

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681039

研究課題名(和文)微量ChIP-seq法の開発による始原生殖細胞のエピゲノム動態解明

研究課題名(英文)Dissection of epigenome dynamics of germ cell specification pathway through establishment of a ChIP-seq method from small number of cells

研究代表者

栗本 一基(Kurimoto, Kazuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20415152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,700,000円

研究成果の概要(和文)：個体を形成する細胞の多様性は、その遺伝子発現を規定する閥内のエピゲノムに依拠している。細胞内の転写因子の結合部位の同定には、技術的な限界によって多数の細胞を必要とし、そのような研究は培養細胞や血球系の細胞等にほぼ限られていた。私は少数の細胞から転写因子の結合部位を同定する手法を確立し、従来の1/100から1/1000のスケールで転写因子のChIP-seqを行うことを可能にした。この手法を始原生殖細胞の試験管内モデル系に応用し転写活性化・抑制にかかわる代表的なヒストン修飾とともに、必須転写因子BLIMP1とT(Brachyury)の結合部位を同定して、この過程のエピゲノム動態を解明した。

研究成果の概要(英文)：The identity of all of the cells that comprise individuals are defined by the cellular epigenome in the nuclei. Due to technical limitation, genome-wide analysis of binding sites of transcriptional regulators are almost limited to cell types for which many cells are available, including hematopoietic cells and cultured cells. I established a method for ChIP-seq of transcription factors from small number of cells and enabled identification of the genome-wide binding sites of transcription factor at 1/100 ~ 1/1000 time previous scale. Using this method, Using this method, I determined binding sites of two key transcription factors for germ cell specification pathway, BLIMP1 and T (Brachyury), in vitro. In addition, I determined representative histone modifications associated to active transcription and repression, and revealed landscape of chromatin dynamics during the PGC specification in vitro.

研究分野：分子生物学・ゲノム科学

キーワード：ChIP-seq BLIMP1 primordial germ cell 始原生殖細胞 微量 次世代シーケンサー 生殖細胞
エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は次世代にゲノム情報を伝達する唯一の細胞種であり、その起源は、胚発生のごく初期、原腸陥入の開始[発生 6.25 日: embryonic day (E) 6.25]とともに、多能性の上皮様細胞層(エピプラスト)から分化する始原生殖細胞[Primordial germ cell(PGC)]に発する。その分化過程は、中胚葉誘導シグナルへの抵抗、潜在的な多能性の再獲得、ゲノムワイドなエピゲノム修飾の再編成(DNAの脱メチル化・ヒストン修飾の転換)などの重要な細胞生物学的特徴を示し、激しい遺伝子発現変動を伴う。この過程を通して、PGCはゲノムインプリントの消去・再獲得や減数分裂などの生殖細胞の特性を獲得するための核内基盤を形成すると考えられる。私は、単一細胞由来の全cDNAを定量的に増幅して、マイクロアレイによりゲノムワイドに解析する方法論を確立し、PGCの分化過程に支配的な役割を果たす転写制御因子 *Blimp1* の機能を詳細に解析してきた。その結果、PGCはその初期には、進行しつつある原腸陥入を促進するシグナルの影響を強く受け、中胚葉関連因子(*Hox* 遺伝子群等)の発現や多能性関連因子(*Sox2* 等)の抑制など、周囲の体細胞と酷似した発現パターンを一時的に示すものの、やがて *Blimp1* の働きにより、中胚葉関連因子の抑制、多能性関連因子の再発現を含む、PGC特異的な発現動態を獲得することが明らかになっていった。しかしながら、*Blimp1* の機能がどのようなクロマチン構造により規定されるのか、また、*Blimp1* がクロマチン構造をどのように変化・維持させ、遺伝子発現を制御するのかなど、PGC形成過程を規定するエピゲノム構造に関する知見はまったくと言ってよいほど存在しなかった。また、上述のエピゲノム修飾の再編成は、非常に動的かつゲノムワイドな変化であるが、具体的にどのゲノム部位が制御を受けているのかは、ほとんど不明であった。さらに、*Blimp1* は生殖細胞のみならず、B細胞から形質細胞への分化や、皮脂腺の恒常性維持、網膜桿体細胞の発生、消化管内分泌細胞など、さまざまな細胞系譜の分化に重要な役割を果たしており、それぞれの系で異なる遺伝子の発現を支配しているが、このような *Blimp1* の生物学的機能の多様性を保証する機構も未解明であった。

細胞のみならず、B細胞から形質細胞への分化や、皮脂腺の恒常性維持、網膜桿体細胞の発生、消化管内分泌細胞など、さまざまな細胞系譜の分化に重要な役割を果たしており、それぞれの系で異なる遺伝子の発現を支配しているが、このような *Blimp1* の生物学的機能の多様性を保証する機構も未解明であった。

