

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21247002

研究課題名（和文）

ダイナミックな染色体構造変化を介した遠隔エンハンサーによる遺伝子発現制御機構

研究課題名（英文）

Gene regulation via dynamic change of chromosomal conformation of remote enhancers

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（和文）：*Shh* 遺伝子は脊椎動物の形態形成に働くシグナルタンパク質をコードする。比較ゲノム解析により、*Shh* 遺伝子上流 6-900Kb に 4 つの非翻訳保存配列（CNCSs）を発見し、これらが全て *Shh* 遺伝子の組織特異的な遠隔エンハンサーであることを明らかにした。また、3D-FISH や 3C 法による染色体高次構造解析を行い、各 CNCSs は組織特異的な染色体動態により *Shh* プロモーターと近接することで *Shh* 遺伝子の発現制御を行っていることを解明した。

研究成果の概要（英文）：Sonic hedgehog (*Shh*) encodes a signaling protein that plays pivotal roles in vertebrate development. Comparison of genomic sequences across mammalian species and teleost fishes revealed four conserved non-coding sequences (CNCSs) that cluster in a region 600 to 900 kb upstream of the *Shh* promoter. These CNCSs drive regional transgenic *lacZ* reporter expression in the limb bud and the epithelial lining of the oral cavity, pharynx and larynx (lung/gut), recapitulating the endogenous *Shh* expression. Targeted elimination of each of the four CNCSs from the mouse genome results in loss of endogenous *Shh* expression in specific regions, corresponding to the expression pattern of the transgenic *LacZ* reporter, and leads to regional-specific defect. The results indicate that these CNCSs are tissue-specific long-range *Shh* enhancers. The 3D-FISH and 3C analyses showed that the *Shh* promoter-enhancer occurs in a tissue specific manner. Thus, chromosome dynamics is a common mechanism to regulate the tissue-specific *Shh* expression by the long-range enhancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2010年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2011年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
総計	34,400,000	10,320,000	44,720,000

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：遺伝学・ゲノム・進化・動物・発生、分化

1. 研究開始当初の背景

形態形成や細胞分化に働く遺伝子の転写

制御に、ヒストン化学修飾を伴うクロマチンリモデリングよりさらに高次のマクロな染

染色体構造の変化が関与する知見が得られている。例えば、間期核内で、一つの染色体はテリトリーと呼ばれる一定のドメインを占有して局在するが、活発に転写される *b-globin* や *Hoxb* 遺伝子は当該遺伝子の存在する染色体テリトリーからループアウトして Pol II が局在する転写ファクトリーに接近する (Frazer and Bickmore, Nature, 2007)。また、形態形成に働く遺伝子のシス制御配列の中には、転写開始点から数百 Kb 以上遠く離れたものが多数存在し (West and Fraser, Hum. Mol. Genet. 2005)、これらの遠隔シス配列と転写開始点の物理的接触を可能とする染色体構造変化が想定される。これらの染色体構造変化は、発生過程に依存し、時期・組織特異性を伴ったダイナミックな事象であると考えられる。ここ数年、転写制御に関わる高次染色体構造変化を担う因子として急速に注目されはじめているのが、核タンパク質 CCCTC-結合因子 (CTCF) である。最近、培養細胞を用いた大規模機能ゲノム解析の結果、ゲノム中に 14,000 カ所存在する CTCF の結合部位は、体細胞分裂期の姉妹染色体の結合に働く Cohesin の結合部位とオーバーラップすると報告された (Wendt et al. Nature, 2008)。現在、両者が間期核においても、遠く離れた染色体の特定領域同士を結合してクロマチンループを形成し転写制御に関与する可能性が提唱されている。極端なケースとして、異なる染色体上の遺伝子とシス制御配列の結合に CTCF が働き転写制御を行うという報告 (Spilianakis et al. Nature, 2005) もある。このように、転写制御を間期核内のマクロでダイナミックな染色体動態という視点で捉え直す必要性が生じている。しかし、CTCF や Cohesin など関与する因子の候補も浮かび上がっているが、全体の分子メカニズムは未知である。

