

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：82704

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15076

研究課題名(和文)染色体立体配座に寄与する配列の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the DNA region contributing to higher structure formation of chromosome

研究代表者

近藤 隆 (Kondo, Takashi)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・未病改善食品評価法開発プロジェクト・研究員

研究者番号：40333299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：染色体立体構造は正常な転写制御、染色体複製において重要な役割を果たすことが近年示唆されている。しかしながら、染色体立体構築形成の機構についてはほとんど知られていない。本研究は、Meis2領域を中心にそのプロモーターに遺伝子発現状態に関わらず相互作用している領域を見出し、その機能の検証を目的としている。

本期間内に、コンディショナルノックアウトのES細胞およびマウスの樹立を行うことに成功した。また、発生時における、Meis2遺伝子の発現は複雑に変容していることが見出された。また期間内の実験により、欠失変異マウスは初期発生において致死であることが示唆されており、今後さらなる検証が必要とされている。

研究成果の概要(英文)：Recent studies suggest that three dimensional structures of chromosomes have important roles in transcriptional regulation or chromosomal replication, however, the mechanisms underlying forming chromosomal three dimensional structures remains unknown. In this work, we made attempt to understand the function of the DNA sequence that we found in a distance of 500 kb from Meis2 promoter and interacting to Meis2 promoter regardless of the transcriptional activity of Meis2.

We tried and succeeded to establish conditional knockout ES cells and mouse line in this funding period. We also found that this DNA region has impact to transcription activities of Meis2 promoter by the conditional deletion of this DNA region. This transcriptional pattern alterations are very complex and out of expectations, and thus the DNA region reveals that it is not simple enhancer sequence. And also, preliminary results suggest that entire knockout homozygotes are lethal in the very early stages (blastocyst?).

研究分野：医師薬学、分子発生学

キーワード：ゲノム医化学 染色体立体配座 遺伝子発現制御 個体発生 Meis2遺伝子座 マウス

1. 研究開始当初の背景

- (1) 近年、遺伝子の発現、染色体の組換え、あるいは複製に関して染色体の高次構造が大きな役割を果たしていると考えられている。しかしながら、その高次構造を規定する DNA 配列情報、あるいはそれに必要とされる蛋白質、RNA 等のトランスの因子に関しては全く判っていない。
- (2) 申請者はこれまでマウスの発生における Meis2 遺伝子をモデルシステムとして転写活性の状態と染色体高次構造（プロモーター・シス転写調節領域間の相互作用による立体配座形成）の関連について研究を進めて来た（Kondo et al., Dev. Cell, 2014）。その途上で、エンハンサー群と異なり、Meis2 遺伝子プロモーターに組織非特異的に相互作用している DNA 断片の存在を見出した。この配列（以下配列 H と呼ぶ）は、Meis2 プロモーターから 350kb の距離に有る。配列 H は、エンハンサーあるいはサイレンサーと結論づける事ができず、既知の配列とは異なる性質を持っているのでは無いかと予想された。
- (3) さらに申請者は配列 H の欠失マウスの作製を目指し、ES 細胞を用い、ノックアウトを試みたが、800 コロニーの細胞を単離したにもかかわらず、一つの組換え細胞を得ることができなかった。この事は ES 細胞における致死性を示唆しており、配列 H の生体活動の上での重要性を示している。

2. 研究の目的

- (1) 配列 H のコンディショナルノックアウト ES 細胞およびマウスの樹立を行う。
- (2) コンディショナルノックアウトマウスの遺伝子発現を検証する。
- (3) ノックアウトマウスの表現系を解析する。
- (4) ノックアウトマウス、ES 細胞を用いて、Meis2 プロモーターおよび配列 H を中心

とした染色体高次構造の解析を行う。

3. 研究の方法

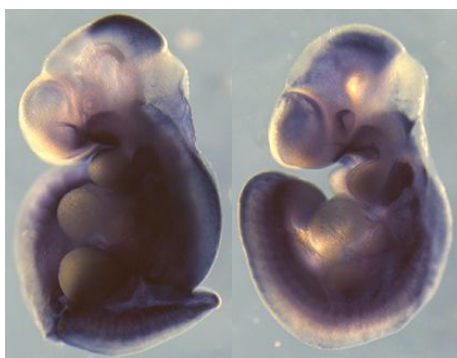
- (1) 野生型 ES 細胞を用い、配列 H の前後を loxP 配列で挟んだ染色体座を持つ ES 細胞を作成する。この ES 細胞は loxP 配列を持つ染色体座をヘテロザイゴートで持っていることになる。この ES 細胞を基にキメラ作成を行い、配列 H-loxP のマウスを樹立する。このマウスを後輩により loxP 座をホモザイゴートにし、さらにここにタモキシフェンで活性誘導を行うことができる組み換え酵素 CreErt2 を全身性に発現するための遺伝子座を導入する（ $H^{flox/flox}; Rosa-CreErt2^{+/-}$ ）。組み換え酵素 CreErt2 はタモキシフェン存在下でのみ loxP 配列に対し、組み換えを起こし、二つの loxP に挟まれた配列を欠失させることができる。このマウスを本実験を行う上での標準系統として以下のほとんどの実験において用いる。さらにこのマウスの胚盤胞より ES 細胞を樹立した。
- (2) マウス発生時の Meis2 遺伝子の発現を whole mount in situ hybridization の手法を用いて検証する。
- (3) 配列 H の loxP 染色体座に恒常的に Cre を発現しているマウスを交配し、配列 H の欠失マウスを作成する。そのヘテロザイゴート同士を掛け合わせ、胎児の出現率の比較を行う。
- (4) コンディショナルノックアウトマウスの胎児、あるいは ES 細胞を集め、chromosomal conformation capture (3C) を基盤とした技術である 4C-seq と染色体座の相互作用を細胞ごとに可視化することができる 3D-FISH の方法を用い、計測を行う。

4. 研究成果

- (1) これまでに通常のノックアウト作成は、800 個以上の ES 細胞コロニーを検証して

きたが一つも得ることができなかった。しかしながら、コンディショナルノックアウトは容易に得ることができ、また、マウスの樹立、さらには目的としていた $H^{flox/flox};Rosa-CreErt2^{+/-}$ のマウス系統を立ち上げることができた。以下のほとんどの実験はこの系統を中心に行う。また、このマウスから $H^{flox/flox};Rosa-CreErt2^{+/-}$ 染色体座を持つ ES 細胞を樹立した。これにより、マウスおよび ES 細胞においてタモキシフェンを与えることにより、発生あるいは培養時期特異的に配列 H を欠失させることが可能になった。ES 細胞を用いた実験はこの細胞を用いて行う。

- (2) マウスの胎生 8 日で母親の腹腔にタモキシフェンを射ち、配列 H を欠失させ、9 日胚で胎児を回収した。Meis2 遺伝子のプローブを用いて whole mount in situ hybridization を行なったところ、目、間脳他の部分での Meis2 の発現上昇が見られると同時に、中脳、鰓弓、体節等での発現下降が観察され、単純なエンハンサーではないことが判明したが、遺伝子の発現に複雑な影響を与える配列であることは明確になった。



野生型 変異マウス

図 1 野生型と変異マウス 9 日胚の発現の比較

- (3) 配列 H の loxP 染色体座を持つマウスを、CAG プロモーターで Cre 組み換え酵素を発現しているマウスと交配し、配列 H を恒常的に欠失したマウスを作成した。ヘ

テロザイゴートは生存可能で交配可能であったため、ヘテロザイゴート同士をさらに交配し、産仔数の検討を行っている。まだ例数が少なく、結果として明言はできないが、7 日胚の時点でホモザイゴートは現在のところ見つかっておらず、初期胚での致死性が示唆された。この初期胚での致死性は我々が行った他のエンハンサーノックアウトでも観察され、この二つの領域間の相互作用を今後検証していきたいと考えている。

