

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18454

研究課題名(和文) エンハンサーの標的決定を超えて：クロマチン基本高次構造の機能的多様性を探る

研究課題名(英文) Beyond allocating enhancers: Deciphering diverse roles of the ground-state chromatin conformation in gene regulation.

研究代表者

辻村 太郎 (Tsujimura, Taro)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：90741893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Tfap2c-Bmp7遺伝子座において、ゲノムの基本高次構造がどのような様態によりどのような役割を果たすのかを探った。まず、網羅的なゲノム変異導入(欠失または逆位)により、基本高次構造の形成原理を詳細に解明した。さらに、その中で、細胞種特異的なエンハンサー様領域が、クロマチン高次構造の形成にアクティブに寄与する様相を示した。そして、基本高次構造を変換する変異導入により、このエンハンサー様領域の相互作用の様態が変化することが示唆され、基本高次構造とエンハンサー制御の関係について、新規知見を得ることができた。その他、*in vitro*、*in vivo*で複数の細胞種におけるエンハンサー解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：I investigated diverse roles of the ground-state conformation of chromatin at a model locus of two adjacent genes Tfap2c and Bmp7. First, I introduced comprehensive deletions and inversions around the locus and analyzed their impact on the chromatin conformation. Notably, I found that an enhancer-like region that is active in a cell type specific manner is actively engaged in the organization of the chromatin conformation. Interestingly, changes of the ground-state conformation of chromatin upon the modification of the genome resulted in alteration of the interaction of the enhancer-like region. This finding highlights a novel mechanism of controlling enhancer activity by the ground-state conformation of chromatin. Furthermore, I analyzed enhancer activity of the surrounding genomic regions of the locus in several cell types using *in vitro* and *in vivo* systems.

研究分野：ゲノム機能解析

キーワード：ゲノム エンハンサー クロマチン高次構造 マウス ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

クロマチンの高次構造は、シス制御領域間の相互作用を規定するため、遺伝子発現の調節において重要な役割を果たす。これまでの研究で、多くの遺伝子座において、細胞種に依らないほぼ同一の基本高次構造が存在し、それがエンハンサーの標的遺伝子を決定する第一の要因であることが明らかになった。しかし、その基本高次構造の機能的な役割については大部分が未知である。特に、実際の生体においては、異なる細胞種で、異なる領域にエンハンサー活性を有するが故に、その位置関係に応じて基本高次構造の機能的役割も多様になり得ると考えられるが、それについて検討された例はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノムの基本高次構造に潜む生体内各組織ごとの機能的多様性を探ることを目的とする。特に、異なる位置に活性エンハンサーを持つ各組織・細胞間で比較して、相互作用パターンや遺伝子活性化作用にどのような多様性が現れるかを示す。そして、その中で基本高次構造が果たす役割を明確に示す。対象モデルは、これまでに最も詳細にゲノムの基本高次構造とその機能が解明されているマウス *Tfap2c-Bmp7* 遺伝子座とする。

3. 研究の方法

(1) 基本高次構造形成原理の解明。培養細胞系におけるゲノム編集により、遺伝子座周辺のゲノム配列を網羅的に改変した。それらについて、4C法 (Circular Chromatin Conformation Capture)により、クロマチン高次構造を解析した。各変異体を比較し、各ゲノム領域がどのように基本高次構造形成に寄与するかを明らかにした。4C法の解析においては、先進ゲノム支援の支援をいただいた。

(2) *in vitro* 分化誘導によるエンハンサー解析。上記ゲノム変異細胞株を *in vitro* で腎系統に分化誘導し、各変異領域中のエンハンサー活性を解析した。

(3) これまでに樹立した変異マウスから特定の組織を取得し、遺伝子発現プロファイルを解析し、変異領域のエンハンサー活性を解析した。

(4) 新たに *Tfap2c*, *Bmp7* の lacZ ノックインマウスを取得し、それぞれのレポーター遺伝子の発現パターンを詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) まず、ES細胞において、ゲノム中の CTCF 結合パターンを目印にして、網羅的な欠失および逆位を導入した。その結果、14の変異体を得ることができた。これらについて、4C法でクロマチン高次構造を解析した。すると、まず、*Tfap2c* と *Bmp7* の間で見られるドメインの分断が、分断領域を挟んだ形で相反目する向きにクラスターする CTCF 結合

サイトによるものであることを示した。

さらに、*Tfap2c* と分断領域との間に、*Tfap2c* および分断領域 CTCF と強く相互作用する領域の存在を認めた。本領域の相互作用は、他の細胞種では検出されていなかった。本領域のエピゲノム状態を調べたところ、CTCF は結合しておらず、一方で、細胞種特異的に RNA polII とコヒーシサブユニットの結合が存在することがわかった。興味深いことに、本相互作用により、クロマチン高次構造の分断が認められた。さらに、*Tfap2c* または分断領域 CTCF 結合サイトそれぞれを、逆位により方向性の反転を施すと、各々の領域との相互作用が消失した。本領域は、RNA polII の結合があることからエンハンサー様活性を有すると考えられる。ただし、ES細胞における *Tfap2c* 発現は本領域には依存していない。上記観察結果より、本領域は、基本高次構造の中で、自身を挟む *Tfap2c* 領域と CTCF 結合領域と排他的に結合していると考えられる。これは、エンハンサー様領域の振る舞いとして、新規の知見である。

(2) *Bmp7* は腎臓発生に必須の遺伝子である。

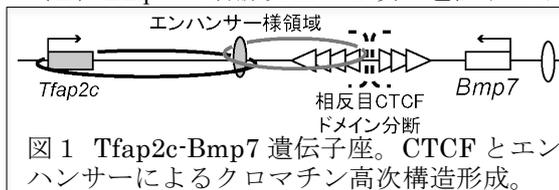


図1 *Tfap2c-Bmp7* 遺伝子座。CTCF とエンハンサーによるクロマチン高次構造形成。

る。しかし、その発現を担うエンハンサーは不明であった。そこで、*in vitro* の腎系統分化誘導系で腎臓エンハンサーのスクリーニングをすることにした。すると、*Bmp7* イントロンに位置する領域の欠失で、有意な *Bmp7* 発現の減少が認められた。反対に、他の領域の欠失では、有意な発現減少は得られなかった。しかしながら、*in vitro* の分化系は、異なる細胞株の分化レベルを同調させることが極めて困難で、微妙な発現レベルの差異の議論には不向きであることも判明した。

(3) これまでに樹立していた本遺伝子座ゲノム変異マウスについて、いくつかの組織で発現変異を解析した。ある変異体で、*Bmp7* の成体脂肪組織での発現減少を見出した。

(4) *Tfap2c* と *Bmp7* の発現を簡便かつ高感度で検出するために、*Tfap2c* の遺伝子トラップ lacZ 挿入ライン、および *Bmp7* の lacZ ノックインラインを得た。そして、それらにおいて、腎臓および乳腺組織での発現パターン解析をした。成体腎臓においては、*Bmp7* の発現が広く分布するものと報告されていたが、興味深いことに、発現はむしろ限定的であった。乳腺組織については、*Tfap2c* と *Bmp7* が、一部オーバーラップするものの、異なるパターンで発現していた。このようなパターンは、乳腺組織における両遺伝子の発現に、基本高次構造が何らかの興味深い役割を担うものと期待させるものと考えている。

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)

Tsujimura T, Idei M, Yoshikawa M, Takase O, Hishikawa K.

Roles and regulation of bone morphogenetic protein-7 in kidney development and diseases.

World J Stem Cells. 2016 Sep 26;8(9):288-96

***Tsujimura T**, Masuda R, Ashino R, *Kawamura S. (* co-corresponding authors)

Spatially differentiated expression of quadruplicated green-sensitive RH2 opsin genes in zebrafish is determined by proximal regulatory regions and gene order to the locus control region.

