

令和元年5月29日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14644

研究課題名(和文) エピゲノム制御に基づくモノアレル遺伝子発現の検出と個体内遺伝的多様性の探索

研究課題名(英文) Detection of monoallelically expressed genes under epigenetic control and quest for intraindividual genetic diversities

研究代表者

阿部 訓也 (Abe, Kuniya)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・チームリーダー

研究者番号：40240915

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)：ランダムに選択され発現するランダムモノアレル発現遺伝子および刷り込み型のモノアレル発現遺伝子は個体内遺伝的多様性に影響する要因になると考えられるが、その実態の詳細は明らかにされていない。本研究では、ES細胞の分化系を利用し、シングルセルRNA-Seqによって各種のモノアレル発現遺伝子の解析を行った。その結果、X染色体不活性化におけるモノアレル発現動態を初めてシングルセルレベルで解析・記述することに成功した。また、予想に反して、既知の刷り込み遺伝子とは異なる、遺伝型に依存してモノアレル発現を示す遺伝子も複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から得られたシングルセルRNA-Seqデータおよびこの度考案したアレル特異的発現解析パイプラインを用いることで、今回明らかにしたX染色体不活性化におけるモノアレル発現ダイナミクスに係わる知見のみならず、刷り込み型や常染色体上のランダムモノアレル発現遺伝子に関する研究にも貢献できると考えられ、本研究で得られた手法やデータは高い学術的価値を持つものと思われる。また、今回、初めて明らかになったgenetic-origin-dependentモノアレル発現遺伝子も、遺伝的多様性の創出に影響すると考えられ今後さらに追究されるべきと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Monoallelically expressed genes (MEGs), both random and imprinted MEGs, could influence genetic constitution of individuals. However, nature of these MEGs and their regulations are not fully understood. In this study, we analyzed expression dynamics of MEGs during differentiation of embryonic stem cells by single cell RNA-Seq. We could analyze and delineate expression dynamics of X-linked random MEGs during progression of X chromosome inactivation process for the first time. We unexpectedly revealed that there are significant number of MEGs expressed in genetic-origin-dependent manner.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：モノアレル発現遺伝子 X染色体不活性化 刷り込み遺伝子 遺伝的多様性 多能性幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物を構成する個々の細胞は、基本的に同一のゲノムを有する。しかし、雌の哺乳類では、2本あるうちの片方のX染色体がランダムに不活性化を受けることが知られている。したがって、X染色体に関しては、実質的に半数体とも考えられ、どちらのX染色体が不活性化を受けるかによって、個々の細胞は異なる活性X染色体を持つ2種類の細胞に

