

平成30年6月14日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05580

研究課題名(和文) 初期胚発生におけるクロマチン動態の網羅的解析

研究課題名(英文) Global analysis of chromatin dynamics in early embryonic development in the mouse

研究代表者

富川 順子 (Tomikawa, Junko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・研究員

研究者番号：80534990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,800,000円

研究成果の概要(和文)：全能性を有する細胞はいくつかの特徴をもつ。そのうちのひとつに反復配列の発現活性化があげられるが、こうした現象がどのようにして起こるのかについてはほとんどわかっていない。全能性を有するマウス2細胞期胚(2C)に特異的なゲノムの三次元構造を調べたところ、2Cでは反復配列が互いに集合した転写活性化構造体を形成していること、また、転写の非常に活発なrDNA領域に接近することで転写活性化を促し、全能性に特徴的な発現プロファイルを確立している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Totipotent stem cells have some characteristic features. One of them is the transcriptional activation of repeat sequence DNAs, but its molecular mechanism is largely unknown. In mice, only the zygote and 2-cell stage blastomeres (2C) can generate an entire organism on their own, and are therefore regarded as totipotent cells. In this study, we explored the 2C-specific three-dimensional (3D) organization of genome. We found the possibilities that the repeat DNAs expressed in 2C-specific manner assembled into transcriptionally active chromatin architectures, and that these repeat elements were closely associated with ribosomal RNA gene (rDNA) loci. These 3D genome structure may establish the transcriptional profile of totipotent cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：全能性 反復配列 三次元構造

1. 研究開始当初の背景

発生における細胞の分化過程では、幹細胞はより広い分化能を有しているのに対し、一旦分化を開始すると細胞は段階的に分化能を失っていき、かわりにある一定の形質を獲得する。この不可逆的な過程には、遺伝子発現のオン/オフを基底状態で決定するエピジェネティック機構が寄与していると考えられる。

DNA のメチル化、ヒストン修飾は共に、高等真核生物の主要なエピジェネティック機構であり、DNA 配列の変化を伴わずに遺伝子機能を変化させ、その変化は DNA 複製、細胞分裂を経て娘細胞ゲノムに再構成される。DNA のメチル化は、遺伝子サイレンシングの中心的分子機構としてその生理機能の理解が比較的進んでいるエピジェネティック機構であり、メチル化された遺伝子領域はクロマチン凝縮を伴い、遺伝子発現が厳しく抑制される不活性化領域となると考えられている (Tomikawa *et al.*, *J Biol Chem*, 2006)。ヒストン修飾もまた、DNA メチル化と相互に作用してクロマチン構造のダイナミックな変化と遺伝子の発現調節とを結び付けている (Tomikawa *et al.*, *J Biol Chem*, 2006; Tomikawa *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012)。このように、個々の遺伝子発現は、DNA およびヒストンの修飾、プロモーター・エンハンサー領域でのクロマチン構造の開放、転写因子の結合、プロモーター・エンハンサーの相互作用、転写開始と、それぞれにいたるステップを段階的に、また正確に経ることによって調節されている。しかし、2万以上にのぼる遺伝子各座においてそれらの現象がばらばらに行われることはあまりにも非合理的であり、ほ乳類細胞において、実際に細胞の分化段階に同調して発現する複数の遺伝子がゲノム上に散在していることから考えても、標的遺伝子群の発現を時期特異的に一括して制御する高次のクロマチン構造制御システムが細胞内に存在することは間違いない。

2. 研究の目的

本研究では、ほ乳類の初期発生過程における最初の分化(胎仔、胎盤系列幹細胞の発生)段階をモデルとし、染色体高次構造変換という観点から胎仔側、胎盤側それぞれへの細胞分化の評価系となりうる機能的なゲノム領域を網羅化する。これにより、正常な発生・分化に不可欠な機能的ゲノム領域の同定を行い、さらには胎仔、胎盤各系譜の多能性幹細胞に分岐する前の細胞が有する「全能性(超万能性)」を規定する機構解明を目的とする。

