

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770202

研究課題名(和文) 発生過程で細胞運命を規定する転写因子の生涯にわたる発現制御機構

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of key developmental genes from embryo to adult

研究代表者

塚原 達也 (TSUKAHARA, Tatsuya)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90586413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：我々はメダカ胞胚期(多様な細胞種への分化能を持つ)および成体筋節・肝臓においてエピゲノム情報(DNAやヒストンに対する化学修飾)を収集し、詳細な解析を行った。その結果、発生関連遺伝子座では、胞胚期においてDNA低メチル化ドメインのサイズとの発現抑制レベルに正の相関があること、成体において遺伝子発現が活性化している場合にDNA低メチル化ドメインが縮小すること明らかとなった。これらの知見はヒトES細胞においても保存されており、修飾ドメインのサイズによる発生関連遺伝子の多能性細胞から成体に至る発現制御というエピゲノム研究における新たな方向性を提示することができた。

研究成果の概要(英文)：We performed the epigenomic analysis of pluripotent blastula embryos and adult myotome and liver in medaka fish. We revealed that, in developmental gene loci, the size of hypomethylated DNA domain (HMD) positively correlates with the repression levels of developmental gene expression in blastula, and HMDs become shortened when the adjacent gene is actively expressed in adult tissues. The comparative analyses with human ES cells, zebrafish embryos and adult muscle showed the conservation of the correlation between HMD size and the repression levels of developmental genes. Therefore, this study highlights the novel features of developmental gene regulation mediated by the size of epigenetic domain from pluripotent embryos to adult.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：エピジェネティクス 発生関連遺伝子 DNAメチル化 メダカ 脊椎動物

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物はたった一つの受精卵から発生し、多くの細胞種からなる複雑な個体を作り出す。受精卵から多能性期（哺乳類では胚盤胞期の内部細胞塊、メダカでは胞胚期）に至るまでは細胞は個体を形成する全ての細胞種へと分化する能力を持っているが、発生が進むにつれて細胞の分化能は徐々に制限され、ここの細胞の運命が決定されていく。共通の DNA 配列を持つ各細胞種のアイデンティティは、DNA のメチル化（脊椎動物においては CpG のシトシンにメチル基が付加される）やヒストンの化学修飾などのクロマチンへのエピジェネティックな修飾によって規定されている。また、脊椎動物は非常に寿命が長く、形態形成が終了してからも年単位の長期間にわたって細胞のアイデンティティを維持する必要がある。したがって、多能性細胞から胚発生期、そして成体に至るまでエピジェネティックな修飾がどのように変化することで細胞のアイデンティティを制御しているかを理解することは発生・再生研究における極めて重要であった。

本研究では、特に発生関連遺伝子、中でも細胞の運命に決定的な役割を果たす転写因子をコード遺伝子群（key transcription factor genes）に着目する。近年これらの遺伝子を異所的に発現させることで細胞の運命を転換することが可能であることが明らかになっており、成体においてこれらの遺伝子発現に異常が生じると細胞のアイデンティティが変化してしまうことでガンや生活習慣病などの原因となることも示唆されている。興味深いことに、key transcription factor genes を含む発生関連遺伝子は、多能性細胞において活性型および抑制型のヒストン修飾が共存している。これらの遺伝子は未分化性を維持するためには発現が抑制されている必要がある一方で、分化刺激に対しては迅速に誘導される必要があり、この特徴的なヒストン修飾パターンはそのような発現制御に関わると考えられている。このように、発生関連遺伝子は多能性細胞から成体に至るまでその発現が正確に制御される必要があり、特に key transcription factor genes の多能性細胞から成体に至る発現制御のメカニズムを理解することは細胞の運命制御のメカニズムを理解する上で重要であった。

これまでのエピジェネティクス研究はそのほとんどが哺乳類の培養細胞を用いた者であり、他の脊椎動物の *in vivo* の細胞を用いた研究は少ない。また、哺乳類と魚類や両生類などのクロマチン状態を詳細に比較した研究も少ない。しかし、ゲノムのサイズの構造は異なりながらも発生パターンや遺伝子の機能には共通点も多いそれらの生物の知見を哺乳類と比較することは、脊椎動物に普遍的な制御や、哺乳類において進化的に獲得された制御などを理解する上で有益である。その点において、ゲノムサイズも小さ

く（800 Mb、マウス・ヒトの約 1/4、ゼブラフィッシュの 1/2 以下）、ゲノム情報も整備されており、体外受精であるため多能性を持つ初期胚の収集も比較的容易であるメダカを用いたゲノムワイド研究およびその結果の多生物種との比較は、発生関連遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構の理解に大きく貢献できる可能性があるかと我々は考えた。