- (4) この二年の間に 4C-seq および FISH の方法を変更し、よりバックグラウンドの少ない方法を開発し、現在、9 日胚でのサンプルを集めており、これらのサンプルを用いて近日中に解析予定である。4C-seq に置ける改良点は、ビオチン化プライマーを用いて特異性を高める点、二つ目の酵素を用いずに超音波破砕で DNA 処理を行うことにより、制限酵素の種類と染色体上における制限酵素認識配列の位置に依存して検出されることがなくなってしまう可能性のある配列をなくした点に特徴がある。FISH はこれまで 30kb から 40kb の大きさの染色体領域に相当する DNA (フォスミド) をプローブに用いていたが、7kb 程度のより特異的な配列で構成された PCR 断片を用いることにより、バックグラウンドを大きく減弱させることに成功した。今後これらの手法を用いて解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) Kondo, T., Ito, S. and Koseki, H. (2016). Polycomb in Transcriptional Phase Transition of Developmental Genes. Trends Biochem. Sci. 41, 9-19. doi: 10.1016/j.tibs.2015.11.005.
- (2) Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F,

- Yasuoka A, Shimada K, Kondo K, Ishijima T, Toyoda T, Arai S, Kondo T, Abe K. (2016). Quantitative deviating effects of maple syrup extract supplementation on the hepatic gene expression of mice fed a high-fat diet. *Mol. Nutr. Food Res.* doi: 10.1002/mnfr.201600477.
- (3) Shinozaki, F., Abe, T., Kamei, A., Watanabe, Y., Yasuoka, A., Shimada, K., Kondo, K., Arai, S., Kumagai, K., Kondo, T. and Abe, K. (2016). Coordinated regulation and adipose tissue transcriptomes by the oral administration of an amino acid mixture stimulating the larval saliva of *Vespa* species. *Genes Nutr.*, doi: 10.1186/s12263-016-0534-2.
- (4) Yakushiji-Kaminatsui, N., Kondo, T., Endo, T.A., Koseki, Y., Kondo, K., Ohara, O., Vidal, M. and Koseki, H. (2016). RING1 proteins contribute to early proximal-distal specification of the forelimb bud by restricting *Meis2* expression. *Development*. **143**, 276-85. doi: 10.1242/dev.127506.
- (5) Kamei, A., Watanabe, Y., Shinozaki, F., Yasuoka, A., Kondo, T., Ishijima, T., Toyoda, T., Arai, S. and Abe, K. (2015). Administration of a maple syrup extract to mitigate their hepatic inflammation induced by a high-fat diet: a transcriptome analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **18**, 1-5.
- (6) Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., Ishikawa, E., Shima, T., Hara, T., Kado, S., Jinnohara, T., Ohno, H., Kondo, T., Toyooka, K., Watanabe, E., Yokoyama, S., Tokoro, S., Mori, H., Noguchi, Y., Morita, H., Ivanov, I.I., Sugiyama, T., Nuñez, G., Camp, J.G., Hattori, M., Umesaki, Y. and Honda, K. (2015). Th17 Cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells. *Cell* **163**, 367-80. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.058.
- 〔学会発表〕(計 3 件)
- (1) Kondo, T., Kondo, K., Sugishita H., Ito, S., Abe, K. and Koseki, H. (2016). Enhancer action on a developmental regulatory gene repressed by *Polycomb*. 分子生物学会年会・横浜、2016 年 11 月 30 日 (シンポジウム、招待、口頭)
- (2) 嶋田 耕育, 安岡 顕人, 亀井 飛鳥, 篠崎 文夏, 渡辺 由貴, 近藤 香, 近藤 隆, 阿部 啓子 (2016). 孤立飼育がマウスの脳と各臓器のトランスクリプトームに与える影響分子生物学会年会・横浜 (ポスター)
- (3) 近藤隆、近藤香、梶下紘貴、古関明彦 (2015). 発生遺伝子群のプロモーター制御において異性型 Polycomb 複合体は従来型と異なる活性を持つ。分子生物学会年会・神戸、2015 年 12 月 4 日 (ワークショップ主催、口頭)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 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 0 件)
- 名称：
 発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 隆 (KONDO Takashi)
神奈川科学技術アカデミー・未病改善食品
評価法開発プロジェクト・研究員
研究者番号： 40333299