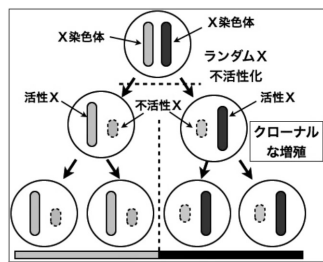


図1：哺乳類♀はX染色体構成の異なる遺伝的モザイク

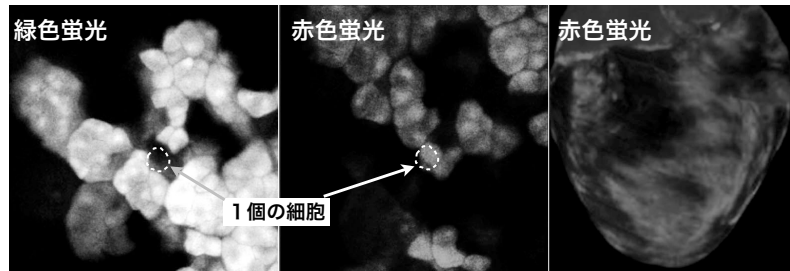


図2：X染色体を蛍光蛋白質発現で可視化するマウス（すい臓）

図3：心臓表面

分けられる。そのため、哺乳類雌は実質的に「遺伝的モザイク」と言うことができよう（図1）。X染色体上には1000以上の遺伝子が存在し、場合によっては、異なるX染色体が活性化している2種類の細胞では表現型の違いが生じ、それが個体全体に波及する。例えば、一卵性双生児の姉妹でありながら、一人だけDuchenne型筋ジストロフィーを発症したという報告がある（Bainbridge, 2003）。この病気の原因遺伝子はX染色体上にあり、普通は男性しか発症しないが、この症例では、変異X染色体がactiveな細胞が筋組織内で優勢となったため女性でも発症したと考えられる。申請者は、X染色体不活性化パターンを細胞レベルで可視化するため雌マウスの2本のX染色体上それぞれに、異なる蛍光蛋白質遺伝子を導入したマウス系統を作製し、どちらか一色の蛍光を発する細胞がモザイク状に各種臓器を形作っていることを観察している（Wuら、2014による同様な報告あり）。非常に興味深いことに、心臓や脳では広い範囲が一方の蛍光蛋白質を発現する細胞・組織によって形成されており、モザイクパターンに大きな偏りが観られた（図3）。このような偏在パターンが、雌個体間の表現型、病態の違いを生み出す一因になると思われるが、その実態や具体例はいまだ殆どが不明の段階にある。

2. 研究の目的

近年、常染色体上にも、多数のモノアレル発現を示す遺伝子が存在することが報告されてきている（例；Gendrel et al., *Dev. Cell*, 2014）。これらは、いわゆるゲノム刷り込み遺伝子とは異なり、どちらの親に由来するかにかかわらずランダムに決定され発現する **random monoallelic expression (RME)** 遺伝子と呼ばれる遺伝子群であり、X連鎖遺伝子と同様に遺伝的モザイクパターンを生み出す要因になり得ると思われる。その数は、報告によって大きく異なり、哺乳類全遺伝子の1~30%がRMEとされているが、これらの報告は異なる手法、異なる材料を用いて複数のグループが行った報告であり、正確なRME遺伝子の数やその特徴、意義などについて定説は無いのが現状である。本研究では研究手法、材料を吟味し、RME遺伝子発現の代表的な例であるX染色体不活性化現象の詳細な解析を行うことを目的とするとともに、RME遺伝子の網羅的な検出・同定することを試み、同一ゲノムを持つ、同一個体内の細胞にどのような遺伝的多様性が生じるか、という問題に対する手がかりを得る。

3. 研究の方法

アレル特異的発現を1塩基多型 (SNP)を用いて識別するために、日本産亜種マウス (MSM 系統、*Mus musculus molossinus*)と標準系統 C57BL/6(B6)の交配から得られたハイブリッド胚から樹立された雌 ES 細胞株を材料として、この ES 細胞をプライム型の幹細胞である EpiSC 細胞に分化させる。この分化過程で、X 染色体不活性化が起きると考えられるので、シングルセル RNA-Seq(scRNA-Seq)法によって遺伝子発現の解析を行う。また、形成された不活性化を受けた EpiSC 様細胞、およびこの EpiSC 様細胞から得られた単一クローンのサブ細胞株数種について scRNA-Seq 解析を行なう。以上の解析から得られた結果を比較してモノアレル発現を示す遺伝子を検出し、それぞれを、ゲノム刷り込みを受ける遺伝子および RME 遺伝子に分類し、その染色体上の分布や機能上の特徴などを解析する。

4. 研究成果

アレル特異的発現を1塩基多型 (SNP)を用いて識別するために、日本産亜種マウス (MSM 系統、*Mus musculus molossinus*)と標準系統 C57BL/6(B6)の交配から得られたハイブリッド胚から樹立された雌 ES 細胞および雌 EpiSC 細胞株を材料として、① ES 細胞から EpiSC 様細胞へ分化していく過程、②雌 EpiSC 細胞株、③②より得られた単一クローンのサブ細胞株数種に関してシングルセル RNA-Seq 解析を行った。モノアレル発現を示す遺伝子を、情報学的に検出するパイプラインを確立し、これを用いて、まず ES-EpiSC 分化プロセスにおける X 染色体不活性化過程の解析を実施した。その結果、ES 細胞の分化誘導後、3 日目から不活性化を受けた細胞が出現し始め、4 日目では大部分の細胞で不活性化が生じており、ES 細胞から形成された EpiSC 様細胞の継代を続け、3 週間後の細胞ではほぼすべての細胞で不活性化が完了していた。さらにクローン化された細胞でも、同一の不活性化パターンが維持されていることが確認された。図 4 に X 連鎖遺伝子の発現の総量の変動を示す。これからもわかるように、

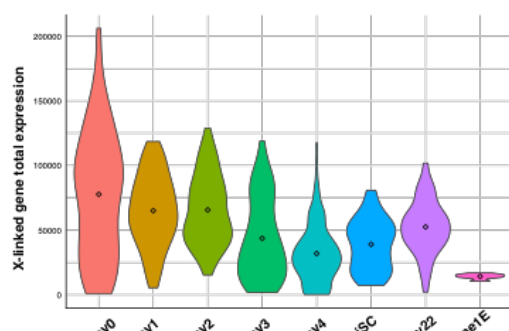


図4：X連鎖遺伝子発現量の分化誘導後の時間変化

に、分化誘導後2日目までは、誘導前と同様の発現量を示すが、3日目から発現量の低下が認められ、不活性化がこの時期から開始されたことが認められた。遺伝子発現の解析に加え、不活性化の開始に重要な役割を持つ非翻訳性RNAである Xist の RNA-FISH 解析、および不活性化X染色体に蓄積することが知られている H3K27me3 のヒストン修飾の解析結果からも X 染色体不活性化を受けた細胞

は誘導後3日目から出現することが確認された。

継代を重ねた EpiSC 様細胞およびクローン株においても、両アレル発現を示す X 連鎖遺伝子が検出されたが、その多くは既知のエスケープ遺伝子であった。予想に反し、不活性化パターンにかかわらず、どちらかのアレル (MSM あるいは B6) からしか発現しないモノアレル発現遺伝子が複数同定された。例えば、B6 由来染色体が不活性化されている場合でも、MSM アレルは発現せず、B6 アレルの発現が見られる例が認められた。すなわち、不活性化からエスケープし、かつ一方のアレルからしか発現しないという発現パターンであり、parent-of-origin に依存する刷り込み遺伝子とも異なるタイプで、genetic-origin に依存する新しいタイプのモノアレル発現遺伝子であるこ

とが明らかとなった。

シングルセルRNA-Seq解析データから、X染色体不活性化の開始から完了までのプロセスを解析できる可能性があり、この点について、情報学的解析および実験的検証を

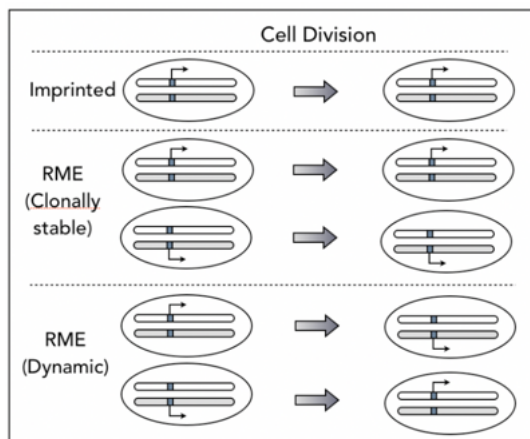


図5：モノアレル発現遺伝子の分類

継続していく。これまでの解析で、X染色体上の不活性化遺伝子および既知のエスケープ遺伝子の検出が可能であることが判明し、この度考案したアレル特異的遺伝子発現解析用パイプラインが期待通りに働くことが確認されたので、同様の手法を用いて、常染色体上のモノアレル遺伝子の検出を行なう。モノアレル発現遺伝子としては、ゲノム刷り込み遺伝子、細胞世代を越えてもアレル発現パターンが維持される clonally stable RME、

世代間でパターンが変化し得る dynamic RME (図5)、それに加えてこの度発見された genetic-origin-dependent モノアレル発現遺伝子があり、検出された遺伝子をそれぞれのタイプに分類する。これらのモノアレル発現遺伝子が発生過程のどのステージで成立するかは不明だが、その成立時期、メカニズムに関する知見を得ることにより、X染色体不活性化やゲノム刷り込み現象との共通点、相違点を浮き彫りにし、哺乳類に特有なモノアレル遺伝子発現の制御様式についての理解を深めることを目指す。

本研究から得られたシングルセル RNA-Seq データおよびこの度考案したアレル特異的発現解析パイプラインを用いることで、今回明らかにしたX染色体不活性化におけるモノアレル発現ダイナミクスに係わる知見のみならず、刷り込み型や常染色体上のランダムモノアレル発現遺伝子に関する研究にも貢献できると考えられ、本研究で得られた手法やデータは高い学術的価値を持つものと思われる。また、今回、初めて明らかになった genetic-origin-dependent モノアレル発現遺伝子も、遺伝的多様性の創出に影響すると考えられ今後さらに追究されるべきと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 16 件)

1. Taelman J, Popovic M, Bialecka M, Tilleman L, Warriar S, Van Der Jeught M, Menten B, Deforce D, Sutter P DE, Nieuwerburgh V, Abe K, Heindryckx B, Chuva de Sousa Lopes SM 2019 WNT inhibition and increased FGF signalling promotes derivation of less heterogeneous primed human embryonic stem cells, compatible with differentiation. *Stem Cells and Development* 28, 579-592. 査読あり
2. Chang Y-H, Abe K, Yokota H, Sudo K, Nakamura Y, Tsai M-D 2019 Human induced pluripotent stem cell region detection in bright-field microscopy images using convolutional neural networks. *Biomedical Engineering: applications, basis and communications* 31, 1950009. 査読あり
3. Shiura H, Abe K. 2019. *Xist/Tsix* expression dynamics during mouse peri-implantation development revealed by whole-mount 3D RNA-FISH. *Sci Rep.* 9, 3637. 査読あり

4. Shiura H, Sakata, [Abe K](#), Sado T. 2018. RNA-FISH and Immunofluorescence of Mouse Preimplantation and Postimplantation Embryos. *Methods Mol Biol.* 1861, 161-176. 査読あり
5. Hosoi Y, Soma M, Shiura H, Sado T, Hasuwa H, [Abe K](#), Kohda T, Ishino F, Kobayashi S. 2018. Female mice lacking *Ftx* lncRNA exhibit impaired X-chromosome inactivation and a microphthalmia-like phenotype. *Nature Communications* 9, 3829. 査読あり
6. Kondo M, Sugimoto M, [Abe K](#). 2018. A simplified and efficient protocol for derivation and maintenance of high-quality mouse primed pluripotent stem cells using Wnt inhibition. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 46, e60. 査読あり
7. Wagatsuma A, Okuyama T, Sun C, Smith LM, [Abe K](#), Tonegawa S. 2018. Locus coeruleus input to hippocampal CA3 drives single-trial learning of a novel context. *Proc Natl Acad Sci USA.* 115, E310-316. 査読あり
8. Mito M, Kadota M, Tanaka K, Furuta Y, [Abe K](#), Iwasaki S, Nakagawa S. 2018. Cell Type-Specific Survey of Epigenetic Modifications by Tandem Chromatin Immunoprecipitation Sequencing. *Sci Rep.* 8, 1143. 査読あり
9. Abugessaisa I, Noguchi S, Böttcher M, Hasegawa A, Kouno T, Kato S, Tada Y, Ura H, [Abe K](#), Shin JW, Plessy C, Carninci P, Kasukawa T. 2018. SCPortalen: human and mouse single-cell centric database. *Nucleic Acids Res.* 46, D781-D787. 査読あり
10. Yanokura M, Banno K, Adachi M, Aoki D, [Abe K](#). 2017. Genome-wide DNA methylation sequencing reveals miR-663a is a novel epimutation candidate in CIMP-high endometrial cancer. *International Journal of Oncology* 50, 1934-1946. 査読あり
11. Chang YH, Yokota H, [Abe K](#), Tang CT, Tsai MD. 2017. Automated Detection and Tracking of Cell Clusters in Time-Lapse Fluorescence Microscopy Images. *J. of Medical and Biological Engineering* 37, 18-25. 査読あり
12. Hirose, M, Hasegawa, A, Mochida, K, Matoba, S, Hatanaka, Y, Inoue, K, Goto, T, Kaneda, H, Yamada, I, Furuse, T, [Abe, K](#), Uenoyama, Y, Tsukamura, H, Wakana, S, Honda, A, Ogura, A. 2017. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in wild-derived mice: generation of tamed wild-derived strains by mutation of the *a* (nonagouti) gene. *Sci. Rep.* 6, 42476. 査読あり
13. Hayashi, M, Shinozuka, Y, Shigenobu, S, Sato, M, Sugimoto, M, Ito, S, [Abe, K](#), Kobayashi, S. 2017. Conserved role of *Ovo* in germline development in mouse and *Drosophila*. *Sci. Rep.* 6: 40056. 査読あり
14. Chang YH, Yokota H, [Abe K](#), Tang CT, Tsai MD. 2016. Fluorescence Microscopy Image

Processing and Visualization for Analyzing Cell Kinematics, Proliferation and Attachment in Mouse Embryonic Stem Cell Culture. *Accepted as a contributed paper for 2016 IEEE 16th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE)*. 査読あり

15. Chang YH, Yokota H, Abe K, Liu JH, Tsai MD. 2016. Detection and Localization of Mouse Induced Pluripotent Stem Cell Formation using Time-Lapse Fluorescence Microscopy Images. *Accepted as a contributed paper for the 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*: 3914-3917. 査読あり

16. Motomura K, Oikawa M, Hirose M, Honda A, Togayachi S, Miyoshi H, Ohinata Y, Sugimoto M, Abe K, Inoue K, Ogura A. 2016. Cellular dynamics of mouse trophoblast stem cells: Identification of a persistent stem cell type. *Biol. Reprod.* 94, 122. 査読あり

[学会発表] (計 20 件) (招待講演のみ記述)

1. Kuniya Abe “Molecular characterizations of developing male germ cells and GS cell lines by single cell transcriptome analysis.” The 4th URICAS Symposium, Penang, マレーシア、2019 年 3 月

2. Kuniya Abe “Robust induction of primed pluripotency in mammals: Wnt inhibition is critical for derivation and maintenance of mouse epiblast stem cells.” Tsukuba Global Science Week 2016, つくば、2016 年 9 月

3. Abe K, Kondo M, Sugimoto M. “Robust induction of primed pluripotency in mammals: Wnt inhibition is critical for derivation and maintenance of mouse epiblast stem cells.” INASCON (International Scientific Conference) 2016, Kelantan, Malaysia, 2016 年 5 月

[図書] (計 1 件)

1. 日本遺伝学会監修・編「遺伝単 遺伝学用語集 対訳付き 日本遺伝学会監修・編「生物の科学 遺伝」別冊、PP. 223-226、エヌ・ティイー・エス社、2017 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：iPS 細胞の白色光観察+機械学習判定

発明者：張元翔，横田秀夫，阿部訓也，蔡明達

権利者：台湾中間大学、理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2017-026477

出願年：2017 年

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。