

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430182

研究課題名(和文)ChIP-Injection法：生体内活性を指標としたエンハンサー同定法の確立

研究課題名(英文)ChIP-Injection: Identification of functional enhancers using zebrafish embryos

研究代表者

川村 哲規 (Akinori, Kawamura)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：10466691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではゼブラフィッシュ胚を用いて、生体内活性を指標としたエンハンサー同定法を確立した。胚から尾芽を切断し、抗H3K27Ac抗体によるChIP法により得たDNA断片をEGFPリポーターに挿入したエンハンサー・ライブラリを作製した。EGFPリポーターをゼブラフィッシュの受精卵へ導入し、領域特異的なEGFP蛍光を示すエンハンサーの探索を行った結果、導入した108個のうち39個において、尾芽、体節、脊索などでエンハンサー活性が観察された。4つのエンハンサーについて組換え魚を作製し、スクリーニング時と同様の活性を確認した。さらに、エンハンサーのゲノム位置を明らかにし、ターゲット候補遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Using zebrafish embryos, we established a ChIP-Injection method that enables identification of functional enhancers based on their enhancer activities in embryos. Each reporter gene possessing the enhancer-associated genomic region enriched by ChIP was injected into zebrafish embryos to analyze the activity of putative enhancers. By using the ChIP-Injection, we identified 32 distinct putative enhancers that drove specific expression. Additionally, we generated transgenic lines that exhibit distributions of the EGFP signal as was observed in the screening. Furthermore, the expression pattern driven by the identified somite-specific enhancer resembled that of the gene *acta2*. The results indicate that ChIP-Injection provides an efficient approach for identification of active enhancers in a potentially wide variety of developmental tissues and stages.

研究分野：ゲノム生物学、発生生物学

キーワード：エンハンサー スクリーニング クロマチン免疫沈降法 ゼブラフィッシュ

### 1. 研究開始当初の背景

個体発生をはじめとする様々な生命現象は、時期及び領域特異的な遺伝子発現によって制御されている。遺伝子発現を司る機構のひとつとしてエンハンサーによる制御が知られており、エンハンサーを同定することは、遺伝子発現制御のメカニズムを理解するうえで重要である。近年、エンハンサーに特異的に存在するヒストン修飾 (H3K27Ac, H3K4me1) が明らかとなり、それらのヒストン修飾に対するクロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーを組み合わせたエンハンサーの網羅的な同定が進んでいる。しかしながら、この方法ではエンハンサー候補のゲノム上での位置は示されるが、同定したエンハンサーの活性を明らかにするためには、その後、生体内に導入し、活性を解析することが必須である。さらに、予想されるエンハンサーの数が膨大であるため、目的のエンハンサーを絞り込むことは難しい。そのため、目的のエンハンサー活性を指標とした新たなエンハンサー同定法を確立することが必要な課題であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、受精卵への遺伝子導入が容易で、蛍光観察が発生過程を通じて可能な点などの発生生物学を研究する上で、様々な利点を有するゼブラフィッシュ胚と、エンハンサー領域に特異的に存在するヒストン修飾に対するクロマチン免疫沈降法を組み合わせ、生体内のエンハンサー活性を指標とした新しいエンハンサー同定法である ChIP-Injection 法を確立し、脊椎動物の胚発生において多分化能を有する尾芽において特異的に活性化されるエンハンサー領域の同定およびその解析を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 生体内活性を指標としたエンハンサー同定法: ChIP-Injection 法の確立