申請者らは、個体発生において、中枢神経系、肢芽 (四肢の原基)、神経管、消化管など様々な組織の形成に働く *Shh* 遺伝子のシス制御配列について進化的保存性を指標として探索してきた。そして、*Shh* 転写開始点から 1 Mb 近く離れた上流に、*Shh* 発現を制御する四つのシス配列 (MFCS1、MFCS4、MRCS1、MACS1) を発見した (Sagai et al. Mammal Genome, 2004; Sagai et al. Development, 2005)。この内、MFCS1 と MFCS4 は、トランスジェニックマウスと knockout (KO) マウスの

詳細な解析で各々肢芽および口腔・咽頭上皮特異的な *Shh* エンハンサーであることが示唆された (Sagai et al. Development, 2005)。そして、遠隔シス配列という点を活かした三次元 (3D)-FISH や Chromosome conformation capture (3C) 法を用いた解析から、約 1 Mb 離れた肢芽エンハンサーが組織特異的に転写開始点と物理的に相互作用してクロマチンループを形成し、かつ染色体テリトリーから突出することで転写が開始される可能性が出てきた。さらに、三つの進化的保存配列が体軸の前後軸に沿って外胚葉由来の口腔上皮、内胚葉由来の口腔・咽頭上皮から肺・消化管上皮特異的な *Shh* のシス制御配列の可能性と、体の前後軸を反映した順序で Colinearity を持つてゲノム上にクラスターを形成していた。以上より、個体発生の過程において 1 Mb 近い距離を持つ遠隔エンハンサーとプロモーターの時期・組織特異的相互作用とマクロな染色体動態によって発生関連遺伝子の発現制御が起こるといふ新しいパラダイムが提示できることがわかってきた。

2. 研究の目的

(1) 遠隔シス制御配列による転写制御を支える染色体ダイナミズムの分子基盤を解明する。申請者らは肢芽エンハンサー MFCS1 の KO マウスでも MFCS1 近傍配列と転写開始点の近接が起こることを見出した。従って、エンハンサーやプロモーター以外に染色体高次構造変化を引き起こすシス・トランス因子が存在すると考えられる。そこで、CTCF に着目して *Shh* 遺伝子座の染色体動態を制御するトランス因子とそれが結合するシス配列を Chip-seq 法という最新のゲノム解析手法で探索する。さらに、CTCF 遺伝子等についてのコンディショナル KO マウスを作製して機能解析を行い、染色体動態による動的転写制御システムを明らかにする。

(2) 染色体動態を介した *Shh* 発現制御システムがどのように進化してきたかを明らかにする。このため、バイオインフォマティクスを活用して異なる動物種間で保存されたシス因子の塩基配列の詳細な比較ゲノム解析を行う。さらに、異種動物の配列を Transgenesis や Knockin の手法でマウスゲノムに導入してシス配列の進化上の機能分化を解析する。また、魚類のシンテニック領域

での染色体構造変化を解析し、染色体動態システムの進化がどのように生物形態の違いを生み出したかを解明する。

3. 研究の方法

(1) CTCF の染色体動態への役割解明

ヒト培養細胞株でCTCFとCohesinの構成因子が*Shh*遺伝子転写開始点および上流の1 Mbの領域の数カ所に結合することが報告されている。申請者らは、その部位が複数の組織特異的*Shh*エンハンサーを挟むことを見出した。本研究では、CTCFが*Shh*遺伝子の組織特異的発現に関与するか否か、どのように*Shh*遺伝子座の染色体構造を制御するのかを包括的に解析する。具体的には、抗CTCF抗体を用いたChIP-Seq法により、CTCFの*Shh*遺伝子座周辺1 Mb領域における結合部位を網羅的にマップする。その際、マウス胚を頭部、肢芽、神経管、消化管に切り分けて調製し、四つの組織特異的エンハンサーとの位置関係に留意してCTCFの結合様式を解析する。

