

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22708

研究課題名（和文）統合オミクス解析を応用した骨格形成における包括的転写制御システムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of transcriptional network controlling skeletal development by genome wide analysis

研究代表者

波多 賢二（Hata, Kenji）

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：80444496

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）：内軟骨性骨形成による骨格形成においては軟骨細胞が重要な役割を演じている。近年のゲノム解析技術の進歩に伴い、ヒストン修飾やクロマチン構造をはじめとする様々な転写制御システムの解明が進んでいるが、軟骨細胞においては未だ解明が進んでいない。本研究では、転写因子がアクセスしやすいオープンクロマチン領域の同定を可能にするATAC-seq、さらには転写活性化領域を示すChIP-seqを行い、その統合解析から軟骨細胞分化に重要なエンハンサー領域と、軟骨細胞の遺伝子発現を制御する転写因子の同定に成功した。本研究結果は、骨格形成における遺伝子発現を制御する転写ネットワークシステムの解明に貢献すると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではゲノム構造解析と遺伝子発現解析を統合的に行うことにより、DNAの塩基配列の変化ではなく、クロマチン構造の変化、ヒストン修飾、mRNA発現という階層的な遺伝子発現システムを体系的かつ網羅的にゲノムスケールで解明することが可能となった。生命計測技術の進歩と情報解析技術の進歩に伴って、様々な研究領域でゲノムワイド解析が応用され生命現象や疾患関連遺伝子の解明に貢献している。次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析は今後の生命科学研究にとってますますその重要性を増すことが予測され、骨・軟骨研究における本研究の学術的意義は高い。

研究成果の概要（英文）：Chondrocytes play important roles during skeletal development. Accumulating evidence indicates that epigenetic regulation, such as histone modification and chromatin structure, is critical for gene expression. To understand the molecular mechanism of chondrocyte differentiation, we performed combination analysis of ChIP-seq and ATAC-seq using primary chondrocytes and identified chondrocyte specific enhancer regions. We have identified 31500 genomic regions as chondrocyte specific enhancer. Among them, we have identified chondrocyte specific enhancer for Sox9 and enhancer deletion mice showed the defects in endochondral bone formation. Moreover, peak-motif analysis identified several transcription factors involved in chondrocyte differentiation. Our findings would uncover novel transcriptional network controlling skeletal development.

研究分野：口腔生化学

キーワード：軟骨細胞 クロマチン構造 ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

顎顔面を含むヒトの骨格の大部分は、内軟骨性骨化とよばれる軟骨細胞が主体の骨化様式により形成される。軟骨細胞の増殖や細胞外マトリックス産生などの骨格形成に必要な細胞活動は、軟骨細胞における遺伝子発現の結果として生じるが、遺伝子発現は転写因子がエンハンサーと呼ばれる DNA 領域に結合し mRNA を発現することにより遂行される。そして、これまでの遺伝子発現に関する研究は、「一つの転写因子がゲノム上の特定の DNA 領域に結合し mRNA を促進するメカニズムを探求する」という研究アプローチで行われてきた。例えば、口蓋裂と小顎症を特徴とするピエールロバン症候群の原因遺伝子である転写因子 SOX9 は、軟骨細胞に特異的な型コラーゲン遺伝子やアグリカン遺伝子のエンハンサー領域に結合し、その mRNA 発現を促進することにより骨格形成を制御する。

一方、近年の分子生物学の進歩により転写の詳細なメカニズム解明が進み、遺伝子発現には階層的な転写制御機構が重要であることが明らかになってきた。すなわち、まず DNA を取り巻くヒストンが化学的修飾を受けることによりゲノム構造が変化し、DNA が緩んで転写因子が結合しやすいオープンクロマチン構造を獲得した後、転写因子が結合する。そしてこれらの分子メカニズム解明を可能にしたのが、近年の次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析の技術革新である。実際、癌などの様々な研究領域においてゲノムワイド解析が応用され、疾患関連遺伝子の同定やその転写制御機構の解明が進んでいる。しかし、軟骨研究におけるゲノムワイド解析は未だ不十分であり、骨格形成における遺伝子発現メカニズムをゲノムスケールで網羅的、体系的に解明することが強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、最新の次世代シーケンサー解析技術を駆使して、転写の初期段階であるヒストン修飾から遺伝子発現に至る階層的な統合オミクス解析を実施し、内軟骨性骨化に重要な新規の転写因子とその制御ネットワークを全ゲノムレベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 軟骨細胞特異的エンハンサー領域の検索

