

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650008

研究課題名(和文) 分化転換を支えるエピジェネティクスの全ゲノム包括的解析

研究課題名(英文) Whole genome epigenetic analysis during transdifferentiation

研究代表者

牧 信安(Maki, Nobuyasu)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：90342849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：一般的に終末分化した細胞は他の細胞種に変化しないと考えられているが、限られた細胞種で分化転換と呼ばれる現象が起こる。ニワトリ胚網膜色素上皮細胞(RPE)は、脱分化を経てレンズ細胞へと分化転換する。本研究では、RPEの脱分化におけるエピジェネティクスをゲノム包括的に解析した。その結果、脱分化の過程で1) 転写に関わるヒストンH3K4me3が極めてダイナミックに変化すること、2) 各エピジェネティクス修飾の増減は非選択的というより、遺伝子選択的に行われること、そして3) 各修飾の変化は連関していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In general it is thought that terminally differentiated cells never change into other type of cells. However, in some species cellular transdifferentiation occur. In retinal pigmented epithelial cells (RPE) in chick embryos undergo dedifferentiation and then transdifferentiate into lens cells. In this study epigenetics change during dedifferentiation of RPE was analyzed and the following characteristic features are revealed, 1) dynamic change of histone H3K3me3, 2) regulation of epigenetic mark is gene-selective rather than non-selective, and 3) the changes of each epigenetic marks are correlated.

研究分野：再生・発生

キーワード：脱分化 分化転換 胚網膜色素上皮細胞 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

iPS 因子の遺伝子導入や卵母細胞への核移植で体細胞核がリプログラミングされる。これらの人為的リプログラミングに対して、脱分化・分化転換という生命現象としての体細胞核リプログラミングが存在する。例えば、イモリの再生過程で、虹彩色素上皮細胞(PEC)が分化細胞としての形質を失い脱分化細胞と呼ばれる細胞に変化し、脱分化細胞はレンズ細胞へと分化(転換)する。我々はイモリのレンズ再生における脱分化・分化転換研究をモデル系として研究を行ってきた (Maki\* and Kimura, *Curr Top Microbiol Immuno*, 2013)。これまでに分化転換過程における、1) ダイナミックなコアヒストンの修飾変動 (Maki et al., *Mol Vis*, 2010)、2) 卵母細胞型リンカーヒストン B4 の発現 (Maki\* et al., *FASEB J*, 2010)、3) iPS 因子 (Sox2, cMyc, Klf4) の発現 (Maki et al., *Dev Dyn*, 2009) を明らかにし、分化転換の過程で核移植や iPS と共通した分子制御が存在することを示してきた。世界的にも脱分化・分化転換におけるエピジェネティクスをゲノムワイドに解析した例はない。この解明により新規な視点で体細胞リプログラミングの実体が明らかになると期待された。この解明により基礎生物学のみならず応用生物学においても重要な知見をもたらされらると思われた。しかし、イモリのゲノム配列が解読されていないため、ゲノム包括的なエピジェネティック解析が不可能であった。

## 2. 研究の目的

脱分化・分化転換におけるエピジェネティクスを解明するためにニワトリ胚網膜色素上皮細胞 (RPE) に着目した。ニワトリ胚 RPE は、培養条件下で脱分化し、レンズ様体へ分化転換する。また、すでにニワトリのゲノム配列は解読されている。この系を用いて分化転換を支えるエピジェネティクスをゲノム包括的に解析し、脱分化・分化転換におけるエピジェネティクス制御の特徴を明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) RPE 細胞の単離

ニワトリ 8 日令胚の眼球から RPE-脈絡膜複合体を摘出した。この複合体に対して EDTA 処理を行い、RPE シートを回収した。得られた RPE シートに対してトリプシン処理を行い、解離 RPE 細胞を得た。

