

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291051

研究課題名(和文) マウス胚ノードにおける初期左右軸形成の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism for initial left-right axis formation in the node of mouse embryos

研究代表者

目野 主税 (Chikara, Meno)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：20311764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス初期胚に出現するノードは左右軸の形成装置として機能する。この機能は時空間的な位置情報と近隣組織との相互作用に依存しており、ノードを胚体制と関連づけることは左右軸形成を理解する上で重要な視点である。本研究では、ノードや左右軸形成に必要なNodalシグナルの遺伝子発現制御機構、及びノード近傍の左右軸関連遺伝子の発現に必要なWnt3aの発現制御機構を解析した。また、これらの解析を進めるツールとしてSraTailorとChIP-Atlasを開発した。ChIP-AtlasはすべてのChIP-seqデータをIGVゲノムブラウザ上で閲覧できる統合データベースである。

研究成果の概要(英文)：The node appears in early mouse embryo and functions as a generator of left-right axis. Since this function depends on spatiotemporal information and interaction with adjacent tissues, associating the node with embryonic system is an important view to understand left-right axis formation. In this project, we analyzed the gene regulation by Nodal signal which is required for node and left-right axis formation, and also examined the expression mechanism for Wnt3a which is required for the expression on left-right axis related genes around the node. Additionally, we developed SraTailor and ChIP-Atlas which were utilized in above project. ChIP-Atlas is an integrated database by which proteins-DNA interactions based on all ChIP-seq data are displayed on IGV genome browser.

研究分野：発生生物学

キーワード：左右軸 データベース ChIP-seq

1. 研究開始当初の背景

マウス初期胚に形成されるノードは、左右軸を生み出す装置として機能する。初期胚原条の前端にノードが出現し、胚の前後軸情報をもとにして胚後方に傾斜したノード腹側層の一次線毛が時計回りに回転することで、左向きの水流が局所的に発生する。水流の物理情報は、ノード辺縁における複数遺伝子の発現量の左右差異を生み出す。ノードにおけるこの左右差は、左側側板中胚葉における *Nodal* 発現につながり、*Nodal* のポジティブ及びネガティブループによって適切に発現域が拡張することで左右軸が確立する。

ノードは左右軸を生み出すために恐らく至適な形状と位置にあり、ノード辺縁における遺伝子発現も近隣組織との相互作用に基づいていると考えられる。ノードに生じた左右差は、側板中胚葉にまで拡張できるシステムであり、最初に左右軸を必要とする心臓原基に適切に情報を伝達することができる。この発生時期における諸現象は連動しており、初期胚発生の劇的な形態・構造変化を伴う胚体制の確立とその諸現象の調和は、左右軸形成を理解する上で欠くことができない視点である。

2. 研究の目的

マウス胚ノードは発生初期に形成される一過的な構造であり、この小さな組織で左右軸形成に関する遺伝子発現制御を解析するには技術的な制約が多い。ノードで左右非対称な *Nodal* 活性を発生させることが、その後の左右軸形成に必要であり、原条及びノード形成そのものも *Nodal* シグナルが必要である。左右軸形成及び胚体制の確立における *Nodal* シグナルの役割を理解するために、組織操作が比較的容易なエピプラストを用いて *Nodal* シグナルの遺伝子発現制御を解析することにした。また、胚後方で発現することで、ノードにおける遺伝子発現及び体節形成を制御する *Wnt3a* に着目し、その胚後方における遺伝子発現の制御機構を解析することで、胚体制と左右軸形成の連携の理解につなげることにした。

一方で、転写因子を含む特定タンパク質が結合しているゲノム DNA 領域を網羅的に解析することができる ChIP-seq 等の情報は遺伝子発現制御を理解する上で有用である。既報のデータは、公共データベースに Sequence Read Archive (SRA) の形式で蓄積されており、この情報をウェット研究者が気軽に利用できる方法の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) SraTailor の開発

公共データベースに登録された興味のある SRA をダウンロードし、これを自動処理した後、ゲノムブラウザー IGV で表示するソフ

トウェア SraTailor を開発した。その詳細は、研究成果に記載する。

(2) ChIP-Atlas の開発

公共データベースに登録されたすべての ChIP-seq SRA を処理し、タンパク質結合情報をゲノムブラウザー IGV で表示するデータベース ChIP-Atlas を開発した。その詳細は、研究成果に記載する。

(3) *Nodal* シグナルによる遺伝子発現制御の解析

マウス E5.5 胚を回収し、SB431542 の存在下で全胚培養を行うことで *Nodal* シグナルを抑制した。SB431542 処理胚及びコントロール胚のエピプラストを単離し、これをサンプルとして RNA-seq を行った。

