

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22695

研究課題名(和文) エピゲノム異常が合指症を引き起こすメカニズムの解明

研究課題名(英文) A novel mouse model of syndactyly: The role of CtBP1/2 in limb organogenesis

研究代表者

薬師寺 那由他 (Yakushiji-Kaminatsui, Nayuta)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：70565316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：CtBP1/2はポリコム複合体のコリプレッサーとして作用することが知られているが、四肢形成における機能についてはほとんど不明である。CtBP1/2欠損型マウスが合指症に似た表現型を示したことから、本研究課題では合指症発症の分子機構をCtBP1/2 およびポリコム複合体によるエピジェネティクス制御の観点から解明することを目指した。その結果、CtBP1/2が失われると、肢芽先端部では遺伝子の発現が上昇する傾向にあること、四肢で作用するエンハンサー領域と遺伝子のプロモーター領域におけるH3K27acとポリコム複合体の結合レベルがそれぞれ上昇することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合指症は生まれつき隣り合った指が癒合した状態であり、外科手術による治療が一般的である。遺伝子のミスセンス突然変異や、DNA配列の重複が発症原因として報告されているものもあるが、多くのタイプではその原因は不明のままである。また、クロマチン抑制因子であるポリコム複合体と、そのコリプレッサーとして作用するCtBP1/2が四肢疾患の発症原因として報告された事例もない。したがって、本研究成果は合指症の発症機序を明らかにするだけでなく、エピゲノムをターゲットとした新しい出生前診断・治療法開発への貢献が大いに期待されるものである。

研究成果の概要(英文)：It is known that CtBP1/2 act as co-repressor of Polycomb group (PcG) proteins, however, its function in limb organogenesis is largely unclear. We first generated Ctbp1/2-dKO mice and found that distal and terminal phalanges were completely fused. This specific phenotype resembles Syndactyly type VI, in which the molecular mechanism is unknown. Therefore, in this research project, we aimed to elucidate the molecular mechanism of Syndactyly from the viewpoint of epigenetic regulation by CtBP1/2 and PcG proteins. By using analyses of transcriptome and chromatin profiling, we showed increased levels of H3K27ac and RING1B across potential limb enhancers under the lack of CtBP1/2. We further found that most PcG-target genes tended to be upregulated in the dKO distal limb bud, correlating with increased level of H3K27ac at the promoters. These suggest that CtBP1/2 act as repressor via regulating the H3K27ac levels across promoters and potential limb enhancers during limb organogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：エピジェネティクス 四肢形成 合指症 CtBP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクス因子の一つであるポリコム複合体は、胚発生過程で分化誘導シグナルと協働して標的となる遺伝子の発現を調節することで、細胞の分化運命を適切に制御している。ポリコム複合体の四肢形成に果たす役割を明らかにするため、申請者はマウスをモデル動物とした研究をこれまで行ってきた。その過程で、ポリコム複合体が分化誘導シグナルであるレチノイン酸シグナルと拮抗しながら、主要な共通標的である *Meis2* 遺伝子の発現を制御していること、両者の拮抗制御によって基部先端部軸（肩から指先の軸）に沿った四肢の形態形成が適切に行われていることを明らかにした (Yakushiji-Kaminatsui et al., *Development* 2016; Yakushiji-Kaminatsui et al., *Development* 2018)。

次に、このポリコム複合体とレチノイン酸シグナルによる拮抗制御の詳細な分子機構をさらに明らかにするため、ポリコム複合体のコリプレッサーとして作用することが報告されている CtBP1 と CtBP2 に着目した。*Ctbp1/2* の両遺伝子を欠損したマウスの四肢は、ポリコム複合体欠損マウスのものと似た形態を示すことが期待された。しかしながら予想に反して、*Ctbp1/2* ダブル欠損 (dKO) マウスの四肢の形態はポリコム複合体欠損マウスのものとは異なっており、主に自脚部(手首から先)における重篤な異常が観察された。過去の知見と照らし合わせたところ、この表現型は先天異常の一つである合指症のタイプ VI によく似ていることがわかった。

2. 研究の目的

合指症は生まれつき隣り合った指が癒合した状態であり、少なくとも 9 つのタイプに分類される先天性四肢障害である。遺伝子のミスセンス突然変異や DNA 配列の重複が発症原因として報告されているものもあるが、多くのタイプではその原因は不明のままである。また、申請者が着目するクロマチンタンパク質のポリコム複合体と、そのコリプレッサーとして作用する CtBP1/2 が四肢疾患の発症原因として報告された事例もない。そこで本研究課題では、*Ctbp1/2* dKO マウスを合指症の新規モデル動物とすることで、四肢形成過程における CtBP1/2 の機能をまず明らかにする。次に、合指症発症の分子機構を CtBP1/2 およびポリコム複合体によるエピジェネティクス制御機構破綻の観点から解明していくことを主たる目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肢芽における CtBP1/2 の標的遺伝子の同定

当研究室で作製した *Ctbp1/2* dKO 胚とコントロール胚の肢芽を用いて、遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行う。遺伝子発現を網羅的に解析することで、CtBP1/2 によって直接的あるいは間接的に制御される遺伝子群を明らかにする。次に、発現変化のあった遺伝子が CtBP1 あるいは CtBP2 の直接的な標的となっているかを調べるため、野生型の肢芽と CtBP1 あるいは CtBP2 を認識する抗体を用いてクロマチンプロファイリング (CUT&Tag あるいは Chromatin immunoprecipitation, ChIP) を行う。RNA-seq の結果とあわせて、CtBP1/2 が直接制御する標的遺伝子群を同定する。

(2) CtBP1/2 欠損がクロマチン修飾状態に与える影響の評価

Ctbp1/2 dKO 胚とコントロール胚の肢芽において、ヒストン修飾状態 (H3K27ac, H3K27me3, H2AK119ub など) とポリコム複合体 (RING1B) の動態がどのように変化しうるかを CUT&Tag

にて解析する。前項目で同定した CtBP の標的遺伝子の発現制御領域（プロモーターおよびエンハンサー）に対して、ヒストン修飾状態と遺伝子発現の変化が相関しているかどうか、その関係性を追求する。

4. 研究成果

(1) 肢芽における CtBP1/2 の標的遺伝子の同定

コントロール胚と *Ctbp1/2* dKO 胚をはじめに観察したところ、E11.5 あたりまでは肢芽の形態に大きな違いはなく、E12.0 以降から徐々に差が見られることがわかった。そのため、遺伝子発現解析 (RNA-seq) は肢芽の形態差がほとんど見られない E10.5、および E11.5 のマウス胚肢芽をそれぞれ使用して実施することとした。その結果、コントロールと dKO 間での遺伝子発現の差は、E11.5 の方がより顕著であり、CtBP1/2 欠損下では発現上昇する遺伝子が圧倒的に多かった。そこで E11.5 での解析に焦点をあてることとし、次に CtBP1/2 の結合領域の同定するため、CUT&Tag と ChIP の 2 つの実験系を用いた。CUT&Tag 法は少数細胞でのクロマチンプロファイリングが可能な実験系である。細胞数が限られている胚組織由来のサンプルを使用する本課題には非常に有効であると考え、実験系の導入最適化を行い、CtBP2 抗体を用いて実験を行った。その結果、CUT&Tag 法にて同定された CtBP2 結合領域はオープンクロマチン領域と一致していたことから、Tn5 transposase に依存したアーティファクトである可能性が示唆された。そのため、次に ChIP による CtBP2 結合領域の同定を試みたが、肢芽の細胞数に限界があったことから、得られた ChIP データのクオリティは期待したほど高くはなかった。今後はよりクオリティの高い結果を得るため、MNase をベースとした CUT&RUN 法にて CtBP の標的領域の同定を行う予定である。

