

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007~2008

課題番号：19370003

研究課題名（和文）遠隔シス因子による組織特異的 *Shh* 遺伝子発現制御と染色体動態研究課題名（英文）Genetic regulation of tissue-specific *Shh* expression by long-range enhancers and chromosome dynamics

研究代表者

城石 俊彦（SHIROISHI TOSHIHIKO）

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90171058

研究成果の概要：マウス発生胚枝芽では、*Shh* 遺伝子の転写レベルの変化に応じて *Shh* 遺伝子座から遠く離れた遠隔エンハンサーを含むシス配列と *Shh* 翻訳領域の物理的距離が時期・組織特異的にダイナミックに変化する。本研究では、*Shh* 遺伝子の転写制御に絡む染色体高次構造変化の分子基盤を明らかにし、その生物学的意義を考察した。本研究成果により、マウス胚芽での *Shh* 遺伝子発現は、エンハンサーとプロモーターの物理的相互作用に加えて染色体テリトリーからの *Shh* 遺伝子座のルーピングアウトという二段階の染色体高次構造の変化によって制御されることが明らかとなった。また、*Shh* 遺伝子の遠隔および近位エンハンサーの詳細な発現量の比較解析を行い、前者は短期で比較的低レベルの遺伝子発現を、後者は長期間にわたる高レベルの遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。このように、染色体の高次構造のダイナミックな変化により、発生関連遺伝子の発現量について精巧な制御が行われていることが明らかとなった。また、本研究では、胚芽以外において、*Shh* 遺伝子の口腔から腸管の上皮組織での発現を特異的に制御するエンハンサーを新たに同定した。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 7,300,000 | 2,190,000 | 9,490,000 |
| 2008年度 | 6,600,000 | 1,980,000 | 8,580,000 |
| 総計 | 13,900,000 | 4,170,000 | 18,070,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：*Shh* 遺伝子、非翻訳保存配列、遺伝子発現制御、遠隔エンハンサー、染色体動態、

1. 研究開始当初の背景

進化的に離れた生物種間の比較ゲノム解析により、遺伝子の翻訳領域以外にも進化的保存配列が多数存在することが明らかになってきた。この進化的保存性を指標として、数多くのシス制御因子が抽出され、機能解明が進んでいる。発見されたシス因子の中には、制御すべき遺伝子の転写開始点から遠く離れたものが存在することも分かってきた（West, A.G. & Fraser, P., 2005）。最近の転写制御研究の進展により、単純なトランス因子のシス制御因子への結合に加えて、遺伝子

周囲の染色体の高次構造変化が転写制御に深く関与するという知見が集積しつつある。例えば、活発に転写されている遺伝子座が、間期核においてその遺伝子が存在する特定の染色体テリトリーから突出（ループアウト）した配置を示すことや（Volpi et al. 2000; Williams et al. 2002）、極端な場合には、染色体構造の変化を介して異なる染色体からトランスに作用する制御因子の存在さえ報告されている（Spilianakis et al. 2005）。このように、遠隔部位に存在するシス制御因子に関する報告が蓄積されるにつれて、転写

制御を染色体動態というマクロでよりダイナミックな視点で捉えなおす必要性が生じている。

Shh 遺伝子は、脊椎動物の発生過程において中枢神経系を始め、肢芽や消化管など様々な組織の形成に重要な役割を果たす分泌性タンパク質をコードしている。我々は、*Shh* 翻訳領域からはるかに離れた 1 Mb 上流に、硬骨魚類から哺乳類に至るまで進化的保存性を示す二つの非翻訳配列が組織特異的 *Shh* 遺伝子発現に働くシス制御因子であることを発見した (Sagai et al. Mammal Genome, 2004; Sagai et al. Development, 2005; Masuya et al. Genomics 2007; Sagai et al. in press)。他の研究グループも、同領域内にさらに複数のシス因子が存在することを報告している (Jeong et al. Development, 2006)。これらの遠隔部位のシス因子がどのようにして *Shh* 遺伝子の発現を制御するのか、その分子機構は不明であり、翻訳領域から 1 Mb も離れたゲノム領域に位置する生物学的意義についても未だに解明されていない

2. 研究の目的

本申請研究の第 1 の研究目的は、遠隔部位に位置するシス因子の転写制御機構を解明することである。*Shh* 遺伝子の発現に伴い、シス制御因子が遺伝子のプロモーター領域に接近するのかどうか、そしてその染色体構造の変化が組織特異的かつ時期特異的に秩序立って制御されているのかどうかを明らかにすることである。このために、3D-FISH 法や Chromosomal conformation capture (3C) 法を用いて、染色体構造の三次元的な配置とその動態を直接的に解析する。

第 2 の研究目的は、何故シス制御因子が 1Mb という遠隔部位に存在するのかという生物学的意義を明らかにすることである。つまり、染色体の高次構造変化という一見複雑で余分なエネルギーを要するよう見える制御システムを採用している生物学的な理由は何か解明することである。1 Mb の広範な領域に既に同定された複数のエンハンサーを有する *Shh* 遺伝子は、近年多く報告されている遠隔エンハンサーの生物学的意義を知るために優れたモデルと考えられる。そこで、翻訳領域に対して遠位と近位に存在する *Shh* 遺伝子の組織特異的エンハンサーの機能の相違について比較検討を行う。

Shh 遺伝子の組織特異的発現機構の解析に第 1 に必要とされるのが、組織特異的に機能するシス因子の同定である。我々は、これ

までに二つの *Shh* シス制御因子 MFCS1、MFCS4 を同定しているが、内在性の *Shh* 遺伝子の発現を考慮すると、まだ同定されていないシス制御因子が存在すると考えられる。そこで第三の研究目的として、新規の *Shh* 制御因子の同定をめざした研究を行う。

以上、本課題研究では、*Shh* 遺伝子発現制御に関与する複数の遠隔部位のシス因子をモデル系として、染色体の高次構造のダイナミックな変化を中心とした遺伝子発現制御機構について包括的に解明する。

3. 研究の方法

研究課題 (1) *Shh* 遺伝子座の染色体ダイナミクスの解析

① 3D-FISH 解析

発生過程のマウス肢芽より、三次元的な構造を保たせたまま細胞核を調整して FISH 法を行う。シス因子と翻訳領域が 1 Mb という距離を隔てていることはそれ自身が非常にユニークであると同時に、FISH によって両者の距離を物理的に検出するための十分な解像度を与える。*Shh* 遺伝子および MFCS 配列に対してそれぞれ異なる標識をしたプローブを用い、細胞核内での両領域に対応する蛍光シグナル間の物理的な三次元距離を計測する。解析においては、特に以下の点に着目して実験を進める。(i) *Shh* 遺伝子を発現する正常肢芽の細胞間期核において、*Shh* 遺伝子翻訳領域と MFCS1 配列の物理的な近接の有無を調べ、その組織特異性と時期特異性を明らかにする。(ii) 染色体動態と転写の関係をより明確にするため、RNA-DNA double FISH を行い、*Shh* 遺伝子の pre-mRNA と MFCS1 の位置関係を調べる。(iii) 上記の三次元的核内配置における MFCS1 配列の役割を解析するため、MFCS1 配列を欠損したノックアウトマウス (当研究室で作製済み) において核内配置が変化するかどうかを調べる。

② 3C 解析

間期核中のゲノム領域におけるエンハンサープロモーター間の相互作用を調べるために、3C 解析を行う。この解析法は、固定剤による架橋で構造を維持したままゲノム DNA を切断し、架橋した領域の近傍でライゲーションさせて、相互作用する 2 領域を検出するという手法である。マウス胚より肢芽をはじめさまざまな組織の細胞を調製し、*Shh* 遺伝子翻訳領域と MFCS1 配列の相互作用の組織特異性を調べる。それぞれのゲノム領域に対応したプライマーを用いて real-time PCR を行い、ゲノム領域間の相互

作用を定量的に評価する。

③ 遠隔シス因子による *Shh* 発現制御の生物学的意義の解明

ES 細胞の相同組換えによって、*Shh* 遺伝子の開始コドンの位置に合わせて不安定型 GFP を挿入したノックインマウスをすでに作製している。不安定型の GFP をレポーター遺伝子として用いているため、このマウスの解析を通じて、発生段階ごとの *Shh* 遺伝子発現を正確に On-time でモニターできる。マウス胚切片上でレポーターの発現を解析することで、異なるシス因子によって制御される *Shh* 遺伝子の組織間での発現レベルの違いを明らかにする。

さらに、内在性の *Shh* 遺伝子発現と遠隔シス因子である MFCS1 とレポーター遺伝子を連結したトランスジーン発現比較を行うことにより、シス因子が遠隔部位にあることの転写活性と四肢の表現型に対する効果を検討する。ここでは、*Shh-d2EGFP* ノックインマウスと MFCS1-*d2EGFP* トランスジェニックマウスを用いたレポーター遺伝子の比較発現解析を行う。

研究課題 (2) 二つの遠隔シス因子による喉頭・咽頭/肺・消化管での *Shh* 遺伝子発現のスイッチングの解析

Shh 遺伝子翻訳領域の約 830kb 上流の MFCS1 と MFCS4 配列の間に哺乳類-鳥類間で保存された配列 (MACS1) がある。この配列でドライブしたレポーター遺伝子は、肺や腸の内在性 *Shh* 遺伝子と類似した発現パターンを示すため、肺や消化管特異的な *Shh* のシス因子である可能性が高い。その発現部位は、胎生 11.5 日において、喉頭・咽頭上皮での特異的な *Shh* 発現のエンハンサーを含む保存配列 MFCS4 でドライブしたレポーター遺伝子の発現部位と境界を接している。したがって、近接した 2 つの保存配列により、喉頭・咽頭部と消化管部での *Shh* 遺伝子発現制御の役割分担がなされている可能性がある。この点を明らかにするため、以下の二つの実験を行う。

① MACS1 配列でドライブする GFP レポーター遺伝子をもつトランスジェニック系統を作製する。この系統にすでに樹立済の FCS4-*LacZ* レポーター遺伝子をもつトランスジェニック系統を交配し、*LacZ* 染色と GFP 免疫染色を同時に行い、MFCS4 と MACS1 による制御領域とその境界を明らかにする。

② MACS1 が *Shh* 遺伝子の肺・消化管特異的なシス因子であれば、そのノックアウトマウスは、ヒトで報告されている食道・気道瘻

や鎖肛などの障害、*Shh* 翻訳領域のノックアウトに観察される消化管の障害を示すと予想される。この点を明らかにするためには、保存配列を Neo カセットと置き換えたベクターでノックアウトマウスを作製して表現型を解析する。

4. 研究成果

研究課題 (1) *Shh* 遺伝子座の染色体ダイナミクスの解析

① 組織特異的かつ時期特異的な MFCS1 エンハンサーと *Shh* 翻訳領域の近接

Shh 翻訳領域の約 1 Mb 上流に位置する MFCS1 エンハンサーが、どのようにターゲット遺伝子の転写制御を行うのか明らかにするために、マウス胚枝芽の後方 *Shh* 発現領域・中間領域・前方領域からそれぞれ調製した細胞を用いて 3D-FISH 法による解析を行った。*Shh* 翻訳領域と MFCS1 のシグナル間の距離を測定した結果、*Shh* 遺伝子を発現する枝芽後方の細胞核では両者のシグナルが重なる傾向にあり、逆に中間領域の細胞では両者のシグナルが離れて観察された。さらに、枝芽前方の組織でも *Shh* 翻訳領域と MFCS1 配列が近接する傾向にあった。多指症を呈するほとんどのミュータントマウスでは、枝芽前方に *Shh* 遺伝子の異所的な発現を示すことが知られており、枝芽前方の細胞は *Shh* 発現の潜在能力 (コンピテンス) を有すると考えられる。エンハンサーと翻訳領域の近接は、*Shh* 遺伝子の転写の前段階として必要な細胞のコンピテンスの実体を表す可能性が示された。

さらに、後方の *Shh* 発現組織と *Shh* 遺伝子を発現しない前方組織との違いを明らかにするため、*Shh* 翻訳領域と第 5 染色体テリトリーとの位置関係を調べた。その結果、後方組織の細胞核のみにおいて、一部の *Shh* 翻訳領域が第 5 染色体テリトリーから飛び出している様子が観察された。このようなルーピングアウト現象は転写が活性化されている遺伝子領域にしばしば見られることが知られている。以上のことより、枝芽の *Shh* 遺伝子領域の活性状態は、エンハンサーの近接と染色体領域との位置関係という二つの異なる機構によって制御されていると考えられた。

また、発生段階の異なる枝芽における染色体構造の変化を調べるために、すでに *Shh* 遺伝子の発現が消失している 12.5 日胚枝芽の細胞を用いて 3D-FISH 解析を行った。12.5 日胚枝芽の細胞核においては 10.5 日胚枝芽の細胞に見られたような MFCS1 領域と *Shh*

翻訳領域の近接がほとんど認められず、*Shh*-MFCS1 の 2 点間の距離は、発生段階の進行に伴って制御されて変化することが明らかになった。3C 法による解析においても 10.5 日胚枝芽の細胞で *Shh* 遺伝子の第 1 エクソン領域と MFCS1 の特異的な相互作用が検出され、*Shh* 遺伝子の発現がすでに停止している 12.5 日胚枝芽の細胞ではその相互作用が認められないことが確かめられた。この結果は、MFCS1 エンハンサーと *Shh* のプロモーターが物理的に相互作用することも示唆している。

② 染色体構造変化における MFCS1 配列の役割

我々の研究室では、すでに MFCS1 配列をノックアウトしたマウスが作製済みである。このホモ個体は、発生期の枝芽での *Shh* 発現を特異的に消失しており、その結果として枝芽の先端部の構造が欠失した表現型を示す。しかし、このシス制御因子の欠質が染色体構造にどのような影響を与えるのか明らかではなかった。そこで、MFCS1 ノックアウトマウス胚の枝芽切片を用いて、3D-FISH 解析を行った。その結果、MFCS1 ノックアウトマウス枝芽において、一定の割合で MFCS1 周辺領域と *Shh* 翻訳領域の近接が観察され、その割合は野生型のマウス枝芽と同程度で有意な差は認められなかった。

さらに、MFCS1 ノックアウトマウス枝芽において、*Shh* 翻訳領域と第 5 染色体テリトリーとの位置関係を調べた。野生型では、後方の細胞核で一定の割合で *Shh* 翻訳領域が第 5 染色体テリトリーから飛び出しているのに対し、MFCS1 ノックアウトマウス胚では、そのようなルーピングアウト現象は観察されなかった。以上の結果から、MFCS1 配列自体は、エンハンサーとプロモーターの相互作用が起こる時には必要とされないが、*Shh* 遺伝子座のルーピングアウトには必須であることが示唆された。

③ *Shh* 発現制御における遠隔シス因子と近位のシス因子の機能の比較

Shh の組織特異的シス因子の機能を評価するため、pre-mRNA と mRNA の発現パターンをマウス胚の枝芽と神経管で比較した。枝芽での *Shh* 遺伝子の発現は遠位の MFCS1 によって制御されるが、神経管の *Shh* 発現は翻訳領域の上流 8 Kb とイントロン部分に存在する近位のシス因子によって制御されることが報告されている。*Shh* 遺伝子の mRNA は、枝芽の後方組織ならびに神経管底板と脊索で均一に発現している様子が観察された。一方、枝芽後方組織では 37% の細胞でのみ pre-mRNA 陽性であった。これは、神経管底

板と脊索で 68% の細胞が pre-mRNA 陽性であることに比較して有意に低い値であった。この結果は、ゲノム上の位置の異なるシス因子によって制御される *Shh* 発現は、組織ごとに異なる発現レベルに維持されている可能性を示している。

組織ごとの発現の違いを確認するため、*Shh-d2EGFP* ノックインマウスを用いて発現解析を行った。E10.5 のノックインマウスの切片上で、不安定型 GFP の発現は神経管底板と脊索のほぼ全ての細胞で認められた。対照的に枝芽の後方組織では、GFP 陽性細胞はただらに分布していた。この結果は、pre-mRNA の分布を調べた結果と矛盾せず、MFCS1 によって制御される枝芽の *Shh* 発現は低レベルに保たれていることが示唆された。

さらに、シス因子が遠隔部位にあることによる転写活性への影響を調べるため、*Shh-d2EGFP* ノックインマウスと MFCS1 とレポーター遺伝子を連結したトランスジェニックの発現比較を行った。前述したように、*Shh-d2EGFP* ノックインマウスの枝芽では、GFP の発現は一部の細胞でのみ観察されたが、MFCS1-*d2EGFP* トランスジェニックマウスの枝芽では、後方組織に一樣に発現していた。人為的に近位に置かれた MFCS1 は、高レベルでターゲットの遺伝子を活性化させることが示唆された。遠隔エンハンサーである MFCS1 は、染色体構造のダイナミックな変化によって、組織に応じた最適な発現レベルを維持している可能性がある。

研究課題 (2) *Shh* 発現制御に関与する新規遠隔シス因子の同定

① *Shh* 遺伝子の約 800k 上流にある咽頭部特異的なシス因子である MFCS4 周辺ゲノム約 130kb について、進化的保存性を示す非翻訳配列を探索し、新たに二つの配列 (MRCS1 と MACS1) を検出した。さらに、各々の配列を *LacZ* レポーター遺伝子に連結したベクターコンストラクトを導入したトランスジェニックマウスを作製して詳細な発現解析を行ったところ、それらの保存配列が各々上皮組織の内、歯原基などの口腔上皮、肺・腸管の原基にレポーター遺伝子を発現させることがわかった。したがって、これらのゲノム配列は、各々の上皮組織に特異的なエンハンサーを含むことが明らかとなった。これらのエンハンサーは、口腔から腸管上皮組織での発現の前後軸に沿うように、ゲノム上でも同一の順序で並んでいることもわかった。

② MRCS1 と MACS1 の二つの保存配列について、*Neo* カセットと置き換えたベクターで

ES 細胞を用いた標的遺伝子破壊実験を行った。現在、両配列とも相同組換えを起こした ES 細胞が得られており、ES 細胞の寄与率の高いキメラマウスも得られている。生殖細胞へのトランスファーが確認され次第、表現型解析を開始する予定である。

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)

- ①Sagai T, Amano T, Tamura M, Mizushina Y, Sumiyama K and Shiroishi T. A cluster of three long-range enhancers directs regional Shh expression in the epithelial linings. *Development* 136:1665-1674, 2009. 査読有
- ②Amano T, Sagai T, Tanabe H, Mizushina Y, Nakazawa H, Shiroishi T. Chromosomal dynamics at the Shh locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Dev Cell.* 16: 47-57, 2009. 査読有
- ③Sakuraba Y, Kimura T, Masuya H, Noguchi H, Sezutsu H, Takahashi KR, Toyoda A, Fukumura R, Murata T, Sakaki Y, Yamamura M, Wakana S, Noda T, Shiroishi T. Gondo Y. Identification and characterization of new long conserved noncoding sequences in vertebrates. *Mamm Genome.* 19: 703-12, 2008. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ①城石俊彦「Sonic hedgehog (*Shh*) 遺伝子の発現制御にかかわる染色体ダイナミクス」第 5 回生命資源研究・支援センターシンポジウム、熊本、2009 年 3 月
- ②Amano T, Sagai T, Tanabe H, Shiroishi T. “Gene kissing: A remote enhancer-promoter interaction regulates expression of Sonic hedgehog in mouse limb buds” The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Osaka, Japan, Dec 2008.
- ③Shiroishi T. “Evolutionary conserved non-coding sequence 1Mb away from the Shh coding sequence acts as limb bud-specific Shh enhancer.” The 16th CDB meeting, “Cis-sequence regulation and its evolution” Kobe, September 2008.
- ④天野孝紀、嵯峨井知子、田辺秀之、水品洋一、中澤博美、城石俊彦、「Long-range エンハンサーによる Shh 遺伝子の動的転写制

御」、第 2 回モロシヌス研究会、東京、2008 年 9 月

- ⑤Amano T, Sagai T, Tanabe H, Shiroishi T. “Hemimelic extra-toes (Hx) mutation gains a new cis-regulatory motif in limb-specific Shh enhancer” 第 41 回日本発生生物学学会 (ISDB 共催)、徳島、2008 年 5 月
- ⑥Sagai T, Amano T, Tamura M, Mizushina Y, Yamamoto H, Okagaki A, Sumiyama K, Shiroishi T. “Two adjacent long-range enhancers regulate segmental Shh expression in epithelial linings of endoderm.” 第 41 回日本発生生物学学会 (ISDB 共催)、徳島、2008 年 5 月
- ⑦ Shiroishi T. “Evolutionary conserved non-coding sequence 1Mb away from the Shh coding region acts as limb bud-specific enhancer in mouse.” The 1st International Symposium of the Biodiversity Global COE Project, “from Genome to Ecosystem” Kyoto, March 2008.
- ⑧Sagai T, Amano T, Tamura M, Mizushina Y, Yamamoto H, Sumiyama K, Shiroishi T. “*Shh* signaling regulated by a highly conserved remote enhancer is essential for the development of posterior oro-pharyngeal apparatus.” 第 40 回日本発生生物学学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会、福岡、2007 年 5 月
- ⑨Amano T and Shiroishi T. “Two Step-wise changes in chromosome architecture regulate Shh expression in the mouse limb bud” 第 40 回日本発生生物学学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会、福岡、2007 年 5 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城石 俊彦 (SHIROISHI TOSHIHIKO)

国立遺伝学研究所・

系統生物研究センター・教授

研究者番号：90171058