2. 研究の目的

このような解析の遅れの要因として、PGCをはじめとして、生体内の特定の細胞系譜が少数の細胞であり、そのエピゲノム構造の解析が非常に困難であったことがあげられよう。一般的に、クロマチンの後成的修飾や転写因子の結合部位の解析には、クロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation: ChIP)またはそれに類似の手法が用いられるが、通常、多数の細胞(ヒストン・DNA修飾: 10^{6-7} 個、転写因子: 10^7 個以上)が必要であり、ゲノムワイドな解析は、大量の試料を得ることができる培養細胞や血球系の細胞、もしくはさまざまな細胞種の混在する組織片に限定されていた。当時、 10^3-10^4 個程度の少数の細胞中の、ヒストンやDNAの修飾、RNAポリメラーゼ等を対象にしたChIPや、それをマイクロアレイ(ChIP-chip)や次世代シーケンサー(ChIP-seq)に適用した手法が報告されていたものの、特定の細胞系譜の解析に耐える精度であるか否か不明であった。また、ヒストンに比べ結合部位が少ない転写制御因子について、少数の細胞を対象にしたChIP-chip法やChIP-seq法は、私の知る限り存在しなかった。これらの技術的制約を解決するため、私はChIPに適したタグを *Blimp1* に付加したノックインマウスの開発および、微量試料からのChIP DNAを次世代シーケンサーに適用可能な形態で増幅する手法の開発を行ってきた。本課題では、これらを用いた、微量ChIP-seq法の検証・完成と、その応用として、分化・成熟過程にあるPGC

における、転写制御因子 Blimp1 の結合部位、転写促進・抑制に関わる主要なヒストン修飾 (H3K4m3, H3K27m3, H3K27ac, H3K9m2) および DNA 修飾 (メチル化、ヒドロキシルメチル化) の動態を、全ゲノムレベルで決定することを目的とした。

3. 研究の方法

私は、Blimp1 の N 末端に EGFP および、ビオチンリガーゼ標的配列 (Avitag) を付加したノックインマウスを開発していた。タグ付き BLIMP1 はデザインした通りに生体内で合成され、正常な発現と機能を示した。私は、開発した微量 ChIP-seq 法を用いて、Blimp1 の結合部位および、代表的なヒストン修飾、DNA 修飾の決定を行うため、ホモ接合マウスの量産を行った。また、PGC 様細胞 (PGCLC) で同様の解析を行うため、このマウスから ES 細胞を樹立した。

私は、微量 ChIP-seq 法の開発にあたり、Blimp1 に付与したものと同一タグ (EGFP, Avitag) を、転写制御因子 Oct3/4 に付与した ES 細胞を樹立し、方法論の検証を可能にする系を構築した。この系を用いて、適切なキャリア分子の導入による DNA のロスや非特異的吸着の抑制、アダプター配列やプライマー配列の改善、ライブラリー化過程における反応効率の改善等を行い、その結果、ヒストン修飾については 1×10^4 個から、転写因子については 1×10^5 個細胞からの微量な ChIP DNA を、定量的に増幅することができるようになった。ここで用いるアダプターは、次世代シーケンサー SoLiD5500xl に直接適用可能なものを用いた。この手法により、従来の 1/100 以下のスケールに相当する微量 Chip-seq が可能になった。

私はまず、次世代シーケンサーを用い増幅法の検証をゲノムワイドに行った。すなわち、 10^7 個程度の大量の ES 細胞を用いて ChIP を

行い、その一部から $10^4 \sim 10^5$ 個少数細胞に相当する ChIP DNA を得て、新規手法によるライブラリー化と増幅を行った。多数の細胞から得た ChIP DNA は従来通りの方法でライブラリー化し、両者の ChIP-seq データを比較することにより、ゲノム部位や ChIP 効率 (%Input) 等に依存する、ライブラリー化・増幅効率のバイアスや再現性の程度 (N をいくつ取ればよいか・必要な統計処理は何か・誤差はどの程度かなど) を、高い精度で、かつ定量的に解析した。このような解析により、微量試料 ChIP-seq 法の有効範囲を厳密に定義し、信頼性の高い方法論として確立した。

初期 PGC 分化過程のモデルとして、PGCLC における Blimp1 結合部位の動態を ChIP-seq により決定するとともに、PGCLC およびその前駆体 [ES 細胞・エピブラスト様細胞 (EpiLC)] について、ヒストン・DNA 修飾の動態を決定した。PGCLC は、胚体内の PGC と同様、免疫染色で観察されるレベルのエピジェネティクス動態 (H3K9m2 減少・H3K27m3 増加・DNA メチル化減少) を示す。単一細胞マイクロアレイ法にて決定した PGC における遺伝子発現データとあわせ、各修飾が占める具体的なゲノム部位および、Blimp1 との関係を明らかにした。

4. 研究成果

ES 細胞を用いた検証実験により、段階希釈した ChIP DNA については 1×10^4 細胞相当に希釈した場合でも上位 5000 ピークの 70% 以上 (coverage > 70%)、上位 3000 ピークの 90% 以上を検出することができた (coverage > 90%)。このことから、ChIP DNA の増幅法自体は正しく機能していることがわかった。一方、実際の 1×10^4 個細胞から ChIP-seq を実施した場合、上位 500 ピークまでは accuracy > 95%, coverage > 50% という結果を得た。細胞数を 1×10^5 個まで増やすと、上位 3000 個のピークに対して accuracy > 98%,

coverage > 75%という良好な結果を得た。このことから、ChIP DNAの増幅法ではなく、ChIP自体のバックグラウンドにより次世代シーケンサーによる解析の精度が抑制されてしまうことが明らかになった。ただし、数百個の主要なピークについてはこの条件下でも十分に同定することができることも明らかになった。

この手法を用いて、始原生殖細胞決定期に支配的な役割を果たす二つの転写因子BLIMP1とT(Brachyury)の結合部位を、始原生殖細胞の試験管内モデル系 (primordial germ cell like cells; PGCLCs) において決定した。また、この手法を応用し、ES細胞からエピブラスト様細胞 (epiblast like cells; EpiLCs) を経てPGCLCsが誘導される過程における主要なヒストン修飾 (転写活性化にかかわる修飾; H3K4me3, H3K27ac、転写抑制にかかわる修飾 H3K27me3, H3K9me2) の動態を解明し、生殖細胞決定過程におけるエピゲノム動態を解明した。

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. Nakamura, T., Y. Yabuta, I. Okamoto, S. Aramaki, S. Yokobayashi, K. Kurimoto, K. Sekiguchi, M. Nakagawa, T. Yamamoto, and M. Saitou, SC3-seq: a method for highly parallel and quantitative measurement of single-cell gene expression. *Nucleic Acids Res*, 2015.
2. Kurimoto, K., Y. Yabuta, K. Hayashi, H. Ohta, H. Kiyonari, T. Mitani, Y. Moritoki, K. Kohri, H. Kimura, T. Yamamoto, Y. Katou, K. Shirahige, and M. Saitou, Quantitative Dynamics of Chromatin Remodeling during Germ Cell Specification from Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 2015.
3. Saitou, M. and K. Kurimoto, Paternal nucleosomes: are they retained in developmental promoters or gene deserts? *Dev Cell*, 2014. 30(1): p. 6-8.

4. Ohnishi, Y., W. Huber, A. Tsumura, M. Kang, P. Xenopoulos, K. Kurimoto, A. K. Oles, M. J. Arauzo-Bravo, M. Saitou, A. K. Hadjantonakis, and T. Hiragi, Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nat Cell Biol*, 2014. 16(1): p. 27-37.

5. Yamaji, M., J. Ueda, K. Hayashi, H. Ohta, Y. Yabuta, K. Kurimoto, R. Nakato, Y. Yamada, K. Shirahige, and M. Saitou, PRDM14 Ensures Naive Pluripotency through Dual Regulation of Signaling and Epigenetic Pathways in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 2013. 12: p. 1-15.

6. Nakaki, F., K. Hayashi, H. Ohta, K. Kurimoto, Y. Yabuta, and M. Saitou, Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature*, 2013. 501(7466): p. 222-6.

7. Kagiwada, S., K. Kurimoto, T. Hirota, M. Yamaji, and M. Saitou, Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *Embo J*, 2013. 32(3): p. 340-53.

8. Aramaki, S., K. Hayashi, K. Kurimoto, H. Ohta, Y. Yabuta, H. Iwanari, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, Y. Kato, K. Shirahige, and M. Saitou, A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell*, 2013. 27(5): p. 516-29.

9. Saitou, M., S. Kagiwada, and K. Kurimoto, Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*, 2012. 139(1): p. 15-31.

10. Hayashi, K., S. Ogushi, K. Kurimoto, S. Shimamoto, H. Ohta, and M. Saitou, Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, 2012. 338(6109): p. 971-5.

[学会発表] (計 1 件)

日本分子生物学会年会 2014 年, 3P-0199 栗本一基, 藪田幸宏, 林克彦, 大田浩, 清成寛, 守時良演, 郡健二郎, 木村宏, 加藤由起, 白髭克彦, 斎藤通紀 微量 ChIP-seq 法を用いた始原生殖細胞のエピゲ

ノムリプログラミング過程の解明

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗本一基 (Kurimoto, Kazuki)

研究者番号：20415152

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：