

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291048

研究課題名(和文)メダカゲノムを用いた発生重要遺伝子のエピジェネティック発現制御機構

研究課題名(英文)Epigenetic regulation of key developmental genes in the medaka genome

研究代表者

武田 洋幸 (Takeda, Hiroyuki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80179647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物モデルであるメダカを用いて、初期胚および発生・成長過程における epigenetic code を発生重要遺伝子に着目して明らかにし、成立機構を解析した結果、発生重要遺伝子は未分化状態の胞胚期細胞ではDNA低メチル化状態にあり、さらに抑制的なヒストン修飾によりその発現が強く抑制されていることが判明した。機械学習および近交系(NNIとHd-rR)の比較により、その遺伝子領域には複数の特徴的配列が集積していることも判明した。また器官形成・再生における epigenetic code を調べるリソースとして、臍臓の内・外分泌腺細胞が標識されるトランスジェニックや細胞を特異的に除去する系を確立した。

研究成果の概要(英文)：We examined genome-wide the epigenetic code of key developmental genes during development using the medaka as a model. We found that, at the blastula stage when all cells are pluripotent, developmental genes are pre-selected and marked by specific epigenetic modifications so as to be robustly repressed before the onset of differentiation. Furthermore, by examining the frequency of the genetic variations in short DNA motifs between the two polymorphic inbred lines, Hd-rR and HNI, and also by applying the machine learning approach, we identified short DNA motifs enriched in the DNA hypomethylated domain. These short sequences could be a platform for recruiting specific epigenetic machinery.

Finally, for the future works on organ differentiation and regeneration, we have established pdx1- and ptf1a-transgenic medaka to visualize endocrine and exocrine cells. We also generated transgenic lines, in which cells can be specifically ablated using the Nitroreductase/Metronidazole system.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：エピジェネティクス メダカ DNAメチレーション ヒストン修飾 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

epigenetic code (DNA 修飾、ヒストン修飾の組み合わせ) は、多能性の維持、発生過程の細胞系譜特異的な細胞分化、癌や神経性疾患などに伴う病理学的変化などの様々な生命現象において重要な役割を果たすと考えられている。また、細胞はそれぞれの状態(履歴や分化状態)を記憶しており、その情報は世代を越えて娘細胞へ継承される。これらの現象は発生学や癌研究の分野において長い間大きな謎とされていたが、epigenetic code の解明によりそのメカニズムに迫ることができる。epigenetic code は、ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) プロジェクトを始めとする様々なプロジェクトにより解析が行われている。2012年9月6日付 Nature 誌に論文 6 編からなる特集が掲載された。しかし、native な胚の細胞を用いた、発生過程に焦点を絞った研究は少なく、ゲノム科学のモデルであるメダカを用いて発生に特化した研究を計画した。

我々は、国立遺伝学研究所・小原博士、東京大学・森下博士らのグループと共同でメダカゲノムの解読 (Kasahara et al., Nature, 2007) に成功している。メダカ (*Oryzias latipes*) は日本産のモデル生物で、小さなゲノム(800Mb はゼブラフィッシュの半分以下、ヒトの 4 分の 1) と複数の近交系の存在が特徴である。特に注目されるのは、メダカのゲノムは地域間の種内変異が非常に高いことである。例えば、二つの近交系 Hd-rR および HNI (それぞれ南・北野生型集団由来) は SNP 率が 2 - 3 % とこれまで報告されたどの脊椎動物のデータよりも高い。これらの近交系のゲノム配列は非コード配列においても高い保存性を示すものの十分な多様性を示しており、メダカゲノムを用いて進化的に保存された機能的に重要な配列を同定しようと考えている。以上のように、メダカは脊椎動物のゲノム機能の理解をめざす研究では、極めて優れたモデル生物である。

