「エピジェネティクスの制御と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成 26 年度終了研究課題－

研究総括　向井　常博

1．研究領域の概要

本研究領域は、エピジェネティクスの制御と生命機能の解明という視点をもった研究を対象とします。より詳しくは、エピジェネティクスの制御機構の解明、様々な生命現象とエピジェネティクスの関わり、エピジェネティクスの多様性や異常がかかわる疾患の解析を対象とします。それらの研究を通してエピジェネティクスの生命機能としての分子基盤を明らかにする事で、細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出を目指します。

具体的な研究内容としては、1）動植物を問わずさまざまなモデル生物を用いてエピジェネティクスの制御機構をいろいろな角度から追求し、明らかにする、2）エピジェネティクスの個体差・多様性を探るとともに、エピジェネティクスの異常にもとづく疾患の解析を行なう、3）エピジェネティクスの解析や制御に資する技術の開発を行う、といった課題が考えられます。

2．事後評価対象の研究課題・研究者名

件数：　15 件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3．事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1）選考は、「エピジェネティクスの制御と生命機能」領域に設けた選考委員 10 名の協力を得て、研究総括が行う。

2）選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

3）　選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準（URL：http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html ）の他、以下の点を重視した。

研究課題の実績はあまりないが、チャレンジグながら期待し、採択した課題

①「エピジェネティクス制御の多様性進化」、

②「哺乳類細部を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」。

4．事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者（該当ない場合は削除）10 名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会（書類選考会議）へ1課題を推薦した。（該当ない場合は削除）

選　考	書類選考	面接選考	採択数			
対象数	155 件	25 件	12 件	内訳	3 年型	11 件(1 件)
					5 年型	1 件

（　）内は大挑戦型としての採択数。

備考：

1）平成 22 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・牧　信安研究者、

研究期間が 5 年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する

（中間評価結果：http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/midterm_h26hyouka.htmll.）

・岩田敦研究者

大挑戦型として採択され、期間延長審査の結果、2 年間延長することが決まったため。

5.　研究実施期間

平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月(3 年型)
平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月(5 年型)

6.　領域の活動状況

領域会議:7 回
研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:14 回

7.　事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 26 年 7 月　評価会開催
平成 27 年 1 月　研究総括による事後評価
平成 27 年 1 月　被評価者への結果通知

8.　事後評価項目

(1)外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
(2)得られた研究成果の科学技術への貢献

9.　評価結果

総論・・・総論評価対象者は 15 名である。アドバイザーによる評価結果は、顕著な成果 2、目標通りの成果 5、満足できるレベル 8、成果不十分ならびに努力不足は 0 である。その中のいくつかを取り上げる。

一つは免疫細胞の維持機構の話しである。T 細胞および B 細胞がその機能を発揮するためには分化・成熟過程においてそれぞれの細胞の運命が厳格に制御・維持されなければならない。T 細胞の分化過程の途上、調節因子(ポリコーム)を欠失させたら B 細胞へ運命転換したのである。分化維持に特定の調節因子が必要であることの発見、ならびに免疫細胞の細胞系譜決定の機構を解き明かした成果は大きい。二つ目は精神疾患の研究であるが、統合失調症のゲノム解析を行い、転移因子が健康人と比べて患者において神経機能に重要な遺伝子にたくさん挿入されていることを見つけた。この事象は細胞・動物モデルを用いた研究で確認している(Neuron 2014)。この事実は社会的影響が大きいだけに、今後多角的にモデルを検証するなど慎重かつ着実な展開を求めている。三つ目は技術開発である。生きた細胞内でエピジェネティックな変化をリアルタイムで解析できる可視化プローブを開発し、その有用性を確認した。プローブのシリーズ化、安定化、スクリーニング系の確立などを試み、抗がん剤開発の新規表的分子探索プローブを開発するなど、エピジェネティック創薬につながる成果を上げげた。四つ目として、記憶の問題を取り上げる。エピジェネティクスは記憶保持に重要な記憶標識であるという新しい概念を提唱し、ショウジョウバエを用いてそれを検証した。長期記憶形成に重要なエピジェネティク因子、及び記憶保持に重要な因子、ならびに記憶に重要なエピジェネティクス因子の標的遺伝子も同定した。この複合体は記憶の保持のみならず記憶の書き換えにも重要であることを見出した。また、この研究を進める過程で、CREB/CRTC の新たな機能も見出した。空腹になると記憶が促進するという事実を発見し、すでに報告している(Science 2013)。

最後に最も光っている課題として、林克彦氏による研究課題「始原生殖細胞の内因性リプログラミング機構による幹細胞制御」を取り上げる。マウスの多能生幹細胞(ES/細胞/iPS 細胞)から始原生殖細胞を分化誘導させる培養方法を構築した。この系より得られた始原生殖細胞様細胞を胎仔の生殖巣の体細胞とともに卵巣に移植することで受精可能な卵子に分化し、その受精卵から健常な個体が得られた(Science 2012)(**Top 10 scientific breakthroughs 2012 に選ばれる。**)。これは世界初の快挙である。分化培養系ができたことにより、生殖関係の研究が一気に進む。マウスでの分化誘導系の確立は人への応用の可能性が高まり、不妊症の原因解明にもつながる。本さきがけ研究の成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本分野のトップランナーとして注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

各研究者の評価

1.　浦　聖恵研究者 「研究課題名:ヒストン H3K36 メチル化酵素 WHSC1 による核構造体を介した新規転写　制御機構の解明」(5 年型)

評価結果・・・Whsc1 が転写活性領域に分布し、転写活性領域にプログラムされた DNA 損傷応答に特異的に関

与し、転写と DNA 損傷応答を共役させるという新規の DNA 代謝制御仮説を提唱した。仮説の検証のために、リンパ球Ｂ細胞に着目してWhsc1 の機能解析を試み、その結果、Whsc1 の欠損によりＢ細胞分化が抑制され、抑制の原因は細胞分化に伴う組換え修復異常によることが明らかになった。また、Whsc1 ノックアウトによる増殖阻害が p53 ノックアウトで解除されることを見出し、Whsc1 が内在性の DNA 損傷に対処するための分子であることを示した。当初研究の方向性に関し紆余曲折はあったが、焦点が絞られてその機能に迫りつつあるのは評価できる。しかしまだおさえるべき点が多々ある。転写制御に伴う内在性の DNA 損傷修復に関して、ゲノム損傷への影響が間接的なものである可能性が排除できないこと、B 細胞以外での機序が未解明なこと、ヒストンメチル化の機能など、具体的な分子機構を明らかにするためには複合体の解析が必要なことなど、もう少し抑える重要なポイントがあるような印象を持っている。提案に新規性があるので今後の発展に期待したい。

2. 夏目　やよい研究者 「研究課題名：発生を制御するヒストン修飾動態の in silico 解析」
評価結果・・・隠れマルコフモデルを用いる前に予め類似パターンを持つと考えられる遺伝子を分類し、その基準としてコアプロモータエレメントの組み合わせを選択した。その結果、TATA box を持たないグループではヒストン修飾の経時的変化が小さいのに対し、TATA box を持つグループでは変化が大きいこと、また、TATA box を持たないグループではヒストン修飾の割合で RNA 量が説明できることなどが分かった。さらに、DPE を持つグループでは H3K27me3 の使用頻度が高いことも分かった。これらの結果をもとに、TATA box を持ち、ヒストン修飾が起きているコアプロモーターにおけるヒストン修飾の動的パターンの解析を進めことになる。長い試行錯誤の結果、新規解析手法の開発が終了し、ゲノムワイド解析の条件を見つけ出す段階に達した。隠れマルコフモデルによる機会学習により法則性を見つけたり予測したりするのはまだこれからである。数理解析や情報解析は今後医学生物学初め様々な分野で益々重要になる中、明確な目標を掲げ新規の発見に導くような手法を開発してくれることを期待する。

3. 伊川　友活研究者 「研究課題名：免疫細胞の運命維持におけるエピジェネティック制御機構」
評価結果・・・T 細胞および B 細胞がその機能を発揮するためには分化・成熟過程においてそれぞれの細胞の運命が厳格に制御・維持されなければならない。しかしその詳細は明らかでなかった。伊川氏はポリコーム群タンパクが T 細胞の分化過程及び成熟後の維持に不可欠であることを見出した。ポリコーム（PRC1）の構成因子である Ring1AB のノックアウトマウスが、T 細胞から B 細胞への運命転換の表現型を示したのである。また、ポリコームの重要な標的として Pax5 を同定した。このことより、ポリコームが T 細胞の分化状態の維持に必要であることの発見、また、免疫細胞の細胞系譜決定の機構の一つを解き明かしたその功績は大きい。伊川氏は免疫に限らず細胞の分化・発生過程のエピジェネティックなメカニズムに関心があり、研究レベルも高く、その解明は基盤的研究なのでいずれ治療に結びつく社会・経済的波及効果が期待できる。

4. 伊藤　秀臣 「研究課題名：環境変動にともなう転移因子と宿主のゲノム応答」
評価結果・・・熱活性型トランスポゾン *ONSEN* が転移したあとに宿主の遺伝子発現に影響を与え、ストレス耐性の表現型を獲得した2系統を得た。*ONSEN* の挿入先は7割以上が遺伝子内であった。2つの系統のうち、一つはエクソン内に挿入されており、もう一方はイントロンに挿入されていた。イントロンに挿入された系統では polIV 変異体（siRNA 生合成に関わる遺伝子の変異体）でしか表現型が観察されなかった。従ってエクソンとイントロンに挿入される場合で挿入先への影響が異なることが分かった。一方トランスポゾンの転移抑制について、野生型では転移は認められないが、polIV 変異体に熱ストレスを与えた個体の子孫に *ONSEN* の転移が認められた。研究はまだ緒についたばかりであり、解決すべき課題が多く存在する。そもそも siRNA が転移に関わる機構は何なのか、次世代に受け継がれるメカニズムの解明、組織特異的な転移機構の解明など、具体的課題のもと研究を進展させて欲しい。また、今後実用化を視野に入れた研究の展開も求められる。

5. 岩本　和也 「研究課題名：気分障害患者脳試料におけるシトシン修飾状態の解析」
評価結果・・・気分障害患者から神経細胞核を分離し DNA メチル化解析を行った結果，脳組織における解析ではゲノム全体として低メチル化になる変化を見出している。抹消血解析では候補遺伝子のプロモーター領域での高メチル化を見出している。また、統合失調症患者の神経細胞で、レトロトランスポゾンである LINE-1 の過挿入が起きていることを見出した。LINE-1 の挿入は神経機能に重要な遺伝子に起きており、統合失調症と密接に関係していることが示唆された。細胞・動物モデルを用いた研究により、過挿入は遺伝要因と環境要因によって起ることを明らかにした。統合失調症による L1 コピー数の増加は興味深い発見であるが、疑問もたくさん残っており、今後多角的にモデルを検証するなど慎重で着実な展開を期待したい。なお、当初計画の気分障害患者のゲノムワイドなメチローム解析は腰を据えてしっかり進めて欲しい。

6. 金田　るり 「研究課題：エピジェネティック治療を目指した心不全の病態解明」
評価結果・・・心不全モデルラットにおいて、H3K9me3 の分布に変化が認められることから、SUV39 阻害薬（ケトシン）を投与することで治療効果が得られることを見出した。効果があった理由として、ケトシン投与でミトコンドリア機能に関する遺伝子群や酸化還元反応に関与する遺伝子の発現が回復することを観察した。ミトコンドリア関連の遺伝子近傍のリピート領域において不全心筋で H3K9me3 の増加が見られ、ケトシン投与でその抑制が見られた。得られた結果は状況証拠であり、リピート配列が心不全を引き起こす因果関係を検証する必要がある。*In vivo* のみの結果は評価が困難であり、場合によっては評価が可能な系に持ち込み検証する必要がある。また、ケトシンに関して毒性を抑えた誘導体が開発されているので試みることを勧めます。今後ともエピジェネティクな治療の可能性を探って欲しいと思います。

7. 小林　慎 「研究課題：X 染色体再活性化ライブイメージング技術を用いた幹細胞研究」
評価結果・・・X 染色体の再活性化と幹細胞の関係に注目して、新しい幹細胞の多能性を評価する系を確立することを目標にした。そのために2本の X 染色体の活性が異なる蛍光でモニターできるマウスを作成した。目標としていた X 染色体の再活性化をライブイメージングでモニターできる系であることを確認し、系の有用性を示した点は評価できる。今後この系を用いて、リプログラミングのライブでの可視化やその機構解明、多能性幹細胞の品質管理、あるいは組織幹細胞、がん幹細胞の研究など具体的活用が求められる。

