

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840087

研究課題名(和文) Nodalシグナルによるepiblastの未分化維持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism to maintain pluripotency of the mouse epiblast via Nodal signaling.

研究代表者

沖 真弥 (Oki, Shinya)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90452713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウス初期発生において極めて重要な役割を演じるNodalシグナルの直接的な標的遺伝子を同定し、エピブラストの多分化能維持機構、神経上皮への分化抑制、または原条形成に関わる遺伝子を特定した。またChIP-seqデータを簡易的に活用できるためのソフトウェア(SraTailor)とデータベース(ChIP-Atlas)を作成し、ウェブを通じて公開した。

研究成果の概要(英文)：This study identified the genes directly regulated by Nodal signaling in the mouse epiblast, particularly involved in the pluripotency, differentiation into the neural epithelium, and primitive streak formation. This study also developed a software and database that are useful to exploit published ChIP-seq data.

研究分野：発生学、バイオインフォマティクス

キーワード：Nodal エピブラスト 中胚葉誘導 原条形成 多分化能 ChIP-seq

1. 研究開始当初の背景

(1) Nodal シグナルはマウス初期発生において極めて重要なはたらきを有する。着床初期における epiblast の pluripotency を維持するだけでなく、そのうち中胚葉形成を促進し、一方で神経への分化を抑制するなど、多機能性を有する。しかし、その Nodal シグナルの直接的な標的遺伝子はほとんど知られていない。これまでに申請者は Nodal シグナルの標的遺伝子を *in vivo* で探索する方法を考案し、それを遂行した。さらにそれらの標的遺伝子候補の中から、Nodal シグナルの伝達を制御すると思われる転写因子群を *in silico* 解析で探索した。これは Nodal シグナルを伝達する転写因子 (Smads, Foxh1) のヒト ES 細胞における ChIP-seq データを活用した。

(2) このような ChIP-seq データは NCBI などの公共レポジトリに生データが保存され、公開されているが、それらのデータの可視化や利活用には複雑なコマンド処理と、膨大な計算資源が必要なため、多くの研究者が簡単に利活用できる状況にはない。

2. 研究の目的

(1) Nodal シグナルの直接的な標的遺伝子候補の機能解析を行い、着床初期における epiblast の pluripotency、中胚葉形成、神経上皮形成における役割を明らかにする。

(2) 公共の ChIP-seq データを多くの研究者が簡単に利活用できるためのソフトウェア、およびデータベースを作成する。

3. 研究の方法

(1) Nodal シグナルの直接的な標的遺伝子候補について、それらによるシグナルを増強または減少させ、着床初期における epiblast の pluripotency、中胚葉形成、および神経上皮形成マーカの発現を調べた。

(2) ChIP-seq データを簡単に利活用するためのソフトウェア、およびデータベースを作成した。前者は Mac, Windows, Linux 環境で動作可能なソフトウェアであり、後者はウェブブラウザでデータの検索や閲覧ができるように開発した。

4. 研究成果

(1) これまでの研究で、Nodal シグナルを特異的に阻害する chemical inhibitor (SB431542) を用いてマウス着床初期胚を培養することで、発現が上昇または減少する遺伝子を複数同定している。さらに Smads や Foxh1 のヒト ES 細胞における ChIP-seq データを活用することで、これらの転写因子が結合する遺伝子に絞り込むことで、よりダイレクトな標的遺伝子を3つまでに絞り込んだ (SB431542 で減少する遺伝子が2つ、上昇する遺伝子が1つ)。

SB431542 で減少する遺伝子は2つとも着床初期胚のエピプラスト全域で発現し、のちに原条に発現が限局するため、Nodal の発現

パターンとよく一致していた。両者ともに分泌因子をコードしており、両者のシグナルを増強または減少させるための chemical inhibitor で着床初期胚を培養した。その結果、シグナルを阻害した場合、Nodal のノックアウト胚や SB431542 培養胚と同じく、原条マーカ (*T*, *Wnt3*) や、また Pluripotency マーカ (*Oct3/4*, *Nanog*) の顕著な発現低下を認めた。また逆にそれらのシグナルを上昇させる chemical agonist で培養すると、E5.5 日胚においても原条マーカの異所的な発現を認めた。