18-22 体節期のゼブラフィッシュ胚の尾芽、未分節中胚葉を含む領域を実体顕微鏡下でメスにより外科的に切断し、約 200 個の胚由

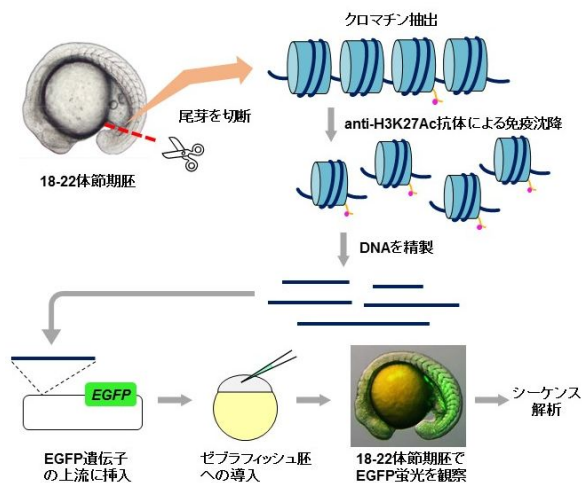


図1. ChIP-Injection法の概要

来の尾芽を集めた。その後、パラホルムアルデヒドを用いて架橋し、エンハンサー領域に特異的なヒストン修飾である H3K27Ac を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて、クロマチン免疫沈降法を行った。得られた DNA 断片を精製し、それぞれ EGFP リポーター遺伝子の上流へ挿入した尾芽エンハンサー・ライブラリを作製した。様々なエンハンサー候補の DNA 断片を上流に有する EGFP リポーター遺伝子をゼブラフィッシュ受精卵へそれぞれ 10 ng/μl の濃度で注入し、18-22 体節期まで発生を進めた後、EGFP 蛍光を観察することで領域特異的なエンハンサー活性を有する候補 DNA 断片のスクリーニングを行った (図1)。

### (2) 同定したエンハンサー領域の解析

同定した興味深い活性を示すエンハンサー候補断片については、その活性を詳細に明らかにするために、transgenic 魚を単離し、その発現領域を解析した。また、同定したエンハンサーの塩基配列を明らかにすることで、ゼブラフィッシュのゲノム上での位置を明らかにした上で、エンハンサー活性が観られた領域と類似する遺伝子が、近傍に存在するかを調べた。さらに、胚発生におけるエンハンサーの機能を明らかにするために、エンハンサー領域近傍を認識する TALEN を作製し、エンハンサーを欠失した変異体を作製し、その表現形およびエンハンサーの制御する遺伝子について詳細に解析した。

### 4. 研究成果

まず、18-22 体節期胚の尾芽を切断し、抗 H3K27Ac 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により得られた DNA 断片をそれぞれ

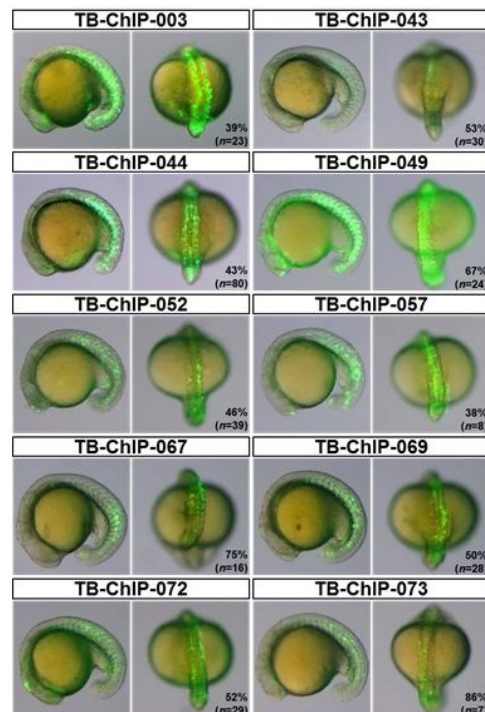


図2. ChIP-Injection法により得られたエンハンサーのゼブラフィッシュ胚における活性

EGFP リポーターの上流へ挿入した尾芽エンハンサー・ライブラリを作製した。作製したライブラリは、尾芽で活性のあることが分かっている *hes6* エンハンサーが含まれることから、目的の尾芽エンハンサー・ライブラリが得られたことを確認した。

作製したライブラリから EGFP リポーターをコードするプラスミドを抽出し、ゼブラフィッシュの受精卵へそれぞれ 10ng/μl の濃度で注入し、18-22 体節期での EGFP 蛍光観察をもとに領域特異的な EGFP 蛍光を示すエンハンサーの探索を行った。その結果、これまでに導入した 108 個のエンハンサー候補断片のうち 39 個において、尾芽、尾芽由来の組織である体節、脊索などで特異的なエンハンサー活性が観察された(図2)。興味深い活性を示した4つのエンハンサーについて、リポーター遺伝子を安定に有する組換え魚を Tol2 トランスポゾン・システムを用いて作製し、詳細に発現パターンを解析した結果、スクリーニング時と同様の活性を示すことを確認した(図3)。さらに、同定したエンハ