2. 研究の目的

我々は、発生関連遺伝子（特に key transcription factor genes）のエピジェネティックな発現制御機構に以下の 2 つのプロジェクトから迫った。

- (1) メダカ多能性細胞（胞胚期）における発生関連遺伝子周辺クロマチン構造の解析し、その知見をヒト ES 細胞との比較する
- (2) メダカ成体筋節および肝臓において発生関連遺伝子周辺クロマチン構造がどのように変化しているか、発現の有無と関連づけて解析し、その知見をゼブラフィッシュのデータと比較する

これらの解析によって、多能性細胞における発生関連遺伝子の発現準備状態がどのように制御されているか、また成体において発生関連遺伝子の発現がどのように制御されているか、を明らかにすることを目指した。

以下 3 と 4 の項目では (1) と (2) に分けて記述する。

3. 研究の方法

(1) メダカ胞胚期における DNA メチル化、活性型ヒストン修飾（ヒストン H3 の 4 番目のリジンにメチル基を 2 つ付加されたもので転写を活性化する機能を持つ、H3K4me2）、および抑制型ヒストン修飾（H3K27me3）のゲノムワイド解析を行った。DNA メチル化については Bisulfite-seq と呼ばれる手法（非メチル化シトシンのみがウラシルに変換される化学的処理を行ったゲノム DNA を次世代シーケンサーで大規模シーケンス）で得られた発現済みデータを用い（Qu W et al, Genome Research, 2012）、ヒストン修飾については ChIP-seq 法と呼ばれる手法（ヒストン修飾特異的抗体でホルマリンにより架橋後断片化したクロマチンを免疫沈降し、産物を次世代シーケンサーで大規模シーケンス）をメダカに適用して解析した。遺伝子発現解析については、精製した RNA から ribosomal RNA を除き、次世代シーケンサーで大規模シーケンスを行う RNA-seq と呼ばれる手法を用いた。ヒト ES 細胞については公開データを我々自身で再解析し（Lister R et al, Nature, 2009; Lister R et al, Nature, 2011）、メダカ胞胚期との詳細な比較を行った。また、多能性細胞におけるクロマチン修飾のパターンがどのように確立するかについての知見を得るために、桑実胚期（～128 細胞期）においても ChIP-seq 解析を行った。

(2) メダカ成体の背・腹筋節および肝臓を用いて DNA メチル化、H3K4me2、H3K27me3 および遺伝子発現量のゲノムワイド解析を行った。DNA メチル化については、肝臓は発表済みデータを用い (Qu W et al, Genome Research, 2012)、さらに受精後 7 日目の稚魚の背・腹筋節と、体幹部背側が腹側化する *Da* 変異体の成体背・腹筋節でもゲノムワイド解析を行った。ゼブラフィッシュについては sphere 期 (メダカ胞胚期と同等) および成体筋節の DNA メチル化データおよび遺伝子発現データを公開データから得て (Potok M et al, Cell, 2013)、我々自身で再解析を行った。

4. 研究成果

(1) 胞胚期における DNA メチル化および活性型ヒストン修飾 (H3K4me2)、抑制型ヒストン修飾 (H3K27me3) パターンをゲノムワイドで解析したところ、メダカゲノムはほぼ全域にわたって DNA メチル化が高レベルであり、一部低メチル化状態が連続した領域が約 15,000 ヶ所存在していた (10 以上の CpG が連続して低メチル化状態にある領域: DNA 低メチル化ドメイン、Hypomethylated domain, HMD)。HMD には H3K4me2 のみが存在するもの (K4HMD) と、H3K4me2 と H3K27me3 の両方が存在するもの (K27HMD) の二種類が存在していた。HMD はそのほとんどが数 kb の長さであったが、興味深いことに K27HMD の中には数十 kb にもおよぶ非常に大きなサイズのものも存在しており (図 1A)、4kb 以上の HMD は K4HMD には 0.02% しか存在しなかったが、K27HMD は約 12% が 4kb 以上であった (図 1B)。