8. 佐々木　和樹 「研究課題：ヒストン修飾の動態を可視化検出するための系の確立」
評価結果・・・生細胞内でのエピジェネティックな変化をリアルタイムで解析できるヒストン H3 アセチル化蛍光プローブ、ヒストンメチル化蛍光プローブを開発し、その有用性を確認した。トランスポゾンベクターを用いて組換えを克服し、蛍光プローブを安定に発現する細胞を樹立した。今まで Histac をはじめ複数プローブのシリーズ化、スクリーニング系の確立などを試み、その結果、抗がん剤開発の新規標的分子探索プローブを開発するなど一定の成果を納められた。これらプローブはエピジェネティック創薬に応用できると思われる。今後ともエピジェネティクス医薬品の研究開発や基礎研究に役に立つ技術開発を引き続きお願いしたい。

9. 田上　英明 「研究課題：複合体解析から挑む動的エピゲノム制御と多様性」
評価結果・・・可溶性ヒストン複合体から動的エピゲノム制御を理解するとの考えのもと、新規 H3 結合因子 HiTAP1 を見出し、その分子の生化学的性質、分子機能，生理的意義、量的制御などについて解析した。その結果、この分子は真核生物で保存され、H3 と優先的に結合し、H3/H4 を解離させる活性が見出された。さらに、HiTAP1 の C 末領域を過剰発現すると増殖阻害を起こすこと、ノックアウトマウスでは生殖や発育にも関わること、また、過剰発現時の複合体解析より、代謝や呼吸機能に関わることも示唆されている。このように多くの結果が得られているので現状で取りまとめることを進める。今後得られたデータをもとに、HiTAP1 の生理機能にせまるストーリーを構築する必要がある。

10. 津中　康央 「研究課題：FACT を介したクロマチンリモデリング機構の構造基盤」
評価結果・・・エピジェネティックな遺伝子発現制御に関係しているリモデリング因子がクロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのか、構造生物学的なアプローチにより解析を行なった。FACT の機能ドメイン SPT16 サブユニットの Mid ドメインの結晶化に成功し、分解能 1.92 Å の立体構造解析を行った。ヒトにおいて H2A/H2B 二量体と強く相互作用する FACT の領域は、C 末に存在する酸性天然変性領域であり、この領域が H2B の N 末テールにある塩基性領域と相互作用することを明らかにした。競争はし烈であるが、構造を基盤にした研究は重要であり、今後とも着実な研究姿勢を続け欲しい。

11. 林　克彦 「研究課題：始原生殖細胞の内因性リプログラミング機構による幹細胞制御」
評価結果・・・多能生幹細胞（ES/細胞/iPS 細胞）から始原生殖細胞(PGCs)を分化誘導させる培養方法を構築した。この系より得られた PGC 様細胞(PGCLCs)を胎仔生殖巣の体細胞とともに卵巣に移植することで受精可能な卵子に分化させ、その受精卵から健常な個体を得た。これは世界初の快挙であり、波及効果のある成果である。次に、PGC の分化機構について、PGCLCs の分化誘導系を用いて解析し、PGC の分化には転写因子 Prdm14 が中心的な働きをすることを明らかにした。分化培養系ができたことにより、発生初期の生化学的解析が可能になり、PGCs の分化機構の解明が進む。また、マウスでの ES/iPS 細胞による分化誘導系の確立はヒトへの応用の可能性が高まり、不妊症の原因解明にもつながる。本さきがけ研究の成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本分野のトップランナーとして注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

12. 平谷　伊智朗 「研究課題：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」
評価結果・・・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。

13. 平野　恭敬 「研究課題：記憶タグとして機能するエピジェネティクスの解明」
評価結果・・・エピジェネティクスは記憶保持に重要な記憶タグであるという新しい概念を提唱し、ショウジョウバエを用いてそれを検証した。長期記憶形成に重要なエピジェネティク因子（CBP, Trx, HDAC6, Lid）、及び記憶保持に重要な因子（GCN5, Tip609, Ash19, UbcD6）、ならびに記憶に重要なエピジェネティクス因子の標的遺伝子も同定した。上記の研究を進める上で記憶の保持に重要な転写因子として CREB/CRTC 複合体を同定している。この複合体は記憶の保持のみならず記憶の書き換えにも重要であることを見出した。また、この研究を進める過程で、CREB/CRTC の新たな機能も見出した。空腹になると記憶が促進するという事実を発見し、すでに報告している。これらの研究成果は当初の目的を十分達成し、顕著な成果である。今後は得られたエピジェネティックス因子の神経ネットワークにおける役割、ならびに生理的な意義を明らかにして行く必要がある。今後の展開を大いに期待している。本さきがけ在籍中に顕著な成果をだしており（発表、未発表データを含む）、研究者としての飛躍につながることを期待している。

14. 西山　朋子 「研究課題：コヒーシンによるクロマチン構造変換の可視化と制御機構の解明」
評価結果・・・分裂期における接着解離のメカニズムは西山氏の長年のテーマである。接着を担うコヒーシン複合体の転写制御に焦点を当て研究を進めている。ここではその機能を明らかにするために in vitro 系で再構築・可視化しその実証をめざしている。1分子イメージングにより、ATP 加水分解活性に依存しないコヒーシンが DNA に結合し、DNA 上を自由拡散運動すること、CTCF を DNA の端に結合させるとコヒーシンは CTCF 部位に蓄積し、拡散運動を停止することを見出した。コヒーシンの一分子観察系の確立と、それを用いたコヒーシンの運動性の観察、および他のクロマチン結合タンパク質との相互作用が観察できるようになった。チャレンジングなテーマであり、成果を上げつつある。今後転写制御への寄与、DNA 複製系の確立、コヒーシン病の原因解明など、この系を使って独創的な研究を展開されることを期待する。

15. 増井　修 「研究課題：Long non-coding RNA による転写抑制機構の解明」
評価結果・・・X 染色体の転写を不活性化する分子機構を明らかにするために、Xist RNA のライブイメージングを試みた。先ず検出できる系を確立し、この系を用いて細胞周期の細胞内動態を観察することに成功した。その結果 Xist RNA は周期で局在が変わり、分裂期では不活性 X 染色体の辺縁部に局在し、間期では全体に広がって存在することが明らかとなった。間期について超解像顕微鏡による観察をおこなったところ、細かい粒子状の構造体が観察された。この構造体とタンパクの局在を調べたところ、H3K27me3 と最も強局在することが分かった。システムが確立されたようなので、今後 Xist RNA がどのようにして染色体の不活性化を起こすのか、その機構の解明に向け全力で取り組んで欲しい。Long non-coding RNA の代表格である Xist RNA が先導して成果がでることを期待する。

１０．評価者

研究総括　向井　常博　西九州大学　学長

領域アドバイザー（五十音順。所属、役職は平成 26 年 3 月末現在）

牛島　俊和　　国立がん研究センター・上席副所長
角谷　徹仁　　国立遺伝学研究所総合遺伝研究系・教授
金児-石野　知子　　東海大学健康科学部　教授
古関　明彦　　理化学研究所　統合生命医科学研究センター　グループディレクター
佐々木　裕之　　九州大学生体防御研究所　所長
白髭　克彦　　東京大学分子細胞生物学研究所　教授
眞貝　洋一　　理化学研究所 眞貝細胞記憶研究室　主任研究員

田島　正二　　大阪大学蛋白質研究所エピジェネティクス研究所　教授
中西　理　　　独立行政法人医薬基盤研究所　部長
広瀬　進　　　国立遺伝学研究所　名誉教授

（参考）
件数はいずれも、平成 27 年 1 月末現在。

（1）外部発表件数

	国　内	国　際	計
論　文	2	28	30
口　頭	100	55	155
その他	0	0	0
合　計	102	83	185

（2）特許出願件数

国　内	国　際	計
0	0	0

（3）受賞等

- 伊川　友克：2011 年度(第 6 回)日本免疫学会研究奨励賞（H23.11）
- 伊川　友克：平成 24 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰　若手科学者賞（H24.4）
- 伊藤　秀臣：日本遺伝学会第 82 回大会 Best Paper 賞（H22.11）
- 佐々木　和樹：平成 24 年度　理研　研究奨励賞(H25.3)
- 佐々木　和樹：第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会優秀演題賞(H25.6)
- 平野　恭敬：2012 年度　包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 若手優秀発表賞(2012 年度　包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 若手優秀発表賞)（H24.7）
- 増井　修　：Mouse Molecular Genetics Conference ポスター賞（H24.10）

（4）招待講演
国際　23件
国内　63件

別紙

「エピジェンティクスの制御と生命機能」領域　事後評価実施　研究課題名および研究者氏名

（5年型）

研究者氏名（参加形態）	研　究　課　題　名（研究実施場所）	現　職（平成 27 年 3 月末現在）（応募時所属）	研究費（百万円）
浦　聖恵（兼任）	ヒストン H3K36 メチル化酵素 WHSC1 による核構造体を介した新規転写制御機構の解明（大阪大学大学院医学研究科）	千葉大学　理学部　生物学科　教授（大阪大学　大学院医学研究科　助教）	100

（3年型）

研究者氏名（参加形態）	研　究　課　題　名（研究実施場所）	現　職（平成 27 年 3 月末現在）（応募時所属）	研究費（百万円）
夏目　やよい（専任）	発生を制御するヒストン修飾動態の in silico 解析（京都大学化学研究所）	科学技術振興機構　さきがけ研究者（京都大学　化学研究所　特定研究員）	12
伊川　友克（兼任）	免疫　細胞　の運命維持におけるエピジェネティック制御機構（理化学研究所）	理化学研究所　上級研究員（理化学研究所　研究員）	40
伊藤　秀臣（兼任）	環境変動にともなう転移因子と宿主のゲノム応答（北海道大学大学院理学研究科）	北海道大学　大学院理学研究科　助教（北海道大学　大学院理学研究科　助教）	40
岩本　和也（兼任）	気分障害患者脳試料におけるシトシン修飾状態の解析（東京大学大学院医学系研究科）	東京大学　大学院医学系研究科　特任准教授（東京大学　大学院医学系研究科　特任准教授）	40
金田　るり（兼任）	エピジェネティク治療を目指した心不全の病態解明（慶應義塾大学医学部）	慶應義塾大学　医学部　特任講師（慶應義塾大学　医学部　特任助教）	40
小林　慎（専任）	X 染色体再活性化ライブイメージング技術を用いた幹細胞研究（東京医科歯科大学大学院難治療研究所）	科学技術振興機構　さきがけ研究者（東京医科歯科大学　大学院難治療研究所　非常勤講師）	43
佐々木　和樹（専任）	ヒストン修飾の動態を可視化検出するための系の確立（理化学研究所）	科学技術振興機構　さきがけ研究者（科学技術振興機構　ERATO 研究員）	40
田上　英明（兼任）	複合体解析から挑む動的エピゲノム制御と多様性（名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科）	名古屋市立大学　大学院システム自然科学研究科　准教授（名古屋市立大学　大学院システム自然科学研究科　准教授）	40
津中　康央（専任）	FACT を介したクロマチンリモデリング機構の構造基盤（京都大学　物質・細胞　統合システム拠点）	科学技術振興機構　さきがけ研究者（国際高等研究所　アシスタントフェロー）	40
西山　朋子（兼任）	コヒーシンによるクロマチン構造変換の可視化と制御機構の解明（名古屋大学　理学部）	名古屋大学　高等研究員　特任講師（ウイーン分子学研究所ヤンミヒャエル・ピーターズ研究室　博士研究員）	40
林　克彦（兼任）	始原生殖細胞の内因性リプログラミング機構による幹細胞制御	九州大学　大学院医学研究院　教授（京都大学　大学院医学研究科　講師）	45

	（九州大学医学研究院）		
平谷伊知郎 （兼任）	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 （理化学研究所）	理化学研究所　ﾁｰﾑﾘｰﾀﾞｰ （国立遺伝学研究所　助教）	40
平野　恭敬 （兼任）	記憶タグとして機能するエピジェネティクスの解明 （京都大学大学院医学研究科）	都大学大学院医学研究科　特定准教授 （東京都医学総合研究所　客員研究員）	48
増井　修 （兼任）	long non-coding RNA による転写制御機構の解明 （理化学研究所）	理化学研究所　研究員 （理化学研究所　研究員）	40

研　究　報　告　書

「ヒストン H3K36 メチル化酵素 WHSC1 による核構造体を介した新規転写制御機構の解明」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月
研 究 者： 浦 聖恵