BMC Genet. 2015 Nov 4;16:130

[学会発表] (計 1 3 件)

辻村太郎、高瀬敦、出射真奈、吉川真弘、南学正臣、高戸毅、菱川慶一: 効率的ゲノム領域欠失・逆位導入によるクロマチン高次構造形成原理の解析, 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター (宮城県・仙台市), 2017 年 3 月 7 日 (火) ~9 日 (木)

辻村太郎、高瀬敦、出射真奈、吉川真弘、南学正臣、高戸毅、菱川慶一: 網羅的なゲノム欠失・逆位導入による、Tfap2c-Bmp7 領域のクロマチン高次構造形成メカニズムの解析, 第 39 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2016 年 11 月 30 日~12 月 1 日

Taro Tsujimura, Osamu Takase, Masaomi Nangaku, Keiichi Hishikawa,: Differential Usage of Enhancers for Bmp7 in Different Lineages of Kidney Development In Vitro, Annual Meeting of American Society of Nephrology KIDNEY WEEK, Chicago, IL, USA, Nov 15-20, 2016

辻村太郎、高瀬敦、南学正臣、菱川慶一: *in vitro* での Bmp7 腎臓発生特異的エンハンサーの効率的探索, 第 59 回日本腎臓学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2016 年 6 月 17 日~19 日

辻村太郎、高瀬敦、出射真奈、南学正臣、高戸毅、菱川慶一: マウス ES 細胞のゲノム編集による、Tfap2c-Bmp7 遺伝子座の階層的ドメイン構造の解析, 第 10 回日本エピジェネティクス研究会, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府・大阪市), 2016/05/19 ~ 2016/05/20

辻村太郎 :クロマチン構造と遺伝子発現 - 疾患研究への応用を見据えて, 第 60 回再生医療カンファレンス, 東京大学医学部附属病院 (東京都・文京区), 2016 年 4 月 21 日

辻村太郎、高瀬敦、出射真奈、南学正臣、高戸毅、菱川慶一: 片アリル欠失 ES 細胞株を用いた Bmp7 の腎系統分化誘導特異的エンハンサー領域の効率的探索, 第 15 回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市), 2016 年 3 月 17 日 (木) ~19 日 (土)

Taro Tsujimura, Osamu Takase, Mana Idei, Francois Spitz, Masaomi Nangaku, Tsuyoshi Takato, Keiichi Hishikawa,: Functional dissection of enhancers for Bmp7 in kidney development, Annual Meeting of American Society of Nephrology KIDNEY WEEK, San Diego, CA, USA, Nov 3-8, 2015

辻村太郎 : 腎臓発生における Bmp7 の特異的発現を制御するクロマチン高次構造, 第 45 回 日本腎臓学会東部学術大会「よくわかるシリーズ」, 東京ミッドタウン (東京都・港区), 2015 年 10 月 2 日 (金) ~3 日 (土)

Taro Tsujimura,: Linking the hierarchical structure of chromosome domains to functions in gene regulation, THE 40th NAITO CONFERENCE ON "Epigenetics—From Histone Code to Therapeutic Strategy", CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO (北海道・札幌市), Japan, September 15-18, 2015

辻村太郎、高瀬敦、南学正臣、菱川慶一: 腎臓発生における Bmp7 発現のシス制御機構の解析, 第 58 回日本腎臓学会学術総会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2015 年 6 月 5 日 (金) ~7 日 (日)

辻村太郎、高瀬敦、南学正臣、高戸毅、Francois Spitz, 菱川慶一: マウス Tfap2c-Bmp7 遺伝子座における階層的ドメイン構造の機能解析, 第 9 回日本エピジェネティクス研究会, 東京一ツ橋学術総合センター, (東京都・千代田区), 2015/05/25 ~ 2015/05/26

Taro Tsujimura, Osamu Takase, Mana Idei, Masaomi Nangaku, Tsuyoshi Takato, Keiichi Hishikawa, : Generation of a "semi-haploid" ES cell line for comprehensive characterization of cis-regulatory regions in the Tfap2c-Bmp7 locus. The 11th International Workshop on Advanced Genomics, 東京一ツ橋学術総合センター, (東京都・千代田区), JAPAN, May 20. 2015 - May 22. 2015

[図書] (計 件)

[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
<http://researchmap.jp/tarotsujimura/?lang=japanese>

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻村 太郎 (TSUJIMURA, Taro)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：90741893

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()