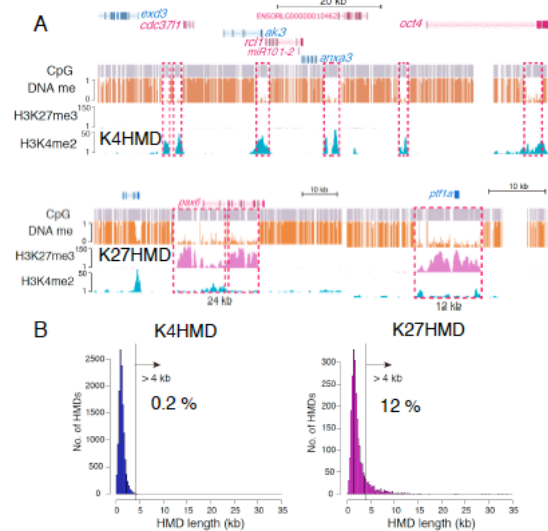


図 1. メダカ胞胚期における 2 種類の HMD
(A) ゲノムブラウザーで可視化した K4HMD (上) および K27HMD (下)
(B) K4HMD および K27HMD のサイズ分布

サイズの大きなものは K27HMD のみであったことから、我々は次にヒストンの修飾レベルと HMD の大きさの関係性を解析した。その結果、K27HMD のサイズと H3K27me3 のレベルとは正の相関がある一方で H3K4me2 のレベルとは負の相関があることも明らかとなった (図

2)。4kb 以上の K27HMD を large K27HMD、4kb 以下のものを small K27HMD と定義し、それぞれがマークする遺伝子について Gene Ontology 解析によりその性質を調べたところ、どちらも発生プロセスに関わる遺伝子が多かったものの、large K27HMD には特に転写制御因子が、small K27HMD には細胞間相互作用やシグナル伝達に関わる遺伝子が多く含まれていた。実際に、large K27HMD に含まれる遺伝子のうち、約 2/3 が発生過程で細胞の運命に対して決定的な役割を果たす key

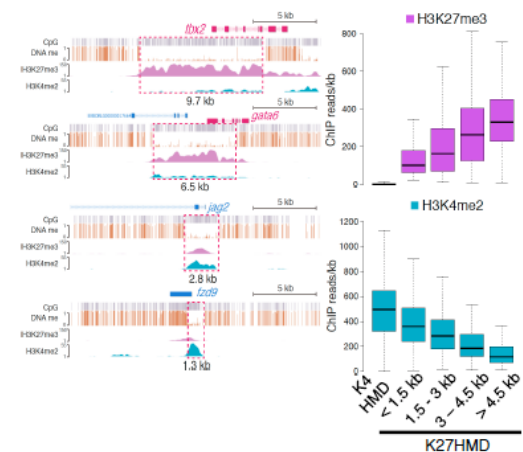


図 2. K27HMD のサイズとヒストン修飾の相関
(左) 様々な大きさの K27HMD のゲノムブラウザー表示
(右) 各サイズ範囲における H3K27me3 と H3K4me2 のレベル

transcription factor genes であった。

ヒト ES 細胞のデータについても同様の解析を行ったところ、large K27HMD (ヒトでは 8kb と定義した) は small K27HMD よりも高レベルの H3K27me3 を含んでおり、遺伝子発現もより強く抑制されていることが明らかとなった (図 3A)。したがって、K27HMD のサイズによる遺伝子の抑制状態の制御は脊椎動物間で保存されていることが示された (図 3B)。

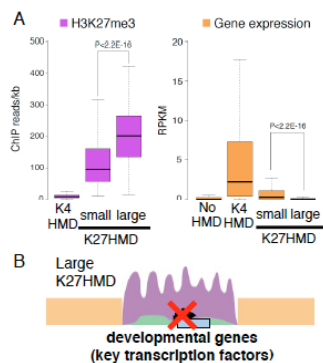


図 3. ヒト ES 細胞における K27HMD のサイズと発現制御状態
(A) K4HMD, small and large K27HMD における H3K27me3 のレベルおよび遺伝子発現レベル。P 値: Wilcoxon test
(B) 多能性細胞における key transcription factor gene の制御モデル

Large K27HMD に多く含まれる key transcription factor genes は細胞の分化に決定的な役割を果たすため、多能性細胞において発現してしまうと不適切な分化を引き起こす。したがって、それらの遺伝子は large K27HMD によってその発現が強固に抑制されている必要がある。一般に DNA メチル化よりもヒストン修飾の方がフレキシブルに変化しやすいことから、large K27HMD による制御