ATAC-seq によりクロマチン構造が緩み転写因子がアクセスしやすい状態になっているオープンクロマチン領域をゲノムワイドに検索する。また、初代軟骨細胞を用いて活性化ヒストン修飾の指標である H3K27ac 抗体、H3K4me2 抗体を用いた ChIP-seq を行い、軟骨細胞において転写が活性化しているゲノム領域を網羅的に検索する。そして、ATAC-seq および ChIP-seq の両方で検出されるゲノム領域を軟骨細胞におけるエンハンサーとして同定する。

(2) エンハンサー領域に結合する転写因子の予測

実験(1)で同定した全てのエンハンサー領域の塩基配列を抽出し、塩基配列の検索アルゴリズムである JASPAR データベースによる解析または Homer 解析により転写因子が結合する塩基配列の予測を行う。具体的には、エンハンサー領域の DNA 塩基配列から軟骨細胞に濃縮されている DNA モチーフ配列を抽出し、その配列を JASPAR データベースに照合することにより、当該モチーフに結合する転写因子を予測する。

(3) 内軟骨性骨化を制御する新規転写因子群の同定

皮膚線維芽細胞、骨芽細胞および軟骨細胞を用いて RNA-seq を行い、軟骨細胞に特異的に

発現する遺伝子群を検索する。そして、(2)および(3)の研究アプローチの両方に重複する転写因子を、内軟骨性骨化を制御する転写因子として同定する。候補が複数ある場合は、発現量の多い転写因子を優先する。

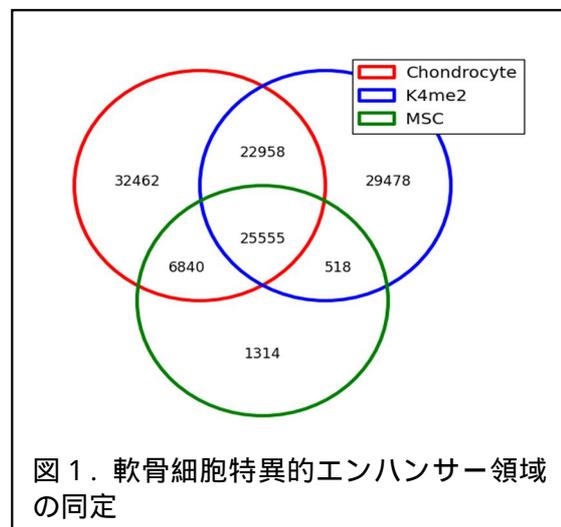
(4) 新規転写因子群の機能解析

同定されたエンハンサーならびに転写因子の内軟骨性骨化における役割を In Vitro および In Vivo で検討する。クローニングされた転写因子を過剰発現またはノックダウンさせ、軟骨細胞分化のマーカー遺伝子の発現を RT-qPCR 法により検討する。In Vivo での検討は CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて、エンハンサー欠失マウスを作製し、軟骨形成を組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 軟骨細胞特異的エンハンサー領域の同定

初代培養軟骨細胞、初代培養皮膚線維芽細胞および初代培養骨芽細胞を用いて ATAC-seq 解析を行った。その結果、初代培養軟骨細胞で 84833、骨芽細胞で 49327、皮膚線維芽細胞では 31500 カ所のオープンクロマチン領域を検出した。そして、軟骨細胞で検出された 84833 カ所のオープンクロマチン領域において、骨芽細胞および皮膚線維芽細胞のオープンクロマチン領域とオーバーラップしないピーク領域を、軟骨細胞特異的なオープンクロマチン領域として同定した。この領域から転写が活性化しているエンハンサー領域を抽出するために、H3K27ac 抗体を用いた ChIP-seq を行い、軟骨細胞特異的な ATAC-seq のピークと重複するゲノム領域を、軟骨細胞遺伝子のエンハンサーとして 22958 カ所同定した。(図1)