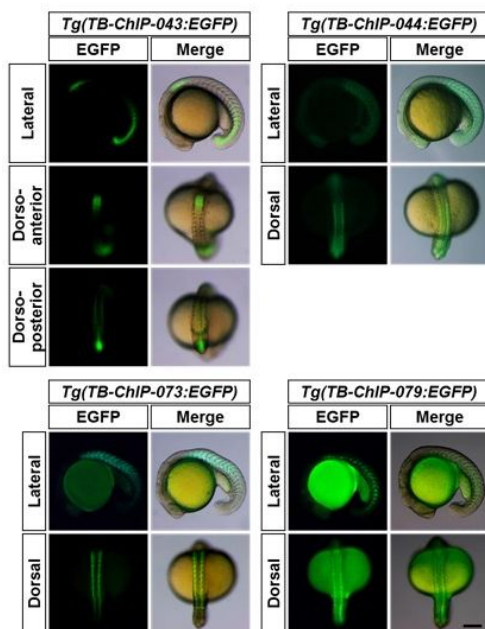


図3. ChIP-Injection法により同定されたEGFPリポーターをもつtransgenic胚におけるEGFP活性エンハンサーの塩基配列を決定し、ゼブラフィッシュゲノム・データベースと照合し、ゲノム上での位置を明らかにした。見出したエンハンサーの活性と類似する発現を示す遺伝子が周辺にないかを調べた結果、体節でエンハンサー活性を示したTB-ChIP-073について、約40kb下流に18-22体節期胚において体節に特異的に発現する *acta2* 遺伝子を同定した(図4)。一般的に、遺伝子から遠位に存在するエンハンサーを同定することは難しいが、我々が確立したChIP-Injection法では、エンハンサー活性を指標としてエンハンサーを同定するため、TB-ChIP-073のように遠位から働くエンハンサーを同定することができることを示唆される。

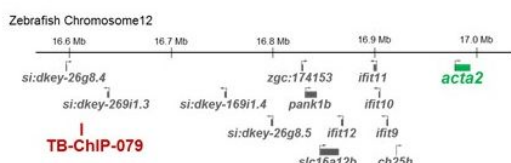
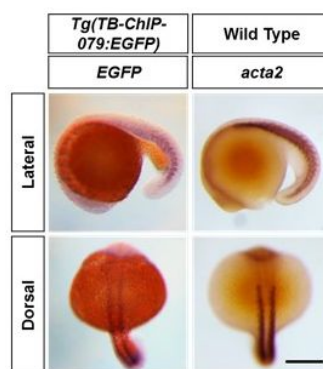


図4. TB-ChIP-079胚におけるEGFPの発現パターンと *acta2* 遺伝子の発現パターンの比較及びゼブラフィッシュ・ゲノム上でのそれぞれの位置

また、これまでに同定しているエンハンサー領域のひとつについて、エンハンサーの機能を明らかにするために、ゲノム編集技術TALENを用いて、エンハンサー領域に欠失を導入した変異体を単離した。交配によりホモ変異体を作製した結果、体節形成期において、一部の体節境界が生じない表現形を示すことが分かった。さらに、エンハンサー近傍に存在する遺伝子を解析した結果、未分節中胚葉における発現が著しく減少していることが分かった。これらの結果から、このエンハンサーは体節形成に関わる遺伝子の発現を制御する必須なエンハンサーであることが強く示唆された。

## 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 2件)

1. Taminato, T, Yokota, D, Araki, S, Ovara, H, Yamasu, K, Kawamura, A. Enhancer activity-based identification of functional enhancers using zebrafish embryos. *Genomics* 108: 102-107 (2016)
2. Kawamura, A., Ovara, H, Ooka, Y, Kinoshita, H, Hoshikawa, M, Nakajo, K, Yokota, D, Fujino, Y, Higashijima, S, Takada, S, Yamasu, K. Posterior-anterior gradient of zebrafish *hes6* expression in the presomitic mesoderm is established by the combinatorial functions of the downstream enhancer and 3'UTR. *Developmental Biology* 409: 543-554 (2016)

[学会発表](計 34件)

1. 江幡奏美, 赤間 耀, 田港朝仁, 弥益 恭, 川村哲規, ゼブラフィッシュ変異体を用いた肋骨形成機構の解析, 第70回日本

- 動物学会 関東支部大会、2018 年
2. 伴 博之、横田大佑、乙坂菜里、木下宏史、藤野友梨、矢部泰二郎、小原弘幹、猪塚彩花、赤間 耀、鹿毛大地、弥益 恭、高田慎治、川村哲規、ゼブラフィッシュ未分節中胚葉における *tbx6* 遺伝子の転写制御機構の解析、第 70 回 日本動物学会 関東支部大会、2018 年
  3. 伴 博之、横田大佑、乙坂菜里、木下宏史、藤野友梨、矢部泰二郎、小原弘幹、猪塚彩花、赤間 耀、鹿毛大地、弥益 恭、高田慎治、川村哲規、第 7 回 宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、2017 年
  4. 藤野友梨、菅谷千尋、大岡優子、木下宏史、小原弘幹、弥益 恭、三嶋雄一郎、川村哲規、ゼブラフィッシュ分節時計における hairy 関連遺伝子群の mRNA 不安定性は異なる、第 7 回 宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、2017 年
  5. 赤間 耀、猪早敬二、田港朝仁、江幡奏美、藤野友梨、木下宏史、弥益 恭、川村哲規、ゼブラフィッシュ変異体を用いた脊椎骨分節機構の解析、第 7 回 宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、2017 年
  6. 荒木 颯、山田一哉、赤間 耀、江幡奏美、弥益 恭、川村哲規、CRISPR-Cas9 を用いたゼブラフィッシュ *hox* クラスター大規模欠損変異体の作製と解析、第 7 回 宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、2017 年
  7. 荒木 颯、赤間 耀、弥益 恭、川村哲規、ゼブラフィッシュを用いた *hox* クラスター変異体の作製と解析、第 40 回 日本分子生物学会年、2017 年
  8. 赤間 耀、猪早敬二、田港朝仁、江幡奏美、藤野友梨、木下宏史、弥益 恭、川村哲規、硬骨魚類における脊椎骨分節機構の解析、第 40 回 日本分子生物学会年、2017 年
  9. 藤野友梨、菅谷千尋、大岡優子、木下宏史、小原弘幹、弥益 恭、三嶋雄一郎、川村哲規、ゼブラフィッシュ分節時計における hairy 関連遺伝子の mRNA 不安定性に関する解析、第 40 回 日本分子生物学会年、2017 年
  10. 伴 博之、横田大佑、木下宏史、藤野友梨、矢部泰二郎、小原弘幹、猪塚彩花、赤間 耀、鹿毛大地、弥益 恭、高田慎治、川村哲規、ゼブラフィッシュ未分節中胚葉における *tbx6* 遺伝子の発現は positive auto regulatory loop によって維持される、第 40 回 日本分子生物学会年、2017 年
  11. Akama K, Inohaya K, Taminato T, Ebata K, Fujino Y, Kinoshita H, Yamasu K, and Kawamura A, Somite patterning provides positional cues for the segmental ossification of the vertebral column in teleosts, The 23rd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2017 年
  12. Fujino Y, Sugaya C, Ooka Y, Kinoshita H, Ovara H, Yamasu K, Mishima Y, and Kawamura A, Distinct mRNA turnover rate mediated by 3'UTR of hairy-related genes in the segmentation clock of zebrafish embryos, The 23rd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2017 年
  13. Ban H, Yokota D, Kinoshita H, Fujino Y, Yabe T, Ovara H, Izuka A, Akama K, Kage D, Yamasu K, Takada S, and Kawamura A, Transcriptional autoregulatory loop maintains the expression of *tbx6* in the zebrafish presomitic mesoderm, The 23rd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2017 年
  14. Kinoshita H, Fujino Y, Ohgane N, Yabe T, Yokota D, Ovara H, Izuka A, Ban H, Kage D, Yamasu K, Takada S, and Kawamura A, Genetic interactions between Ripply and Tbx6 in the somite segmentation and myogenesis in zebrafish embryos, 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2017 年
  15. 荒木 颯、田港朝仁、横田大佑、弥益 恭、川村哲規、ゼブラフィッシュ胚内の活性を指標とした ChIP-Injection 法によるエンハンサー同定と機能解析、第 69 回 日本動物学会 関東支部大会、2017 年
  16. 菅谷千尋、藤野友梨、木下宏史、大岡優子、小原弘幹、弥益 恭、三嶋雄一郎、川村哲規、ゼブラフィッシュ分節時計遺伝子の 3'UTR 依存的な mRNA 不安定性の比較解析、第 69 回 日本動物学会 関東支部大会、2017 年
  17. 赤間 耀、田港朝仁、藤野友梨、木下宏史、弥益 恭、川村哲規、ゼブラフィッシュ変異体を用いた脊椎骨分節機構の解析、日本動物学会 第 69 回 関東支部大会、2017 年
  18. 藤野友梨、木下宏史、大金ななえ、矢部泰二郎、横田大佑、小原弘幹、猪塚彩花、荒木 颯、鹿毛大地、弥益 恭、高田慎治、川村哲規、ゼブラフィッシュの体節形成および筋形成に必須な Ripply の役割、第 69 回 日本動物学会 関東支部大会、2017 年
  19. 横田大佑、伴 博之、木下宏史、藤野友梨、矢部泰二郎、猪塚彩花、赤間 耀、小原弘幹、鹿毛大地、弥益 恭、高田慎治、川村哲規、未分節中胚葉におけるゼブラフィッシュ *tbx6* 遺伝子の発現制御機構の解析、第 39 回 日本分子生物学会年会、2016 年
  20. 田港朝仁、横田大佑、荒木 颯、小原弘幹、弥益 恭、川村哲規、ゼブラフィッシュ胚での生体内活性を指標としたエンハンサー同定法の確立、第 39 回 日本分子生物学会年会、2016 年
  21. 木下宏史、藤野友梨、大金ななえ、矢部泰二郎、横田大佑、小原弘幹、猪塚彩花、荒木 颯、鹿毛大地、弥益 恭、高田慎治、川村哲規、Ripply-Tbx6 の相対的な比がゼ