3. 研究の方法

Chromosome Conformation Capture (3C) 解析法は、Dekker らによって開発された、核内

で三次元的に近接したゲノム領域同士を検出するクロマチン構造解析法の一つであり (Dekker *et al.*, *Science*, 2002)。エンハンサー・プロモーター間など、直接的に相互作用しうる領域を分子生物学的な実験系で検証することが可能である。近年では、次世代シーケンサーとの併用により、全染色体上での遺伝子座集積状況を網羅的に解析することが可能となった (Lieberman-Aiden *et al.*, *Science*, 2009; Dixon *et al.*, *Nature*, 2012; Dekker *et al.*, *Nat Rev Genet*, 2013)。本研究では、3C 法の一つである *in situ* Hi-C 法を用いてゲノムワイドに解析することにより、いわゆる全能性の維持、喪失に伴った染色体高次構造変化という観点から、正常発生に関わる機能的ゲノム領域を探索した。また、その際の遺伝子発現変化を捉えるため、RNA-seq による全トランスクリプトーム解析を行った。全能性細胞モデルとして 2 細胞期胚 (2C) を、胎仔系列細胞モデルとして Embryonic stem (ES) 細胞を、胎盤系列細胞モデルとして Trophectoderm stem (TS) 細胞をそれぞれ用いた。

4. 研究成果

(1) 2C、ES、TS それぞれのクロマチン構造

in situ Hi-C 法により得られた配列情報を 2C 特異的あるいは ES、TS 特異的など、3 者間で比較した。まず、2C でははっきりとしたドメイン構造がみとめられなかった (図 1)。一方、ES-TS 間で Topologically associating domain (TAD) は、これまでの様々な細胞種での報告と同様によく保存されていたが、TS は ES に比べ遠距離間でのインタラクションが多数形成されている傾向がみられた (図 1)。

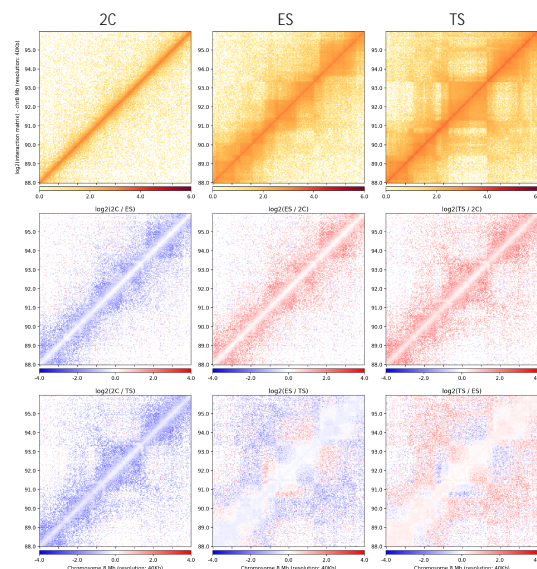


図 1 Hi-C コンタクトマップの比較

(2) ループ形成領域間の距離

2C では分化の進んだ細胞種に比べて染色体間でのインタラクションが多くみとめられた (図 2)。ES では TAD 内インタラクションと推定される比較的距離の短いペア (~1

Mb)の割合が多いのに対し、TSでは他の細胞種に比べて距離が長いペアが多く(5 Mb以上) TAD間インタラクションが多数形成されていることが推定された。また、ES、TSに加えて、すでに公開されているあらゆる細胞種のHi-Cデータを再解析し比較したところ、染色体間インタラクションは細胞の分化レベルに応じて減少していることが示された(図2)。

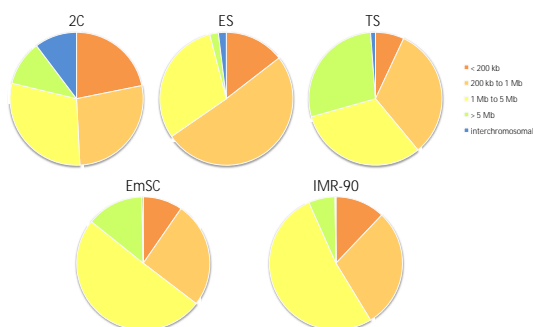


図2 ループ形成距離の細胞種間比較

(3) 2C 特異的なループ形成領域

HOMER (Heinz *et al.*, *Mol Cell*, 2010)を用いたデータ解析により、2C 特異的に形成されるループ領域を959ペア検出した。3者間で共通するペアに比べ、2C 特異的なペアでは染色体間インタラクションの割合が非常に高かった(1.6% vs 51%)。

2C 特異的なループを染色体内及び染色体間のペアに分け、それぞれの特徴を検証したところ、染色体内インタラクションを形成するペアには、2C 特異的に転写活性化された反復配列を含むものが多数みられた。2Cでは、2C 特異的に発現するMERVLというLong terminal repeat (LTR)が知られているが、RNA-seqの結果から、あらゆるタイプの反復配列の転写活性化がみとめられた(図3)。特に、LTR、Long interspersed elements (LINE)の進化的に比較的新しい反復配列サブタイプが高発現していることが明らかになった。

