

幹細胞分化に伴ったクロマチン構造変化の解析

国立成育医療研究センター研究所

周産期病態研究部

富川 順子

【研究の背景および目的】

発生における細胞の分化過程では、幹細胞はより広い分化能を有しているのに対し、一旦分化を開始すると段階的に細胞は分化能を失っていく。そして、かわりにある一定の形質を獲得する。この不可逆的な過程には、遺伝子発現のオン/オフを基底状態で決定するエピジェネティック機構が寄与していると考えられる。私は、あらゆる細胞の運命決定に際して、ゲノムに集約された遺伝情報がどのように取舍選択され機能発現にいたるのか、その本質ともいえるエピジェネティクスに興味をもち、細胞種特異的な遺伝子発現制御機構の研究に取り組んできた (Tomikawa *et al.*, *J Biol Chem*, 2006; 2011)。個々の遺伝子が発現するには、DNA およびヒストンの修飾、プロモーター・エンハンサー領域でのクロマチン構造の開放、プロモーター・エンハンサー領域への転写因子の結合、転写開始それぞれにいたるステップを段階的に、また正確に経ることが必要である。ゲノム解析技術の急速な発展により、種々の転写因子の結合領域やクロマチン構造変換を司るヒストンの修飾状態などをゲノムワイドに解析することが可能となったものの、その結果得られた膨大な配列データから、実際にどのゲノム領域 (シスエレメント) がどの遺伝子を標的とし、どのようにして標的遺伝子のその転写を制御しているのか、その因果関係を見出すことは未だ難しい。ほ乳類細胞において、細胞の分化段階に同調して発現する遺伝子群はゲノム上に散在していることから、これらの遺伝子群を時期特異的に一括して発現調節する高次のクロマチン構造制御システムが細胞内に存在することは間違いない (Cremer, T. & Cremer, M., *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2010)。

私は、脳内の2つの神経核間でエストロゲン刺激に対して全く逆の発現動態を示す *Kiss1* 遺伝子周辺領域でのエピジェネティック修飾に伴うクロマチン構造変化を Chromosome Conformation Capture (3C) 法で解析することにより、両神経核間で *Kiss1* 遺伝子周辺領域では全く異なるクロマチン構造が形成されていることを見出した (Tomikawa *et al.*, *Proc Natl Acad USA*, 2012)。3C 解析法は、近年 Dekker らによって開発された、核内で3次元的に近接した領域を検出するクロマチン構造解析法の一つである (Dekker, J. *et al.*, *Science*, 2002)。エストロゲンによって *Kiss1* 発現が亢進する前腹側室周囲核については、さらに、エストロゲンによりプロモーター領域のヒストンアセチル化が誘起されるとともに、遺伝子下流域に存在するエンハンサー領域がプロモーターに接近作用するというクロマチン構造の変化を経て発現が誘起されることを *in vivo* レポーターアッセイにおいて示すことに成功した (Tomikawa *et al.*, *Proc Natl Acad USA*, 2012)。これらの結果は、核内において3次元的に近接している配列情報を網羅することが新たな機能的シスエレメントの同定に非常に有効な手段であることを示しているといえる。ゲノムプロジェクトの完遂により、ゲノム情報が十分に整備されつつある状況や上記の成果に基づき、本研究では、マウス初期発生過程において最初の分化ともいえる胚体、胚体外系列への幹細胞分化をモデルとし (図1)、3C法を用いていわゆる全能性の喪失に伴うクロマチン高次構造の変化をゲノムワイドに解析することにより、正常な発生に関わる新たな機能的ゲノム領域の同定、ひいては一群の遺伝子発現を集約して制御するクロマチン制御機構の解明を目的とした。

【方法】

本研究では、全能性細胞としてマウス2細胞期胚を、胚体系列細胞としてマウス ES 細胞を、胚体外系列細胞としてマウス TS 細胞をそれぞれ用いた。胚盤胞から樹立される ES、TS 細胞は、再生医療を目的とした場合にはその樹立面に倫理的問題を有するが、体外培養後も胚に戻し発生させることで、ES 細胞は生殖細胞を含む個体中の様々な組織に、TS 細胞は胎盤へと分化することが *in vivo* においても証明されており、正常な発生に伴うクロマチンレベルでの変化を解析するのに最も適したモデルと考えたからである。

3C 解析法には、特定領域、特定の転写因子結合領域を基点として近接領域を検出する方法 (3C, 4C, ChIA-PET など) に加え、ゲノム全体で近接している領域検出を可能とする Hi-C 法がある (Dekker, J. *et al.*, *Nat Rev Genet*, 2013)。2細胞期胚- ES- TS 間でどのような核内ゲノム構造の変化が起きてい

るのか、その全貌を明らかにするため、本研究では Hi-C 法によるゲノムワイドな解析法を選択し、まずはサンプル収集が容易な未分化 ES および未分化 TS 細胞から Illumina のプラットフォームに則したライブラリー作製、シーケンシングを行い配列データを得た。並行して、Hi-C により得られた配列情報よりなんらかの細胞種特異的な特徴を捉えるためのアプローチとして、ChIP-seq および FAIRE-seq (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) によるクロマチン構造の解析を行った。なお、すでに報告・登録のあるデータについては、公開データベースである ENCODE ならびに NCBI GEO より入手・引用した。

【これまでの研究成果】

全能性細胞モデルとなる 2 細胞期胚は目下サンプル採取の過程にあり、各解析に用いる細胞数の確保を急いでいる状況のため、残念ながら今回解析結果を示すことはできなかった。

マウス ES および TS 細胞から作製した Hi-C ライブラリーを読んで得られた配列情報から、両端がユニークにマウスゲノム上にマッピングされたものを近接領域情報として解析対象とした。これまでの報告 (Lieberman-Aiden, E. *et al.*, *Science*, 2009; Hwang, Y. C. *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 2013) を参考に各種フィルタリング工程を組込んだ解析パイプラインを試行しているものの、ChIP アッセイなどと異なる明確なコントロール設定の困難さなどから、より数学的視点からのアプローチの必要性を感じ、現在、九州大学医学研究院・エピジェネティクス分野・大川添行先生に共同研究者として参加を仰ぎ、情報解析をすすめている。

一方、並行して行っていた FAIRE-seq では、ES 細胞ではゲノム全体で 9,078 カ所、TS 細胞では 26,747 カ所の FAIRE 領域 (=オープンクロマチン領域) が検出された (図 2)。その比較から、胚体系列細胞 (ES) に比べ、胚体外系列細胞 (TS) では予想以上に多くの機能的ゲノム領域が獲得され、より複雑なクロマチン構造が形成されている可能性が示唆された。これは、オープンクロマチンを形成する領域の大幅な増加に加え、オープンクロマチン領域がいわゆる転写開始点近傍以外の非プロモーター領域に偏って分布していること、さらに FAIRE 領域を挟んで H3K4me1 の特徴的な二峰性ピークが観察されており (図 3)、遠位エンハンサーとして働く可能性を有していることからもうかがえる。今後、Hi-C による近接配列情報との擦り合わせにより、これらエンハンサーの特徴をもつ領域がどのように機能するのか、さらに明確な予測が可能になると期待される。

【考察・まとめ】

3C 解析法は、理論上、近接する任意の 2 点を検出しているに過ぎず、現在想定しているような複数の遺伝子座が近接した状態にある場合、確率的に常に同一の近接配列のみを検出できるわけではない。その点に関しては、より多くのサンプルを読むことである程度対応は可能であると考えられるが、3 次元的な情報をどのようにまとめていくかについて、その困難さは本研究開始時の私の想定を大きく上回る結果となった。近年、同様の研究プロジェクトの報告が増加してきた背景には、情報解析に関する大きな進展があることはまちがいない、本研究においても、大川先生をはじめ情報学の先生方のご支援を仰ぎ始めている。それにより今後は、現在律速となってしまっている Hi-C 解析を迅速に進め、その結果得られる細胞種 (分化段階) 特異的な遺伝子座近接部位とクロマチン構造変換との関わり、さらにはその生理的機能・意義を追求していきたいと考えている。

本研究において得られる知見は、単に特定の細胞系列分化という枠組みにとらわれず、生体内のあらゆる分化現象の理解に大きなインパクトを与えるものと考えている。今までにない、遺伝子座集積現象に着目したアプローチで、従来からの局所的な分化、細胞種特異的な遺伝子発現制御の理解にくわえて、一群の遺伝子発現を集約制御する分化現象の大局的な把握、理解につながるものと予想される。

一方で、胚体、胚体外組織を構築する両幹細胞の成立・維持に関わるゲノム領域の新たな抽出、同定も期待され、幹細胞間での分化転換能や可塑性についても分子レベルでの基礎となりうる研究成果は、臨床研究の面においても、幹細胞の DNA レベルでの特性評価手段を提供し、より安全で確実な再生医療に貢献しうるものと確信している。

【発表論文・参考文献】

本テーマに関する発表論文はなし

- Cremer, T, Zakhartchenko, V. Nuclear architecture in developmental biology and cell specialisation. *Reprod Fertil Dev* (2011) 23: 94-106.
- Tomikawa, J, Fukatsu, K, Tanaka, S, Shiota, K. DNA methylation-dependent epigenetic regulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene in trophoblast cell lineage. *J Biol Chem* (2006) 281: 12163-9.
- Tomikawa, J, Shimokawa, H, Uesaka, M, Yamamoto, N, Mori, Y, Tsukamura, H, Maeda, K, Imamura, T. Single-stranded noncoding RNAs mediate local epigenetic alterations at gene promoters in rat cell lines. *J Biol Chem* (2011) 286: 34788-99.