(2) Sox9 遺伝子発現を制御するエンハンサー領域の解明

まずはじめに、22958 カ所のエンハンサー領域の中で、軟骨細胞分化に必須の転写因子である Sox9 遺伝子の上流に存在するエンハンサー領域 (E1 および E2) に着目して検討を行った。H3K27ac 抗体を用いた ChIP-qPCR を行い、E1 および E2 領域の定量的解析を行った結果、E1 および E2 領域の転写活性は軟骨細胞分化に伴って促進されることを見出した。E1 および E2 領域に Sox9 遺伝子の minimal promoter 領域をつなげたレポーターアッセイにより、E1 および E2 領域は軟骨細胞において高いエンハンサー活性を示すことを見出した。また、Sox9 遺伝子発現の異なる様々な細胞株を用いて E1 および E2 エンハンサー活性を検討したところ、Sox タンパク質の発現とエンハンサー活性は比例していることが明らかとなった。

骨格形成における E1 および E2 エンハンサーの重要性を検討するために、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて、E1 および E2 のエンハンサー領域を単独で、また両方のエンハンサー領域を同時に欠失させたマウスを作製した。胎生期 E15 日齢の四肢から RNA を回収し RT-qPCR を行った結果、両方のエンハンサー欠損マウスは Sox9 ならびに Col2a1 遺伝子発現が有意に減少していることが明らかとなった。また、In Situ Hybridization 法による組織学的解析の結果、Col2a1 陽性の成長板軟骨領域の面積も有意に減少していた。さらにエンハンサー欠失マ

ウスより採取した肢芽細胞は、野生型マウスに比較して軟骨細胞分化能が低下していることが明らかとなった。

(3) DNA モチーフ解析による転写因子の同定

(1) でクローニングしたエンハンサー領域全ての塩基配列を抽出し、HOMER を用いて DNA 結合モチーフの解析を行った。その結果、軟骨細胞のエンハンサーに濃縮されている DNA モチーフとして、複数の転写因子結合配列が見つかった(図2)。これらの結合モチーフには既に骨格形成に重要であることが報告されている Runx ファミリーや Arid5a のみならず、新規の転写因子も含まれていた。

エンハンサー領域に濃縮していた転写因子結合モチーフをさらに絞り込むために、皮膚線維芽細胞、骨芽細胞および軟骨細胞を用いて RNA-seq を行い軟骨細胞において高発現する転写因子を抽出した。RNA-seq の結果と HOMER の結果の統合解析を行った結果、軟骨細胞に高発現しかつ結合配列が濃縮されている転写因子として Maf ファミリー遺伝子を同定した。Maf ファミリーの中でも Mafb 遺伝子欠損マウスは生後すぐに死亡し低身長を示すことが報告されている。これらの研究結果より、Mafb は軟骨細胞の複数のエンハンサー領域に結合することにより、骨格形成に関与している可能性が示唆される。

Rank	Motif	P-value	log P-value
1		1e-823	-1.897e+03
2		1e-305	-7.043e+02
3		1e-168	-3.888e+02
4		1e-101	-2.332e+02
5		1e-88	-2.028e+02

図2.軟骨細胞エンハンサーにおける DNA 結合モチーフ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishimura R, Hata K, Takahata Y, Murakami T, Nakamura E, Ohkawa M, Ruengsinpinya L	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of Signal Transduction Pathways and Transcription Factors in Cartilage and Joint Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21041340.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ono Koichiro, Hata Kenji, Nakamura Eriko, Ishihara Shota, Kobayashi Sachi, Nakanishi Masako, Yoshida Michiko, Takahata Yoshifumi, Murakami Tomohiko, Takenoshita Seiichi, Komori Toshihisa, Nishimura Riko, Yoneda Toshiyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Dmrt2 promotes transition of endochondral bone formation by linking Sox9 and Runx2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01848-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ruengsinpinya Lerdluck, Murakami Tomohiko, Nakamura Eriko, Takahata Yoshifumi, Hata Kenji, Nakaminami Yuri, Okae Hiroaki, Nishimura Riko	4. 巻 533
2. 論文標題 G protein subunit 1 is an important mediator of the late stage of endochondral ossification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 90～96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.08.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 波多賢二
2. 発表標題 軟骨細胞分化のエピジェネティクス
3. 学会等名 日本軟骨代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenji Hata
2. 発表標題 Epigenetic Regulation of Chondrocyte Differentiation
3. 学会等名 Japan Bone Academy (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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