

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07249

研究課題名(和文) 転写にともなう条件的ヘテロクロマチン形成機構のダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Elucidation of transcription-coupled facultative heterochromatin dynamics

研究代表者

大畑 樹也 (Ohhata, Tatsuya)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80616459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写はクロマチンと呼ばれる分子複合体の動的な変動を介して制御されているが、その制御因子や機構に関する知見は乏しい。

本研究では、Tsix発現誘導系を用い、Xist遺伝子座における動的な条件的ヘテロクロマチンダイナミクスの解明を試みた。結果、段階的な変換を明らかにした。始めに、オープンクロマチンおよび活性型ヒストン修飾導入を伴う一時的な発現上昇が確認された。次に、ヒストン修飾変化を伴うTsix 依存的で可逆的な発現抑制へと推移した。最後に、DNAメチル化導入を伴う、Tsix非依存的で不可逆的な発現抑制状態へと推移した。本研究成果は、条件的ヘテロクロマチン形成機構の理解に大きく貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、Tsix RNA によるエピジェネティック修飾および構造変化の関係性及び階層性を明らかにした。この成果は、アンチセンス転写による制御機構の理解に留まらず、エピジェネティクスを介した遺伝子発現制御機構といった、さらに一般的な基礎研究領域にも貢献する。

発生段階や細胞分化に応じてヘテロクロマチン化する領域は条件的ヘテロクロマチンとよばれており、この時間空間特異的な発現調節機構の理解は、再生医療や老化、その破綻によるがんを含む各種疾患への関与など、その応用面でも注目されている。本研究成果により明らかとなった条件的ヘテロクロマチン形成機構の理解は、各種疾患への応用へも期待される。

研究成果の概要(英文)：The fine-scale dynamics of epigenetic switching from euchromatin (EC) to facultative heterochromatin (fHC) has remained largely unclear. Here, we focused on Xist and its silencing initiator Tsix as a paradigm of transcription-mediated epigenetic switching. Studying the dynamics revealed that the conversion proceeds in a stepwise manner: initially, transient activation accompanied by active epigenetic alterations and opened chromatin structure is observed. In the second step, gene silencing is initiated that is initiator-dependent and reversible and accompanied by simultaneous changes of multiple histone modifications. At the last step, silencing becomes initiator-independent and irreversible, correlated with DNA methylation introduction. This choreography provides fundamental information to understand the mechanism of gene regulation via epigenetic machinery.

研究分野：分子生物学、エピジェネティクス、ノンコーディングRNA、アンチセンスRNA、X染色体不活性化

キーワード：エピジェネティクス X染色体不活性化 ノンコーディングRNA アンチセンスRNA cisNATs Tsix

1. 研究開始当初の背景

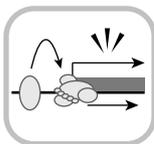
転写はクロマチンと呼ばれるヌクレオソーム、タンパク質、RNAが結合した分子複合体の動的な変動を介して制御されている。ほ乳類のメスでは、オスとのX連鎖遺伝子発現量を等量に補正する為に、一本が不活性化される。このX染色体不活性化は機能的長鎖ノンコーディングRNAである*Xist*が引き起こす。*Xist*全体を覆う形で逆向きに転写されているアンチセンスRNAである*Tsix*は、*Xist*の発現を負に調節する。その際、*Tsix*によって*Xist*プロモーター上には条件的ヘテロクロマチンが形成される。この様な、発生段階や細胞分化の転写制御機構である条件的ヘテロクロマチンの動的な構造変化に関して、それを制御する因子や機構に関する知見は乏しかった。

2. 研究の目的

本研究は、ユークロマチンから条件的ヘテロクロマチン形成に至るまでのエピジェネティック修飾群の動的な構造変化の解明を目的とした。この目的のために、独自に開発した実験系であるエピブラスト幹細胞を用いた。この細胞の大きな特長は、ドキシサイクリン添加による*Tsix*の転写誘導に伴い、*Xist*プロモーター領域に条件的ヘテロクロマチンが形成されることである。

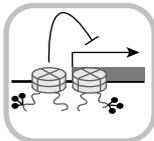
3. 研究の方法

本研究目的である、ユークロマチンから条件的ヘテロクロマチン形成に至るまでのエピジェネティック修飾群の動的な構造変化の解明のため、以下の各種エピジェネティック修飾群の解析を行った。



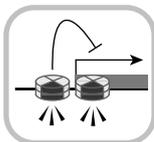
Xist の転写活性の解析 (転写因子、RNA ポリメラーゼ II 修飾など)

Tsix 発現誘導にて *Xist* の発現は抑制される。この際の、RNA ポリメラーゼ II、その修飾、転写因子 YY1 などの局在の変化を、ChIP アッセイにて解析。



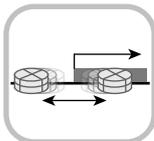
各種ヒストン修飾解析 (ChIP アッセイ)

ヒストン修飾は遺伝子のエピジェネティックな発現制御に関わる。各種ヒストンマークの継時的な変化を、ChIP アッセイを用いて解析。



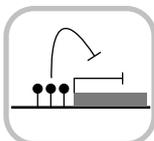
ヒストンバリエーションの解析

ヒストンバリエーションはヒストンタンパクの亜種であり、クロマチン形成とゲノム機能発現調節を行っている。この変化を、ChIP アッセイにて解析。



クロマチンリモデリング解析 (MARS アッセイ)

転写の状態に合わせてヌクレオソームは移動する。このヌクレオソーム位置情報の継時的変化を、MARS アッセイにて解析。



DNA メチル化解析 (パイロシークエンシング)

プロモーターへの DNA メチル化導入はその転写を抑制する。この DNA メチル化の継時的変化を、パイロシークエンシング法にて解析。

4. 研究成果

本研究により、*Tsix*の転写誘導に伴う*Xist*プロモーター領域のユークロマチンから条件的ヘテロクロマチン形成に至るまでの動的な構造変化が明らかになった。それらは、未報告なものも多く含む、ヒストン修飾変化、ヒストンバリエーション変化、DNAメチル化変化、ヌクレオソームの配置変化、クロマチン形成因子局在変化などであった。

ChIPによる微細な継時的変化をより正確に解析するためにSpike-in法を用いた解析を行った。この結果、*Tsix*の転写誘導に伴う*Xist*プロモーター領域のユークロマチンから条件的ヘテロクロマチン形成に至るまでのヒストン修飾群の継時的変化が明らかになった。さらに、一度誘導した*Tsix*発現を再び休止させることで、可逆的な遺伝子発現制御から、*Tsix*非依存的で不可逆的な遺伝子発現抑制にいたるエピジェネティック修飾の変移も明らかになった。

ダイナミクス解析により、ユークロマチン(図1、A)から条件的ヘテロクロマチン(図1、B)への段階的変換が明らかとなった。第一に、オープンクロマチンおよび活性型ヒストン修飾導入を伴う一時的な発現上昇が確認された(図1、A')。次に、ヒストン修飾変化を伴う*Tsix*依存的で可逆的な発現抑制が確認された(図1、B')。そしてその発現抑制状態は、転写開始点上流のヌクレオソームの占有およびDNAメチル化導入を伴う、*Tsix*非依存的で不可逆的な発現抑制状態へと推移した(図1、B'')。本研究成果により明らかになったユークロマチンからヘテロクロマチンへの動的な構造変化および発現抑制能変化は、X染色体不活性化の制御機構に留まらず、条件的ヘテロクロマチン形成機構の理解に大きく貢献すると思われる。

