

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26710011

研究課題名(和文)小分子RNAに誘導されるエピゲノム変化の生化学的解析

研究課題名(英文)Biochemical analysis of small RNA-induced epigenetic changes

研究代表者

山中 総一郎(YAMANAKA, SOICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80711845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：トランスポゾンとその残滓は、ヒトゲノムでは45%もの領域を占めている。トランスポゾンの持つ転移能は個体に有害であり、特に生殖細胞におけるトランスポゾンの発現抑制は次世代への正確な遺伝情報の伝達を考えた場合に、生物にとって喫緊の課題である。私は小分子RNAがトランスポゾンの発現を生殖細胞でいかに抑制しているかに関して研究をハエとマウスを用いて行ってきた。ハエにおいては、特定ゲノム領域に存在するタンパク質群を網羅的に同定する手法を開発してきた。また、マウスにおいては精巢中に含まれる少量の生殖細胞からクロマチン状態をプロファイルし、その様態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：More than 45% of human genome consists of transposons and its remnants. Transpositional events of them are deleterious to their hosts, especially in their gonads. Here, I am engaged in how small RNA would induce transcriptional silencing at transposon sequences, by using both fly and mouse systems. For fly system, I am trying to establish a method to proteomically identify the chromatin components at specific genomic region. For mouse system, I have profiled the chromatin dynamics in the small number of germ cells within the whole testis, and comprehensively described its temporal change in detail, particularly at transposon sequences.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：小分子RNA トランスポゾン 生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾンとその残滓は、ヒトゲノムでは45%もの領域を占めている。トランスポゾンの持つ転移能は個体に有害であり、特に生殖細胞におけるトランスポゾンの発現抑制は次世代への正確な遺伝情報の伝達を考えた場合に、生物にとって喫緊の課題である。PIWI タンパク質とそれに結合する小分子RNAであるpiRNAは高等真核生物の生殖巣で特異的に発現しており、トランスポゾン抑制に重要な働きを持つ。PIWI タンパク質は標的の発現を2通りの経路で抑制する。一つ目は、自身の持つRNA切断活性を介した経路。二つ目は、標的遺伝子座のクロマチンを転写に抑制的な状態に誘導する経路である。特に後者の抑制機構に関しては、それに関与する因子が数個単離されているのみで未だにその全容が明らかになっていない。さらに現象の包括的理解に欠かせない、各素過程の生化学的解析に関しては殆どなされていないのが現状である。

PIWI-piRNAの核内での働きを解明する際に障害となってきたのは、その限局した発現パターンである。ショウジョウバエでは雌生殖巣から樹立された「OSC」と呼ばれる培養細胞では機能的なPIWI-piRNA複合体が発現しており、現在までに生化学的解析が進んでいるのに対して、マウスなど哺乳類ではそのような培養細胞が現在までに得られていない。マウスでPIWI-piRNAが核内で働きを持っているのはゴノサイトと呼ばれる時期で、これは胎生後期から生後数日までの生殖細胞を指す。Miwi2は3つあるマウスPiwiファミリータンパク質の一つで、ゴノサイトの時期に核内で特異的に発現している。Miwi2に依存したトランスポゾン上のDNAのメチル化や抑制性ヒストン修飾が知られているが、Miwi2が直接何に結合してエピゲノム変換を引き起こしているかに関しては未だ謎が多い。Miwi2研究を遅らせている要因の一つとして、一個体から得られるゴノサイトの少なさが挙げられる。ゴノサイトは一つの精巣あたり1万個程度であり、生化学的実験に用いるには程遠く、この細胞の持つ「稀少性の壁」を超える必要がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、RNAによって引き起こされるクロマチン修飾の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

ショウジョウバエのOSCを用いた研究では特定クロマチン領域に存在するタンパク質を網羅的に同定することで、PIWI-piRNAによって誘起されるクロマチン変化の全体像を知ること目標とした。

マウスPIWI-piRNAのクロマチン変化解析に関しては、生化学的実験に用いることのできるような培養細胞の樹立と並行して、少量細胞からクロマチン変化に関するデータ取得することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Genome-IP 法

ショウジョウバエにおけるPIWI-piRNA関連タンパク質群を網羅的に解析するための手法(以下、Genome-IP法)を開発してきた。手法自体の確立が成果の一部となっているため、その方法に関しては研究成果の項目で記述する。

(2) ATAC-seq 法によるゴノサイトクロマチン動態解析

ATAC-seq法は2013年に開発された手法で、DNAへのアクセシビリティの情報を非常に簡単に、かつ少量の細胞からゲノムワイドに知ることが出来る。ゴノサイトにおけるクロマチン構造変化をプロファイルするために、この手法をゴノサイトに適用する。マウス胎仔の精巣には非常に多くの体細胞が含まれており、そのなかでゴノサイトの占める割合は数%に満たない。そこでMvh-Venusトランスジェニックマウスを用いて、胎仔の精巣からゴノサイトのみを回収することにした(Mvhは生殖細胞特異的なマーカーでE10.5からその発現が見られる)。Mvh-Venusマウス胎仔精巣からFACSでVenus陽性の細胞集団を濃縮したところ、単一の精巣から

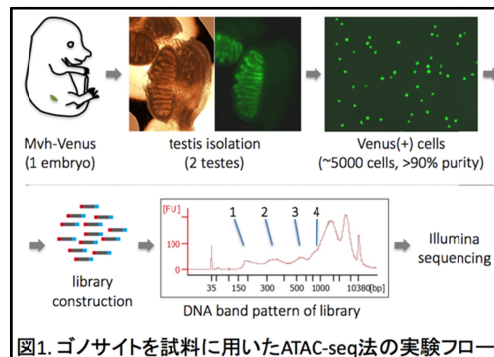


図1. ゴノサイトを試料に用いたATAC-seq法の実験フロー

約5000個程度の生殖細胞が90%以上の純度で得られた。その後、この細胞集団からATAC-seqライブラリを調製し、それを次世代シーケンサーで配列決定した(図1)。その後の配列解析により、得られたデータはゴノサイト特異的なデータを反映していることが明らかになった。データの詳細は研究成果の項目で記述する

4. 研究成果

(1) Genome-IP法の確立

OSCを用いて、GenomeIP法の確立を試みてきた。gRNAをゲノム上の特定領域に設計することでCas9を当該領域に呼び込み、その領域を大量に細胞から回収した。細胞からの核の単離法や免疫沈降に用いるビーズの調製法などの改良の結果、一回の免疫沈降のステップで非常に純度の高いクロマチンを得ることが出来た。しかし、現段階では遺伝子座ごとで得られるタンパク質群に差が見られず、現在この点に関してのさらなる改良を行っている。

上記と並行して、GenomeIP法の確立に向

けた試みをTALENシステムを用いて行った。OSCではゲノム上のワンコピーの遺伝子座に対して実験を行ったが、TALENの場合はNIH3T3細胞やmES細胞を用いて、セントロメアやテロメアに存在するリピート配列をターゲットにした。リピート配列を認識するTALEコンストラクトにflagやGFPといったタグ配列をタンデムに融合させた。このコンストラクトを恒常的に発現する細胞株では、セントロメアもしくはテロメアが光る様子が観察される。この細胞株から、2種類のタグ配列を用いて2回連続的に免疫沈降したところ、ネガティブコントロールの遺伝子座に比べて10万倍程度のシグナルノイズ比が得られた。現在、以上の条件で大量の細胞から免疫沈降産物を調製している。今後、得られた画分に含まれるタンパク質群をMASS解析で同定し、その機能を生化学的に解明する。

(2) ゴノサイトにおけるクロマチン変化解析

ATAC-seq法をゴノサイトに適用した。Miwi2が発現しはじめるE13.5から生後6日目までの間を時系列に沿ってプロファイルしたところ、E17.5でクロマチン構造が緩

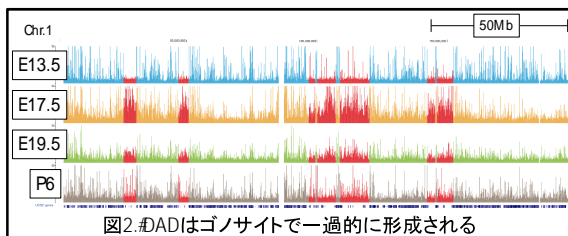


図2.#DADはゴノサイトで一過的に形成される

む領域が多数存在した。この領域はその後また閉じたクロマチン構造に戻るため、このクロマチン構造形成が非常に一過的であることが明らかとなった(図2)。今回、以上のような振る舞いを示す領域をDAD(Differentially Accessible Domain)と命名し

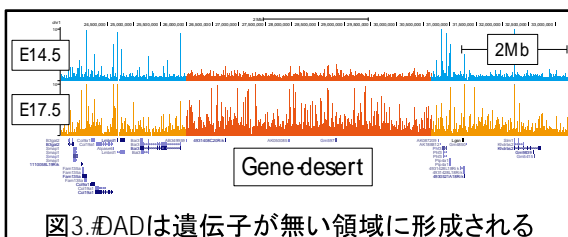


図3.#DADは遺伝子が無い領域に形成される

た。この染色体領域に注目して観察すると、DADは遺伝子が無い領域、いわゆるgene desertに形成されていた(図3)。マウスゲノム上には計75のDADが存在する。そのうち、殆どのDADはgene desert上に形成されたが、残りのものに関しては特殊な遺伝子上に形成された。Olfactory receptor gene、Prolactin gene、Keratin geneはゲノム上の特定の領域での遺伝子重複により、クラスターを形成している。DADはこれらクラスターの領域に形成された(図4)。