は、未分化性の維持のための強い抑制と、迅速な分化のための発現誘導能を擁立させる者であると考えられる。我々はさらに、ヒトとメダカで DNA メチル化状態の異なる遺伝子について解析を進め、ヒト ES 細胞では K27HMD によりマークされるにも関わらず、メダカ胞胚期においては完全に DNA メチル化されている遺伝子には、神経活動やシナプス伝達、神経可塑性などに関わる遺伝子が多く含まれることが明らかとなった。これらの遺伝子の機能はメダカとヒトで共通していると考えられるが、ヒトにおいてはその発現がよりフレキシブルに制御されることで複雑な神経ネットワークの形成に寄与している可能性がある。

さらに我々は、胞胚期よりもさらに初期である桑実胚期における H3K4me2 と H3K27me3 のパターンをゲノムワイドで解析した。その結果、H3K27me3 は K27HMD において胞胚期の約 40-50%程度のレベルであり、胞胚期のパターンが一様に確立していくことを示唆する結果が得られた。しかし H3K4me2 に関しては、一部の K4HMD ではすでに胞胚期と同レベルあるいはより高いレベルを示した一方で、残りの K4HMD と K27HMD については胞胚期と比べて著しく低レベルの蓄積しか示さなかった (図 4)。

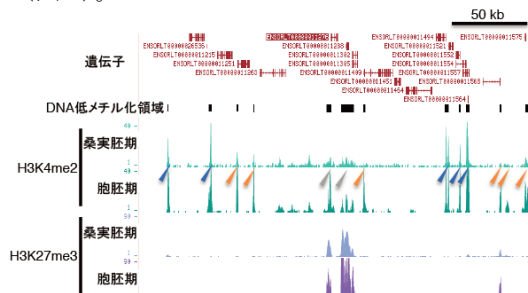


図 4. 桑実胚期と胞胚期におけるヒストン修飾パターンの比較

ゲノムブラウザーによる H3K4me2 および H3K27me3 の比較。青矢尻は H3K4me2 のレベルが胞胚期と同程度の領域を、橙矢尻および灰色矢尻は桑実胚期において H3K4me2 の蓄積がほぼ見られない領域を示している (灰色矢尻は K27HMD)。

したがって、H3K4me2 が胞胚期のパターンを確立する動態は、HMD によって大きく異なることが明らかとなった。現在この動態の違いが生み出されるメカニズムの解明を目指して解析を進めている。

(2) 我々は成体における解析を行うにあたり、*zic1/zic4* という、ゲノム上にタンデムに配置され体幹部の背側形態を制御する key transcription factor genes に着目した。*zic1/zic4* は胞胚期において 25kb にわたる large K27HMD に存在していたが、成体筋節においては、発現の活性化している背側のみ HMD の縮小が起こっていた (図 5)。

時系列を追った解析からこの HMD の縮小は孵化後徐々に生じることが明らかとなり、発現の誘導ではなく維持に寄与する可能性が示唆された。また、トランスポゾンの挿入によ

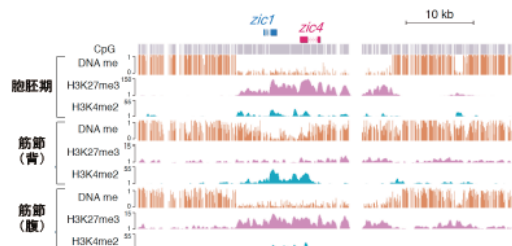


図 5. 胞胚期、背・腹筋節における *zic1/zic4* 遺伝子座のクロマチン修飾状態

り中胚葉エンハンサーの機能が阻害された *Da* 変異体においては *zic1/zic4* は背側筋節においても発現しないが、その場合 HMD の縮小も生じないこと、ヘテロ変異体においては転写の起こっている野生型アリルでのみ HMD の縮小が起こったことから、HMD の縮小には抑制型ヒストン修飾 (H3K27me3) の消失を伴う遺伝子発現の活性化が必要であることが強く示唆された。

さらに、この K27HMD の縮小が普遍的な現象であるかを明らかにするため、筋節および肝臓のデータについて詳細な解析を行ったところ、K27HMD の縮小が生じているものは、変化していないものと比較して低レベルの H3K27me3 および高レベルの遺伝子発現を示すことが明らかとなった。このような傾向は large K27HMD においてより顕著であり、また DNA メチル化の上昇が起こっても H3K4me2 の存在するプロモーター領域は低メチル化状態が維持されており、実際に K27HMD の「縮小」が起こっていることが示された。また、孵化期の筋節においては K27HMD の縮小は生じていなかったことから、縮小が発現の維持に寄与することが示唆された (図 6A)。