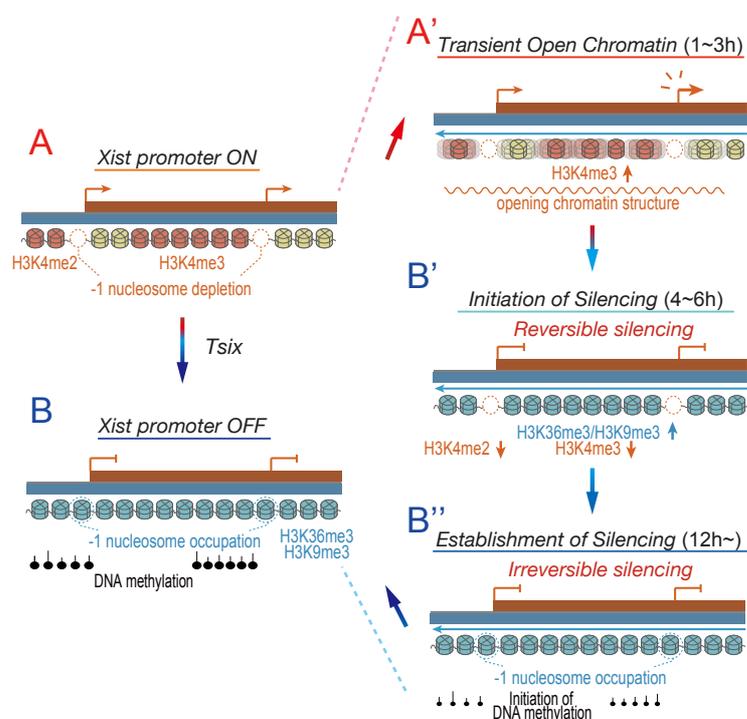


図1 本研究にて明らかとなった、*Tsix*による、*Xist*プロモーター上におけるユークロマチンから条件的ヘテロクロマチンへのダイナミクス (In revision)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大畑 樹也
2. 発表標題 A snapshot of facultative heterochromatin dynamics revealed by antisense long non-coding RNA Tsix
3. 学会等名 第6回 X染色体研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大畑 樹也
2. 発表標題 A snapshot of facultative heterochromatin dynamics revealed by antisense long non-coding RNA Tsix
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuya Ohhata, Hiroshi Kimura, Kazuki Yamazawa, Anton Wutz, Masatoshi Kitagawa
2. 発表標題 アンチセンス非コードRNA Tsix による条件的ヘテロクロマチン形成機構の動的解析
3. 学会等名 第11回 日本エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tatsuya Ohhata, Hiroshi Kimura, Kazuki Yamazawa, Anton Wutz, Masatoshi Kitagawa
2. 発表標題 Dynamics of facultative heterochromatin formation at the Xist promoter evoked by antisense long non-coding RNA Tsix
3. 学会等名 The 43rd Naito Conference on "Noncoding RNA: Biology, Chemistry, & Diseases" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tatsuya Ohhata, Hiroshi Kimura, Kazuki Yamazawa, Asuka Miura-Kamio, Hisato Kobayashi, Anton Wutz, Masatoshi Kitagawa
2. 発表標題 A snapshot of facultative heterochromatin dynamics revealed by antisense long non-coding RNA Tsix
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Epigenetics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大畑 樹也
2. 発表標題 A snapshot of facultative heterochromatin dynamics revealed by antisense long non-coding RNA Tsix
3. 学会等名 第5回 X染色体研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大畑 樹也
2. 発表標題 A snapshot of facultative heterochromatin dynamics revealed by antisense long non-coding RNA Tsix
3. 学会等名 第4回 北陸エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大畑樹也
2. 発表標題 条件的ヘテロクロマチン形成機構の解明を目指して
3. 学会等名 第1回浜松医科大学学内研究交流会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tatsuya Ohhata
2. 発表標題 Dynamics of repressive chromatin conformation at the Xist promoter revealed by Tsix-inducible system
3. 学会等名 X chromosome inactivation -A tribute to Mary Lyon- (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tatsuya Ohhata
2. 発表標題 Investigating the molecular mechanisms of Tsix antisense RNA involved in the Regulation of X-chromosome inactivation
3. 学会等名 第3回北陸エビジェネティクス研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大畑樹也、松本美香、Martin Leeb、柴田進和、北川恭子、丹伊田浩行、酒井聡、Anton Wutz、北川雅敏
2. 発表標題 アンチセンスRNA TsixはH3K36me3をXistプロモーターに導入しXistの発現を抑制する
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tatsuya Ohhata
2. 発表標題 Dynamics of repressive chromatin conformation at the Xist promoter revealed by Tsix-inducible system
3. 学会等名 第22回浜松医科学シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大畑樹也	4. 発行年 2016年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 12
3. 書名 lncRNAと疾患, ノンコーディングRNA -RNA分子の全体像を俯瞰する-	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----