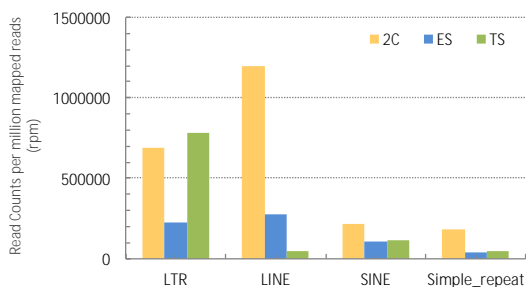


図3 2Cにおける反復配列の転写活性化

一方、染色体間インタラクションを形成するペアでは、17番染色体のRn45遺伝子領域との強いインタラクションが多数検出された。Rn45はリボソームDNA (rDNA)配列の一部を有する偽遺伝子であることから、Hi-CデータをrDNAに着目してマッピングし直してみると、2CではrDNA全域との強いインタラクションがみとめられた。

さらにHOMERによるモチーフ解析から、rDNAとインタラクションしている領域に集中している結合因子が推定された。この因子は、2Cにおいてもすでに発現していることから、2Cの核内高次構造形成への関与が示唆された。そこで、この因子のノックアウトマウスを作製し、この因子が全能性の確立においてどのような役割を果たすのか検証を試みている。

このように、2Cの核内では、はっきりとしたドメイン構造はみとめられないものの、2C 特異的に転写活性の高い反復配列同士が集合した染色体内高次構造を形成している可能性が示唆された。また、2Cでは分化の進んだ細胞種に比べて染色体間のインタラクションが多く、なかでもrDNAを基点とした2C 特異的な高次構造体を形成している可能性が示唆された。染色体間インタラクションは分化の進行に相関して減少しており、分化レベルを示す指標になるのではないかと考えられた。以上のことから、2Cでは反復配列が互いに集合した転写活性化構造体を形成、あるいはrDNA領域との染色体間インタラクションを形成することで転写活性化を促し、全能性に特徴的な発現プロファイルを確立しているのではないかと考えられた。

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 3件)

- 1) **Tomikawa J.**, Takada S, Okamura K, Terao M, Akutsu H, Tanaka S, Hata K, and Nakabayashi K. An inter-chromosomal enhancer-promoter interaction critical for *Tead4* expression in the blastocyst. *Nucleic Acids Res.* (査読あり) 投稿中
- 2) Hori I, Kawamura R, Nakabayashi K, Watanabe H, Higashimoto K, **Tomikawa J.**, Ieda D, Ohashi K, Negishi Y, Hattori A, Sugio Y, Wakui K, Hata K, Soejima H, Kurosawa K, and Saitoh S. CTCF deletion syndrome: Clinical features and epigenetic delineation. *J. Medical Genetics* (査読あり) 54: 836-842 (2017) doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104854
- 3) Masuda A, Katoh N, Nakabayashi K, Kato K, Takeda S, Hata K, and **Tomikawa J.** An improved method for the isolation of endometrial epithelial and stromal cells from the total hysterectomy specimen. *J. Reprod. Dev.* (査読あり) 62: 213-218. (2016) doi: 10.1262/jrd.2015-137

[学会発表](計 4件)

- 1) **宮川順子**、高田修治、岡村浩司、阿久津

英憲、田中智、秦健一郎、中林一彦. 染色体間相互作用を介した細胞系列特異的 *Tead4* 発現制御. 第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会. 2017 年 12 月 20 日～12 月 22 日. 蒲郡グリーンホテル三ヶ根

- 2) **富川順子**、高田修治、岡村浩司、阿久津英憲、田中智、秦健一郎、中林一彦. クロマチン高次構造に基づいた細胞系列特異的エンハンサーの探索. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 2017 年 12 月 6 日～12 月 9 日. 神戸ポートアイランド
- 3) **Tomikawa J**, Takada S, Okamura K, Hayashi K, Terao M, Akutsu H, Tanaka S, Hata K, Nakabayashi K. *Tead4* interactome organized for mouse extraembryonic cell lineage specification. 第 72 回藤原セミナー. 2017 年 9 月 13 日～9 月 15 日. 北海道苫小牧
- 4) **富川順子**、岡村浩司、阿久津英憲、田中智、秦健一郎、中林一彦. クロマチン高次構造に基づいた細胞系列特異的エンハンサーの同定. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日. パシフィコ横浜

〔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〕

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

富川順子 (TOMIKAWA Junko)

国立成育医療研究センター研究所・研究員
研究者番号：80534990

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

西園啓文 (NISHIZONO Hirofumi)

富山大学 研究推進機構 研究推進総合支援センター・助教

研究者番号：10502289