを明らかにすることができ、さらに、Shh遺伝子と近傍の遺伝子で異なる相互作用パターンを示すことが明らかになった。また、Shhの喉頭エンハンサーの脊椎動物種間の比較では、系統的な配列保存性の境界を見だし、硬骨魚類の一群が、陸生動物とは異なる新たな内胚葉エンハンサーを進化させたことがわかった。

研究成果の概要(英文)：The Shh locus provides a good model to study gene regulatory by tissue-specific enhancers residing at very remote regions from the Shh promoter. Our next-generation sequencing analysis revealed dynamic chromosomal architecture around the Shh locus, which is possibly responsible for the promoter-enhancer interactions in the mouse embryo. We also demonstrated different sizes of interactome between the Shh gene and neighboring genes or genomic segments. In addition, we found a phylogenetic boundary of evolutionary conservation of a larynx Shh enhancer by genome comparison among different vertebrate species. Euteleost has evolved a novel endodermal enhancer that functionally corresponds to the larynx enhancer in terrestrial animals.

研究分野：哺乳類遺伝学

キーワード：遺伝子発現制御 染色体高次構造 エンハンサー 発生生物学 シジ制御配列の進化 Shh マウス

1. 研究開始当初の背景

発生関連遺伝子の時期・組織特異的な転写が、プロモーターから Mb オーダーで遠く離れた複数のエンハンサーで制御される例が知られている。それらの遠隔エンハンサーは、クロマチンループ形成という高次染色体動態でプロモーターに作用すると考えられている。遠隔エンハンサーとプロモーターの間には、発現様式を異にする別遺伝子が存在することがあり、それらの発現に影響を与えずにどのようなメカニズムで遠隔エンハンサーが対応する遺伝子のプロモーターに作用するのかは大きな謎である。

申請者らは、脊椎動物の形態形成に働く分泌性シグナルタンパク質をコードする *Sonic hedgehog (Shh)* 遺伝子を例にとり、遠隔エンハンサーの染色体動態による発現制御機構について研究を進めてきた。これまで、進化的保存性から四つの遠隔エンハンサー配列を *Shh* プロモーター上流の約 1 Mb に及ぶ長大な領域に同定した (図 1)。

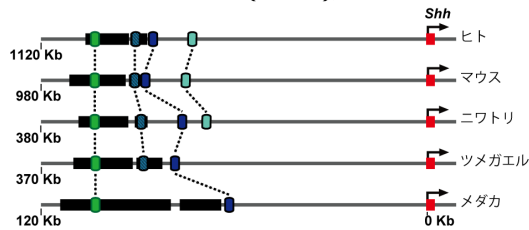


図 1 脊椎動物種間で階層的な進化的保存性を示す *Shh* エンハンサー。マウスでは、4 つの遠隔エンハンサーが *Shh* プロモーター上流の 500~1000 Kb の領域に存在する。肢芽エンハンサー: 緑、喉頭・肺・消化管エンハンサー: 青、口腔・咽頭エンハンサー: 赤、舌・歯エンハンサー: 黄。

また、三次元(3D)-FISH 法や Chromosome Conformation Capture (3C)法を駆使して、マウス胚の肢芽エンハンサーである MFCS1 配列が *Shh* を発現する肢芽でプロモーターに特異的に作用する高次染色体構造の変化を明らかにした。MFCS1 ノックアウトマウスの肢芽でも同様な染色体動態が観察されることから、高次染色体構造の変化には MFCS1 は不要であり、未知のシス配列とトランス因子が必要なことが示された。また、マウス胚で消化管上皮エンハンサー-MACS1 と肢芽エンハンサー-MFCS1 の二つの配列について 3D-FISH 法で解析したところ、各配列が組織特異的に独立した染色体構造変化によって *Shh* プロモーターと近接することを見出した。この結果は、各エンハンサーとプロモーターを作用させる組織特異的な分子メカニズムの存在を示している。

染色体上の離れた二点を結合してクロマチンループを形成するトランス因子として CCCTC-結合核タンパク質 CTCF が知られており、遠隔エンハンサーとプロモーターに結合した CTCF の二量体形成による染色体動態が提唱されている。最近、他の研究グループの実験で、マウス胚肢芽特異的な CTCF 欠損により、肢芽での *Shh* 発現が消失するという報告があった。これにより、CTCF による染色体動態を介した *Shh* 発現制御の可能性が高まった。しかし、*Shh* 遺伝子を含めて個

体レベルで CTCF を介した転写制御の研究は少なく、近隣の別遺伝子の転写が遠隔エンハンサーの作用を遮断する仕組みの実態も未知である。このように、遠隔エンハンサーによる転写制御メカニズムの全貌は謎に包まれている。

組織特異的な複数の遠隔エンハンサーが進化上どのように出現し、それらがどのように特徴的な形態進化に寄与したかも、たいへん興味深い問題である。申請者らは、各エンハンサー配列を個別に欠失した 4 つのマウスノックアウトシステムを作製して表現型を解析し、*Shh* 発現部位に対応した形態異常を観察した。両生類で出現した MACS1 配列のノックアウトマウスは、水棲から陸棲への転換時に出現した肺呼吸に必須の器官である喉頭に限局した形成異常が認められた。また、魚類から哺乳類まで存在する MFCS4 と爬虫類で出現した MRCS1 は、マウス胚の歯プラコードでの *Shh* 発現を誘導するが、MRCS1 欠損でのみ軽微な歯発生異常を示す。この結果は、歯の発生が二つのエンハンサーの重層化で生じた可能性を示している。新規エンハンサー出現に伴い染色体動態がどのように進化してきたかも本研究の課題の一つである。

2. 研究の目的

(1) 染色体動態を介して遠隔エンハンサーが組織特異的な *Shh* 発現を制御する分子メカニズムの解明を目指して、CTCF 遺伝子の条件的ノックアウトマウスの染色体動態解析により、クロマチンループ形成における CTCF の機能を解析する。また、マウスの *Shh* 発現組織間で *Shh* 領域全体のクロマチンループ構造を比較解析し、染色体動態の組織特異性の分子的基盤を解明する。

(2) 進化過程における *Shh* 発現制御に係わる遠隔エンハンサーの出現と脊椎動物の形態進化の関連を明らかにする。肺呼吸に働く器官である喉頭や、歯の発生を例に取り、階層的なエンハンサーの出現に対応した特徴的な形態進化を実証する。さらに、それらの基盤となる染色体動態の進化的変遷を解明する。

3. 研究の方法

(1) 染色体動態を介した複数の遠隔エンハンサーによる組織特異的な *Shh* 発現制御システムの解明

国際連携による「ENCODE Project」の成果として、CTCF がヒトゲノムの *Shh* プロモーターとその上流 1 Mb の領域の数力所に *Shh* 遠隔エンハンサーを挟むような位置で結合するデータが公開されている (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>)。申請者らの予備的実験では、マウス胚肢芽組織を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) で、CTCF の *Shh* プロモーター近傍への結合を確認している。そこで、CTCF 二量体形成の違いが組織間でのクロマチンループ形成の違いの原因

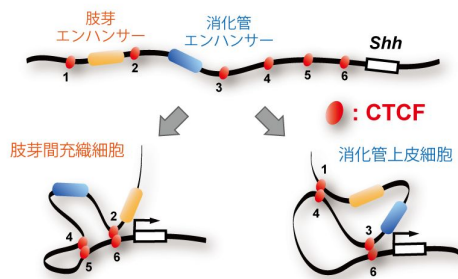


図2 クロマチンループ構造変換による遺伝子発現制御モデル。CTCF 二量体形成パターンの違いによるクロマチンループ構造の違いが、*Shh* 発現制御にかかわる可能性をノックアウトマウスの機能解析や4C法などの染色体構造解析で明らかにする。

となっていることを検証する(図2)。このため、CTCF 遺伝子の組織特異的ノックアウトマウスを用いて CTCF が染色体動態へ直接関与することを調べる。また、Circular Chromosome Conformation Capture (4C)法により、*Shh* プロモーター近傍の CTCF と相互作用して染色体動態に関与する CTCF 結合配列を、*Shh* 上流 1 Mb 領域で体系的に探索する。

染色体動態における CTCF の機能解析

申請者らは、CTCF 開始メチオニンを含む exon を loxP 配列で挟んだ 条件的ノックアウトマウスを独自に作製した。このマウスに *Prx1* プロモーターに Cre を繋いだ Transgenic (Tg)マウスを交配して、*Shh* 発現細胞を含む肢芽特異的に CTCF を欠損させ、そこでの *Shh* 発現を解析する。また、3D-FISH 法で MFCS1 と *Shh* プロモーターの相互作用を調べる。この時、肢芽発生異常による副次的効果を除くため、Tg 導入の *Shh* 発現により正常発生を示す肢芽を用いて染色体動態を解析する。

肢芽特異的 CTCF 欠損において MFCS1 と *Shh* プロモーターのクロマチンループ形成不全が確認されたら、薬剤(タモキシフェン)誘導型の pCAGGS-CreERT2 マウスとの交配によって消化管上皮等でも CTCF を欠損させ、各組織での染色体動態における CTCF の機能を明らかにする。

4C 法によるクロマチンループ形成に関わる相互作用部位(インタラクトーム)の解析

3C 法の発展型である 4C 法では、染色体構造変化による既知の領域と相互作用する未知ゲノム領域を同定することができる。本手法は肢芽細胞を用いた予備的実験により申請者らの研究室ですでに確立されている。本研究では、*Shh* プロモーター配列やその近傍で CTCF の結合が確認されている DNA 断片を既知配列にして、肢芽間充織の *Shh* 発現細胞を対象にして 4C 法で解析し、既知領域と相互作用する配列を探索する。これにより *Shh* プロモーターがどのゲノム領域と相互作用して三次元クロマチンループ構造を形成しているかを体系的に調べる。

染色体動態に必要な未知のシス因子の探索

Acheiropodia は四肢先端の形成異常を示す。患者ゲノムは肢芽エンハンサーMFCS1 近

傍に欠失を持ち、その領域に CTCF 結合配列がマップされている。申請者らは、マウス MFCS1 を含む BAC DNA に GFP レポーターを挿入したコンストラクトをマウスゲノムに導入して内在性 *Shh* 発現を再現するレポーター発現系を構築した。この系で Acheiropodia 患者と相同なマウスゲノム領域を欠失させた BAC DNA の Tg アッセイにより肢芽での GFP 発現の消失を確認しており、その領域が染色体動態に必要なことがわかっている。Acheiropodia 責任領域やマウス *Shh* 上流領域の多数の deletion シリーズを作製し、マウス個体で Tg アッセイを行って、CTCF 結合配列の有無にかかわらず、肢芽特異的 *Shh* 発現に必要なシス領域を体系的に探索する。候補領域については、BAC-DNA Tg アッセイでシス配列を同定し、それらが関与する染色体動態を 4C 法等で解析する。

(2) 階層的な *Shh* 遠隔エンハンサーの出現による形態進化と染色体動態の進化的変遷の解明

両生類で出現した MACS1 配列のノックアウトマウスは、肺呼吸に必須の喉頭に限局した形成不全を示す。また、魚類から哺乳類まで配列が保存される MFCS4 と爬虫類で出現した MRCS1 は協働して歯発生に働く可能性が示されている。そこで、階層的な遠隔エンハンサーの出現が形態進化に関わった可能性を検証する。さらに、口腔から喉頭の形態進化に伴って、染色体動態を介した転写調節システムがどのように進化変遷してきたかを明らかにする。

遠隔エンハンサーMACS1 の出現による喉頭器官の形態進化

マウス個体での Tg アッセイにより、マウス喉頭上皮でのレポーター発現制御に関わる配列を特定する。MACS1 配列には Fork-head domain を持つ転写因子 FoxA の結合配列が存在し、「ENCODE Project」の成果からヒトの相同領域への FoxA1 と FoxA2 の結合が推定されている。そこで、ChIP 法や EMSA 法でこれらの因子が MACS1 に結合することを検証する。

複数のエンハンサー(MFCS1 と MRCS1)の重層化と形態進化

申請者らは、Tg アッセイでマウス胚の歯ブラコードでの *Shh* 発現を誘導する二つの遠隔エンハンサー(MFCS4 と MRCS1)を含む 127 Kb のゲノム領域を欠失した染色体を Targeted Meiotic Recombination (TAMERE)法で作出した。交配実験により、この欠失染色体のホモ接合体作出し、歯ブラコードを中心とした口腔の表現型を X 線-マイクロ Computer tomography (CT)等を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) CTCF による *Shh* 発現制御システムの解明

CTCF・Cohesin 関連遺伝子の機能解析

Cre-loxP システムを用いた条件的ノックアウトマウスによる CTCF の機能解析のために、肢芽の間充織特異的なプロモーターであ

る pPrx1 によって Cre を発現するマウス、肢芽の表皮特異的なプロモーターである pMsx2 によって Cre を発現するマウス、ユビキタスプロモーターの pCAGGS 下で試薬誘導型 CreERT2 を発現するマウスの 3 系統新たに樹立した。pPrx1-Cre マウスと CTCF 条件的のノックアウトマウスの掛け合わせにより、四肢が欠損する表現型を確認した。

また、国際ノックアウトコンソーシアムより、Cohesin の複合体形成に必須の ESCO2 が条件的にノックアウトされた ES 細胞を入手し、ノックアウトマウスを作製した。この系統は、肢芽特異的 Cre マウスとの交配を行い、CTCF のノックアウトマウス同様の四肢欠損を確認した。

また、Cohesin の輸送に関わる Mau2 に関して、条件的ノックアウトアレルを有するマウス系統を樹立した。これらの解析は、CTCF・Cohesin が染色体高次構造を介した遺伝子発現制御をどのように行うのか理解するうえで非常に重要である。

さらに、肢芽と頭部から試料を調製し、CTCF、Mau2、Smc1a (Cohesin サブユニット) に対する抗体を用いて、ChIP-Seq 解析を行った。これらの次世代シーケンサーを用いた大規模な配列決定には、「ゲノム支援」のサポートを受けた。この ChIP-Seq の結果により、マウス胚組織における CTCF と Cohesin 関連タンパク質のゲノム上の分布を網羅的にマップすることができた。肢芽での *Shh* 発現に必須であることが知られている CTCF は、*Shh* 翻訳領域を挟むように上流 3.5 Kb と下流 6.5 Kb の位置にピークが認められた。また、肢芽エンハンサーの上流と下流 20 Kb に各々ピークが認められた。一方で、エンハンサーと *Shh* 翻訳領域の間の 800 Kb に及ぶインタージーン領域では、数個の低いピークが認められるだけであり、CTCF の結合は MFCS1・*Shh* 翻訳領域特異的であった (図 3)。CTCF はホモ二量体を形成することで、高次の染色体ループ構造の形成に寄与するため、*Shh* 遺伝子の翻訳領域と肢芽エンハンサー近傍の両方に強い CTCF の結合が認められたことは、このエンハンサーを介した *Shh* の転写活性化に CTCF が関与する可能性を強く示している。中でも、肢芽エンハンサーの上流 20 Kb に位置する CTCF 結合領域は、ヒトの四肢欠損を呈する常染色体劣性遺伝疾患である *Acheiropodia* の原因候補領域と一致しており、特に興味深い。



図 3 CTCF 抗体によるクロマチン免疫沈降サンプルに対して大規模配列解析を行い、明らかにされたマウス *Shh* 遺伝子座における CTCF の分布パターン。*Shh* 遺伝子と肢芽エンハンサー周辺に特異的なピークが観察される。

これら 4 か所の CTCF 結合サイトが *Shh* の発現と四肢の表現型にどのように影響を

与えるのか明らかにするために、ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 系を用いて、それぞれノックアウトしたマウス株を樹立した。

4C-Seq によるインタラクトーム解析

Shh プロモーターとその近傍の CTCF 結合領域をベイトとした 4C-Seq 法による解析の結果、*Shh* 翻訳領域と MFCS1 を含む 1 Mb 超の区画の中で高頻度に相互作用が起きていることが明らかになった。これは、*Shh* と MFCS1 が特定の染色体ループ構造を作って安定な結合をしているというよりも染色体上の機能的な区画の中で動的に相互作用を繰り返していることを示唆しており、我々が以前に報告した、肢芽エンハンサーと *Shh* プロモーターは断続的な相互作用を繰り返すというデータをよく支持していた。

また、*Shh* 近傍の *Lmbr1* のプロモーターは、*Shh* に比べてより小さな相互作用ドメインを形成しており、*Shh* 翻訳領域との相互作用はほとんど認められなかった。マウス肢芽において、*Shh* と *Lmbr1* は異なる発現パターンを呈するため、両者のプロモーター領域における排他的な相互作用ドメインの形成は、その発現の違いを生み出すのに必要である可能性がある。

(2) 進化過程における *Shh* 発現制御に係わる遠隔エンハンサーの出現

MACS1 エンハンサーの進化

喉頭・肺で機能する MACS1 の形態進化への寄与を明らかにするため、魚類での進化的保存性を追跡した。シーラカンス・ガンギエイ・ガーパイクから MACS1 オーツログを同定し、マウス胚を用いたレポータートランスジェニック法で発現解析を行った。これらの比較から肺呼吸の必要な陸生動物間には MACS1 の高度な保存性が認められるが、肺の代わりに鰓を有する硬骨魚類は、MACS1 の保存配列を失い、新たな内胚葉エンハンサーを進化させたことがわかった。

また、MACS1 と呼吸器官の形態進化との相関性を明らかにするため、主に条鰭類ゲノムを用い、サザンブロット解析によって MACS1 の保存性を検証した。その結果、呼吸器官の機能、形態進化がすすむ真骨魚類内に MACS1 保存性の境界を見いだした。

Shh エンハンサーの機能重層化

Shh 遺伝子座の上流 100 kb の領域に新規消化管エンハンサーである SLGE を同定し、国際誌に報告した。SLGE と MACS1 は発現制御領域の多くを共有しており、遺伝子発現調節の機能的重層化を考える良いモデルとなる。そこで、SLGE のノックアウトマウスを作製し、MACS1 ノックアウトマウスとの機能比較を行った。MACS1 の欠失は、喉頭に限局した形成異常を引き起こす一方で、SLGE の欠失は、顕著な表現型を示すことがなかった。

現在同定されている *Shh* の肺・消化管エンハンサーは、SLGE と MACS1 の二つのみである。エンハンサーの機能重層化の実態を明らかにするため、両者のダブルノックアウトマウスを作製した。マイクロ CT による形態解析の結果、ダブルノックアウトマウスで肺形成不全がみられた。しかし、*Shh* 翻訳領域のノックアウトマウスは、肺や上部消化管により重篤な欠損を示すことから、機能重複的な新規エンハンサーの存在が示唆された。エンハンサーの機能重層化をさらに包括的に理解する目的で、SLGE と MACS1 の間に存在する 650 Kb の長距離欠失マウスの作製を行った。

また、歯芽での機能的重複が確認されている MRCS1 と MFCS4 に関してダブル KO マウスを作製し、マイクロ CT を用いた観察により、歯の形成異常を明らかにした。

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 6 件)