### (2) 脱分化細胞の誘導

RPE 細胞をヒアルロニダーゼとフェニルチオウレアを含む EFPH 培地で培養することにより、脱分化を誘導した。EFPH 培地で 2

代培養し、透明化した脱分化細胞細胞を回収した。

### (3) ChIP seq

RPE および脱分化細胞に対するクロマチン免疫沈降 (ChIP) は、ヌクレオソームの固定を行わない Native ChIP 法によって行った。細胞分取後、速やかに核分核を調整した。核分核に対して MNase および塩処理を行い、ヌクレオソーム分画を得た。得られたヌクレオソーム分画に対して免疫沈降を行った。免疫沈降には ヒストン H3K4me3 抗体、H3K9me2 抗体、H3K9me3 抗体、および H3K27me3 抗体を用いた。免疫沈降分画から DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、シーケンスを行った。

### (4) コンピュータ解析

得られたシーケンスデータをニワトリゲノムに対してマッピングし、各修飾パターンを視覚化した。細胞特異的な修飾領域を明らかにするために、細胞間で修飾領域の比較を行った。そして、ゲノムアノテーションデータから細胞特異的に修飾されている遺伝子を特定した。

## 4. 研究成果

RPE のレンズ分化転換は脱分化とそれに続くレンズ分化の 2 段階に分けられる。当初の計画では、脱分化とレンズ分化の両過程を解析する計画であったが、細胞取得が予想以上に難航したため、より重要なステップと考えられる脱分化に集中して解析を行った (Fig. 1)。

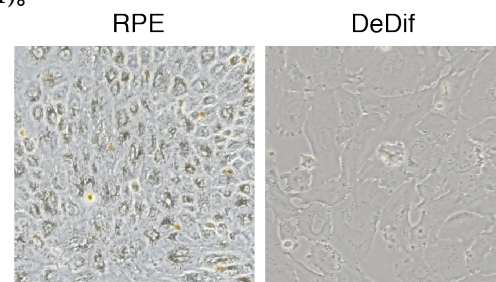


Fig.1. RPE の脱分化. EFPH 培地で約 2 週間培養した。

脱分化の過程で、転写活性化に関与するヒストン H3K4me3 が極めてダイナミックに変化し (Fig. 2)、H3K4me3 が消失する領域 (例: TFEC) や増加する領域 (例: glioma pathogenesis-related protein1) が共に認められた。また、H3K4me3 の減少がヘテロクロマチン形成に関わる H3K27me3 の増加と連関する領域 (Fig. 3, 例: SOCS2, negatively regulate cytokine receptor signaling)、さらに H3K4me3 の減少が H3K9me3 の増加と連関する領域 (例: IRF5) が認められた。逆に H3K4me3 の増加がそれ

ぞれ H3K27me3(Fig. 4)や H3K9me3 の減少と相関する領域も認められた。以上から脱分化の過程で 1) H3K4me3 がダイナミックに変化すること、2) 各エピジェネティクス修飾のリクルートは非選択的というより、むしろ選択的に行われること、そして 3) 各修飾の変化は連関していることが明らかになった。

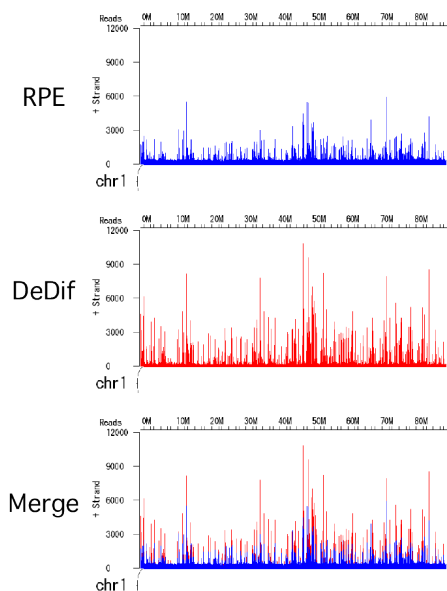


Fig. 2. RPE 脱分化前後における H3K4me3 の変化。RPE, 網膜色素上皮細胞, DeDif, 脱分化細胞  
B) 脱分化細胞, 青, RPE; 赤, 脱分化細胞。