(4) *Wnt3a* 発現制御機構の解析

Wnt3a のゲノム断片をレポーター遺伝子 *LacZ* に連結し、これを顕微鏡下で注入した受精卵を偽妊娠マウスに移植することによってトランスジェニック胚を作製した。E8.5 において胚回収し、原条での X-Gal 染色の有無を指標にゲノム断片のエンハンサー活性を評価した。

4. 研究成果

(1) SraTailor の開発

特定タンパク質のゲノム DNA との結合を解析した ChIP-seq のデータが、公共データベースに SRA として蓄積されてきている。これらは左右軸形成における遺伝子発現制御を解析する上で活用すべき情報であるが、SRA を可視化するには各種ツールでコマンド入力による処理を行う必要があり、一般の研究者にとって敷居の高いものであった。そこで、SRA アクセッション番号を入力するだけで、特定タンパクのゲノムへの結合を可視化できる GUI ソフト SraTailor を開発した。SraTailor は MacOS、Windows、Ubuntu で利用することが可能であり、初回の起動で処理に必要な各種ツールを自動ダウンロードする。SRA のアクセッション番号を入力すると、Aspera Connect - sratoolkit - bowtie2/bowtie/bwa - samtools - genomeCoverageBed - bedGraphToBigWig で自動処理され、ゲノムブラウザー IGV で任意のゲノム DNA 領域における特定タンパクの結合を表示することができる。SraTailor によって自前の ChIP-seq データも容易に解析することができ、関連研究分野に広く活用してもらおうべく、フリーウェアとして研究室 website で公開した。

(2) ChIP-Atlas の開発

公共データベース上に登録されたすべての ChIP-seq SRA (ヒト、マウス、ラット、シヨウジョウバエ、*C. elegans*、出芽酵母) のキュレーションとスーパーコンピュータに

よる処理を行い、ゲノムブラウザー IGV で任意のゲノム DNA 領域における ChIP-seq データを一覧できるデータベース ChIP-Atlas を構築し公開した。公共データベースへの ChIP-seq SRA の集積は著しく、ChIP-Atlas は新規登録された SRA を定期的に処理し、これらを追加することで、研究者は最新の情報を享受することが可能になっている。ChIP-Atlas には、任意のゲノム DNA 領域と結合しているタンパク質を一覧できる「Peak Browser」の他、特定の転写因子が制御する可能性がある遺伝子を探索する「Target Genes」、特定の転写因子と共局在する因子を探索する「Colocalization」、遺伝子発現や特定ゲノムのリスト等の enrichment 解析ができる「*in silico* ChIP」の解析機能を組み込んでいる。ChIP-Atlas は 2017 年度の時点で、1800 人以上の利用者による月 5 万ページ以上の閲覧があり、有用なデータベースとして世界的な信頼を獲得したと考えられる。

(3) Nodal シグナルによる遺伝子発現制御の解析

Nodal は発生初期の複数の局面で重要な役割を果たす分泌因子である。胚体制の確立及び左右軸形成における Nodal シグナルの役割に関する知見を得るため、組織構成が単純な E5.5 胚を材料にして Nodal シグナルの有無の条件下、単離エピプラストの RNA-seq を行った。Nodal シグナルは、その受容体 Alk4 の阻害剤である SB431542 で処理することによって抑制した。SB431542 処理によって、発現が抑制される遺伝子群、逆に発現が亢進した遺伝子群をリスト化することができた。例えば、Nodal はポジティブループの発現制御機構を備えるが、SB431542 処理によってその発現が減少した。また、*Lefty1* 及び *Lefty2* は Nodal のネガティブフィードバックを構成する遺伝子であるが、これらのエピプラストにおける遺伝子発現は SB431542 処理によって消失した。これらを例として本実験系は機能しており、ChIP-Atlas を活用した遺伝子発現制御の解析や発生現象との関連付けを行った。

(4) *Wnt3a* 発現制御機構の解析

Wnt3a ゲノム領域の様々なゲノム断片について、E8.5 胚原条におけるエンハンサー活性の有無をトランジエントトランスジェニックマウスアッセイで評価した。エンハンサー活性を保有するゲノム断片を見出し、この断片を欠失させ、突然変異導入を行うことによって、原条におけるエンハンサー活性を担う配列を同定することができた。このエンハンサーに対して、ChIP-Atlas Peak Browser を使用して既存の ChIP-seq データの活用を図ったが、胚後方で発現する転写因子の結合情報は存在しなかった。そこで、モチーフ検索によってエンハンサーとの結合が推察される転写因子に着目し、その結合の有無の解析を進め、*Wnt3a* 発現領域との関連において意

義付けを行った。

(総括と今後の展望)

本研究テーマを推進するツールとして SraTailor と ChIP-Atlas を開発し、これらは既に多くの研究者に利用されている。特に、ChIP-Atlas へのアクセス数は膨大であり、関連研究の発展に貢献できているものと考えられる。本研究は、初期左右軸形成の分子機構の理解を深めることを目的とし、このために胚体制の確立及び調和の視点で解析を行った。本研究で得られた実験結果は、今後、さらに実験を重ねることで内容を深め、左右軸形成の理解につなげる予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Semba, Harada, Maehara, Oki, Meno, Ueda, Yamagata, Suzuki, Onimaru, Nogami, Okada, Akashi, Ohkawa: Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 45, 8758-8772, 2017, 査読有り 10.1093/nar/gkx475

Hayashi, Maehara, Harada, Semba, Kudo, Takahashi, Oki, Meno, Ichianagi, Akashi, Ohkawa: Chd5 Regulates MuERV-L/MERVL Expression in Mouse Embryonic Stem Cells Via H3K27me3 Modification and Histone H3.1/H3.2. *J Cell Biochem* 117, 780-792, 2016, 査読有り 10.1002/jcb.25368

Ishii, Saeki, Liu, Sasaki, Koga, Kitajima, Meno, Okuno, Yokomizo: Leukotriene B4 receptor type 2 (BLT2) enhances skin barrier function by regulating tight junction proteins. *FASEB J* 30, 933-947, 2016, 査読有り 10.1096/fj.15-279653.

Hachisuga, Oki, Kitajima, Ikuta, Sumi, Kato, Wake, Meno: Hyperglycemia impairs left-right axis formation and thereby disturbs heart morphogenesis in mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E5300-7, 2015, 査読有り 10.1073/pnas.1504529112

Anderson, Brown, Meno, Spicer: The importance of being isomeric. *Clin Anat* 28, 477-486, 2015 査読有り 10.1002/ca.22517.

Oki, Maehara, Ohkawa, Meno. SraTailor: graphical user interface software for

processing and visualizing ChIP-seq data. Genes Cells 19, 919-926. 2014, 査読有り 10.1111/gtc.12190

〔学会発表〕(計 13 件)

Oki, Ohta, Shioi, Hatanaka, Ogasawara, Okuda, Kawaji, Nakaki, Sese, Meno: Integrative analysis of transcription factor occupancy at enhancers and disease risk loci in noncoding genomic regions. Keystone Symposium; Gene Control in Development and Disease, 2018

Oki, Ohta, Shioi, Hatanaka, Ogasawara, Okuda, Kawaji, Nakaki, Sese, Meno: Integrative analysis of transcription factor occupancy at enhancers and disease risk loci in noncoding genomic regions. 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2017

Oki, Ohta, Shioi, Hatanaka, Ogasawara, Okuda, Kawaji, Nakaki, Sese, Meno: The transcription factor landscape decodes the enhancers and risk variants in non-coding regions, Keystone Symposium; Epigenetics and Human Disease: Progress from Mechanisms to Therapeutics, 2017

沖真弥, 目野主税, 他: 既報のChIP-seqデータの利活用術, 第4回発生における代謝を考える会, 2017

蜂須賀正紘, 北島桂子, 沖真弥, 生田智美, 目野主税: 妊娠前糖尿病における左右軸形成異常, 第39回日本分子生物学会年会, 2016

沖真弥, 目野主税, 他: 網羅的かつ統合的なChIP-seqデータの解析, 第39回日本分子生物学会年会, 2016

Oki, Ohta, Shioi, Nakaki, Ogasawara, Okuda, Hatanaka, Meno: ChIP-Atlas: Comprehensive and integrative database for visualizing and mining all published ChIP-seq data. Systems Biology: Global Regulation of Gene Expression, 2016

Oki, Ohta, Shioi, Meno: ChIP-Atlas: Comprehensive database for visualizing all published ChIP-seq data, 48th Annual Meeting of JSDB, 2015

沖真弥, 目野主税, 他: ChIP-seq RNAを利用するための統合データベース, NGS現場の会第四回研究会, 2015

沖真弥, 目野主税, 他: 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, 第38回日本分子生物学会年会, 2015

Oki, Maehara, Ohkawa, Meno: SraTailor: GUI software for visualizing high-throughput sequence read archives. 47th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2014

蜂須賀正紘, 北島桂子, 沖真弥, 生田智美, 目野主税: 高血糖症はマウス胚の左右軸形成を阻害することで心臓形態形成を攪乱する. 第37回日本分子生物学会年会, 2014

沖真弥, 前原一満, 大川恭行, 目野主税: SraTailor: 誰でも使えるChIP-seqデータの可視化ツール. 第37回日本分子生物学会年会, 2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

https://devbio.wp.med.kyushu-u.ac.jp/sra_tailor/

<http://chip-atlas.org>

http://chip-atlas.org/peak_browser

http://chip-atlas.org/target_genes

<http://chip-atlas.org/colo>

http://chip-atlas.org/in_silico_chip

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

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

北島 桂子

北島 桂子 (KITAJIMA, Keiko)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：00332784

大川 恭行 (OHKAWA, Yasuyuki)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：80448430

(4)研究協力者