CtBP2 抗体を用いた肢芽での CUT&Tag および ChIP の結果が芳しくなかったことから、既に公開されているマウス ES 細胞を用いた CtBP2 ChIP データの再解析を行い (Kim et al., Stem Cells. 2015)、CtBP2 の標的領域を調べた。ES 細胞において、CtBP2 は主にイントロン領域や遺伝子間領域に結合していること、CtBP2 結合領域はエンハンサー領域の指標となる P300 とも部分的に共局在していることが明らかとなった。これは CtBP が標的遺伝子のプロモーター領域だけでなく、エンハンサー領域に結合することで遺伝子の発現を制御している可能性を示唆するものであった。

(2) CtBP1/2 欠損がクロマチン修飾状態に与える影響の評価

CtBP1/2 の欠損がポリコム複合体の動態とクロマチン修飾状態に与える影響を調べるため、E11.5 の肢芽を用いて CUT&Tag を行った。ES 細胞の CtBP2 ChIP データから、CtBP2 はエンハンサー領域に結合していることが示唆されていたため、はじめに肢芽エンハンサー領域群のクロマチン修飾状態に着目した。その結果、*Ctbp1/2* dKO 肢芽の先端部領域では、肢芽エンハンサーを含む周辺の 5kb 領域に対する H3K27ac の蓄積がコントロールよりも増加していることがわかった。H3K27ac はプロモーターおよびエンハンサー領域の活性化の指標であることから、CtBP1/2 欠損下では肢芽エンハンサー群は網羅的に活性化される傾向にあることが示唆された。また、ポリコム複合体によって形成される発現抑制の指標となる H3K27me3 は肢芽エンハンサー領域での蓄積はほとんど確認できなかったが、ポリコム複合体構成因子の一つである RING1B の蓄積とわずかではあるものの H2AK119ub の蓄積が認められた。また、興味深いことに、CtBP1/2 が失われると肢芽エンハンサー領域における RING1B の結合はわずかに増加

していた。これは H3K27ac の増加と相関していることから、CtBP1/2 欠損によるエンハンサーの網羅的な活性化を正常状態に戻すように、抑制機構として作用している可能性が考えられる。

次に、全遺伝子のプロモーター領域に着目し、ポリコム複合体とそれによるヒストン修飾状態 (H3K27me3, H2AK119ub)、そして H3K27ac の結合状態から 3 つの Cluster に分けて解析を行った。そのうち、ポリコム複合体の標的となりうる遺伝子群は Cluster I と Cluster II に含まれており、Cluster III はヒストン修飾および RING1B の結合はほとんど見られなかった。Cluster I と Cluster II に着目すると、CtBP1/2 欠損下では RING1B や H3K27me3, H2AK119ub の結合レベルにはわずかな上昇は観察されたものの、エンハンサー領域と同様に、H3K27ac レベルの変動が著しいことがわかった。さらに *Ctbp1/2* dKO の RNA-seq と ES 細胞の CtBP2 ChIP-seq の結果とあわせて、*Ctbp1/2* dKO の肢芽先端部で優位に発現が上昇している遺伝子群 (Cluster I および Cluster II) のプロモーターおよびエンハンサー領域に着目したところ、それらの制御領域には CtBP2 が結合しており、H3K27ac のレベルは優位に増加していることが明らかとなった。これらの結果から、四肢形成において、CtBP はプロモーターとエンハンサー領域の H3K27ac レベルを調節することで、標的遺伝子の発現を抑制するように作用している可能性が示唆された。この抑制機構が破綻することで、標的遺伝子の発現が異常となり、四肢の先端部の癒合を引き起こしていると考えられる。