- ブラフィッシュの体節形成に必須である、第 39 回 日本分子生物学会年会、2016 年
22. Kinoshita H, Ohgane N, Fujino Y, Yabe T, Yokota D, Ovara H, Izuka A, Kage D, Yamasu K, Takada S, and Kawamura A, Relative levels of rippy and tbx6 are required for the somite segmentation in zebrafish, The 22nd International Congress of Zoology & The 87th meeting of Zoological Society of Japan, 2017 年
  23. 木下宏史、藤野友梨、大金ななえ、矢部泰二郎、横田大佑、小原弘幹、猪塚彩花、荒木 颯、鹿毛大地、弥益 恭、高田慎治、川村哲規、ゼブラフィッシュの予定体節境界形成に必須な rippy-tbx6 の相対的なバランス、埼玉大・自治医大大学院合同研究発表会オースタムリトリート、2016 年
  24. 田港朝仁、横田大佑、荒木 颯、小原弘幹、弥益 恭、川村哲規、生体内活性を指標としたエンハンサー同定法を用いた尾芽エンハンサーの解析、埼玉大・自治医大大学院合同研究発表会オースタムリトリート、2016 年
  25. Kinoshita H, Ohgane N, Fujino Y, Yabe T, Yokota D, Ovara H, Izuka A, Kage D, Yamasu K, Takada S and Kawamura A, Relative levels of rippy and tbx6 are required for the proper somite segmentation in zebrafish, The 22nd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2016 年
  26. 田港朝仁、横田大佑、荒木 颯、小原弘幹、弥益 恭、川村哲規、生体内活性を指標としたエンハンサー同定法の確立と制御遺伝子の探索、第 68 回 日本動物学会 関東支部大会、2016 年
  27. 横田大佑、木下宏史、猪塚彩花、小原弘幹、大岡優子、鹿毛大地、弥益 恭、川村哲規、ゼブラフィッシュ T-box 型転写因子 Tbx16 と Tbx24 にみられる DNA 結合能の差、第 38 回 日本分子生物学会年会、2015 年
  28. Taminato T, Yokota D, Araki S, Yamasu K and Kawamura A, Enhancer activity-based identification of functional enhancers using zebrafish embryos, 第 38 回 日本分子生物学会年会、2015 年
  29. Taminato T, Yokota D, Araki S, Yamasu K and Kawamura A, Enhancer activity-based identification of functional enhancers using zebrafish embryos, 21st Japanese Medaka Zebrafish Meeting, 2015 年
  30. 横田大佑、大岡優子、木下宏史、小原弘幹、弥益 恭、川村哲規、尾芽および未分節中胚葉における T-box 型転写因子の DNA 結合能の解析、第 67 回 日本動物学会 関東支部大会、2015 年
  31. 大岡優子、小原弘幹、干川美樹、木下宏史、高田慎治、弥益 恭、川村哲規、ゼブラフィッシュ分節時計遺伝子 hes6 の濃度

- 勾配発現制御機構の解析、第 67 回 日本動物学会 関東支部大会、2015 年
32. 田港朝仁、横田大佑、弥益 恭、川村哲規、ゼブラフィッシュ胚を用いた新たなエンハンサー同定法の確立、第 67 回 日本動物学会 関東支部大会、2015 年
  33. 高橋一樹、伊藤佑貴、吉村麻美、津田佐知子、二階堂昌孝、川村哲規、弥益恭、酸素代謝関連遺伝子による神経堤細胞の発生制御、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年
  34. Ovara H, Ooka Y, Hoshikawa M, Takada S, Yamasu K and Kawamura A, A posterior-to-anterior gradient expression of hes6 in the presomitic mesoderm is established by the transcriptional and post-transcriptional regulations, 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2014 年

〔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

埼玉大学 理学部 生体制御学科 H P

<http://seitai.saitama-u.ac.jp/>

埼玉大学 理学部 生体制御学科 発生生物学研究室 H P

<http://devbiol.seitai.saitama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村 哲規 (KAWAMURA, Akinori)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：10466691