近年、DNA メチル化と H3K27me3 が拮抗するというを示唆する報告がなされており、K27HMD の縮小は、DNA メチル化によって発現の誘導時に低下した H3K27me3 が再び上昇することを防ぎ、転写活性化状態を固定する機能があると考えられる (図 6B)。

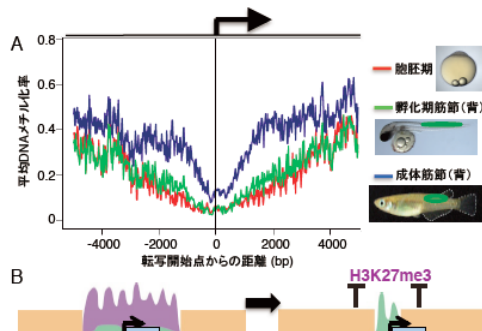


図 6. HMD の縮小による遺伝子発現維持モデル

(A) 成体筋節において胞胚期、孵化期筋節および成体筋節において HMD の縮小が生じた large K27HMD に含まれる遺伝子の転写開始点近傍における胞胚期、孵化期筋節、成体筋節の平均 DNA メチル化率

(B) HMD の縮小による遺伝子発現の維持モデル。(large) K27HMD は多能性細胞では高レベルの H3K27me3 が存在するが (左)、発現誘導により H3K27me3 が低下することで HMD の縮小が起こり、DNA メチル化が H3K27me3 と拮抗することで転写活性化状態が維持される。

実際に *zic1/zic4* の発現は、開始直後は細胞外シグナルによって可逆的に制御されているが、孵化期以降では細胞自律的な制御へと変化することも明らかになっており、HMD の縮小が長期間にわたる発現の維持に重要である可能性がある。ゼブラフィッシュを用いた解析でも、sphere 期における large K27HMD のうち、成体筋節で HMD の縮小の生じていたものは変化のなかったものよりも高レベルの遺伝子発現を示していたため、HMD の縮小は生物種を超えて普遍的な現象であることが示唆された。

これらの (1)、(2) の解析から、発生関連遺伝子 (特に key transcription factor genes) の発現は K27HMD のサイズによって多能性細胞から成体に至って精緻に制御されていることが明らかとなった。これまでのエピジェネティクス研究はそのほとんどが修飾の種類に注目した者であったが、本研究によって修飾ドメインのサイズによる抑制状態の制御という遺伝子発現制御における新たなメカニズムを提起することができたと考えられる。

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 1 件)

Ryohei Nakamura, Tatsuya Tsukahara, Wei Qu, Kazuki Ichikawa, Takayoshi Otsuka, Katsumi Ogoshi, Taro L Saito, Kouji Matsushima, Sumio Sugano, Shinichi Hashimoto, Yutaka Suzuki, Shinichi Morishita, and Hiroyuki Takeda, "Large hypomethylated domain serves as strong repressive machinery for key developmental genes in vertebrates", *Development*, 査読有, in press (受理済)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Ryohei Nakamura, Tatsuya Tsukahara, Hiroyuki Takeda, "The size of DNA hypomethylated domain reflects repression levels of developmental genes", 日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日~2013 年 12 月 6 日, 神戸(神戸国際展示場・ポートピアホテル、兵庫県)
- ② Tatsuya Tsukahara, "Epigenetic Regulation of Key Developmental Genes in the Medaka Genome", *Systems Biology Across the Pacific: from Molecules to Ecosystems (UTokyo Forum)*, 2013 年 11 月 6 日~2013 年 11 月 7 日, サンチアゴ (カトリカ大学、チリ)
- ③ Ryohei Nakamura, Taro L Saito, Wei Qu, Jun Yoshimura, Shinichi Morishita, Yutaka Suzuki, Shinichi Hashimoto,

Tatsuya Tsukahara and Hiroyuki Takeda, "Antagonistic relationship between H3K27me3 and DNA methylation in long-term regulation of developmental genes", *CDB symposium 2013*, 2013 年 3 月 4 日~2013 年 3 月 6 日, 神戸 (理化学研究所発生・再生科学総合研究センター、兵庫県)

- ④ Ryohei Nakamura, Taro L Saito, Wei Qu, Jun Yoshimura, Shinichi Morishita, Yutaka Suzuki, Shinichi Hashimoto, Tatsuya Tsukahara and Hiroyuki Takeda, "Antagonistic relationship between H3K27me3 and DNA methylation in long-term regulation of developmental genes", 日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~2012 年 12 月 14 日, 福岡 (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡県)

[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:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原 達也 (TSUKAHARA Tatsuya)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号: 90586413

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: