

研究報告書

「三胚葉分化直前の条件的ヘテロクロマチン形成の発生生物学的意義」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者： 平谷 伊智朗

1. 研究のねらい

条件的ヘテロクロマチンの代表例である哺乳類雌不活性 X 染色体はマウス三胚葉形成直前の時期に初めて観察され(=複製時期が S 期前半から S 期後半に変化)、以後全ての体細胞で安定的に維持される。最近私は、同じ時期に全ゲノム配列の 6%強に相当する多数の常染色体 EtoL 領域もヘテロクロマチン化され(EtoL 領域=複製時期が S 期前半から S 期後半に変化)、以後その状態が安定的に維持されることを見出した。これらの条件的ヘテロクロマチンは iPS 細胞では解除されていたが、リプログラミングが不完全な partial iPS 細胞では解除されていなかった。即ちこの時期の条件的ヘテロクロマチン形成は不活性 X 染色体にとどまらないゲノムワイドな現象であり、その形成は未分化状態から分化状態への移行に、その維持は分化状態の維持に、それぞれ密接に関わっている可能性が考えられた。以上を踏まえ、本研究ではこのゲノムワイドな条件的ヘテロクロマチン形成の分子基盤と発生生物学的意義を明らかにすることを試みた。研究のねらいは以下の3つである。

- (1) 三胚葉形成直前の時期に起こるゲノムワイドな条件的ヘテロクロマチン形成の分子基盤の解明
- (2) X 染色体と常染色体の条件的ヘテロクロマチン形成の分子基盤の共通点と相違点の解明
- (3) 条件的ヘテロクロマチン形成の人為的操作による、その発生・分化における役割の解明

2. 研究成果

(1) 概要

一般に多細胞生物のゲノムは多能性幹細胞の分化に伴い、徐々に密に折り畳まれてヘテロクロマチン化していく。しかし、分化のどの段階で高次構造変化が起き、それが何によって起き、その意義は何であるのか等、多くの課題が残されている。私は先行研究で DNA 複製時期がゲノム高次構造のよい指標であることを示し、マウスのエピブラストに相当する時期を境に大規模な高次構造変化(条件的ヘテロクロマチン化)が起きることを提唱した。また、いくつかの状況証拠から、常染色体に点在する EtoL 領域と不活性 X 染色体の条件的ヘテロクロマチン形成に共通の分子基盤が存在するという仮説を立てた(EtoL 領域は分化に伴い複製時期が S 期前半から S 期後半に変化する領域)。本研究では、この仮説の検証という形を取りながらエピブラスト期の条件的ヘテロクロマチン化の分子機構の解明をめざした。

エピブラスト期のクロマチン変化を調べる材料としては、不活性 X を持ち、「エピブラスト後」型の表現型を示すマウス雌胚性癌細胞株 MC12 を用いた。MC12 は不活性 X にのみ Hprt 遺伝子を持ち通常は 6TG 耐性であるが、不活性 X が再活性化されると Hprt が転写抑制解除されて HAT 耐性を獲得する。不活性 X の S 期後半複製が解除された HAT 耐性クローンを調べた所、驚いたことに常染色体 EtoL 領域が核内部に再配置された「エピブラスト前」型の表現

型を示し、常染色体 EtoL 領域と不活性 X の連動制御を仮定した前述の仮説と矛盾しなかった。

そこで MC12 の 6TG 耐性クローンを用いて siRNA スクリーニングを行った所、不活性 X の S 期後半複製解除を引き起こす siRNA を 6 つ同定することに成功した。不活性 X の S 期後半複製解除は、不活性 X の脱凝縮を伴う一方、不活性化初期のヒストンメチル化修飾 H3K27me3 には影響せず、不活性化の後半に機能することが示唆された。また、これらの因子の siRNA は常染色体 EtoL 領域の S 期後半複製を解除しなかったが、その核内配置を核内部寄りにやや変化させた。これらの結果は、前述の共通の分子基盤の存在を支持すると共に、得られた因子が共通の分子基盤の一部である可能性が考えられた。今後は不活性 X と常染色体 EtoL 領域制御の共通性に程度を明らかにしつつ、これらの因子 (による条件的ヘテロクロマチン化) の ES 細胞分化自体における必要性を明らかにする。

(2) 詳細

(1) 三胚葉形成直前の時期に起こるゲノムワイドな条件的ヘテロクロマチン形成の分子基盤の解明

エピブラスト期の常染色体と不活性 X の条件的ヘテロクロマチン形成に共通の分子基盤の存在を仮定し、雌マウス MC12 細胞の不活性 X の S 期後期複製の解除を指標 siRNA スクリーニングを行った。

		エピブラスト前	エピブラスト後
常染色体 EtoL ドメイン	複製タイミング	S 期前半 (Early-S)	S 期後半 (Late-S)
	核内配置	核内部	核膜周辺
	クロマチン凝縮	なし	あり
その他の核内変化	核膜周辺ヘテロクロマチン	なし	あり
	X 染色体不活性化	なし (Early-S複製)	あり (Late-S複製)

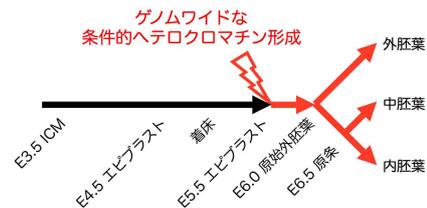


図1. (左) 三胚葉形成直前時期(エピブラスト期)にヘテロクロマチン化される EtoL ドメイン (= Early-S から Late-S に複製タイミングが変化、ゲノムの 6% 強を占める) に生じる変化とその他の核内変化。(右) エピブラスト期にゲノムワイドに条件的ヘテロクロマチンが形成されると考えられる。

(1-1) 遺伝子発現プロファイルに基づいた候補遺伝子の siRNA スクリーニング

HAT 耐性を獲得かつ不活性 X の S 期後期複製が解除された MC12 クローン (以後、不活性 X 再活性化 MC12 クローンと呼ぶ) を不活性 X 全体が再活性化されたものとみなし、これと再活性化前の MC12 クローン (= 6TG 耐性かつ不活性 X の複製時期が S 期後半) について全ゲノム遺伝子発現比較を行い (Agilent 全ゲノムマイクロアレイ)、6TG 耐性 MC12 クローンで発現の高い遺伝子のリストを得た。これらを不活性 X 維持に関与する候補遺伝子とみなし、これらの siRNA の上位 68 個を MC12 に導入して不活性 X の解除を指標にスクリーニングを行った。第一に、HAT 耐性の獲得を指標としたスクリーニングを行い、12 個を陽性と判定した。第二段階として不活性 X の S 期後期複製の解除を指標としてスクリーニングを行った所、12 個中 4 個に強い活性が認められた。これら 4 つはいずれも、不活性 X を脱凝縮させる活性も示し、表現型は確かであることが強く示唆された。

(1-2) ゲノムワイド shRNA スクリーニング

マウスのゲノムスケールのレンチウイルス shRNA ライブラリー (Cellecta Custom DECIPHER 27K Lentiviral shRNA Library Plasmid, Mouse Module 1: 27,500 種類の shRNA から構成され 4625 種類の遺伝子を標的とする) を MC12 に導入し、HAT 耐性クローンのプールからゲノム DNA を回収し次世代シーケンサーによる大規模配列解析を用いてこのゲノム DNA プール内の各々の shRNA 量を定量的に測定する実験系を最適化した。この実験系を用いて HAT 耐性クローンのプールに濃縮されていた shRNA のリストを得て、この中から不活性 X の S 期後期複製解除を引き起こす shRNA の同定を試みた所、現在までに 2 個を陽性と判定できた。

(2) X 染色体と常染色体の条件的ヘテロクロマチン形成の分子基盤の共通点と相違点の解明

本研究は常染色体と不活性 X 染色体の条件的ヘテロクロマチン形成に(少なくとも部分的に)共通の分子基盤の存在を仮定している(図1)。したがって(1)で得られた遺伝子群の常染色体における役割を調べることによって、X 染色体不活性化と常染色体上の条件的ヘテロクロマチン形成の両方に機能する因子が本当に存在するか否かを検討した(=2-2)。これに先立って、HAT 耐性を獲得かつ不活性 X の S 期後期複製が解除された「不活性 X 再活性化 MC12 クローン」において常染色体上の条件的ヘテロクロマチン解除の有無を検討し、X 染色体と常染色体の協調制御の有無を検討した(=2-1)。

(2-1) X 染色体と常染色体の協調制御の有無の検討

マウス三胚葉形成直前の時期に複製時期を S 期前半(Early S)から S 期後半(Late S)に変化させる常染色体 EtoL 領域は同じ時期に核内部から核膜周辺へと核内配置も変える。3 つの代表的な EtoL 領域 (*Rex1/Zfp42*, *Rex2*, *Dppa2*) は、再活性化前の MC12 では予想通り核膜周辺に位置していたが、不活性 X 再活性化 MC12 クローンにおいては核内部に再配置されていた。即ち、驚くべきことに不活性 X の再活性化に伴って常染色体 EtoL 領域も連動して制御されていることが示唆された。一方、不活性 X 再活性化 MC12 クローンのゲノムワイド DNA 複製タイミング解析を行った結果、不活性 X の S 期後期複製の解除は認められたが、常染色体 EtoL 領域の複製タイミングは S 期後期複製のまま連動制御はされていなかった。したがって、不活性 X の再活性化に伴い常染色体 EtoL 領域のヘテロクロマチン状態は全面的に解除される訳ではないが(複製タイミング解析結果)、少なくともその一部(核内配置)は解除されることが分かった。これは常染色体と不活性 X 染色体の条件的ヘテロクロマチン形成制御機構に少なくとも一部重複がある可能性を示唆しており、X 染色体不活性化ベースのスクリーニングで常染色体制御因子を取るという戦略に一定の正当性を与える結果が得られたと言える。

(2-2) 常染色体条件的ヘテロクロマチン解除の有無を指標とした候補 siRNA の選別

1-1で同定した 4 つの siRNA を導入した MC12 細胞においてゲノムワイド DNA 複製タイミング解析を行い、常染色体上の条件的ヘテロクロマチン解除(=常染色体 EtoL 領域の S 期後期複製の解除)の有無を検討したが、いずれも S 期後期複製を維持しており、結果はネガティブであった。しかし、並行して FISH 解析を行った所、得られた siRNA の導入により常染色体 EtoL 領域の核内配置は、核膜周辺(分化型指標)から核内部(未分化型指標)に一定程度(=partial に)リセットされた。ゆえに、得られた 4 つの陽性因子のうち少なくとも一部は、部分

的とはいえ常染色体上の条件的ヘテロクロマチン維持にも関与する可能性が示唆された。

(3) 条件的ヘテロクロマチン形成の人為的操作による、その発生・分化における役割の解明
 研究開始当初は、(1)と(2)で得られた各 siRNA/shRNA を導入したマウス ES 細胞を分化誘導して条件的ヘテロクロマチン形成が阻害されるか否かを検討し、候補因子の中から条件的ヘテロクロマチンの維持のみならず、その形成にも関与する因子を同定することを考えていた。また、このような siRNA については、リプログラミングへの影響や ES 細胞分化それ自身が阻害されるか否かも明らかにすることを考えていた。しかし、研究の過程で、siRNA 導入と ES 細胞分化の両立が技術的に難しいと判断し、遺伝子ノックアウトの方が表現型の解釈が容易で最終的に結論が出しやすいであろうと考えた。そこで、この考え方に基づき CRISPR/Cas9 法によりノックアウト ES 細胞を作製しており、ノックアウト ES 細胞の分化実験を開始した。

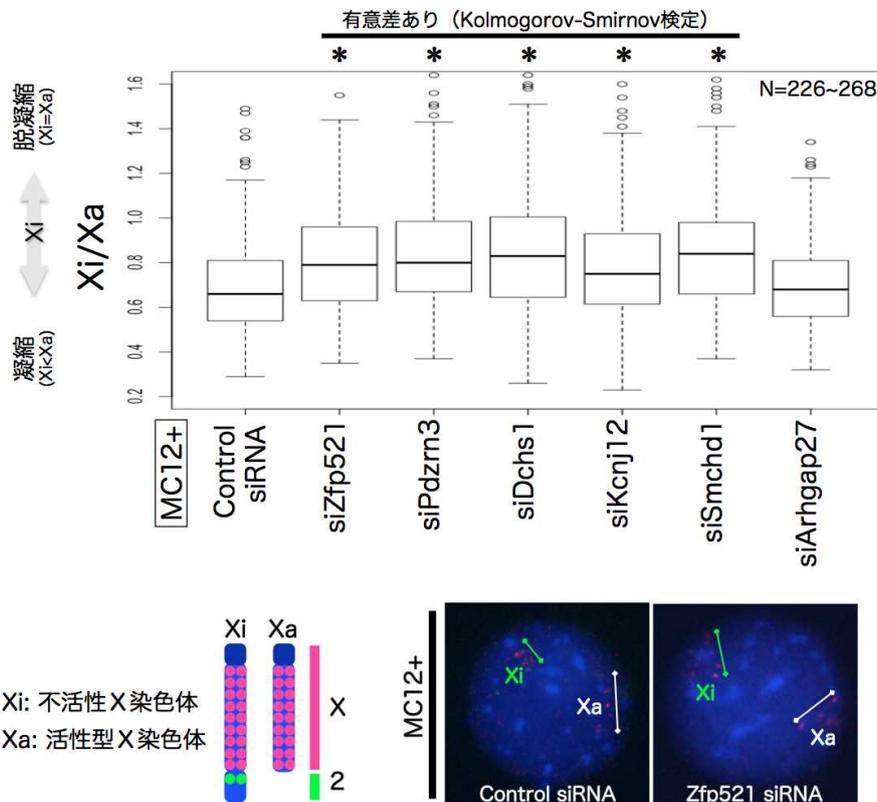


図. MC12 細胞の不活性 X 染色体の S 期後期複製タイミング解除を引き起こした siRNA はいずれも不活性 X 染色体(Xi)の脱凝縮も引き起こした(Dchs1, Zfp521, Pdzn3, Kcnj12)

3. 今後の展開

哺乳類の雌X染色体不活性化の研究はエピジェネティクス分野の主要トピックの1つであるが、不活性化後期に起きるクロマチン凝縮の分子機構はほぼ未解明であった。その凝縮と密接に関係している不活性XのLate S複製タイミングに着目してその解除を指標にsiRNAスクリーニングするという試みは前例の無いことであったが、新規因子が多く同定できたことの意義は大きく、前例の無い試みは成功であったと言える。最近、ヒトSMCHD1及びHBIX1遺伝子が不活性X凝縮に必要であると報告されたため(Nozawa et al, Nat SMB 2013)、不活性X凝縮に関与する初めての因子同定とは行かなかった。しかしながら、不活性X凝縮の分子機構にはまだ不明な点が多い。X染色体不活性化の分野は、不活性化初期に働くXist非コードRNAを中心に展開しているが、後期に起きる凝縮の機構を理解し、不活性化初期のイベントとの因果関係や関連を理解することはX染色体不活性化の理解の向上に大きく貢献するはずである。したがって、同定した遺伝子の機能の細胞種特異性、因子間の機能重複の有無、遺伝子発現への影響、進化的保存性などの重要な課題に今後も継続して取り組んでいく。

また、クロマチン凝縮という常染色体にも共通の現象に関与する因子の機能を解析することは、染色体ドメインの高次構造制御の普遍的理解に資するものでもある。本研究では常染色体と不活性X染色体の条件的ヘテロクロマチン形成について、少なくとも一部重複する分子基盤の存在を想定し、実際に、部分的に重複がある可能性を支持する結果が得られた。したがって、当面は重複の程度・範囲を明らかにすることが目標となる。そのためにまず、ゲノムワイドDNA複製タイミング解析と並んで、核内三次元空間におけるゲノム空間配置の良い指標であるゲノムワイドHi-C解析を進めている。核内配置に影響が出るのならば、ゲノムの相互作用と空間配置の指標であるHi-Cマップにも影響が出ると考えられるからである。

一方、ねらい(3)は、まだ当初の予定を消化しておらず、こちらも鋭意研究を続けていく。実は本研究計画の立案段階で私が最も知りたかったことは、ゲノム高次構造制御と細胞分化との接点や因果関係であった。本研究で、高次構造制御への関与が想定される複数の新規因子が得られたことから、まさにこの問いに答える研究基盤が整ったと言える。今後はこの大きな問題に焦点を当ててその答えを手に入れたいと考えている。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

私は先行研究でDNA複製時期がゲノム高次構造のよい指標であることを示し、マウスのエピブラストに相当する時期を境に大規模な高次構造変化(条件的ヘテロクロマチン化)が起きることを提唱した。また、いくつかの状況証拠から、常染色体に点在するEtoL領域と不活性X染色体の条件的ヘテロクロマチン形成に共通の分子基盤が存在するという仮説を立てた。本研究では、この仮説の検証という形を取りながらエピブラスト期の条件的ヘテロクロマチン化の分子機構の解明をめざした。仮説の検証は現在進行形であり、やるべきことは多く残されている。だが、常染色体と不活性Xが一部連動制御されることを示唆するデータが得られ、今後期待を抱かせる結果となった。また、仮説の検証を進めつつも、前例のないsiRNAスクリーニングを断行したことで、不活性XのS期後半複製およびクロマチン凝縮に必要な遺伝子を複

数同定することに成功した。DNA 複製タイミングとクロマチン高次構造を長く研究してきたが、これらの制御に関わる因子は文献的にほとんど知られていない。また、不活性 X 特有の高次クロマチン構造の分子基盤にも未だ不明な点が多い。今後これらの因子の解析を進めていくことで X 染色体不活性化やクロマチン高次構造制御全般の理解の向上に貢献するはずである。これまでの結果から、これらの因子は、常染色体を一部連動制御する可能性も示唆され、またエピブラスト相当時期の ES 細胞分化に必要な因子も含まれているなど、不活性 X の高次構造制御を足がかりに常染色体、発生・分化、と今後いろいろな方向に発展していく可能性が生まれた。さきがけ研究期間中に成果を論文にはまとめられなかったのはひとえに私の力不足だが、新たに生まれた課題に正しくアプローチするための足場固めを行っており、得られた成果は必ず論文にまとめていく。さきがけ期間の前半は一人で実験を行っていたが、幸い3年目の後半に独立する機会も得られ、徐々に仲間も増えてきた。一人の時期に比べると責任は遥かに大きくなったが、一つ一つの課題を地道にこなしていくことで良い成果を世に出していき、領域終了後も本さきがけ領域およびエピジェネティクス研究に貢献していく意気込みで取り組んでいきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

マウスエピブラスト期のゲノムワイドな条件的ヘテロクロマチン形成の分子基盤と発生生物学的意義の解明をめざして研究を行った。そのためにマウス雌胚性がん細胞株MC12を用い、複製タイミングの変化を指標にして雌X染色体不活性化の解除を引き起こすsiRNAのスクリーニングを行い、複数の遺伝子を同定した。得られた遺伝子のsiRNAについて不活性Xを脱凝縮させる活性を見出すなど検証を行った。研究としては候補遺伝子が得られたところであり、同定した分子がいかにしてクロマチン凝縮に関わるのか今後のメカニズムの解明に期待する。研究は全般的に力強く進んでいるようなので今後の発展を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shang WH, Hori T, Martins NM, Toyoda A, Misu S, Monma N, **Hiratani I**, Maeshima K, Ikeo K, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw WC, Fukagawa T. Chromosome engineering allows the efficient isolation of vertebrate neocentromeres. *Dev Cell*. 2013 24(6):635-648.

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な学会発表

- ・ **平谷伊智朗**、前島一博 「ゲノムワイド DNA 複製タイミング解析から見てきたマウス初期



- 発生時期の広範なゲノム高次構造変化とその意義」第34回日本分子生物学会年会ワークショップ 2011年12月16日(横浜) 口頭発表
- ・ 平谷伊智朗、前島一博「核内ゲノム高次構造の発生制御」第35回日本分子生物学会年会ワークショップ 2012年12月11日(福岡) 口頭発表
 - ・ Hiratani I “Developmental Regulation of Nuclear Genome Organization” RSC Publishing-iCeMS Joint International Symposium, Cell-Material Integration and Biomaterials Science (国際シンポジウム) 2013年3月19日(京都) 招待講演
 - ・ 平谷伊智朗、前島一博「核内ゲノム高次構造の発生制御」第36回日本分子生物学会年会ワークショップ 2013年12月4日(神戸) 口頭発表