次に、DAD内のATAC-seqピークの周辺に多く存在するDNAモチーフを抽出したところ、図5で示したようなDNAモチーフが得られた。これらは既知のDNA結合モチ

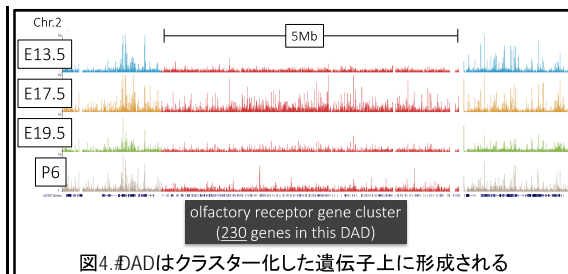


図4.#DADはクラスター化した遺伝子上に形成される

フにマッチしなかったため、これらの配列を用いてBLAST検索をした。すると、これら3つの配列は全てLINE1トランスポゾンに由来することがわかった。そこで今度は、トランスポゾン上のアクセシビリティが上昇しているかファミリーごとの変動を数値化することで確認したところ、実際に多くのトランスポゾンのファミリーのアクセシビリティが上昇していることがわかった(図6)。

ATAC-seqによる解析と並行して、ゴノサイトの各ステージおいてのトランスクリプ

Motif	E-value
	2.3e-108
	5.6e-69
	6.8e-64

図5.#DAD内のピーク周辺に多く存在するモチーフ群

トームをnanoCAGE-seqによってプロファイルしている。nanoCAGE-seqは少量細胞からトランスクリプトームを知ることのできる手法で、ゴノサイトを用いた解析に適している。さらに、およそ2万個のゴノサイトを用いたChIP-qPCRも可能になり、分化の主要なマーカーと考えられているH3K27me3

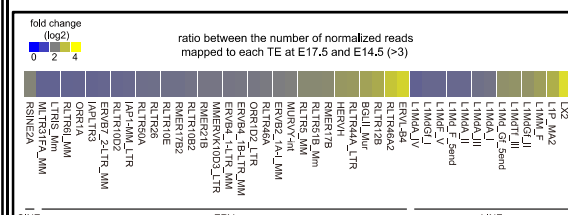


図6.トランスポゾンのアクセシビリティはE17.5で上昇するのChIP-seqを現在行っている。以上のATAC-seq、nanoCAGE-seq、ChIP-seqのデータを総合的に解析することでゴノサイトのクロマチン状態を詳細に記述する。

上記の解析は主に野生型ゴノサイトの性状記述のためのものである。では、Miwi2はこれらの過程にどのような働きをもっているのだろうか。そこで、ゴノサイトのATAC-seqによる解析をMiwi2ノックアウトにおいても行い、Miwi2の寄与を明らかにする。また、申請書にも記述したように、Miwi2とH3K27me3の責任酵素であるポリコーム複合体との相互作用をtwo-hybridで見出している。よって、ATAC-seqのみならず、

H3K27me3 の ChIP-seq を通して、Miwi2 のヒストン修飾への影響をも詳細に理解していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

① Yamanaka S, Siomi H., Misprocessed tRNA response targets piRNA clusters, EMBO J, 2015;34(24):2988-9 査読有

② Yamanaka S, Siomi MC, Siomi H., piRNA clusters and open chromatin structure, Mobile DNA, 2014;5:22 査読有

③ Yamanaka S, Siomi H, diRNA-Ago2-RAD51 complexes at double-strand break sites, Cell Research, 2014;24(5):511-2 査読有

〔学会発表〕(計3件)

① Yamanaka S: “Analysis of chromatin kinetics in developing male germ cells”, International meeting “Chromosome Orchestration System”, Royal Society (London), 2017年2月20~22日

② Yamanaka S, Li T., Kawamura T., Kodama T., Siomi H.: “Developing a novel method to identify chromatin components at transposons using CRISPR/Cas9 system”, RNA2016 – The 21st Annual Meeting of the RNA Society and The 18th Annual Meeting of the RNA Society of Japan, 国立京都国際会館 (京都府京都市)、2016年6月28日~7月2日

③ 山中総一郎、李典、塩見春彦: “培養細胞を用いた DNA 免疫沈降法の確立”, 第二回公開シンポジウム“生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御”, 九州大学 コラボ・ステーション(福岡県福岡市)、2014年10月31日~11月1日

〔図書〕(計2件)

① 山中総一郎、羊土社、実験医学増刊、2015、33

② 山中総一郎、学研メディカル秀潤社、細胞工学、2014、34

〔その他〕

ホームページ等

<http://siomilab.med.keio.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山中 総一郎 (YAMANAKA, Soichiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80711845