- Tomikawa, J, Uenoyama, Y, Ozawa, M, Fukanuma, T, Takase, K, Goto, T, Abe, H, Ieda, N, Minabe, S, Deura, C, Inoue, N, Sanbo, M, Tomita, K, Hirabayashi, M, Tanaka, S, Imamura, T, Okamura, H, Maeda, K, Tsukamura, H. Epigenetic regulation of *Kiss1* gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. Proc Natl Acad Sci U S A (2012) 109: E1294-301.
- Dekker, J, Rippe, K, Dekker, M, Kleckner, N. Capturing chromosome conformation. Science (2002) 295: 1306-11.
- Dekker, J, Marti-Renom, MA, Mirny, LA. Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. Nat Rev Genet (2013) 14: 390-403.
- Lieberman-Aiden, E, van Berkum, NL, Williams, L, Imakaev, M, Ragoczy, T, Telling, A, Amit, I, Lajoie, BR, Sabo, PJ, Dorschner, MO, Sandstrom, R, Bernstein, B, Bender, MA, Groudine, M, Gnirke, A, Stamatoyannopoulos, J, Mirny, LA, Lander, ES, Dekker, J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. Science (2009) 326: 289-93.
- Hwang, YC, Zheng, Q, Gregory, BD, Wang, LS. High-throughput identification of long-range regulatory elements and their target promoters in the human genome. Nucleic Acids Res (2013) 41: 4835-46.

【図表】

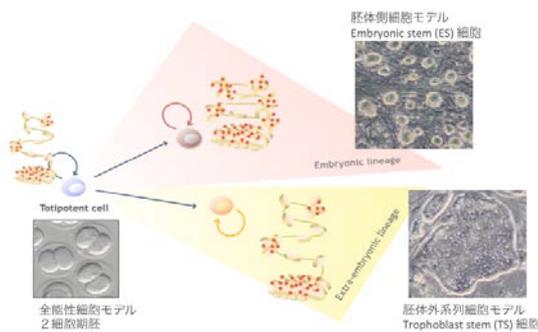


図1 マウス初期発生過程における胚体、胚体外系列への幹細胞分化

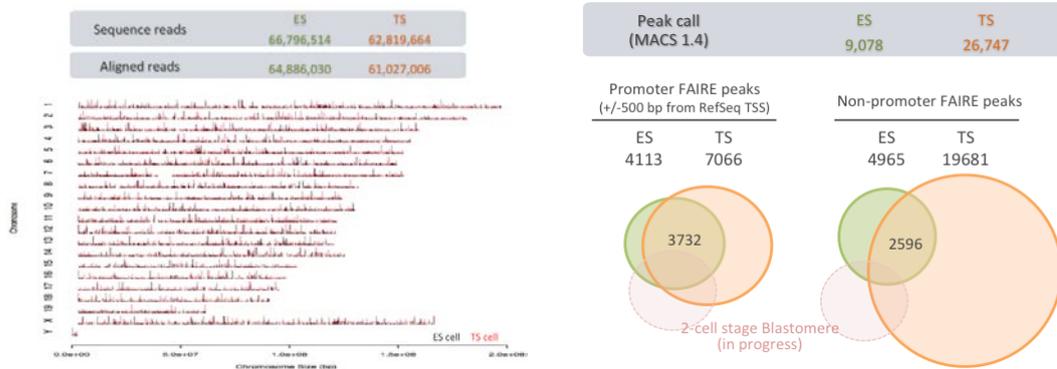


図2 ES-TS間でのFAIRE（オープンクロマチン）領域の分布比較

(左) 染色体ごとに得られたFAIREピークの分布状況 (右) プロモーター／非プロモーター領域での分布比較

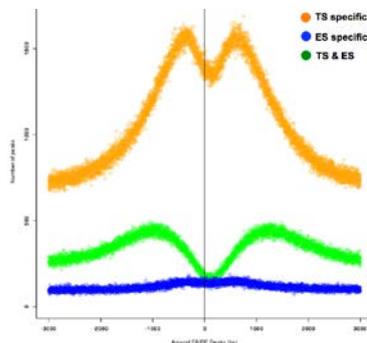


図3 ES-TS間でのFAIRE領域におけるH3K4me1修飾の変化
ES特異的領域 (青)、TS特異的領域 (黄)、ES-TS重複領域 (緑)