1. Tamura M, Amano T and Shiroishi T. The Hand2 gene dosage effect in developmental defects and human congenital disorders. *Curr Top Dev Biol.* 110: 129-152 (2014)., doi: 10.1016/B978-0-12-405943-6.00003-8 査読なし。
2. Nabeshima Y, Washida M, Tamura M, Maeno A, Ohnishi M, Shiroishi T, Imura A, Razzaque MS, Nabeshima Y., Calpain 1 inhibitor BDA-410 ameliorates -klotho-deficiency phenotypes resembling human aging-related syndromes. *Sci. Rep.* 4: 1-7 (2014)., doi: 10.1038/srep05847., 査読有。
3. Tsukiji N, Amano T and Shiroishi T. A novel regulatory element for *Shh* expression in the lung and gut of mouse embryos. *Mech Dev* 131: 127-136 (2014)., doi: 10.1016/j.mod.2013.09.003、査読有。
4. Nikaido M et al., Amano T (21 番目/28), Shiroishi T (23 番目/28), Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land. *Genome Res.* 23: 1740-1748 (2013)., doi: 10.1101/gr.158105.113、査読有。
5. Tamura M, Hosoya M, Fujita M, Iida T, Amano T, Maeno A, Kataoka T, Otsuka T, Tanaka S, Tomizawa S, Shiroishi T. Overdosage of Hand2 causes limb and heart defects in the human chromosomal disorder partial trisomy distal 4q. *Hum Mol Genet* 22: 2471-2481 (2013)., doi: 10.1093/hmg/ddt099、査読有。

6. Anderson C, Williams VC, Moyon B, Daubas P, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Shiroishi T, Hughes SM, Borycki AG. Sonic hedgehog acts cell-autonomously on muscle precursor cells to generate limb muscle diversity. *Genes Dev.* 26: 2103-2117 (2012)., doi: 10.1101/gad.187807.112、査読有。

[学会発表](計 6 件)

1. 天野孝紀、城石俊彦、Regulatory elements for limb-specific expression of developmental genes in the coelacanth, 日本進化学会 第 16 回大会、2014 年 8 月 21 ~ 24 日、大阪(高槻現代劇場)。
2. Mouri K, Sagai T, Amano T and Shiroishi T, Mouse Hammer toe (*Hm*) mutation affects a long-range *Shh* regulation., 第 47 回発生生物学会、2014 年 5 月 27 ~ 30 日、名古屋(ウインク愛知)。
3. Sagai T, Amano T, Maeno A, Mizushima Y and Shiroishi T, Elimination of an oral epithelia-specific *Shh* enhancer causes an extra premolar-like tooth in mouse., 第 47 回発生生物学会、2014 年 5 月 27 ~ 30 日、名古屋(ウインク愛知)。
4. Amano T and Shiroishi T, Enhancer sharing and promoter insulation from enhancer activities: spatial and temporal organization of gene regulation around the mouse *Shh* locus., 第 47 回日本発生生物学会、2014 年 5 月 27 ~ 30 日、名古屋(ウインク愛知)。
5. Sagai T, Amano T, Maeno A, Kimura T, Naruse K and Shiroishi T, Evolutionary divergence of an epithelial linings-specific *Shh* enhancer., 第 46 回日本発生生物学会、2013 年 5 月 28 ~ 31 日、松江(くにびきメッセ)。
6. Amano T Tsukiji N and Shiroishi T, Identification of a novel regulatory element for *Shh* expression in the mouse lung and gut., 第 46 回日本発生生物学会、2013 年 5 月 28 ~ 31 日、松江(くにびきメッセ)。

[図書](計 2 件)

1. 天野孝紀、城石俊彦、シーラカンスの鰭(ひれ)から四肢への進化を考える 生物の科学 遺伝 6 8 巻 2014 220-225
2. 天野孝紀 マウスゲノムを読み解くための新しい文法書 生物の科学 遺伝 6 7 巻 2013 141-144

〔産業財産権〕
出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城石 俊彦 (SHIROISHI, Toshihiko)
国立遺伝学研究所・
系統生物研究センター・教授
研究者番号：90171058

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

天野 孝紀 (AMANO, Takanori)
国立遺伝学研究所・
系統生物研究センター・助教
研究者番号：20419849

(3) 研究協力者

嵯峨井 知子 (SAGAI, Tomoko)
国立遺伝学研究所
系統生物研究センター
特任研究員