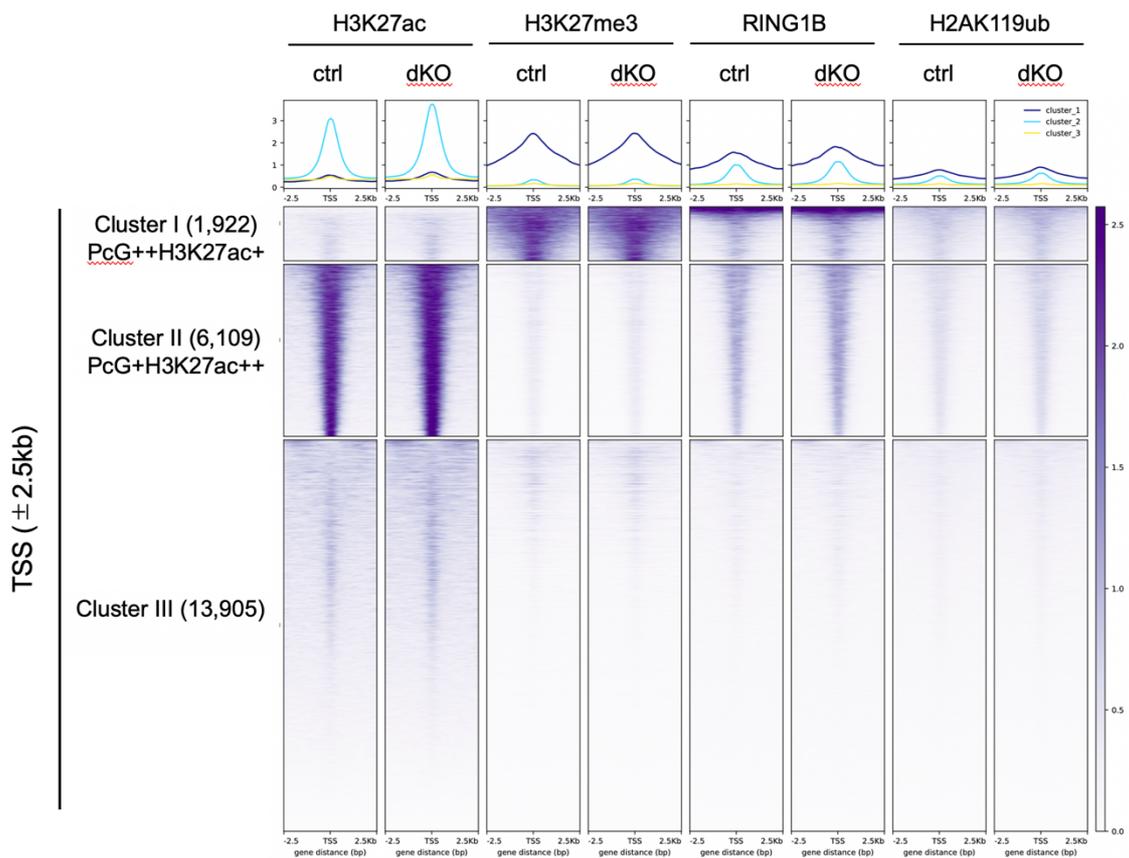


図 1 : CtBP1/2 欠損による、E11.5 肢芽先端部におけるプロモーター領域周辺のクロマチン修飾状態の変動.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Eto Hikaru, Kishi Yusuke, Yakushiji-Kaminatsui Nayuta, Sugishita Hiroki, Utsunomiya Shun, Koseki Haruhiko, Gotoh Yukiko	4. 巻 11
2. 論文標題 The Polycomb group protein Ring1 regulates dorsoventral patterning of the mouse telencephalon	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19556-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nayuta Yakushiji-Kaminatsui, Hiroki Sugishita, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki
2. 発表標題 A novel mouse model of syndactyly: The role of CtBP1/2 in limb organogenesis
3. 学会等名 53rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大川 恭行、宮成 悠介	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 270
3. 書名 クロマチン解析実践プロトコール	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------