(2) 上皮特異的シス制御配列と*Shh*遺伝子座周辺の染色体領域の構造変化の解析

Shh 転写開始点から 620-740 Kb 上流に同定した三つのシス配列は LacZ レポーターを指標とした Transgenic assay により、外胚葉性の口腔上皮 (MRCS1)、内胚葉性の口腔・咽頭上皮 (MFCS4)、内胚葉性の肺・消化管上皮 (MACS1) での遺伝子発現をドライブすることが判明した。MFCS4 は KO マウスの表現型解析より、口腔・咽頭エンハンサーであることが立証されている。本研究では、残りの二つのシス配列も組織特異的 *Shh* エンハンサーであることを検証し、三つが肢芽エンハンサーMFCS1 と同様に染色体高次構造の変化を伴って転写制御を行うかどうかを解析する。特に、三つのシス配列と *Shh* 転写開始点が染色体レベルで直接相互作用するかを調べるため、マウス胚組織切片上で 3D-FISH を行う。特に、発生過程で、口腔・咽頭から消化管の上皮において、三つのシス配列が同時に *Shh* 翻訳領域に近づくのか、それとも組織によって選択的に近づくのかに注目して解析を進める。さらに、口腔・咽頭部を含むマウス胚頭部の細胞を調製して 3C 法を行い、これらのシス配列と *Shh* 転写開始点の物理的な相互作用を検証する。平行して、染色体テリトリーからの組織特異的な *Shh* 遺伝子座のループアウトの有無を 3D-FISH 法で解析する。

(3) Cohesin 関連タンパク質の機能解析

Cohesin は、細胞分裂期の姉妹染色体接合に必須であり、その機能を発揮するためには ESCO2 と Nipbl の二つのタンパク質が必要である。両遺伝子の変異はヒトの四肢形成異常を含む重篤な先天的奇形である Roberts シンドローム (ESCO2) と Cornelia de Lange シンドローム (Nipbl) を引き起こし、発生過程における Cohesin と協同遺伝子の関与が示唆される。そこで、各症候群のモデルとなる KO マウスを作製し、ESCO2 と Nipbl の発生過程における機能を明らかにする。申請者らは、遺伝子トラップ ES 細胞から ESCO2 の機能不全マウスの作製を完了している。ホモ個体が得られた時点で、骨格をはじめとした変異表現系の解析を行う。さらに、*Shh* を含むマウス肢芽形成に働く遺伝子発現に焦点をあて、転写制御への ESCO2 と Cohesin の役割を解明する。*Nipbl* の遺伝子トラップ ES 細胞は未作製であり、この遺伝子の Exon1 と Exon2 を欠損するコンストラクトベクターを調製して KO マウスの作製を行う。その後、ESCO2 と同様の解析を行う。

4. 研究成果

(1) CTCF の染色体動態における役割の解明

① 抗CTCF抗体を用いたChIP-seq解析

ENCODE 計画の成果として、培養細胞株におけるマウスゲノム上の CTCF の分布が公開されており、*Shh* 遺伝子周辺には 12 個の CTCF 結合領域が見出される。実際に発生過程のマウス胚ではどの結合領域が利用されているのか調べるために、抗 CTCF 抗体を用いた ChIP 解析を行った。11.5 日胚のマウス肢芽では、*Shh* 遺伝子の 8 Kb 下流、肢芽エンハンサーの 22 kb 下流、*Lmbr1* 遺伝子のプロモーター領域に強い ChIP エンリッチメントが確認された。*Shh* 遺伝子を発現していない尾芽の細胞や NIH3T3 細胞株を用いた場合でも同じ領域に CTCF の結合が見られたことから、CTCF は細胞種を問わない普遍的な染色体の高次構造の構築に関与しているの可能性がある。

② CTCF 遺伝子の条件付 KO マウスを用いた解析染色体高次構造を介した転写制御機構における CTCF の機能を解明するため CTCF 遺伝子の条件付 KO マウスを作製した。肢芽間充織特異的に Cre 組換え酵素を発現する

マウスと交配して肢芽の間充織でのみで、特異的に CTCF タンパク質を欠損するマウスを作出した。このマウスで、現在 *Shh* 発現と *Shh* 遺伝子周囲の染色体高次構造変化を 3D-FISH 法と 3C 法で評価している。

(2) 上皮特異的シス制御配列と *Shh* 遺伝子座周辺の染色体領域の構造変化の解析

進化的保存配列である MRCS1, MFCS4, MACS1 は、*Shh* 遺伝子翻訳領域の 600-750kb 上流の進化的保存配列で、口腔から下部消化管などの *Shh* 発現領域に領域特異的なレポーター遺伝子の発現を誘導する。これらによる単独あるいは協調的な制御機構を知るため実験を行い、以下の成果を得た。