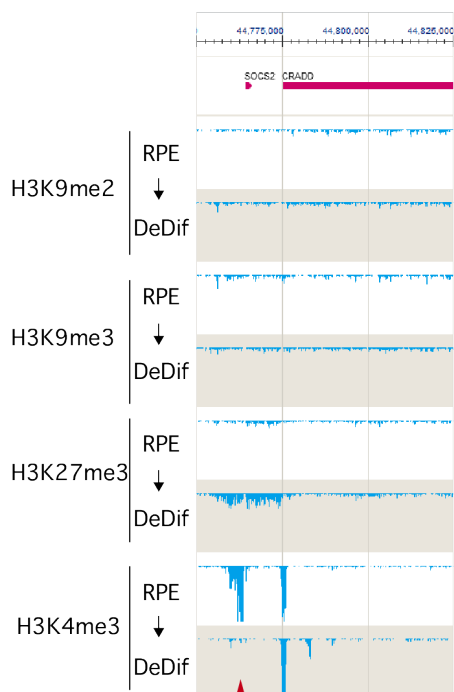


Fig. 3. RPE の脱分化における H3K4me3 の減少(矢尻)。H3K4me3 の減少が H3K27me3 の消長と逆相関の関係にある例を示した。RPE, 網膜色素上皮細胞; DeDif, 脱分化細胞

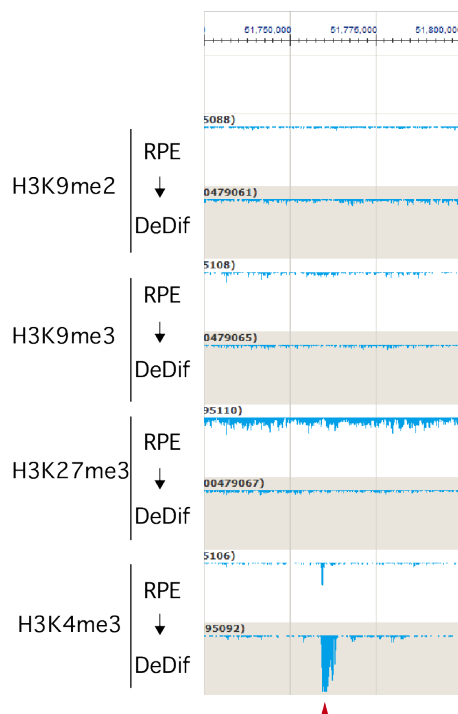


Fig. 4. RPE の脱分化における H3K4me3 の増加(矢尻)。H3K4me3 の増加が H3K27me3 の消長と逆相関の関係にある例を示した。RPE, 網膜色素上皮細胞; DeDif, 脱分化細胞

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

牧 信安、傷上皮が産生する四肢再生誘導因子の探索、日本動物学会、9月17日、2015年、新潟市

牧 信安、イモリの四肢再生過程で形成される傷上皮背腹接触域における遺伝子発現、日本発生生物学会、6月3日、2015年、つくば市

〔図書〕(計 1 件)

Maki, N\*, Newt lens transdifferentiation: From lentectomy to immuno-FISH: Methods Mol. Biol., 2015, 1290, 81-89.

〔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

牧 信安 (MAKI, Nobuyasu)  
大阪大学・蛋白質研究所・特任准教授  
研究者番号：90342849

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

深川 竜郎 (FUKAGAWA, Tatsuo) 大阪  
大学・生命機能研究科・教授  
研究者番号：60321600  
(平成 27 年度より連携研究者)

堀 哲也 (HORI, Tetsuya) 大阪大学・生命  
機能研究科・准教授  
研究者番号：70550078  
(平成 27 年度より連携研究者)