SB431542 で発現が増加する遺伝子を強制発現する ES 細胞を作成し、そのキメラ胚の解析を行った。その結果、Nodal のノックアウト胚と同様に神経上皮マーカ (*Sox1*, *Pax6*) の顕著な発現上昇を認めた。これらの結果により、これら3つの遺伝子は Nodal シグナルの標的遺伝子であり、SB431542 で減少する遺伝子はエピプラストの Pluripotency 維持や原条形成に必要であること、また SB431542 で上昇する遺伝子はエピプラストの神経上皮化を担うことが明らかになった。

(2) これまで論文などで報告されたほぼすべての ChIP-seq 生データは NCBI, ENA, DDBJ が共同管理する SRA (Sequence Read Archive) として登録されており、作成したソフトウェアやデータベースはそれらの簡易的に利活用できる。

GUI 操作のみで ChIP-seq 生データをダウンロード、計算処理、可視化をおこなえるソフトウェア (SraTailor) を開発した。また、SRA 以外にも研究者自身が所持する ChIP-seq データについても簡単な操作で同様の処理ができる。

ヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫、出芽酵母のすべての ChIP-seq SRA を収集し、マッピングとピークコールを行い、それらのデータが簡単に閲覧できるようなデータベース (ChIP-Atlas) を作成した。すべてのデータについて、サンプルメタデータのアノテーションを行い、目的の抗原や使われた細胞名を明確にした。このアノテーションにより、興味のあるゲノム領域にどんな転写因子が結合しているかが一目でわかるようになった。また、すべての ChIP-seq データを用いた統合的な解析をおこなった。これにより、所与の転写因子の標的遺伝子候補や、ゲノムにおける共局在パートナーを予測することができ、これらはウェブサイトを通じて公開した。さらに、この膨大な量のタンパク質-ゲノム相互作用データと、ユーザの所持するデータを用いて、enrichment 解析できるようなツールも作成した。これにより、興味のある遺伝子群やゲノム領域群に結合が enrichment するような転写因子を探索できる。この機能を利用して、FANTOM5 プロジェクトで同定された組織特異的遺伝子、エンハンサーや、Genome-wide

association study (GWAS)で得られた SNP 領域に結合が enrichment するような転写因子を同定した。これらは組織の特異性や遺伝子疾患を司る転写因子と考えられ、ウェブサイトを通じて公開した。

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) Hachisuga, M., Oki, S., Kitajima, K., Ikuta, S., Sumi, T., Kato, K., Wake, N., and Meno, C. (2015). Hyperglycemia impairs left-right axis formation and thereby disturbs heart morphogenesis in mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5300-E5307. doi: 10.1073/pnas.1504529112. 査読あり

(2) Hayashi, M., Maehara, K., Harada, A., Semba, Y., Kudo, K., Takahashi, H., Oki, S., Meno, C., Ichiyangi, K., Akashi, K., et al. (2015). Chd5 Regulates MuERV-L/MERVL Expression in Mouse Embryonic Stem Cells Via H3K27me3 Modification and Histone H3.1/H3.2. *J. Cell. Biochem.* 13, 780 - 792. doi: 10.1002/jcb.25368. 査読あり

(3) Oki, S., Maehara, K., Ohkawa, Y., and Meno, C. (2014). SraTailor: Graphical user interface software for processing and visualizing ChIP-seq data. *Genes to Cells* 19, 919-926. doi: 10.1111/gtc.12190. 査読あり

(4) Shiratori, H., Yashiro, K., Iwai, N., Oki, S., Minegishi, K., Ikawa, Y., Kanata, K., and Hamada, H. (2014). Self-regulated left-right asymmetric expression of Pitx2c in the developing mouse limb. *Dev. Biol.* 395, 331-341. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.002. 査読あり

(5) Kitajima, K., Oki, S., Ohkawa, Y., Sumi, T., and Meno, C. (2013). Wnt signaling regulates left-right axis formation in the node of mouse embryos. *Dev. Biol.* 380, 222 - 232. doi: 10.1016/j.ydbio. 査読あり 2013.05.011.

(6) Sumi, T., Oki, S., Kitajima, K., and Meno, C. (2013). Epiblast Ground State Is Controlled by Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling in the Postimplantation Mouse Embryo and Epiblast Stem Cells. *PLoS One* 8, e63378. doi: 10.1371/journal.pone.0063378. 査読あり

〔学会発表〕(計 17 件)

(1) ChIP-Atlas: Comprehensive and integrative database for visualizing and mining all published ChIP-seq data. Shinya Oki, Tazro Ohta, Go Shioi, Ryo Nakaki, Osamu Ogasawara, Yoshihiro Okuda, Hideki Hatanaka, Chikara Meno. SYSTEMS BIOLOGY: GLOBAL REGULATION OF GENE EXPRESSION. 2016年3月17日. Cold spring harbor (USA).

(2) 既報の ChIP-seq データの統合解析. 沖 真弥. 個体パターンニング研究会. 2016年3月11日. 大阪大学吹田キャンパス (大阪府吹田市).

(3) ChIP-seq SRAの統合的可視化とバイオデータベースとの連携. 沖 真弥. 統合化推進プログラム 統合データ解析トライアル 平成 27 年度研究成果報告会. 2016年3月10日. JST 東京本部 (東京都千代田区).

(4) 既報の ChIP-seq データをフル活用するための統合データベース. 沖 真弥, 大田 達郎, 塩井 剛, 仲木 竜, 目野 主税. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015年12月1日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

(5) ChIP-seq データベースのためのメタ情報アノテーション. 沖 真弥. Annotathon 2015. 2015年11月12日. 国立遺伝学研究所 (静岡県三島市).

(6) 既報の ChIP-seq データをフル活用するための統合データベース. 沖 真弥, 大田 達郎, 塩井 剛, 仲木 竜, 目野 主税. トーゴの日シンポジウム 2015. 2015年10月5日. 東京大学弥生講堂 (東京都文京区).

(7) 既報の ChIP-seq データをフル活用するための統合データベース. 沖 真弥, 大田 達郎, 塩井 剛, 仲木 竜, 目野 主税. 生命情報科学若手の会 第 7 回研究会. 2015年10月1日. 慶應義塾大学鶴岡タウンキャンパス TTCK レクチャーホール (山形県鶴岡市).

(8) ChIP-seq SRA を利活用するための統合データベース. 沖 真弥, 大田 達郎, 塩井 剛, 目野 主税. NGS 現場の会第四回研究会. 2015年7月1日. つくば国際会議場 (茨城県つくば市).

(9) Comprehensive database for visualizing all published ChIP-seq data. 沖 真弥, 大田 達郎, 塩井 剛, 仲木 竜, 目野 主税. 48th Annual Meeting of JSDB. 2015年6月2日. つくば国際会議場 (茨城県つくば市).

(10) 誰でも使える ChIP-seq データの可視化

ツール. 沖 真弥. 定量性物の会 第7回年会. 2015年1月11日. 九州大学筑紫キャンパス 筑紫ホール (福岡県春日市).

(11) 既報の ChIP-seq データを超簡単に可視化する方法. 沖 真弥. 遺伝研セミナー. 2014年12月22日. 国立遺伝学研究所 (静岡県三島市).

(12) SraTailor: 誰でも使える ChIP-seq データの可視化ツール. 沖 真弥. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月25日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).

(13) How to visualize published ChIP-seq raw data. 沖 真弥. CDB seminar. 2014年7月23日. RIKEN CDB (兵庫県神戸市).

(14) SraTailor: GUI software for visualizing high-throughput sequence read archives. 沖 真弥. 47th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. 2014年5月27日. ウィンクあいち (愛知県名古屋市).

(15) Development of a GUI software to visualize high through-put sequence read archives. 沖 真弥. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月3日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).

(16) 既報の次世代シーケンサ解析データを可視化するための簡易ソフトウェア. 沖 真弥. 定量生物学の会 第六回年会. 2013年11月22日. 大阪大学吹田キャンパス 銀杏会館 (大阪府吹田市).

(17) Development of a Mac GUI Application to Visualize Published Raw ChIP-seq data. 沖 真弥, 目野 主税. The 61st NIBB Conference Cellular Community in Mammalian Embryogenesis. 2013年7月10日. 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市).

〔図書〕(計 1件)

沖 真弥. SraTailor: 誰でも使える ChIP-seq データの可視化ツール. 実験医学. 2014年11月号. 3101-3106.

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
研究室ホームページ
<http://www.dev.med.kyushu-u.ac.jp>
SraTailor
http://www.devbio.med.kyushu-u.ac.jp/sra_tailor/
ChIP-Atlas
<http://chip-atlas.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖 真弥 (OKI, Shinya)
九州大学大学院・医学研究院・助教
研究者番号: 90452713

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

目野 主税 (MENO, Chikara)
九州大学大学院・医学研究院・教授
研究者番号: 20311764