2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物モデルであるメダカを用いて、発生・成長過程における特定の細胞系譜の epigenetic code をゲノムワイドで包括的に明らかにし、epigenetic code を創り出す機構を解明する。メダカは多型を示す近交系に加えて、胚や幼魚から実験試料を比較的容易に大量に得ることができる。この利点を生かして、主な実験対象を native な胚の細胞とし、機能解析も主に in vivo で行う。実際多型を示す近交系間で得られたデータを比較することで、epigenetic code の成立に重要な cis 領域を絞り込むことが可能と考えている。さらに、トランスジェニックや cis 領域への変異導入を行って、その影響を調べる。本研究では、多能性、細胞の運命決定、分化状態の維持、再生などに重要な役割を果たす key developmental genes (250 個程度と想

定される) へのエピジェネティック修飾に焦点を絞る。そして、胞胚期を未分化状態のレファレンスとして、筋節、消化管、肝臓へ分化する細胞系譜での epigenetic code の変化を解析する。

本研究により明らかとなる未分化及び細胞系譜特異的 epigenetic code は、細胞が持つ記憶 (memory) と反応能 (competency) を規定するものであり、細胞の状態を表す指標としてこれまで用いられてきた遺伝子発現 profile に代って用いられることが期待される。

3. 研究の方法

多細胞生物は、その発生過程で一つの多能性細胞である受精卵が無数の異なった細胞集団を生み出していく。その過程で細胞の分化能力 (competency) は徐々に制限されていき、最終的に細胞は不可逆的に運命が決定される (図 1)。この過程では、エピジェネティックな制御が重要な役割を果たしていると考えられる。我々はエピジェネティック制御の詳細な解析を実施するため、発生過程における特定の細胞系譜に焦点を絞り、それらの細胞や組織から包括的なエピゲノム情報を抽出する。細胞系譜特異的な epigenetic code が成立するために必須な cis 領域を同定するために、少なくとも 2 種類の近交系 (南北集団から各 1 系統、Hd-rR と HNI) について同様の解析を行い、DNA 配列と epigenetic code の情報を比較する。また適宜、マウスとヒトの ES 細胞のデータとも比較する。epigenetic code の変化と関連付けられた cis 領域の機能を、トランスジェニック (Tg) 系を作製し in vivo でその影響を解析する。メダカという実験系の利点を活かし、サンプルとなる細胞の収集および機能解析を in vivo で行う。1 回の ChIP 解析では 10^6 程度の細胞を出発材料とし、DNA メチル化、DNA ヒドロキシメチル化及びヒストン修飾 (H3K4me2, H3K27me3, H3K9me3) を調べる。

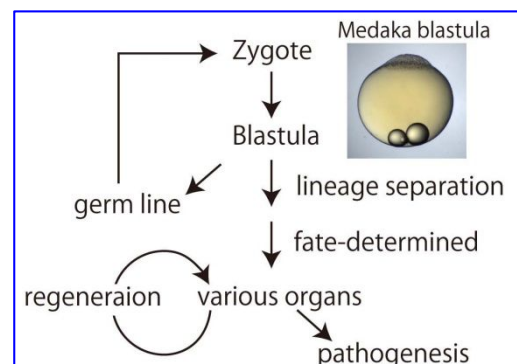


図1. 動物の発生と様々な系譜への分化
細胞の多能性は胞胚期まで維持されるが、その後徐々に制限されていき、最終的に器官において不可逆的に分化する。

4. 研究成果

(1) 未分化ステージにおける epigenetic code

ES 細胞と同様に未分化で多分化能を有する胞胚期 (2000-4000 細胞期) では発生重要遺伝子 (selector 遺伝子など) のほとんど (250 個程度) が、発現する前にもかかわらず DNA の低メチル化と抑制的 (H3K27me3) および促進的 (H3K4me2) の両方のヒストン修飾を受けている (以下、bivalent な状態) ことが明らかとなった (図 2)。

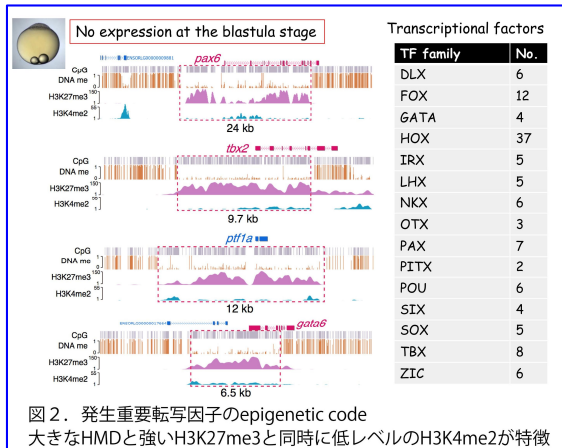


図 2. 発生重要転写因子の epigenetic code
大きな HMD と強い H3K27me3 と同時に低レベルの H3K4me2 が特徴

その生物学的意味は以下のように解釈される。まず DNA メチル化は一般的には転写に対して抑制的であると考えられていたが、H3K27me3 で制御される発生関連遺伝子においてはその低メチル化領域が広がるほど H3K27me3 レベルが上がり、遺伝子発現は強く抑制されていることが明らかとなった。H3K27me3 を修飾するポリコム遺伝子群は CpG アイランドに結合するが、DNA メチル化はその結合を阻害することがあるので、本研究の結果と合わせると、large K27HMD においては低メチル化状態の CpG が大量に存在することでポリコム遺伝子群の結合が増え、H3K27me3 レベルが高くなっていることが示唆された。これによって未分化細胞では、発生に重要な転写因子の発現が強力に抑制されることで分化が抑えられていることが示唆される。逆に、成熟した組織では K27HMD のサイズが縮小することでそれらの転写因子の発現を維持している可能性が考えられる。一方、これらの遺伝子が発生過程で発現を開始し、その発現が維持される場合には、低メチル化領域の縮小 (non-promoter 領域の DNA メチル化亢進) が起きることも判明した。従って、DNA メチル化は発生初期での転写抑制と発生後期の転写維持に深くかかわっていることが判明した (図 3)。これらの研究成果は発表済みである (Nakamura et al., 2014)。

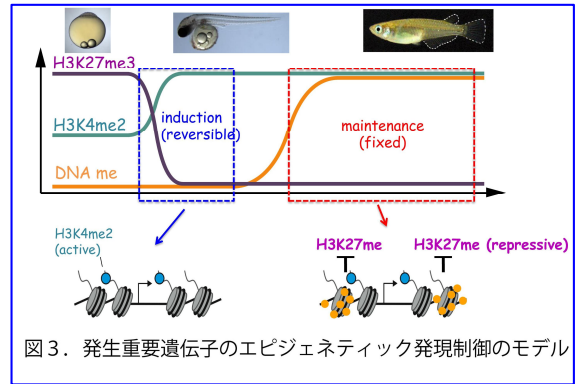


図 3. 発生重要遺伝子のエピジェネティック発現制御のモデル

機械学習アルゴリズム (Support Vector Machine) を用いてメダカ胞胚期における Epigenetic code を DNA 配列から推定した。その結果、DNA 低メチル化領域内部における 5 種類のヒストン修飾状態 (H3K27me3、H3K27ac、H3K4me1、H3K4me2、H3K4me3) を DNA 配列のみから高い精度で識別できることが明らかになり (図 4)、それぞれの修飾状態の確立に重要な DNA 配列の候補を同定した。この解析の論文は投稿準備中である。

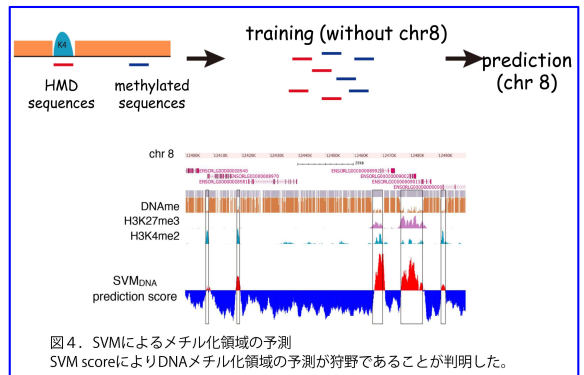


図 4. SVM によるメチル化領域の予測
SVM score により DNA メチル化領域の予測が狩野であることが判明した。

(2) DNA 低メチル化領域の成立機構

異なる 2 種に分類されるメダカ近交系 Hd-rR、HNI 間でのゲノム配列、エピゲノム情報の比較解析から、胞胚期ゲノムにおける DNA 低メチル化ドメイン (HMD) の規定に関わる DNA 配列を探索した。

2 種のメダカ胞胚期における HMD を他方の種のゲノムへとマッピングし、メチル化パターンを比較することにより、マップされた HMD のうち 90% 以上が 2 種間で共通して見られること、これらの種間で共通している HMD の大部分がプロモーター領域に存在する一方で、種特異的な HMD の大部分はプロモーター以外の領域に存在することを明らかにした (図 5)。

また、RNA-seq の解析により、プロモーターに存在する種特異的 HMD が種特異的な遺伝子発現に影響していることを示した。さらに、2 種間のゲノム配列の差異を見てみると、種間で共通の HMD では、メチル化領域とほぼ変わらないレベルで配列の差異が見られたが、特定の DNA 配列が保存されており、

また高頻度に HMD 内に存在していた (図 6)。これらの配列の一部は転写因子の結合配列と類似していた (Uno et al., Zoological Science, 2016)。

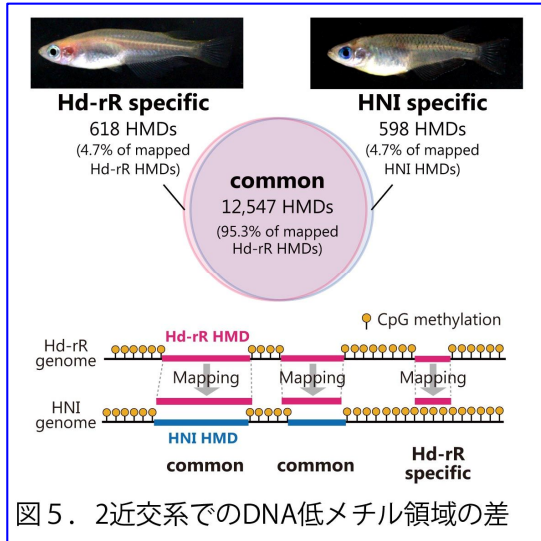


図 5. 2近交系でのDNA低メチル領域の差

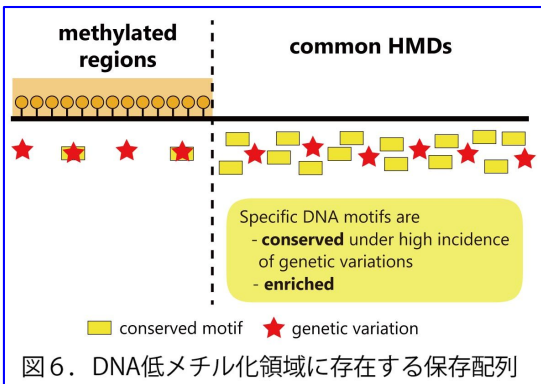


図 6. DNA低メチル化領域に存在する保存配列

さらに保存された塩基配列の変異がメチル化パターンの違いに寄与するかどうかを検証するため、一方の系統のゲノム配列をもう一方の系統に導入したトランスジェニックメダカ、内在配列を人工的に変えたメダカを作製した。その結果、意外なことに、どのような配列を導入しても外来配列はメチル化されず、DNAメチル化は塩基配列に依存していないことが示唆された。この結果は、DNAメチル化は近傍のDNA配列が規定しているという従来のモデルに反する結果である。しかし、これまでの知見の多くは培養細胞を用いた研究から得られたものであり、今回の結果は生体内では状況が異なることを示唆している。今後はメダカトランスジェニック系統をさらに継続して解析することでDNAメチル化パターンの確立メカニズムの解明を進める予定である。

(3) 成体器官分化に伴うエピジェネティック修飾の変化を解析する実験系の立ち上げ
消化管の領域化の確立および維持機構を解析するために、予定膵臓領域、内分泌腺、外分泌線で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック (Tg) メダカ系統を作成した

(膵臓領域、内分泌腺: *pdx1* プロモーター-GFP、外分泌線: *ptf1a* プロモーター-DsRed cDNA)。このTg魚では内分泌腺、外分泌線の発生がリアルタイムで観察できる系が確立された (図 7) (Otsuka et al., 2015)。

さらに、膵臓の細胞の再生過程のエピジェネティック修飾変化を調べるために、Nitroreductase (NTR)/Metronidazole (Mtz) システムを応用したTgを完成させた。このTgでは、インシュリンプロモーターの下流にEGFP-NTRを挿入して、細胞をGFPで可視化すると同時に、Mtz処理により、NTRを発現する細胞のみを除去 (NTRにより細胞毒性を有するMtz代謝産物が生成される) することができる。この魚を用いて、細胞除去後の回復過程を観察した。その結果、メダカの細胞の回復は除去後速やかに起こること、さらに除去処理を行った個体では細胞の数が逆に増加することを見出した (図 8) (Otsuka and Takeda, 2017)。

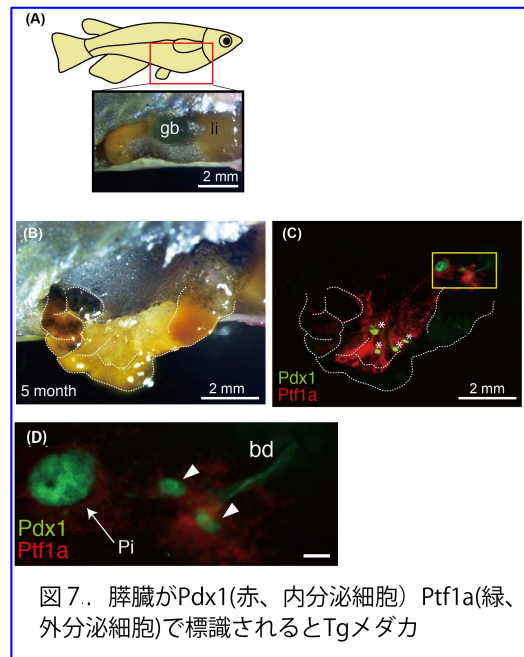


図 7. 膵臓がPdx1(赤、内分泌細胞) Ptf1a(緑、外分泌細胞)で標識されるとTgメダカ

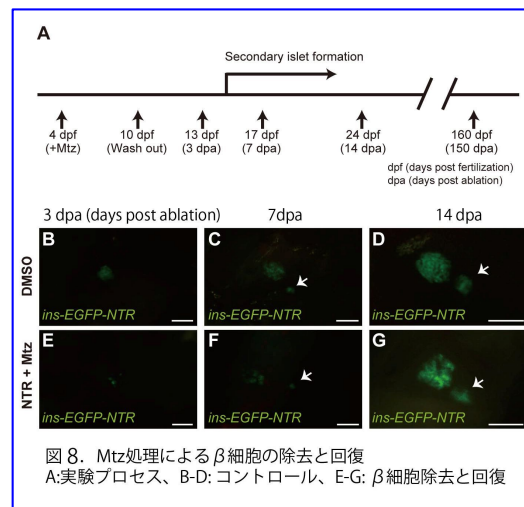


図 8. Mtz処理によるβ細胞の除去と回復
A:実験プロセス、B-D:コントロール、E-G:β細胞除去と回復

今後は FACS ソートの技術を適応して、膵臓の発生および細胞の再生過程のエピジェネティック修飾変化を詳細に解析する予定である。

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4件)

Otsuka T & Takeda H, Targeted ablation of pancreatic cells in medaka, *Zoological Science*, 査読有, in press(2017)

Uno A, Nakamura R, Tsukahara T, Qu W, Sugano S, Suzuki Y, Morishita S & Takeda H, Comparative analysis of genome and epigenome in the closely related medaka species identifies conserved sequence preferences for DNA hypomethylated domains, *Zoological Science*, 査読有, 33(4), 358-365 (2016) DOI: 10.2108/zs160030

Otsuka T, Tsukahara T, & Takeda H, Development of the pancreas in medaka, *Oryzias latipes*, from embryo to adult, *Development, Growth & Differentiation*, 査読有, 57(8), 557-69 (2015) DOI: 10.1111/dgd.12237

Nakamura R, Tsukahara T, Qu W, Ichikawa K, Otsuka T, Ogoshi K, Saito TL, Matsushima K, Sugano S, Hashimoto S, Suzuki Y, Morishita S & Takeda H, Large hypomethylated domains serve as strong repressive machinery for key developmental genes in vertebrates, *Development*, 査読有, 141, 2568-2580 (2014) DOI:10.1242/dev.108548

[学会発表](計11件)

Takeda H, Deciphering the genetic code for the vertebrate pluripotent epigenome: Insights from the medaka genome, 3rd Medaka Strategic Meeting and 17th Australia & New Zealand Zebrafish Meeting, February 3, 2016, Flinders(Australia)

Takeda H, Sequence-based logic for the vertebrate pluripotent epigenome, 4th International Symposium of the mathematics on Chromatin Live dynamics, 2015年12月7日, JMS アステールプラザ(広島県広島市), 招待講演

Nakamura R, Deciphering the genetic code for the vertebrate pluripotent epigenome, *BMB2015*, 2015年12月1日, 神

戸国際会議場(兵庫県神戸市)

大塚堯慶、塚原達也、武田洋幸 メダカ *Oryzias latipes* における膵臓 beta 細胞の再生過程の解析, 日本動物学会第 86 回大会, 2015年9月17日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

Takeda H, Genomics and epigenomics in fish genomes, The 7th International Symposium of Integrative, August 25, 2015, Xi'an(China)

Takeda H, Prepatterning of Developmental Gene Expression in Vertebrates - interplay between genetic and epigenetic mechanisms, UT - NTU Joint Symposium - Frontier of Biological Sciences, March 9, 2015, Taipei(Taiwan)

Takeda H, Logic of the epigenetic code in the vertebrate genome, Finnish-Japanese joint symposium on Morphogenesis and Signaling, March 4, 2015, Helsinki(Finland)

Nakamura R, Role of large hypomethylated domains in epigenetic regulation of key developmental genes, JSPS - Bilateral Seminar Program "Genomic and epigenomic insights into vertebrate regeneration, development and evolution - Xenopus and fish as models, November 4, 2014, Santiago(Chile)

Takeda H, Epigenetic regulation of key developmental genes - A genome-wide approach in the medaka genome, 2nd Strategical Meeting for Medaka Research, Casa de la Ciencia, April 11, 2014, Seville(Spain)

Takeda H, Epigenetic regulation of key developmental genes in the medaka genome: Large DNA hypomethylated domains as a robust repression platform in pluripotent cells, 6th Asia Oceania Zebrafish Meeting, January 21, 2014, Hong Kong(China)

Takeda H, Epigenetic Regulation of Key Developmental genes: A Genome-wide approach in the medaka genome, 7th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, June 15, 2013, Hong Kong(China)

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/h>

assei/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武田 洋幸 (Takeda, Hiroyuki)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：80179647