①第一に保存配列の機能を個体レベルで解析するため、それぞれのノックアウト (KO) マウスを作製した。その結果、MRCS1 KO マウスは、齧歯類では進化の過程で退化したとされる小臼歯様の過剰歯を誘導すること、また MFCS4 と MACS1 の KO マウスは、それぞれ嚙下、呼吸に重要な口腔-咽頭器官と咽頭-喉頭器官の形成不全により新生児致死となった。さらに、それぞれの KO マウスと *Shh* 構造遺伝子の KO マウスとの compound hetero 個体では、表現型がより激しく広範になること、MFCS4 KO マウスでは咽頭上皮特異的に *Shh* 発現が消失することなどから、これらが *Shh* の組織特異的なエンハンサーであることを実証した。このように進化的保存配列の KO マウスが明白な表現型を示す例は希である。以上の結果、複数エンハンサーによる *Shh* 遺伝子発現の制御分担機構を個体レベルで解析することが可能になった。

②Evolutionary Rigidity Assay (ERA) を行い、MRCS1 が祖先型 MFCS4 内保存配列の進化的重複によって生じた可能性を見出した。MFCS4 によりドライブされるトランスジェニックレポーター遺伝子の一過的発現部位 (歯芽、舌味蕾) が MRCS1 による発現部位の一部と重なることもこの可能性を支持した。さらに、MRCS1KO マウスが歯の進化にかかわると予測される表現型を示したことから、進化の過程で祖先型の制御因子からあらたな機能獲得因子が生成する機構を解明するという独創的な研究へと展開する可能性が示された。

③上皮シス制御配列と *Shh* 遺伝子座周辺の染色体構造変化の解析

・三次元 (3D) FISH による染色体動態の解析、肺・消化管上皮エンハンサーである MACS1 の 3D-FISH による染色体動態の解析を行った。*Shh* 発現のあるマウス胚消化管上皮細胞では、MACS1 と *Shh* プロモーターとの物理的接近が観察されたが、*Shh* 発現の無い直下の間充織組織では両者は離れる傾向にあり、MACS1 の消化管上皮特異的な染色体動態が示された。MACS1 KO マウスでは消化管の *Shh* 発現が 3 割程度減少する。また、消化管上皮では MACS1 と共局在する *Shh* の pre-mRNA と局在しない pre-mRNA がそれぞれ観察された。したがって、消化管での *Shh* 発現は複数のエンハンサーによる制御を受けていることが示唆された。そこで、Tg マウスによるレポーター発現解析を行い、*Shh* プロモーター上流 950Kb の部位に進化的保存性を示さない消化管上皮特異的な第 2 のエンハンサーがあることを見出した。また、消化管上皮細胞における 3D-FISH の結果、肢芽特異的エンハンサーである MFCS1 配列と *Shh* プロモーターの物理的接近はみられなかった。この結果から、*Shh* 遺伝子周辺では、組織特異的に各遠隔エンハンサーとプロモーターの相互作用が起きていることが示された。

・*Shh* 発現を制御するシス配列の機能分化の解析上皮特異的なシス配列内の転写因子結合部位をトランスジェニックアッセイによって探索した結果、口腔上皮特異的な MRCS1 内の TCF/LEF 結合モチーフ、呼吸/消化管特異的な MACS1 内の Fox 結合モチーフの重要性が示された。咽頭上皮特異的な MFCS4 及び MACS1 は、ゲノム約 125kb 内に含まれる。これらの KO マウスは、いずれもレポーター遺伝子の発現部位の一部だけに表現型を示す。この結果は、互いの機能の相補性か未検出シス配列の存在を示唆する。現在、この範囲にあるシス因子の機能性を包括的に探索するため減数分裂期特異的な Cre 組換え酵素により MRCS1 から MACS1 にいたる 125kb を欠失あるいは重複した遺伝子改変マウスの作成を進めている。

・*Shh* 発現制御の上流因子の探索

レポーター発現解析と KO マウスの表現型解析から、肺・消化管上皮エンハンサー MACS1 は単独で咽頭上皮の *Shh* 発現を制御することが明らかになった。この配列上の転写因子結合部位を Tg アッセイによって

探索し、転写因子 Fox の結合モチーフを検出した。喉頭上皮から mRNA を調整してマイクロアレイ解析を行い、Fox 遺伝子が将来喉頭上皮となる組織に発現していることがわかった。以上から、喉頭上皮での *Shh* 発現を転写因子 Fox が制御する可能性が示された。

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 10 件)

1. Yokoyama H, Maruoka T, Aruga A, Amano T, Ohgo S, Shiroishi T, Tamura K. Prx-1 Expression in *Xenopus laevis* Scarless Skin-Wound Healing and Its Resemblance to Epimorphic Regeneration. *J Invest Dermatol.* 132:2477-2485 (2011). 査読有.
2. Kondrashov N, Pusic A, Stumpf CR, Shimizu K, Hsieh AC, Xue S, Ishijima J, Shiroishi T, Barna M. Ribosome-mediated specificity in hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145: 383-397, (2011). 査読有.
3. Shikata Y, Okada T, Hashimoto M, Ellis T, Matsumaru D, Shiroishi T, Ogawa M, Wainwright B, Motoyama J. Ptch1-mediated dosage-dependent action of Shh signaling regulates neural progenitor development at late gestational stages. *Dev Biol.* 349: 147-59 (2011). 査読有.
4. Uejima A, Amano T, Nomura N, Noro M, Yasue T, Shiroishi T, Ohta K, Yokoyama H, Tamura K. Anterior shift in gene expression precedes anteriormost digit formation in amniote limbs. *Dev Growth Differ.* 52: 223-234 (2010). 査読有.
5. Suzuki D, Yamada A, Amano T, Yasuhara R, Kimura A, Sakahara M, Tsumaki N, Takeda S, Tamura M, Nakamura M, Wada N, Nohno T, Shiroishi T, Aiba A, Kamiyo R. Essential mesenchymal role of small GTPase Rac1 in interdigital programmed cell death during limb development. *Dev Biol.* 335: 396-406 (2009). 査読有.
6. Kiso M, Tanaka S, Saba R, Matsuda S, Shimizu A, Ohyama M, Okano HJ, Shiroishi T, Okano H, Saga Y. The disruption of Sox21-mediated hair shaft cuticle differentiation causes cyclic alopecia in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 9292-9297 (2009). 査読有.
7. Amano 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.
8. Sagai T, Amano T, Tamura M, Mizushina Y, Sumiyama K, 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.
9. Sakuraba 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. *Mammal Genome.* 19: 703-712 (2009). 査読有.
10. Uehara S, Izumi Y, Kubo Y, Wang CC, Mineta K, Ikeo K, Gojobori T, Tachibana M, Kikuchi T, Kobayashi T, Shibahara S, Taya C, Yonekawa H, Shiroishi T, Yamamoto H. Specific expression of *Gsta4* in mouse cochlear melanocytes: a novel role for hearing and melanocyte differentiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22: 111-119 (2009). 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

1. Shiroishi T. “Long-range enhancers directing regional Shh expression in the epithelial linings.” The Hedgehog Meeting, Singapore, 20 March, (2012).
2. Shiroishi T. “Long-range enhancers regulate developmental Shh expression via chromosomal dynamics.” EMBO Meeting, Barcelona, 7 Sept. (2010).
3. Amano T, Tanabe H, Sagai T. and Shiroishi T. “Chromosome dynamics underlying regulation of developmental Shh expression.” 第 32 回日本分子生物学会年会 シンポジウム 横浜、12 月 10 日 (2009) .

4. Amano, T., Sagai, T., Tanabe, H. and Shiroishi T. “Long-range enhancer-promoter interaction via chromosomal dynamics at the *Shh* locus.” 23th INTERNATIONAL MOUSE GENOME CONFERENCE 2009, La Jolla, San Diego, USA Nov. 1-4, (2009).
5. 天野孝紀, 城石俊彦 「染色体ダイナミクスを介した Shh 遺伝子の動的発現制御」日本遺伝学会第 81 回大会ワークショップ「核ダイナミクス研究の新展開」、松本 9 月 16-18 日 (2009)

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし