

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290063

研究課題名(和文) 全ての転写産物を網羅したゲノム刷り込み領域の多元的解析

研究課題名(英文) Analysis of the imprinted regions based on the entire transcriptome

研究代表者

清澤 秀孔 (KIYOSAWA, Hidenori)

高知大学・医学部・特任准教授

研究者番号：30295422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本申請では神経細胞特異的に刷り込みを受けるゲノム領域の特定を試みるため、in vitroでマウスES細胞を神経細胞へ分化させ、その過程でのRNA-seqによるトランスクリプトーム解析を行い、非コードRNAを含め新規のゲノム刷り込みされた転写産物を同定した。同時にiPS細胞でも同様の実験を行い、パイロット的に小規模のRNA-seqを行いES細胞のデータとの相違点を同定した。H3K36 トリメチルマークのChIP-seqとTSS-seqとの結果とも合わせ、長鎖非コードRNA転写領域の転写の様相を解析した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to identify novel neuron-specific imprinted region with the samples utilizing in vitro neuronal differentiation system and RNA-seq. We performed transcriptome analysis with those data, and identified novel imprinted regions, including the regions producing non-coding RNAs. We also performed a similar analysis with iPS cells, and identified difference from the ES cell data. We obtained the ChIP-seq data with H3K36 and TSS-seq data, and analyzed the transcriptional landscape of long non-coding RNAs.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ゲノム刷り込み トランスクリプトーム エピジェネティクス 幹細胞 神経分化

1. 研究開始当初の背景

ゲノム刷り込みは哺乳動物特有の生命現象であると考えられており、母親由来もしくは父親由来のうち、どちらか片方の対立遺伝子（アレル）しか発現が見られない現象である。植物においても将来個体発生を助ける胚乳組織において、片親由来のアレルのみが発現する現象が知られているが、個体自身において片親アレルのみの発現が知られているのは哺乳動物のみである。

遺伝子によっては母親由来もしくは父親由来のアレルしか発現しないため、このことが哺乳動物では単為発生が不可能な原因であるとされており、おおよそ 100-150 個程度のゲノム刷り込み遺伝子が同定されている。1980 年代にゲノム刷り込みが発見されて以来、ゲノム刷り込み遺伝子は個々の遺伝子ごとに発見されてきたが、2000 年以降のポストゲノム時代になるとマイクロアレイを利用した網羅的な解析も試みられた。

研究開始当初までには次世代シーケンサーを利用した網羅的解析もいくつか行われていた。Gregg らはマウス胎児脳において約 1,300 個のゲノム刷り込み遺伝子を同定し (Science 329, 643, 2010)、Goncalves らはマウス肝臓において約 500 個のゲノム刷り込み遺伝子を同定した (Genome Res. 22, 2376, 2012)。しかしながら DeVeale らは Gregg らの解析には欠陥があり、再解析の結果、100 個程度が妥当であるとの結果を得ている (PLoS Genet. 8, e1002600, 2012)。

これらの解析は母親と父親由来の DNA 配列を区別する為、実験室マウスの標準的近交系 C57BL/6 (以降、B6) と CAST/Ei (CAST) を交配した F1 マウスを用い、B6 と CAST 間の DNA 多型情報を用いて遺伝子の発現解析を行っている。

当時までのゲノム刷り込み遺伝子の次世代シーケンサーによる主な網羅的解析は上記に挙げたもののみであるが、いくつかの共通する短所がある。

- (1) RNA の発現解析において鎖特異性が無い。
- (2) ポリ A 鎖のある RNA のみを対象としている。
- (3) 特定の時期の個体組織におけるゲノム刷り込みを見ているため、組織特異的なゲノム刷り込みなどがある場合、そのダイナミックな動態がわからない。

特に脳では脳特異的なゲノム刷り込みが報告されており、時系列な解析が望まれている。

申請者は 2000 年以降、特に遺伝子のアンチセンス転写及び非コード RNA (タンパク質

をコードしない RNA) の研究を行ってきており、申請時時点において上記 3 点の欠点を補った次世代シーケンサーのデータを既に所有していた。我々は CAST より更に多くのゲノム DNA 多型を有する日本産野生マウス由来 MSM/Ms (以降、MSM) と B6 間の F1 個体由来の ES 細胞を樹立し、in vitro で神経細胞へ分化させることにより、神経細胞特異的なゲノム刷り込み領域の同定を試みていた。

これら手持ちのデータ解析から出発し、ヒストン修飾などのエピジェネティックなマークにも注目しつつ、全ての転写産物を対象とした解析を目指した。

2. 研究の目的

本申請では独自に樹立した遺伝的多型を有する ES・iPS 細胞を in vitro で神経細胞へ分化させる系を用いて、時系列かつダイナミックに神経特異的なゲノム刷り込みを受けるゲノム領域の特定を行う。アンチセンス RNA が組織特異的なゲノム刷り込みに関与している例も知られているが、全転写産物を解析対象とした事例はないため、アンチセンス RNA・ポリ A 鎖を欠く RNA を考慮した包括的なトランスクリプトーム解析を行う。更にエピゲノム情報との相関も解析する。また ES 細胞と iPS 細胞の多分化能の同等性を非コード RNA を含めたトランスクリプトームレベルで検証する。

3. 研究の方法

我々が既に所有している次世代シーケンサー (RNA-seq) データのインフォマティクス解析から始めた。所有しているのは ES 細胞から成熟した神経細胞へ in vitro において分化させた 4 タイムポイントの RNA-seq データである。ES 細胞の種類は MSM (母親) と B6 (父親) の F1 胚盤胞から作製した亜種間雑種 ES 細胞 (MB-ES 細胞) と、母親と父親の組み合わせを逆にした亜種間雑種 ES 細胞 (BM-ES 細胞) の 2 種類である。まず、リファレンスデータとして MB 成体個体脳および BM 成体個体脳における RNA-seq データを入手した。全ての配列は鎖特異的 (strand-specific)、ポリ A 鎖を有する RNA のみを対象としたデータとポリ A 鎖を有しない全 RNA を対象としたデータの両方とした。

MSM の全ゲノムデータは公開されており B6 と MSM 間の DNA 配列多型情報を利用し、RNA-seq 配列データをゲノム上にマップし MSM と B6 の染色体の由来を区別した発現解析を行った。特にポリ A 鎖の無いアンチセンス RNA に注目し、組織特異的なゲノム刷り込みが確立されるに従って変動するゲノム発現領域を同定した。

長鎖非コード RNA のより正確な転写単位同定

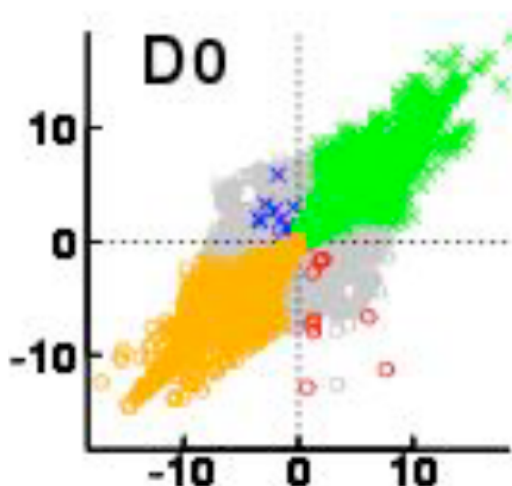
を試みるため、H3K36me3 の ChIP-seq 及び、転写開始点解析 (TSS-seq) を次世代シーケンサーにて行った。

ChIP 及び TSS 解析を既に所有する RNA-seq データを合わせて解析することにより、神経細胞分化に伴うエピジェネティックなマークの動態を解析すると共に、特に神経細胞特異的なゲノム刷り込み現象に伴い変化するエピゲノム解析を行った。

F1 個体胎児由来の MEF (mouse embryonic fibroblast) 細胞由来の iPS 細胞を作製し、神経細胞の分化マーカーをもとに、iPS 細胞が ES 細胞と同等に神経細胞へ分化させることが出来たことを確認した後、分化のタイムポイントをサンプリングし、RNA-seq を行い、ES 細胞のデータと比較検討した。

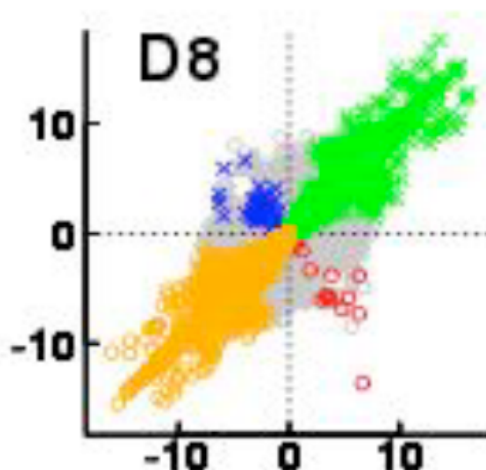
4. 研究成果

1. MB-ES 細胞、BM-ES 細胞の *in vitro* 神経分化系、及び、成体脳リファレンスサンプルでの RNA-seq データに基づき、各ポイントでのモノアレル発現の解析を行い、グラフ化した。



縦軸がマップされたリード数 (B6 of MB/MSM of MB) $[\log_2]$ 、横軸がマップされたリード数 (B6 of BM/MSM of BM) $[\log_2]$ であり、上図はポリ A 鎖を有する RNA を対象とした ES 細胞のサンプルである。赤色が主に母親由来の染色体から発現している遺伝子、青色が主に父親由来の染色体から発現している遺伝子となる。また、黄色が MSM 特異的に発現している遺伝子、緑色が B6 特異的に発現している遺伝子となる。図でもわかるようにいわゆるゲノム刷り込み遺伝子 (親の染色体由来によるモノアレル発現) よりも近交系特異的に発現するモノアレル発現の方が格段と多い。

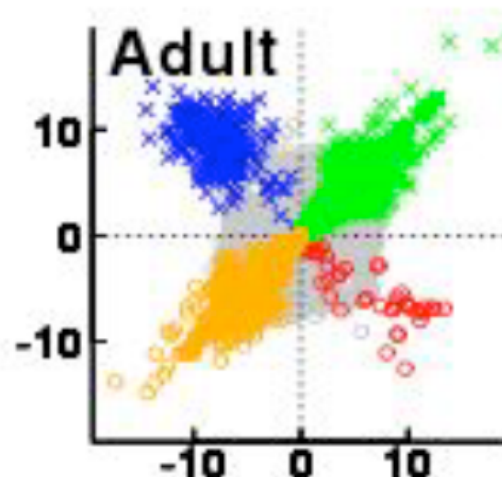
次の図は、*in vitro* 分化系で作製した神経細胞のサンプルでの同様の解析図である。



ゲノム刷り込みタイプのモノアレル発現を示す遺伝子数が増えており、分化に従って増えていくことが示された。

全 RNA を対象としても同傾向が見られた。

次の図は全 RNA を対象とした時の成体脳サンプルでの解析図である。



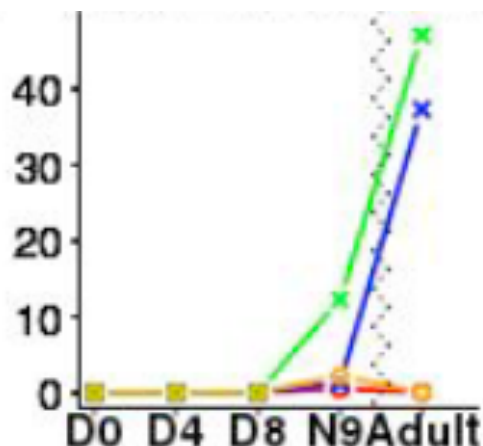
ポリ A 鎖を有する RNA の解析と比べて父親由来発現のゲノム刷り込み遺伝子が多いように見えるが、その多くは Ube3a 遺伝子座のアンチセンス RNA に由来するもので、Ube3a 遺伝子座が特異的な遺伝子座である様子が示された。

2. Ube3a 遺伝子座に関する解析

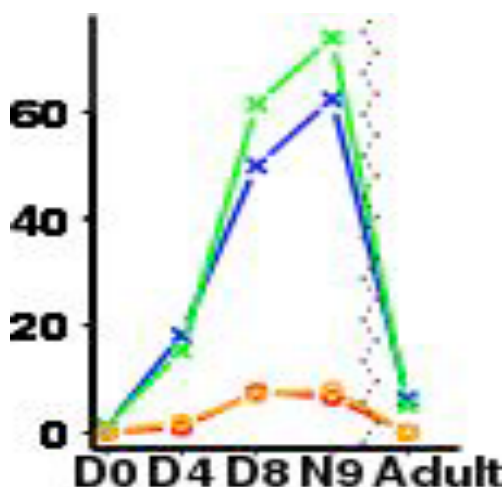
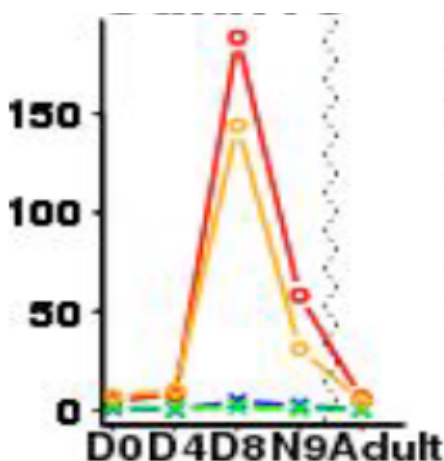
神経細胞へ分化に従って、アンチセンス RNA の転写が急速に高まる様子が定量的に示された。

次の図は、縦軸が発現度 (FPKM: Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments)、横軸が分化のタイムポイントである。D0 が分化前の ES 細胞、D8 が神経幹細胞、N9 が神経突起を伸ばした神経細胞 (D17

に相当)、Adult はリファレンスの成体脳である。赤色：BM の B6 アレル発現 (B6-BM と表記、以下同様)、青色：MSM-BM、緑色：B6-MB、黄色：MSM-MB である。



3. 分化の過程でモノアレル発現の変動する様子がうかがえた。以下、その例を示す。軸及び折れ線グラフの色は前出の図と同様である。(遺伝子名は不記載)



4. iPS 細胞 (MB-iPS、BM-iPS) を in vitro で神経へ分化させ、パイロット的に RNA-seq を行い、ES 細胞を用いたデータと比較をした

ところ、神経分化のマーカーの発現には主な違いがないが、ゲノム刷り込み状態には変化が見られる遺伝子座が存在することがわかった。現在、詳細を解析中である。

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 1 件)

1. Eitoku M, Suganuma N, and Kiyosawa H: Comparison of two types of non-adherent plate for neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cytotechnology*, **68**, 2761-2768, 2016. (査読あり)
DOI: 10.1007/s10616-016-9968-z

[学会発表] (計 6 件)

1. 栄徳勝光、近藤伸二、鈴木穰、高田豊行、加藤英政、城石俊彦、菅沼成文、清澤秀孔：デフォルト神経分化過程での亜種特異的モノアレル発現、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2016 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日。
2. Eitoku M, Kondo S, Suzuki Y, Takada T, Kato H, Shiroishi T, Suganuma N, Kiyosawa H: Subspecies-specific monoallelic expression during neural differentiation, The 21st Annual Meeting of The RNA Society, The International Conference Center (Kyoto, Japan), June 28 - July 2, 2016. (国際学会)
3. 近藤伸二、加藤英政、鈴木穰、高田豊行、城石俊彦、菅沼成文、清澤秀孔：10 週間に亘るマウス胚幹 (ES) 細胞の神経分化過程における F1 ハイブリッドマウス対 4 アレルのゲノム上のポリ A 鎖付加を伴う且つ伴わない転写活動の動的変化の比較解析、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)、2015 年 12 月 1-4 日。
4. 栄徳勝光、近藤伸二、鈴木穰、高田豊

行、加藤英政、城石俊彦、菅沼成文、清澤秀孔：デフォルト神経分化による神経特異的ゲノム刷り込み領域における縦断的エピジェネティック解析、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）、2015 年 12 月 1-4 日.

5. 近藤伸二、加藤英政、鈴木穰、高田豊行、城石俊彦、菅沼成文、清澤秀孔：in vitro 神経細胞分化系を用いた網羅的な組織特異的ゲノム刷り込み領域の解析、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）、2014 年 11 月 25-27 日.
6. 近藤伸二、加藤英政、鈴木穰、高田豊行、城石俊彦、菅沼成文、清澤秀孔：亜種間雑種 ES 細胞を用いた組織特異的ゲノム刷り込み解析、第 16 回日本 RNA 学会年会、ウインクあいち（愛知県名古屋市）、2014 年 7 月 23-25 日.

[図書] (計 1 件)

1. Eitoku M and Kiyosawa H: Genomic imprinting and the brain: neuron-specific switching of gene expression at imprinting regions, in “Advances in Genetics Research. Volume 15” (Urbano KV ed.), pp. 127-150, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清澤 秀孔 (KIYOSAWA, Hidenori)
高知大学・医学部・特任准教授
研究者番号：30295422

(2) 研究分担者

近藤 伸二 (KONDO, Shinji)
大学共同利用機関法人情報・システム研究機構・大学共同利用機関等の部局等・特任准教授
研究者番号：30415161

(3) 研究分担者

加藤 英政 (KATO, Hidemasa)
愛媛大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50292123

(4) 研究分担者

栄徳 勝光 (EITOKU, Masamitsu)
高知大学・教育研究部医療学系連携医学部門・助教
研究者番号：50552733