1．　研究のねらい

酵母からヒトに至るまで，すべての真核生物のゲノム DNA は、ヒストンタンパク質と結合してクロマチンを形成し，例えばヒトでは 1 細胞当たり 2m にもおよぶ DNA が直径約 10μm の核に折り畳まれて存在する。従ってクロマチンの修飾状態は、転写や DNA 修復など DNA 上で起こるあらゆる反応(DNA 代謝反応)の制御に密接に関わっている。近年、アセチル化やメチル化など様々なヒストン修飾酵素が同定され、さらにゲノムワイドに、ヒストン修飾状態が因子の結合や転写産物 RNA の情報とあわせて解析されるようになった。その結果、単純に遺伝子の転写活性化状態を正か負に 2 分する従来の転写制御モデルでは説明できない、転写開始から伸長・終結までを共役させながら進行する核構造体の存在が示唆される。エピジェネティクス制御を真に理解するためには、この既存の概念を越えた未知の転写制御機構の解明が欠かせない。そこで、種を越えて進行中の転写活性領域に分布を示すが、転写との直接の繋がりが未だに判然としないヒストン H3,36 番目リシン残基のメチル化(H3K36me)に着目した。ヒストン H3K36me は酵母では唯一 Set2 によって担われており、ヒトやマウスでは5つの Set2 類似タンパク質が同定されている。Whsc1 はその一つで、これまでに遺伝子欠損マウスを作製して、ヒト 4 番染色体片アレル欠損によって発症する発育不良、形態異常、精神遅滞そして免疫欠損を特徴とする 4p 症候群の主要な原因遺伝子であることを突き止めた（図 1）。本研究では、独自に同定した H3K36me 修飾酵素 Whsc1 の機能解析から、新しい転写制御機構の概念を導き出すことにある。

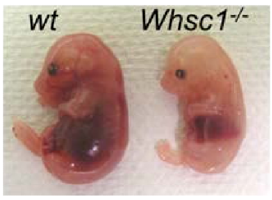


図1. *Whsc1*欠損マウス

2．　研究成果

（1）概要

*Whsc1*遺伝子のホモ欠損マウスは、胎性中期から様々な程度の成長遅延を示して出生直後に大半が死亡する。また、*Whsc1* 欠損 ES 細胞は、未分化状態では野性型に比べて細胞形態、増殖に何ら異常が認められないが、分化誘導に伴って増殖抑制が認められる。さらに *Whsc1* 欠損 MEF 細胞の解析からも Whsc1 が DNA 損傷応答に関与することが示唆され、DNA 二本鎖切断応答に関与する因子と複合体を形成することが明らかになった。しかし、通常の DNA 損傷応答因子と異なって、レーザー照射などによる外因性の DNA 二本鎖切断に対して、損傷部位への集積も、遺伝子欠損による DNA ストレス感受性の上昇も認められない (Hartlerode A. et al. 2012)。そこで Whsc1 が転写活性領域にプログラムされた DNA 損傷応答に特異的に関与し、転写と DNA 損傷応答を分子共役させる新規の転写制御仮説に至った。

この仮説を検証するために、プログラムされた DNA 切断・遺伝子再構成を伴って分化する

ユニークな組織であるリンパ球 B 細胞に着目して、Whsc1 の機能解析を試みた。まず造血幹細胞を含む胎仔の肝臓細胞の骨髄移植解析から、*Whsc1* 欠損によって、B 細胞分化が抑制されることが明らかになった。さらに造血幹細胞の ex vivo B 細胞分化系実験から、B 細胞分化が抑制は、細胞分化に伴う V(D)J 遺伝子再構成(V(D)J recombination)と呼ばれるゲノム再編成の異常によることが判明した。

造血幹細胞をB細胞に分化させる過程で時間を追ってDNAの傷を調べた所、分化誘導後、一過性にDNA二本鎖切断の集積が認められた。以上結果から、Whsc1はランダムにゲノムに形成された損傷修復には関与しないが、*Igh*遺伝子座のように転写が活性化された特定の遺伝子座において形成されるプログラムされたDNA二本鎖切断修復に積極的に機能すると結論し、ヒストンメチル化酵素Whsc1を介した新規の"転写–DNA損傷修復共役"機構をここに提唱する。

(2)詳細

2-1. Whsc1 欠損個体、欠損細胞観察から新規の転写制御仮説の樹立

*Whsc1*遺伝子のホモ欠損マウスは、胎性中期から様々な程度の成長遅延を示して出生直後に大半が死亡する。しかも *Whsc1* 遺伝子はハプロ不全[を示し、ヘテロ欠損マウスの1割ほどで、著しい成長遅延や骨形成異常、さらに感染症や脾臓細胞数の減少などのリンパ球系の異常が認められた。一方、*Whsc1* 欠損 ES 細胞は、未分化状態では野性型に比べて細胞形態、増殖に何ら異常が認められないが、分化誘導に伴って増殖抑制が認められる(図 2)。さらに *Whsc1* 欠損 MEF 細胞の解析からも Whsc1 が DNA 損傷応答に関与することが示唆され、DNA 二本鎖切断応答に関与する因子と複合体を形成することが明らかになった。しかし、通常の DNA 損傷応答因子と異なって、薬剤やレーザー照射などによる外因性の DNA 二本鎖切断に対して、損傷部位への集積も、遺伝子欠損による DNA ストレス感受性の上昇も認められない(Hartlerode A. et al. 2012)。Whsc1 が担う H3K36me は転写活性領域に分布することから、Whsc1 が転写活性領域にプログラムされた DNA 損傷応答に特異的に関与し、転写と DNA 損傷応答を分子共役させる新規の転写制御仮説を構築するに至った(図 3)。

図2. *Whsc1*欠損による
ES細胞胚様態の成長阻害

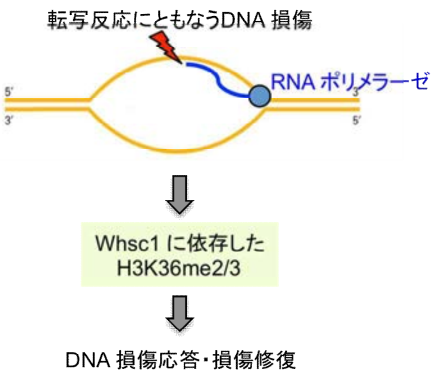


図3. ヒストンK3K36メチル化酵素による
転写–DNA損傷応答の共役モデル

2-2.Whsc1 よるプログラムされた DNA 二本鎖切断応答

図 3 のモデルを検証するために、プログラムされた DNA 切断・遺伝子再構成を伴って分化するユニークな組織であるリンパ球 B 細胞に着目して、Whsc1 の機能解析を試みた。まず、遺伝子欠損マウスは出生直後に致死のため、造血幹細胞を含む胎仔の肝臓細胞を野生型成体マウスの骨髄に移植して、4ヶ月経過したマウスの末梢血、骨髄、脾臓、胸腺の細胞解析を行っ

た。その結果、*Whsc1* 欠損細胞移植マウスでは特に B 細胞の比率が末梢血で低下し、骨髄では、分化段階を追って次第に B 細胞の数が減少して最終的に抗体発現が低下することが明らかになった。造血幹細胞からの B 細胞分化過程では、免疫グロブリン遺伝子座（重鎖：*Igh* 遺伝子座、軽鎖：*Igk* および *Igl* 遺伝子座）でプログラムされた DNA 二本鎖切断・連結反応が起こる。この V(D)J 遺伝子再構成（V(D)J recombination）と呼ばれるゲノム再編成によって、多様な抗体生産を可能にして生体を防御している。*Igh* 遺伝子座では遺伝子座が転写活性化されてから、V(D)J 遺伝子再構成が起こり、タンパクをコードした RNA が転写され免疫グロブリン重鎖タンパク質を合成する（図 4）。

Whsc1 が B 細胞分化に果たす機能を明らかにするために、胎仔の肝臓細胞から造血幹細胞を単離して *ex vivo* で B 細胞分化培養を行って、遺伝子発現および V(D)J 遺伝子再構成を詳細に調べた。その結果、*Whsc1* 欠損によって、*Igh* 遺伝子座の活性化や、B 細胞分化を誘導する因子の発現はほとんど影響を受けないが、V(D)J 遺伝子再構成が滞ってアポトーシスが誘導されることが判明した。そこで、V(D)J 遺伝子再構成がすでに完了した免疫グロブリン遺伝子を *Whsc1* 欠損マウスに導入したマウスを作製したところ、*Whsc1* 欠損による B 細胞分化異常が野性型と同じレベルにまで回復した。

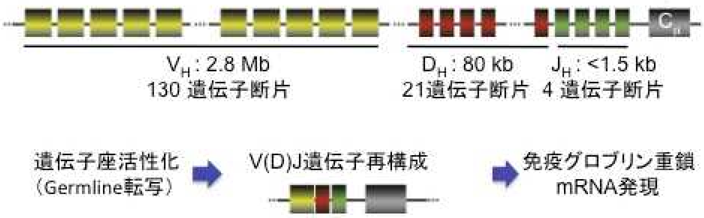


図4. マウス*Igh*遺伝子座における転写と遺伝子再構成

以上の結果から、Whsc1がV(D)J遺伝子再構成におけるDNA切断や修復など、直接DNA代謝反応に関与するか、あるいはDNA切断応答に関与すると考えられる。造血幹細胞をB細胞に分化させる過程で時間を追ってDNAの傷を調べた所、分化誘導後、一過性にDNA二本鎖切断の集積が認められた。従って、Whsc1はランダムにゲノムに形成された損傷修復には関与しないが、*Igh*遺伝子座のように転写が活性化された特定の遺伝子座において形成されるプログラムされたDNA二本鎖切断修復に積極的に機能すると結論した。

転写活性化に伴ってDNA二重鎖はほどけてDNA損傷の危険は高まる。高等真核生物ではこのような転写反応によって導かれる内在性のDNA損傷を通常のランダムに生じるDNA二重鎖機構と異なる機構でH3K36メチル化酵素Whsc1を介して修復する新規の“転写–DNA損傷修復共役”機構をここに提唱する（図5）。

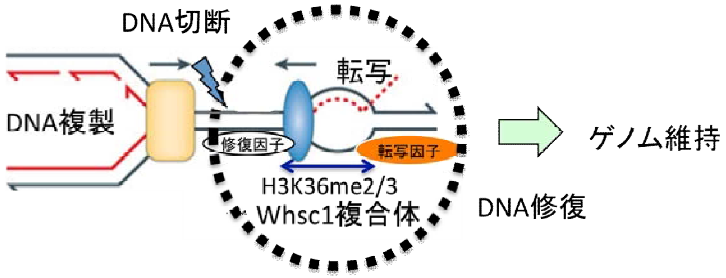


図5. ヒストンメチル化酵素Whsc1を介した転写-DNA損傷修復共役モデル
転写活性化に伴う内在性のDNA損傷修復にWhsc1は機能する。転写ファクトリーはゲノム維持ファクトリーでもあるのかもしれない。

3.　今後の展開

本研究により、ヒストンH3K36メチル化酵素によって転写とDNA修復を分子共役させて、遺伝子コード領域のゲノム維持を保証する新規のDNA代謝機構の存在が示唆された（図5）。ヒストンメチル化の機能など、具体的な分子機構を明らかにするためには複合体の解析など、まだ行うべき多くの研究が残されている。しかし、転写活性領域をマークするように分布するヒストン修飾酵素が、DNA修復を担うことを示す本知見は、古くから転写ファクトリーとよばれてきた転写活性化領域の核構造体の概念に変化をもたらすものである。それは、転写とゲノム維持の両機能を備えた高次複合体なのではないだろうか。ゲノム進化の視点からも今後、転写制御をDNA損傷修復、更にはDNA複製を含めたあらゆるDNA代謝反応を考慮して研究を進める必要がある。

これまで転写の制御因子とDNA修復因子を分離して研究が進められて来た。そしてDNA損傷・修復の分野では強い放射線照射や薬剤処理によって生じる外因性のDNAの傷に対する細胞応答の研究が盛んに行われて来た。私達のゲノムDNAはこのような強いDNAストレスを外から与えなくても、細胞の内在的な営みで絶えず傷つき、修復してゲノムを維持している。Whsc1はB細胞以外に広く発現していることから、様々な細胞の内在性のDNA損傷修復を担うことが予想される。高齢化に伴って、癌や、老化に対する社会の関心が高まっているが、ヒストンH3K36メチル化酵素の研究は、その根底にあるゲノム維持機構の解明に向けた突破口に発展することが期待される。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

当初、Whsc1の機能解析を、心臓特異的な転写因子Nkx2.5との協調的な転写制御に着目し、ES細胞の心筋細胞への分化系で解析する予定で研究をスタートした。Whsc1欠損ES細胞では、野性型に比べて分化誘導後の増殖異常や拍動心筋細胞の出現の遅れなど、異常は認められたが、心筋細胞への分化効率の低さ、さらに個体レベルでの異常の複雑さの問題から、Whsc1の分子機能の探究には不適切であると判断し、着目すべき分化異常を再検討した。これまでのヒストン修飾酵素の機能解析を越えて、転写制御に新しい概念を導く研究を目指して、核構造への関与を意識して様々なex vivo培養系を摸索した。例えばES細胞におけるWhsc1複合体に含まれるhnRNPUが網膜細胞のヘテロクロマチン形成に関与することに着目してex vivo網膜細胞分化系でWhsc1の関与を検討した。が、なかなか期待に応える明確な分化異常を示す実験系が見出せずにいた。その問題の第一は、個体および細胞レベルでWhsc1欠損による分化異常のばらつきが大きい点にあった。その問題点から遺伝子欠損によって細胞運命が変換するよりむしろ、ストレス応答によって間接的に個体差の大きな分化異常を示すのではないかと考えるに至り、転写とDNA損傷修復の分子共役を意識したB細胞分化に着目した研究に軌道修正することになった。この軌道修正に長い時間を費やした点は反省される。が、これまで数多くなされたヒストン修飾酵素欠損による個体発生・分化の異常を、安易に数個の遺伝子発現変動をピックアップして、曖昧に議論して来た現状を打破するためには、重要な研究過程であったと考える。新規の転写制御機構の解明を目指し、再構成クロマチン系を用いた実証には本

研究期間内に到達できなかったが、転写制御の枠を越えたDNA代謝制御に研究に広げることができた点を高く自己評価する。世界に先駆けて、エピゲノム制御あるいは核構造体を介した転写制御の根底に、DNA複製やDNA損傷修復などのゲノム維持機構が存在することを示しつつあることに、達成感を感じている。今後、見出した新領域から確固たる成果を継続して積上げるように励みたい。現代社会が直面している老化や発癌のエピゲノム研究をリードして行きたい。

（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）

Whsc1が転写活性領域に分布し、転写活性領域にプログラムされたDNA損傷応答に特異的に関与し、転写とDNA損傷応答を共役させるという新規のDNA代謝制御仮説を提唱した。仮説の検証のために、リンパ球B細胞に着目してWhsc1の機能解析を試み、その結果、Whsc1の欠損によりB細胞分化が抑制され、抑制の原因は細胞分化に伴う組換え修復異常によることが明らかになった。また、Whsc1ノックアウトによる増殖阻害がp53ノックアウトで解除されることを見出し、Whsc1が内在性のDNA損傷に対処するための分子であることを示した。当初研究の方向性に関し紆余曲折はあったが、焦点が絞られてその機能に迫りつつあるのは評価できる。しかしまだおさえるべき点が多々ある。転写制御に伴う内在性のDNA損傷修復に関して、ゲノム損傷への影響が間接的なものである可能性が排除できないこと、B細胞以外での機序が未解明なこと、ヒストンメチル化の機能など、具体的な分子機構を明らかにするためには複合体の解析が必要なことなど、もう少し抑える重要なポイントがあるような印象を持っている。提案に新規性があるので今後の発展に期待したい。

５．　主な研究成果リスト

（１）論文（原著論文）発表

1. Kashiwagi K., Nimura K., Ura K. and Kaneda Y. DNA methyltransferase 3b preferentially associates with condensed chromatin. ***Nucleic Acids Res.***, 39, 874-888, 2011
2. Hartlerode A., Guan Y., Rajendran A., Ura K., Schotta G., Xie A., Shah J. and Scully R. Impact of histone H4 lysine 20 methylation on 53BP1 responses to chromosomal double strand breaks, ***PLoS ONE***, 7, e49211, 2012
3. Shirakawa T., Yaman-Deveci R., Tomizawa S., Kamizato Y., Nakajima K., Sone H., Sato Y., Sharif J., Yamashita A., Takada-Horisawa Y., Yoshida S., Ura K., Muto M., Koseki H., Suda T., Ohbo K. An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to transition from an undifferentiated Kit-negative to a differentiating Kit-positive identity. ***Development***, 140, 3565-3576, 2013.
4. Sarai N., Nimura K., Tamura T., Kanno T., Patel M.C., Heightman T. D., Ura K. and Ozata K. WHSC1 links transcription elongation to HIRA-mediated histone H3.3 deposition in activated genes. ***EMBO J.***,32, 2392-2406, 2013

5. Machida S., Takaku M., Ikura M., Sun J., Suzuki H., Kobayashi W., Kinomura A., Osakabe A., Tachiwana H., Horikoshi Y., Fukuto A., Matsuda R., Ura K, Tashiro S., Ikura T., Kurumizak H. Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. *Sci. Rep.* 4, 4863, 2014

（2）特許出願

研究期間累積件数:0 件

（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）

主要な学会発表

- 浦　聖恵“ヒストン H3K36 メチル化酵素による転写制御と疾患”日本分子生物学会第 10 回春期シンポジウム, 松島, 2010, 6.　（招待講演）
- 浦　聖恵 “再構成クロマチンから疾患モデルマウスを用いたヒストン多種多様性の生物学的意義の探求” 構造エピジェゲノム研究会第3回ワークショップ, 横浜, 2011,4.（招待講演）
- Ura K. “A histone H3 lysine 36 methyltransferase links developmental transcription factors to Wolf-Hirschhorn syndrome.” International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, 淡路島, 2011, 1.（招待講演）
- Ura K. “Role of histone methylation and histone variants in developmental gene regulation.” CDB Symposium 2011, 神戸, 2011, 3.（招待講演）
- 浦　聖恵 “再構成クロマチンから疾患モデルマウスを用いたヒストン多種多様性の生物学的意義の探求” 構造エピジェゲノム研究会第3回ワークショップ, 横浜, 2011, 4.（招待講演）
- 浦　聖恵 “ヒストンの多種多様性を介したエピジェネティク制御” 第5回日本エピジェネティクス研究会年会シンポジウム, 熊本, 2011, 5.（招待講演）
- Ura K. “Regulation and Function of Histone Diversity in Development and Disease.”第 11 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ, 大阪, 2011, 6.（招待講演およびオーガナイザー）
- Ura K. Regulation and Function of Histone Diversity in Development Gene Regulation. 第 35 回日本分子生物学会, 横浜 2011, 12.
- Ura K. Yokota T, Kajio M, Iwama A and Kaneda Y. “Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 controls the programmed DNA-damage response during V(D)J recombination” The 8th 3R Symposium, Awaji 2012, 11.（口頭発表選出）
- Ura K. “Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 controls the programmed DNA-damage response.”第 65 回日本細胞生物学会、シンポジウム, 2013, 6.
- Ura K. “Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 links transcription and DNA damage repair.” International Conference, Replication, Repair and Transcription, Kyoto 2014, 2.
- Ura K. Histone H3 lysine 36 methyltransferase controls the programmed DNA-damage respons. 第 5 回日米 DNA 修復会議, 鳴門 2014, 10.
- Ura K. “Histone H3 lysine 36 methyltransferase controls the programmed DNA-damage

response." the 5th meeting of the Asian Forum of Chromosome and Chromatin Biology, India. 2015

研 究 報 告 書

「発生を制御するヒストン修飾動態の in silico 解析」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成22年10月～平成27年3月
研 究 者： 夏目 やよい

1. 研究のねらい

DNA はヒストンと呼ばれるタンパク質によって巻き取られており、ヌクレオソームと呼ばれるコンパクトな構造を作って核内に格納されている。ヒストンは単体ではなく、4種類のヒストン（H2A, H2B, H3, H4）が2つずつ集まって形成した8量体を一つの単位として機能しているが、このヒストンのアミノ酸残基が修飾を受けることで転写などの生命現象が制御されていることが明らかになってきている。例えば、H3K4me3（H3 の4番目のリジンがトリメチル化を受けている）や H3K27ac（H3 の 27 番目のリジンがアセチル化を受けている）は、転写がおこなわれている領域で見られるのに対して、H3K27me3（H3 の 27 番目のリジンがトリメチル化を受けている）は転写が不活化されている領域で見られる。しかし、ヒストン修飾は動的な変化であり、また種類や修飾部位も豊富であるため、未だ不明な点が多い。

近年における次世代シークエンサーの普及は生物学研究に大きな影響を与えた。例えば、クロマチン免疫沈降法と次世代シークエンサーを組み合わせた ChIP-seq によって、興味のあるタンパク質がゲノム上のどこにあるのかを検出することができる。また、RNA の大量並列シークエンシングによって、どの転写産物がどのくらいあるのかを定量的に検出することができる。これらの実験手法の普及に伴って大量のデータが公開されるようになった。modENCODE プロジェクト（ショウジョウバエを含むモデル動物であらゆる配列に関わる情報を収集することを目指している）によってショウジョウバエが卵から成虫になるまでの発生段階でどのヒストン修飾がゲノム上のどこで起きているのか、そのとき転写産物はどのくらいあるのかといった実験結果が入手可能となった。しかし、全ゲノム解析は一つの実験データでも膨大な情報量を含み、複数の異なる実験データを統合して一つの仮説を得るプロセスは困難を極める。そこで本研究では、大量のデータから意味のある情報を探し出すことを目的として発展した情報科学の機械学習と呼ばれる分野に注目した。modENCODE プロジェクトの ChIP-seq データ、RNA-seq データ、更に他のデータベースといった異なる性質の情報統合に機械学習の手法を適用し、ヒストン修飾がショウジョウバエ発生に伴ってどのように変化していくのか（ヒストン修飾の動的変化パターンの検出）、その生物学的意義は何なのか（ヒストン修飾の動的変化に関与する非コード RNA の探索）を明らかにすることを目標に定めた。

2. 研究成果

（1）概要

Spectral learning を用いた隠れマルコフモデル（Daniel H et al., *Journal of Computer and System Sciences* (2012) 78 (5): 1460-1480）を応用して、ChIP-seq の時系列データからヒストン修飾の動的変化パターンを検出する解析手法を構築した。更に、ASH1 標的遺伝子における既知の動的変化を検出することに成功した。この手法を用いたゲノムワイド解析をおこなう

ためには、あらかじめ類似パターンを持つと考えられる遺伝子を大まかに分類する必要がある。そこで、その分類基準としてコアプロモーターエレメントの組み合わせを選択した。コアプロモーターとは転写に最低限必要な DNA 配列を指し、この領域内に存在する生物間でよく保存された DNA モチーフをコアプロモーターエレメントという。ショウジョウバエのコアプロモーターエレメントのデータベースから、コアプロモーターエレメント（TATA box、DPE）の有無に従って分類されたコアプロモーターの DNA 配列を入手し、ChIP-seq データからヒストン修飾（H3K4me3、H3K27ac、H3K27me3）が起きている割合をコアプロモーター領域およびその転写領域で計算した。このヒストン修飾の割合が時系列でどのように変化するかを比較したところ、TATA box を持たないグループでは経時的変化が小さいのに対して、TATA box を持つグループでは変化が大きいことが示された。また、RNA-seq データと統合して回帰分析をおこなった結果、TATA box を持たないグループではヒストン修飾の割合で RNA 量を説明できることが示されたのに対して、TATA box を持つグループではヒストン修飾で RNA 量を予測できない群が混ざっていた。更に、各グループ間でヒストン修飾の相対的な頻度を比較した結果、DPE を持つグループでは H3K27me3 の使用頻度が高いことが示された。この結果をもとに、既に構築した解析手法を用いて、TATA box を持ちヒストン修飾が起きているコアプロモーターにおけるヒストン修飾の動的変化パターンの解析を進めようとしている。

（２）詳細

研究テーマ A「modENCODE データのプロセシング」

　第１年度実施予定であり、研究テーマ B の準備にあたる。用いた modENCODE データセット（GSE15292）には、810 の ChIP-chip データ、114 の ChIP-seq データ、12 の RNA-seq データが含まれている。これらのうち、H3K4me3、H3K9ac、H3K9me3、H3K27ac、H3K27me3、RNA polymerase II の全 ChIP-seq データと RNA-seq データの生データをダウンロードし、リードのクオリティチェック（ChIP-seq,RNA-seq）やマッピング（ChIP-seq、RNA-seq）、ピーク検出（ChIP-seq）、転写産物の定量（RNA-seq）をおこなうための条件検討をおこなった。また、ChIP-chip データについてはプロセッシング済みデータをダウンロードし、ChIP-seq データとの統合を図ったが、条件検討の末に ChIP-seq データのみを用いることとした。

研究テーマ B「発生段階におけるヒストン修飾の動的変化の検出」

　まず、ChIP-seq の時系列データを用いて、ヒストン修飾の動的変化パターンを検出する解析手法を構築した。初めに、既に遺伝子発現の動的変化パターンを検出する目的で開発・報告されている変法隠れマルコフモデル（Yoneya T and Mamitsuka H, *Bioinformatics* (2007) 23 (7): 842-849.）を用いて、ASH1 標的遺伝子における既知の動的変化を検出するできることを確認した。次に、更に精度を改良するため、spectral learning を用いた隠れマルコフモデル（Daniel H et al., *Journal of Computer and System Sciences* (2012) 78 (5): 1460-1480）を応用して新規の手法を開発した。これについても既知の動的変化を検出することに成功し、精度が上がったことを確認することができたため、ゲノムワイド解析に取りかかることにした。これに際して、あらかじめ類似パターンを持つと考えられる遺伝子を大まかに分類する必要があり、その分類基準として RNA-seq の時系列データにおける遺伝子発現の変動を予定していたがクラスタリングが期待通りの結果にならなかった。そこで、別の分類基準の候補としてコア

プロモーターエレメントの組み合わせを選択した。コアプロモーターとは転写に最低限必要なDNA 配列を指し、この領域内に存在する生物間でよく保存された DNA モチーフをコアプロモーターエレメントという。ショウジョウバエのコアプロモーターエレメントのデータベースから、コアプロモーターエレメント(TATA box、DPE)の有無に従って分類されたコアプロモーターのDNA 配列を入手し、ChIP-seq データからヒストン修飾(H3K4me3、H3K27ac、H3K27me3)が起きている割合をコアプロモーター領域および転写領域で計算した。得られたグループは、i) Inrグループ:TATA box も DPE も持たず、Inr のみを有するコアプロモーターのグループ、ii) DPEグループ:DPE と Inr を持ち、TATA box は持たないグループ、iii) TATA グループ:TATA boxと Inr を持ち、DPE は持たないグループ、iv) TATA-DPE グループ:TATA box、DPE、Inr の全てを持つグループ、の4通りである。これらのグループにおいてヒストン修飾の割合が時系列でどのように変化するかを比較したところ、TATA box を持たないグループでは経時的変化が小さいのに対して、TATA box を持つグループでは変化が大きいことが示された。

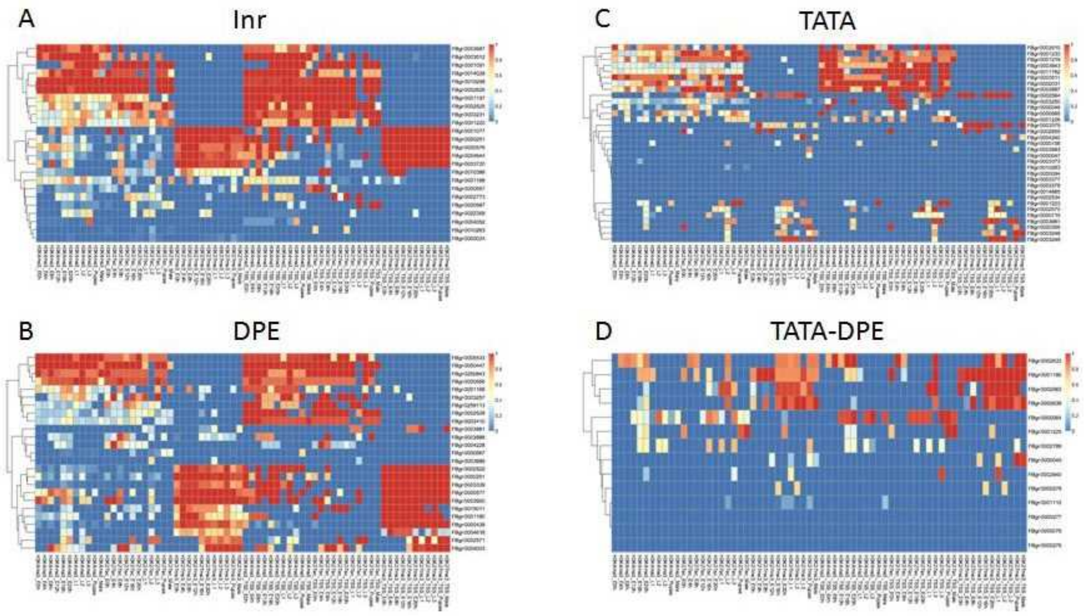


図:各コアプロモーターエレメントグループにおけるヒストン修飾の割合

縦軸にコアプロモーターがアサインされている遺伝子、横軸にヒストン修飾(左から順にH3K4me3(転写領域)の胚 0-4 時間～成虫雄、H3K27ac(転写領域)の胚 0-4 時間～成虫雄、H3K27me3(転写領域)の胚 0-4 時間～成虫雄、H3K4me3(コアプロモーター領域)の胚 0-4 時間～成虫雄、H3K27ac(コアプロモーター領域)の胚 0-4 時間～成虫雄、H3K27me3(コアプロモーター領域)の胚 0-4 時間～成虫雄)。赤いほどヒストン修飾が起きている領域の割合が高い。Inr グループと DPE グループでは発生段階の進行に伴う変化が小さいことがわかる。

また、RNA-seq データと統合して回帰分析(目的変数:RNA 発現量、説明変数:ヒストン修飾の割合)をおこなった結果、TATA box を持たないグループではクロスバリーデーションにおいて測定値(RNA-seq の実験結果)と予測値(回帰式にヒストン修飾の割合を代入して得られた値)の間に期待通り正の相関があり、ヒストン修飾の割合で RNA 量を説明できることが示されたのに対して、TATA box を持つグループでは上記のような群の他に、ヒストン修飾が検出

されていないにも関わらず測定値が予測値から大幅に外れる群が混ざっていた。更に、各グループ間でヒストン修飾の相対的な頻度を比較した結果、DPE を持つグループでは H3K27me3 の使用頻度が高いことが示された。この結果をもとに、既に構築した解析手法を用いて、TATA box を持ちヒストン修飾が起きているコアプロモーターにおけるヒストン修飾の動的変化パターンの解析を進めようとしている。

研究テーマ C「ヒストン修飾の動的変化に関与する非コード RNA の探索」
　残念ながらさきがけ研究期間中に研究テーマ C に至ることができなかった。研究テーマ B で開発した解析手法はこのテーマも念頭に入れてつくったものであるため、研究テーマ C についても今後の目標にしたい。

3.　今後の展開

　今後は、これまでに見いだしたヒストン修飾の動的変化と CPE の関連性をふまえ、既に構築した解析手法を用いて、ゲノムワイドにヒストン修飾が起きている TATA グループにおけるヒストン修飾の割合からヒストン修飾動的変化パターンの検出とその生物学的意義の解明を目指す。また、TATA box を持つコアプロモーターで見られたヒストン修飾非依存的な転写とも言える現象は実際にどのような意味を持つのかなど、ヒストン修飾と CPE の関係性についてより詳細に調べたい。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

　当初の研究構想は、研究テーマ A: ChIP-seq データと RNA-seq データのプロセッシング、研究テーマ B: ショウジョウバエ発生段階におけるヒストン修飾の変化を検出、研究テーマ C: B で見いだしたヒストン修飾の変化に関与する非コード RNA の探索となっていた。

　現時点までに、研究テーマ B に必要な新規解析手法の開発が終了し、ゲノムワイド解析の条件を見つけ出す段階まで達成した。その過程でコアプロモーターエレメントとヒストン修飾の関連性といった新規性の高い発見をすることができた。この発見については現在論文投稿準備中であり、研究テーマ B のゲノムワイド解析の方向性についても見いだすことができた。さきがけ研究期間中に研究目標を達成することはできなかったが、提案した研究テーマが軌道に乗ってきたことについては評価したい。研究費は主にコンピュータと出張費に使用した。受け入れ研究室では情報科学の議論、さきがけ領域では生物学の議論の機会に恵まれ、更に海外や国内の学会に参加する機会を多く与えられて情報生命科学の議論もすることができた。本研究のアプローチは類似研究が少なく、期待される研究成果をあげることによって今後コンピュータ解析を積極的に取り入れた研究の有効性を示すことができると考えている。これまでの手厚いサポートにふさわしい研究成果につなげていきたい。

（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）

隠れマルコフモデルを用いる前に予め類似パターンを持つと考えられる遺伝子を分類し、その基準としてコアプロモータエレメントの組み合わせを選択した。その結果、TATA boxを持たないグループではヒストン修飾の経時的変化が小さいのに対し、TATA boxを持つグループでは変化が大きいこと、また、TATA boxを持たないグループではヒストン修飾の割合でRNA量が説明できることなどが分かった。さらに、DPEを持つグループではH3K27me3の使用頻度が高いことも分かった。これらの結果をもとに、TATA boxを持ち、ヒストン修飾が起きているコアプロモーターにおけるヒストン修飾の動的パターンの解析を進めことになる。長い試行錯誤の結果、新規解析手法の開発が終了し、ゲノムワイド解析の条件を見つけ出す段階に達した。隠れマルコフモデルによる機会学習により法則性を見つけたり予測したりするのはまだこれからである。数理解析や情報解析は今後医学生物学初め様々な分野で益々重要になる中、明確な目標を掲げ新規の発見に導くような手法を開発してくれることを期待します。

5．　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

（2）特許出願

研究期間累積件数：0件

（2）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）

- 「*In silico* analysis of histone modification dynamics at Ash1 binding regions in *D.melanogaster*」 13th Annual International Workshop on Bioinformatics and Systems Biology 2013 年 7 月 31 日－8 月 2 日、京都（日本）
- 「Detection of timing-differences in histone modification at Ash1 target genes」 ECOMB/ISCB 2013 Conference on Regulatory & Systems Genomics with DREAM Challenges 2013 年 11 月 8－12 日、トロント（カナダ）
- 「Detection of histone modification dynamics at Ash1 target genes」 Next Generation Sequencing Conference (NGS) 2014 2014 年 6 月 2-4 日、バルセロナ（スペイン）
- 京都大学化学研究所広報誌「黄檗第３９号」研究トピックス（さきがけプロジェクト研究活動紹介）

研　究　報　告　書

「免疫細胞の運命維持におけるエピジェネティック制御機構」

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：　 伊川　友活

１．　研究のねらい

T 細胞および B 細胞は感染防御において互いに協調し合いながら重要な役割を果たす。T および B 細胞がその機能を発揮するためには分化・成熟過程においてそれぞれの細胞の運命が厳格に制御・維持されなければならない。この維持にはクロマチンレベルのエピジェネティックな転写制御が必要であると考えられるが詳細は明らかでない。我々は最近、ポリコーム群タンパクが T 細胞の分化過程および成熟後の維持に不可欠であることを見いだした（未発表）。驚くべき事にポリコームタンパク複合体の構成分子である *Ring1A* および *Ring1B* を欠いた T 細胞は B 細胞へ運命転換されることが明らかとなったのである（図１）。本研究ではこのポリコームタンパクによる T 細胞系列のアイデンティティーの確立及び安定性維持機構を解明することを目的とする。本研究により免疫細胞の運命維持におけるエピジェネティック制御機構が明らかになるだけでなく、将来的に白血病発症機序の解明、免疫細胞を用いた新しい細胞療法の開発に結びつくと考えられる。

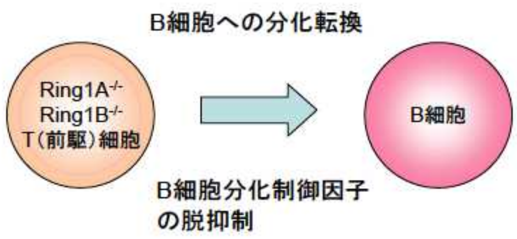


図１．Ring1A$^{-/-}$Ring1B$^{-/-}$ T（前駆）細胞のＢ細胞への運命転換

２．　研究成果

（1）概要

本研究では *Ring1A/B* ダブルノックアウトマウスの胸腺細胞を用いてポリコームタンパクが T 細胞の生成過程においてその運命の確立・維持にどのように関わっているかを明らかにすることを目的に研究を行った。まず、*Ring1A/B* の T 細胞分化における機能を明らかにするために、Lck-CRE トランスジェニック（Tg）マウスと *Ring1A*$^{-/-}$ *Ring1B*$^{flox/flox}$ マウスを掛けあわせることによりＴ細胞特異的 *Ring1A/B* コンディショナルノックアウト（cKO）マウスを作成した。このマウスの胸腺を解析したところ、T 細胞分化が未分化な段階で顕著に阻害されていた。次にこのマウスの T 前駆細胞の分化能を調べるために、放射線照射した NOG マウスへ移植したところ、驚いたことに移植後４～６週後に骨髄および脾臓においてＢ細胞様細胞が検出された。この細胞がＴ細胞由来であるかどうか確かめるためにゲノム DNA の遺伝子再構成の状態を調べた。その結果、運命転換された B 細胞では免疫グロブリン（Ig）の D_H-J_H、V_HD_H-J_H、Vκ-Jκ2、 Vκ-Jκ5 および Vλ1-Jλのすべての遺伝子座においてオリゴクローナルな遺伝子再構成が認められた。また、同様に T 細胞受容体（TCR） Dβ-Jβ2.6、Vβ-Jβ2.6 についても多様

な再構成バンドが検出された。このことは既に TCRβ鎖遺伝子再構成を開始していた、すなわち T 系列へ運命決定されていた T 前駆細胞が B 細胞へ運命転換し、多様な遺伝子再構成パターンを持つ B 細胞クローンを生成していることを示している。次に運命転換された B 細胞の機能を調べるために、Cdkn2a, Ring1A/B TKO マウス胸腺の T 前駆細胞を移植した NOG マウスから脾臓の B 細胞を採取し、CSFE ラベルした後 LPS によって刺激した。培養4日後に細胞を回収し FACS を用いて解析したところ、この B 細胞は正常な脾臓 B 細胞と同様の増殖を示した。また、培養液中に IgM 抗体を産生していた。従って *Ring1A/B* 欠失により運命転換された B 細胞は、少なくとも *in vitro* において B 細胞として一定の機能を有することが明らかとなった。最後に T 細胞分化における Ring1A/B の役割を明らかにするために、LckCRE-Ring1A$^{-/-}$Ring1B$^{fl/fl}$ Pax5$^{fl/fl}$(TKO)マウスを作成し、このマウスの胸腺および脾臓細胞を FACS によって解析した。驚いたことに胸腺細胞数はコントロールの Ring1A$^{-/-}$Ring1B$^{fl/fl}$ マウスとほぼ同程度まで回復していた。このことから T 細胞分化においては転写因子 Pax5 が Ring1A/B の重要な標的遺伝子の一つであることが明らかとなった。

（2）詳細

1） T 細胞特異的 *Ring1A$^{-/-}$Ring1B$^{flox/flox}$* コンディショナルノックアウト（cKO）マウスの作成および解析

Ring1A/B の T 細胞分化における機能を明らかにするために、T 細胞特異的に CRE タンパクを発現する Lck-CRE トランスジェニック（Tg）マウスと *Ring1A$^{-/-}$Ring1B$^{flox/flox}$* マウスを掛けあわせることにより *Ring1A/B* コンディショナルノックアウト（cKO）マウスを作成し解析を行った。このマウスから T 細胞を作る器官である胸腺を採取し、胸腺細胞を T 細胞分化マーカーである CD4 および CD8 で染色した。これをフローサイトメーター（FACS）により解析すると *Ring1A* 単独の欠損マウスでは T 細胞分化に全く異常が認められなかったのに対して *Ring1A/B* cKO マウスでは、T 細胞分化が未分化な CD4^{-}CD8^{-} (Double negative: DN)段階で顕著に阻害されていた（図2）。この変異マウス由来胸腺細胞の遺伝子発現プロファイルを正常な胸腺細胞と比較したところ、ポリコームタンパクのターゲットである *p16^{Ink4a}/p19^{Arf}* の脱抑制と共に、B 細胞分化に必須の転写因子である Ebf1、Pax5 及び B 細胞特異的遺伝子（*Cd79a*, *Cd79b*, *VpreB1*, ・・・・など）の脱抑制が見られた。さらに変異マウス胸腺細胞では細胞表面に B 細胞特異的マーカーである CD19 の発現が認められた。そこでこの胸腺 T 前駆（DN3）細胞の B 細胞への分化能を調べるために LckCre-*Cdkn2a$^{-/-}$Ring1A$^{-/-}$Ring1B$^{fl/fl}$* TKO マウスより採取した胸腺 DN3 細胞を放射線照射した免疫不全マウス（NOG マウス）に移植した。4週間後にマウスを解析したところ、驚くべき事に、骨髄および脾臓から胸腺細胞由来の B 細胞が検出された。この細胞は表面に IgM を発現していたが TCR の発現は認められなかった（図3）。さらに DN3 細胞だけでなくより分化の進んだ CD4^{+}CD8^{+} (Double positive: DP)細胞を移植しても同様の結果が得られ

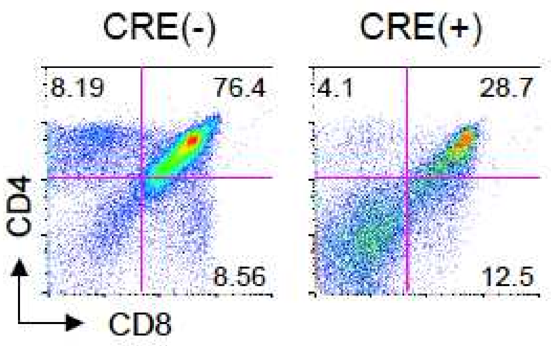


図２． LckCre-Ring1A$^{-/-}$Ring1B$^{fl/fl}$ マウス

た。この結果はポリコームタンパクが T 細胞としてのアイデンティティーの確立・安定性維持に必須であることを示唆している。

次にポリコームタンパクの DP 段階以降の役割を明らかにするために Lck-CRE Tg マウスの代わりに CD4-CRE Tg マウスを用いて解析した。CD4CRE-*Ring1A*$^{-/-}$*Ring1B*$^{fl/fl}$ マウスの胸腺、脾臓を調べたところ、いずれにおいてもＴ細胞分化は正常で殆ど異常が認められなかった。この結果は DP 段階以降の分化・成熟に Ring1A/B は必須でないことを示している。

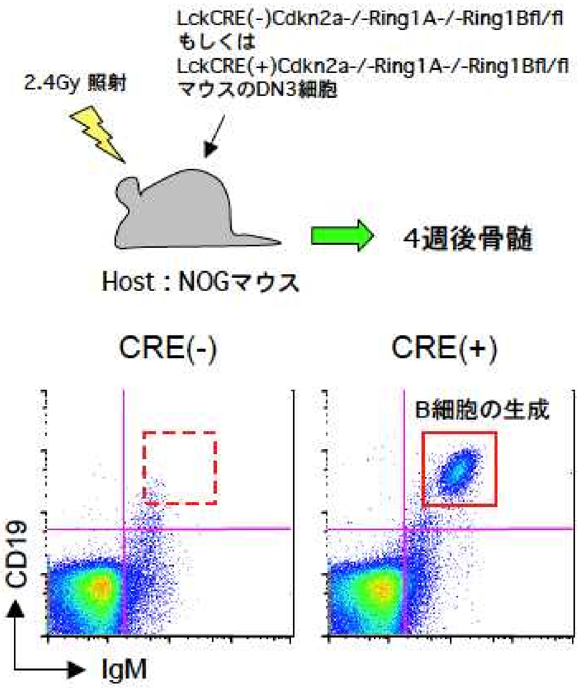


図３： LckCRE-Cdkn2a$^{-/-}$ Ring1A$^{-/-}$ Ring1B$^{fl/fl}$ マウスの胸腺Ｔ前駆細胞からＢ細胞への運命転換

2)運命転換された B 細胞の遺伝子再構成の解析

以上の解析から Ring1AB Cdkn2a TKO マウスの胸腺Ｔ前駆細胞はＢ細胞へ運命転換することが示唆された。しかし、このＢ細胞が本当にＴ細胞由来であるかどうか明らかではない。そこで運命転換した B 細胞からゲノム DNA を精製し、PCR 法を用いて TCRβ 鎖及び IgH, IgL 鎖の遺伝子再構成を調べた。まず、IgH 鎖 D_H–J_H、V_HD_H–J_H、および IgL 鎖 Vκ–Jκ、Vλ–Jλ,について解析を行った。その結果、運命転換された B 細胞では D_H–J_H、V_HD_H–J_H、Vκ–Jκ2、 Vκ–Jκ5 および Vλ1–Jλのすべての遺伝子座においてオリゴクローナルな遺伝子再構成が認められた。また、同様に TCR Dβ–Jβ2.6、Vβ–Jβ2.6 についても解析したところ、いずれにおいても多様な再構成バンドが検出された。このことは、運命転換の頻度は低いものの、既に TCRβ鎖遺伝子再構成を開始していた、すなわち T 系列へ運命決定されていた T 前駆細胞が B 細胞へ運命転換し、多様な遺伝子再構成パターンを持つ B 細胞クローンを生成していることを示している。さらに、この運命転換をよりはっきりと証明するために TCRβ 鎖および IgH 鎖の両方の遺伝子再構成を1個の細胞から検出する実験系を開発し、少なくとも5クローンにおいて両方の遺伝子座の遺伝子再構成を検出することに成功した。このことは T 前駆細胞が B 前駆細胞へ運命転換したことを確証している。

3) 運命転換された B 細胞の機能解析

運命転換された B 細胞の機能を調べるために、Cdkn2a, Ring1A/B TKO マウス胸腺の DP 細胞を移植した NOG マウスから脾臓の B 細胞を採取し、CSFE ラベルした後 LPS によって刺激した。培養4日後に細胞を回収し FACS を用いて解析したところ、この B 細胞は正常な脾臓 B 細胞と同様の増殖を示した。また、培養液中の抗体量を解析したところ、IgM 抗体を産生していた。しかし IgG 抗体は検出されなかったことから、ポリコームタンパクがクラススイッチに重要であることが示唆された。従って *Ring1A/B* 欠失により運命転換された B 細胞は、少なくとも

in vitro においてB細胞として一定の機能を有することが明らかとなった。

4) 胸腺T細胞におけるRing1BのChIP解析

T細胞分化におけるRing1Bの機能を更に詳しく調べるために、正常なマウスより胸腺T細胞を採取し、網羅的なクロマチン免疫沈降(ChIP-on-chip)解析を行った。Ring1B の EBF1, PAX5, IRF4およびIRF8遺伝子の転写制御領域への結合を調べたところ、いずれも胸腺T細胞において高い結合が認められた。同様にH3K4me3の割合を調べたところ、EBF1領域には比較的高い頻度で認められたものの、それ以外の領域には認められなかった。一方、ポリコームタンパクが制御していることが知られているH3K27me3はすべての遺伝子の転写調節領域において認められ、Ring1B の結合と一致していた。これら B 細胞関連遺伝子座における Ring1B の結合および H3K27me3 の結果は ChIP-PCR によっても確認された。このことはEBF1, PAX5, IRF4およびIRF8の発現が正常な胸腺T細胞ではほとんど認められないことと一致している。これらの結果から胸腺T細胞ではRing1Bが少なくともEBF1, PAX5, IRF4およびIRF8の発現を直接制御することによって、B細胞への運命転換を抑制していることが示唆された。

5) LckCRE-Ring1A$^{-/-}$Ring1B$^{fl/fl}$マウスとPax5 $^{fl/fl}$マウスを掛け合わせるとT細胞分化は回復するか?

これまでの解析から、T 細胞分化過程におけるポリコームのターゲット遺伝子の一つとして Pax5 が示唆された。そこで T 細胞分化における Ring1A/B の役割を解析するために、LckCRE-Ring1A$^{-/-}$Ring1B$^{fl/fl}$ Pax5$^{fl/fl}$(TKO)マウスを作成し、このマウスの胸腺および脾臓細胞をFACSによって解析した。驚いたことに胸腺細胞数はコントロールのRing1A$^{-/-}$Ring1B$^{fl/fl}$マウスとほぼ同程度まで回復していた。またT細胞の各分化段階(DN, DP, CD4SP, CD8SP)の割合をコントロールの Ring1A$^{-/-}$Ring1B$^{fl/fl}$マウスと比較したところ、いずれにおいても殆ど差が認められなかった。さらに脾臓のT細胞についても同様に解析したところ、コントロールと同程度の成熟T細胞が認められた。このことからT細胞分化においてはPax5が Ring1A/Bの重要な標的遺伝子の一つであることが明らかとなった。

3. 今後の展開

以上の結果から、ポリコームタンパクがPax5の発現を抑制することによりT細胞系列へ決定後の運命維持に重要な働きをすることが明らかとなった。ただし、ポリコームが重要なのは胸腺 DP 細胞段階までで、これ以降は必須でない。今後は Ring1AB-DKO, Ring1AB Cdkn2a-TKOおよびRing1AB Pax5-TKOの胸腺細胞の遺伝子発現を比較することにより、ポリコームの機能を明らかにしたい。現在行なっているRNA-SeqとChIP-Seq解析を組み合わせることにより、正常な T 細胞分化過程において、あるいはポリコームを欠損させることによって起こるB細胞への分化転換過程においてエピジェネティックな変化がどのように起こっているのかを網羅的に解析する。また、ポリコームの標的遺伝子としてEBF1も予想されるが、EBF1KOマウスと Ring1A/B DKOマウスを掛け合わせることにより、PAX5と同様にT細胞分化が回復するのかどうか検討する。このようにしてT細胞とB細胞が生成される過程でポリコームがどのよ

うに働いているのかを明らかにしたい。また、ポリコームは白血病との関連も示唆されているので将来的には白血病の発症機構の解明に結びつくように努力したい。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

本研究では *Ring1A/B* ダブルノックアウトマウスの胸腺細胞を用いてポリコームタンパクが T 細胞の生成過程においてその運命の確立・維持にどのように関わっているかを明らかにすることを目的に研究を行った。上記の通り、*Ring1A/B* ダブルノックアウトマウスの T 前駆細胞は B 細胞へ運命転換することが明らかとなった。また、転写因子である Pax5 が T 細胞分化におけるポリコームタンパクの最も重要な標的遺伝子の1つであることも明らかとなった。途中、実験系の確立やマウスの掛け合わせなどに予想以上に時間がかかる部分もあったが、ほぼ当初の計画通り、データを得ることができた。研究費も予定通り執行された。現在論文を作成しており、投稿の準備中である。今後速やかに publish 出来るよう努力したい。また、このさきがけ領域では様々な仲間と出会い、見聞を広めることができた。領域内での共同研究も進行中である。今後は細胞分化におけるエピジェネティック制御機構の解明に取り組み、免疫細胞にとどまらず、様々な細胞の分化・発生過程にポリコームを含めたエピジェネティクスがどのように関与しているのか明らかにしたい。また、正常な分化過程から逸脱した白血病などがんの発症機構の解明にも取り組み、新しい治療法の開発に結びつくよう努力したい。

(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)

T 細胞および B 細胞がその機能を発揮するためには分化・成熟過程においてそれぞれの細胞の運命が厳格に制御・維持されなければならない。しかしその詳細は明らかでなかった。伊川氏はポリコーム群タンパクが T 細胞の分化過程及び成熟後の維持に不可欠であることを見出した。ポリコーム(PRC1)の構成因子である Ring1AB のノックアウトマウスが、T 細胞から B 細胞への運命転換の表現型を示したのである。また、ポリコームの重要な標的として Pax5 を同定した。このことより、ポリコームが T 細胞の分化状態の維持に必要であることの発見、また、免疫細胞の細胞系譜決定の機構の一つを解き明かしたその功績は大きい。伊川氏は免疫に限らず細胞の分化・発生過程のエピジェネティックなメカニズムに関心があり、研究レベルも高く、その解明は基盤的研究なのでいずれ治療に結びつく社会・経済的波及効果が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Ikawa T. Genetic and epigenetic control of early lymphocyte development. *Curr Top*

	Microbiol Immunol. 2014 381:1-20
2.	Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Nakayama M, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi, Tajima S, Matsumoto H, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. ***Nat Immunol.*** 2014 15: 571-579
3.	Okuyama K, Ikawa T, Gentner B, Hozumi K, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A. MicroRNA-126-mediated control of cell fate in B-cell myeloid progenitors as a potential alternative to transcription factors. ***Proc Natl Acad Sci USA.*** 2013 110: 13410-13415
4.	Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S, Koseki H, Kawamoto H. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells. ***Cell Stem Cell.*** 2013 12: 31-36,
5.	Seo W, Ikawa T, Kawamoto H, Taniuchi I. Runx1-Cbfb facilitates early B lymphocyte development by regulating expression of Ebf1. ***J Exp Med.*** 2012 209 1255-1262

（2）特許出願

研究期間累積件数：0件

（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）

学会発表：

- **伊川友活** “ポリコーム群タンパク Ring1A/B は Pax5 の発現を抑制することにより T 細胞系列へ決定後の運命を維持する”Kyoto T cell Conference 2014 年 5 月 16 日　京都市
- **Ikawa T** “Polycomb group proteins Ring1A/B are required for the maintenance of T cell fate.” Gene expression & signaling in the immune system. 2014 年 4 月 22 日　コールドスプリングハーバー、アメリカ
- **Ikawa T** “Maintenance of T cell identity by Polycomb group proteins.” RIKEN Epigenetics in Yokohama 2014 年 2 月 17 日　横浜市
- **Ikawa T** “Maintenance of T cell identity by Polycomb group complexes.” 日本免疫学会 2013 年 12 月 12 日　千葉市
- **Ikawa T** “Roles of Polycomb group proteins in the maintenance of T cell fate.” 15th International Congress of Immunology. 2013 年 12 月 12 日　ミラノ、イタリア
- **Ikawa T** “A genetic network during the T cell lineage specification.” The 6th International Workshop of Kyoto T cell conference 2013. 2013 年 6 月 3 日　京都市
- **Ikawa T** “Maintenance of T cell fate after the commitment to the T cell lineage.” 日本免疫学会 2012 年 12 月 6 日　神戸市
- **Ikawa T** “Gene regulatory networks in T cell lineage specification” FANTOM5 MEETING 2012 年 10 月 31 日　横浜市
- **伊川友活** “T 細胞系列へ決定後の運命維持機構”Kyoto T cell Conference 2012 年 7 月 6

日　京都市

- Ikawa T "Induction of myelo-lymphoid stem cells by suppressing E-protein activities." Gene expression & signaling in the immune system. 2012 年 4 月 25 日　コールドスプリングハーバー、アメリカ

招待講演:

- Ikawa T "Genetic and epigenetic control of early lymphocyte development."Max Planck Institute of Immunology and Epigenetics 2014 年 10 月 20 日　フライブルク、ドイツ
- Ikawa T "Maintenance of T cell fate by polycomb group proteins."France-Japan Immunology meeting 2014 年 10 月 23 日　カシス、フランス
- 伊川友活 「細胞分化の研究に魅せられて」新学術領域「細胞運命制御」若手の会　2014 年 4 月 18 日　浜松市
- Ikawa T "Epigenetic regulation in T cell lineage commitment." The 5th LJI & IMS-RCAI Workshop 2013 年 10 月 30 日　横浜市
- 伊川友活 「T 細胞から B 細胞へのリプログラミング」 第17回血液化学セミナー　2011 年 11 月 6 日　東京

受賞:

- 2012 年 4 月　科学技術分野の文部科学大臣表彰　若手科学者賞
- 2011 年 11 月　第6回日本免疫学会研究奨励賞

日本語文献:

- 伊川友活, 宮井智浩. B細胞系列への運命決定を制御する転写因子.臨床免疫・アレルギー科 61:704-710, 2014
- 伊川友活, 河本宏. T細胞運命決定マスター遺伝子の同定. 感染・炎症・免疫 41:81-83, 2011

研　究　報　告　書

「環境変動にともなう転移因子と宿主のゲノム応答」

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：　伊藤　秀臣

１．　研究のねらい

“動く遺伝子”トランスポゾンは様々な生物に広く存在しゲノムの主たる構成要素となっている。近年トランスポゾンがゲノムの安定化に重要な働きをしていること、近傍の遺伝子の発現を調節していることなどが報告されるにつれその生物学的な重要性が明らかになってきた。一方宿主はトランスポゾンの転移によるゲノム破壊などの悪影響を防ぐための防御機構を備えている。一つはトランスポゾンの転写を抑制することで不活性化させ転移を防ぐ機構。もう一つは転移を抑制することで世代を超えたゲノム変化を抑制する機構である。我々は先行研究で高温ストレス条件下で活性化し、RNA　干渉を担う遺伝子の変異体で、次世代に転移が伝わるトランスポゾンを同定した。このトランスポゾンは“高温”と“RNA　干渉の欠落”という条件下で、宿主の二重(転写と転移)の防御機構を免れることで、次世代に転移が伝わり自らのコピー数を増殖することに成功した。さらに、このトランスポゾンの転移は配偶子形成時期より前の体細胞組織で起ったことが示唆された。トランスポゾンの世代を超えた転移は、宿主の遺伝子情報をコントロールすることで環境に適応した個体を生じさせる原動力となり得ると考えられる。本研究の一つ目のねらいは、この活性型トランスポゾンを用いることで、環境ストレスにより活性化したトランスポゾンと宿主ゲノムにおけるエピジェネティックなゲノム変化を明らかにすることである。現在までに、活性化したトランスポゾンをもつ個体の子孫でストレス耐性を得た個体を複数得ており、この個体にどのようなエピジェネティックな変化が起きているのか調べる。本研究の二つ目の狙いは、環境ストレスで活性化したトランスポゾンについていつ、どこで転移が起るのかを明らかにすることである。そのため、シロイヌナズナの組織特異的なトランスポゾンの制御機構を明らかにする。具体的には、植物のメリステムでトランスポゾンの制御が起る可能性を考えており、本研究では特にメリステムが持つトランスポゾン制御機構の解明を目的とする。さらに「栄養成長メリステム」から「生殖成長メリステム」へと相転換に伴うトランスポゾンの制御機構について理解することを目的とする。宿主としての植物のトランスポゾン制御機構を解明することでメリステムの持つ新しい機能を理解することができると考える。

２．　研究成果

（１）概要

活性化トランスポゾンと宿主ゲノムのエピジェネティックな変化

トランスポゾンは宿主のゲノム構造を変化させ、時には宿主遺伝子を調節する重要な要素となり保存されている。そのため、トランスポゾンの転移は進化の速度を早める重要な因子であり、また生物が環境変動にさらされた際に環境適応形質を生み出す因子になり得る。本研究ではシロイヌナズナのRNA 干渉に関与する遺伝子の変異体において、高温ストレスで転移するトランスポゾン（*ONSEN*）を用いた。この転移は次世代に伝わり、転移先は遺伝子領域が８割以

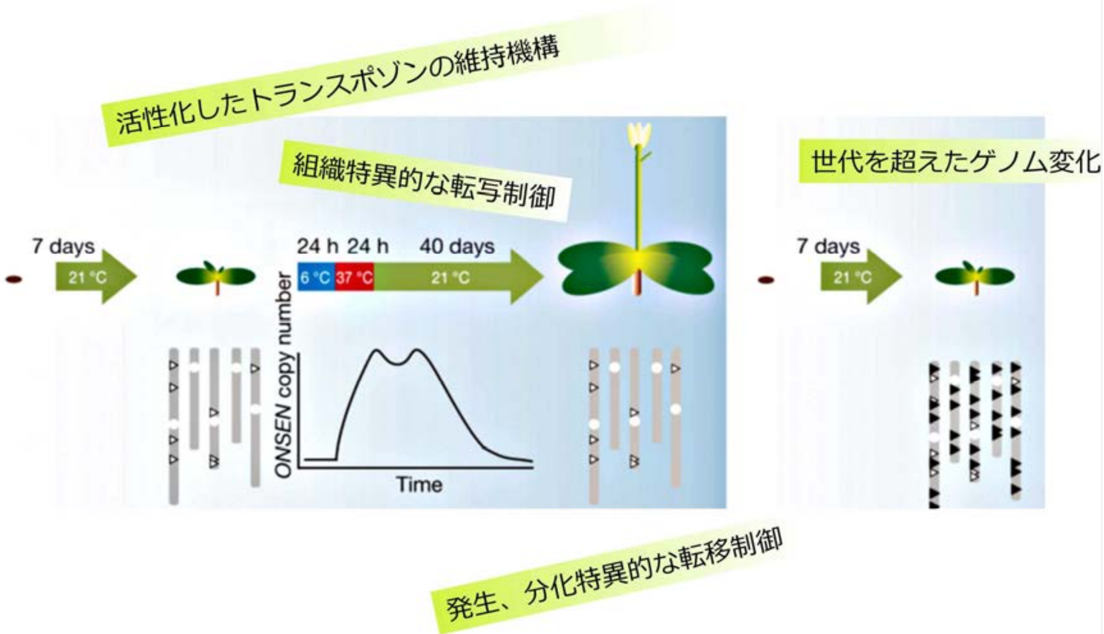
上を占めていた。トランスポゾンの転移が観察された個体のいくつかは、ストレス耐性を獲得した。このことは環境変化が生物の進化に大きな影響力を持つことを示唆している。得られたストレス耐性個体において、トランスポゾンの挿入による遺伝子発現の変化をゲノムワイドに解析した。

トランスポゾンの転移抑制機構の解析

幼少期に活性化した *ONSEN* が次世代に転移する機構を解明するために幼少期の植物に高温ストレスを与え、活性化したトランスポゾンを用いて組織特異的な転写活性を解析した。葉原基組織をレーザーマイクロダイセクションで単離し発現解析を行い組織特異的なトランスポゾンの制御系を調査した。RNA 干渉を担う遺伝子の変異体ではトランスポゾンの転移抑制機構が働かなくなっていることが予想され、そのような状態で活性化したトランスポゾンはどのような状態で維持されているのか分子遺伝学的なアプローチにより解析した。

***ONSEN* の転写制御因子の同定**

ONSEN トランスポゾンは高温ストレスにより活性化するが、その活性のメカニズムは明らかにされていなかった。また、多くのトランスポゾの転写活性が DNA のメチル化で抑制されているのに対し、*ONSEN* は DNA メチル化とは独立した機構で制御されていると考えられた。本研究では、*ONSEN* の制御因子を明らかにするため、トランスポゾンのプロモーター配列にレポーター遺伝子(GFP)を繋いだ形質転換体を作成し、植物体内でのトランスポゾンの発現解析を行った。



（2）詳細

1. 熱活性型トランスポゾンの転移による宿主ゲノムのエピジェネティック変化

シロイヌナズナの RNA 干渉を担う遺伝子の変異体に高温ストレスを与えその子孫でレトロト

ランスポゾン *ONSEN* の転移が確認された集団を作成した。集団に様々なストレスを与えることでストレス耐性個体のスクリーニングを行った。その結果、植物ホルモンであり乾燥耐性や種子の休眠に関与するアブシジン酸(ABA)に対するストレス耐性（非感受性）個体を得ることができた。次世代シーケンサーを用いた解析より、*ONSEN*の挿入をマッピングした結果、ABA ストレス関連遺伝子に *ONSEN* が挿入されていることが明らかになった。現在までにストレス耐性スクリーニングによって独立した 2 系統を得ており、それぞれ別の遺伝子に *ONSEN* の挿入が見つかった。各 *ONSEN* 挿入系統における遺伝子発現解析を行い、ABA 関連遺伝子が *ONSEN* の挿入により発現しなくなっていることを確かめた。*ONSEN* の挿入先は7割以上が遺伝子内であるが、その配列には共通のモチーフが見つからないことや、発現パターンにも共通性が無いことから、エピジェネティックな特徴があるのか調べるために、クロマチン免疫沈降法を用いてヒストン修飾を調べた。*ONSEN* が挿入された遺伝子の一つである ABI5 の 5' UTR, exon, intron 領域にヒストン H3K9ac, H3K9m2, H3K4ac, H3K4m3 の抗体を用いた免疫沈降実験を行った。高温処理の前後において野生型、polIV 変異体それぞれについて実験をおこなった結果，この領域は遺伝子を ON にするヒストン修飾を受けていることがわかったが、高温や変異体を用いた場合でも顕著なヒストン修飾の変化は見られなかった。今回さらにクロマチン免疫沈降法を用いて H3K27me3 の修飾を調べた。その結果、*ONSEN* の転移が見られる polIV 変異体に高温ストレスをかけた場合、ABI5 の 5' UTR, exon, intron 領域の H3K27me3 の修飾が減少していること傾向がみられた。

ONSEN の新たな転移が宿主の遺伝子発現に与える影響について、前回までの報告でストレスホルモンであるアブシシン酸(ABA)非感受性表現型の原因遺伝子を遺伝学的なマッピングで試みた結果、F2 世代で予測される分離比に分離しなかった。しかしながら ABA ストレス非感受性集団を自殖させた子孫集団では表現型は維持されていた。これらの結果から考えられる仮説は、ABA ストレス非感受性集団は siRNA が生成されない polIV 変異体では維持されるが、マッピングのために野生型と交配することで F1, F2 集団ではトランスポゾン由来の siRNA が生成され RNA-directed DNA methylation (RdDM)によりトランスポゾンに DNA のメチル化が起こり表現型に関与する遺伝子の発現を変化（もとに戻す）させるというものである。この仮説を検証するために、今回独立に転移が起きた 2 つの系統を用いて解析を行った。1つ目の系統では、*ONSEN* が ABI4 のエクソンに挿入されており、2 つ目の系統では ABI5 のイントロンに挿入されている。ABI4 と ABI5 は共に ABA ストレス応答遺伝子であり、ストレス環境下では ABI4 と ABI5 が発芽を抑制する。ABI4、ABI5 の変異体では ABA ストレスに非感受性となり ABA ストレス下でも発芽が見られる。発芽を指標とした F2 集団での表現型観察の結果、ABI4 に挿入された系では polIV の有無に関わらず分離集団で劣性遺伝の分離比に表現型が観察される一方、ABI 5に挿入された系では polIV 変異体下でしか表現型が観察できなかった。このことから *ONSEN* がエクソンに挿入された場合とイントロンに挿入された場合で挿入先への影響が異なることがわかった。

2、トランスポゾン *ONSEN* の転移抑制機構の解明

2−1）トランスポゾンの転移制御と siRNA の関連性について

熱活性型トランスポゾンである *ONSEN* は熱応答性のプロモーター配列を持ち、その領域に

結合する熱ショック因子の欠乏変異体での解析結果から、高温条件下で熱ショック因子を介した転写の促進が行われていることが明らかになってきた。この *ONSEN* の熱活性は野生型の植物にも起こる現象であるが、野生型では転移は認められない。一方 siRNA 生合成に関わる遺伝子の変異体に熱ストレスを与えた個体の子孫で *ONSEN* の転移が観察された。このことから、siRNA がトランスポゾンの転移を何らかの形で制御している可能性が考えられる。*ONSEN* の発現が組織特異的に起こっているのか調べるために *ONSEN* のプロモーター領域に GFP を繋いだ形質転換体を用いて解析を行った。その結果 *ONSEN* の発現は熱ストレス後植物体全体で上昇していることが分かった。さらに、polIV 変異体ではその活性度合いが認められた。しかしながら、活性化の継続時間は野生型と polIV 変異体で大きな差は見られなかったことから、活性化の引き金と持続には独立した機構が働いているようである。形質転換体の *ONSEN* プロモーター領域のメチル化をメチル化感受性の制限酵素 McrBC で処理した DNA を鋳型とした PCR により解析を行った結果、野生型では熱ストレス後プロモーター領域がメチル化されるが、polIV 変異体ではメチル化されないことが分かった。

3. 今後の展開

抗 H3K27me3 抗体を用いた ChIP-seq を行うことで，*ONSEN* の挿入ターゲット領域に特異的なヒストン修飾の変化を解析する予定である。また、DNA のメチル化の変化が *ONSEN* の挿入先を決めている可能性を調べるために、高温ストレスをかけた直後のゲノムワイドな DNA のメチル化の変化についてもバイサルファイトシークエンスにより解析中である。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

研究課題提案時に掲げた研究目的は7割ほどの達成度である。研究実施体制は1年目でほぼ整えることができたが2年目以降実験補助員を雇用し実験の効率化を図った。研究費の執行にあたっては計画的に行うことができた。研究成果の公表はこれからであり、可能な限り早急に論文による発表を行う予定である。研究期間中に新たな研究の進展につながる成果を得ることができたため、今後の研究の発展が期待される。

（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）

熱活性型トランスポゾン *ONSEN* が転移したあとに宿主の遺伝子発現に影響を与え、ストレス耐性の表現型を獲得した2系統を得た。*ONSEN* の挿入先は7割以上が遺伝子内であった。2つの系統のうち、一つはエクソン内に挿入されており、もう一方はイントロンに挿入されていた。イントロンに挿入された系統では polIV 変異体（siRNA 生合成に関わる遺伝子の変異体）でしか表現型が観察されなかった。従ってエクソンとイントロンに挿入される場合で挿入先への影響が異なることが分かった。一方トランスポゾンの転移抑制について、野生型では転移は認めら

れないが、polIV 変異体に熱ストレスを与えた個体の子孫に *ONSEN* の転移が認められた。研究はまだ緒についたばかりであり、解決すべき課題が多く存在する。そもそも siRNA が転移に関わる機構は何なのか、次世代に受け継がれるメカニズムの解明、組織特異的な転移機構の解明など、具体的課題のもと研究を進展させて欲しい。また、今後実用化を視野に入れた研究の展開も求められる。

5．主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1.	Matsunaga W, Kobayashi A, Kato A, <u>Ito H</u>. The effects of heat induction and the siRNA biogenesis pathway on the transgenerational transposition of ONSEN, a copia-like retratransposon in Arabidopsis thaliana. ***Plant & Cell Physiology.*** 53: 824-833 (2012).
2.	<u>Ito H</u>, Yoshida T, Tsukahara S, Kawabe A. Evolution of the ONSEN retrotransposon family activated upon heat stress in Brassicaceae. ***Gene.*** 518: 256-261 (2013).
3.	Kato H, Saito T, <u>Ito H</u>, Komeda Y, Kato A. Overexpression of the TIR-X gene results in a dwarf phenotype and activation of defense-related gene expression in Arabidopsis thaliana. ***Journal of Plant Physiology.*** 171: 382-388 (2014).
4.	Yamada M, Yamagishi Y, Akaoka M, <u>Ito H</u>, Kato A. Genomic localization of AtRE1 and AtRE2, copia-type retrotransposons, in natural variants of Arabidopsis thaliana. ***Mol Genet Genomics.*** published on line. (2014)

（2）特許出願

特になし

（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）

学会発表

（国内）

- 日本遺伝学会第 83 回大会（2011.9.20）
- 第 53 回日本植物生理学会シンポジウム（2012.3.16）招待講演
- 日本遺伝学会第 84 回大会（2012.9.26）
- 植物電子顕微鏡若手ワークショップ（2013.1.15）
- 種生物学会シンポジウム（2012.12.9）招待講演
- 日本分子生物学会年会ワークショップ（2012.12.14）招待講演
- 日本遺伝学会第 85 回大会（2013.9.19）
- 遺伝研研究集会(2013.10.10）招待講演
- 日本育種学会第 125 回講演会(2013.10.12)
- 第 30 回資源植物科学シンポジウム（2014.3.6）
- 第 55 回日本植物生理学会年会シンポジウム（2014.3.17）招待講演
- 日本実験動物科学技術札幌２０１４(2014.5.15)　招待講演

（国際）

- The 14th Hokkaido University-Seoul National University Joint Symposium (2011.11.18)
- Genomic Impact of Eukaryotic Transposable Elements (2012.2.26)
- The 8th Okazaki Conference Speciation and Adaptation II (2012.3.22) 招待講演
- Frontiers in Plant RNA Research 2012 (2012.10.16) 招待講演
- FUJIHARA SEMINAR 2012 A new horizon of retroposon research (2012.8.2) 招待講演
- CMCB2013 (2013.6.14) 招待講演
- 24th International Conference on Arabidopsis Research (2013.6.25)

受賞

- 日本遺伝学会第 82 回大会 Best Paper 賞受賞 (2010.11.1)

研 究 報 告 書

「気分障害患者脳試料におけるシトシン修飾状態の解析」

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： 岩本 和也

1． 研究のねらい

気分障害である双極性障害（躁うつ病）や統合失調症は、民族集団、地域、時代を問わずそれぞれ約 100 人に 1 人が罹患する重篤な精神疾患です。双極性障害では躁状態と鬱状態を繰り返し、統合失調症では幻覚・妄想を主体とする陽性症状、感情鈍麻などを呈する陰性症状並びに認知・思考障害を主症状とします。両疾患とも思春期前後に好発期があり、遺伝と環境の複雑な相互作用によって発症に至ると考えられています。現在までに多くの遺伝学研究が行われてきましたが、確実な原因遺伝子の同定には至っていません。また、近年行われている大規模なゲノムワイド関連研究では、オッズ比が 1.2 程度の遺伝因子が多数同定されているものの、疾患に確実に関与する因子の同定には成功していません。

エピジェネティクスとは、塩基配列の変化を伴わずゲノムにコードされている情報が変質する現象を指します。DNA やヒストン蛋白質の修飾状態の変動などが含まれますが、多くの場合、細胞や組織における長期的な遺伝子発現の変動を伴います。双極性障害や統合失調症では、一卵性双生児の発症一致率が 60%程度であり非常に高いレベルにあるものの完全に一致しないことが知られています。これは環境要因の作用結果だと考えられていますが、分子レベルではエピジェネティクスの概念で説明できると考えられます。本研究課題では双極性障害の死後脳や末梢組織を用いたエピゲノム解析を行い、病因・病態を明らかにすることを目的とします。

2． 研究成果

（1）概要

死後脳を用いた解析では、米国スタンレー財団より提供された前頭葉凍結試料を用いて解析を行っています。脳試料はニューロンやグリア細胞など多様な細胞群で構成されています。異なる種類の細胞は異なるエピゲノム状態を示すことが知られており、脳全体を用いてエピゲノム解析を行うと、得られたエピゲノム情報の変動が細胞種の構成比の状態を反映してしまう可能性があります。そこで我々は、神経細胞核でのみ発現する蛋白を指標にセルソーターを用い、脳試料を神経細胞核と非神経細胞核に分画する実験系を確立しました。それぞれの分画から抽出した DNA を用いて網羅的 DNA メチル化解析を行い、ゲノム上のメチル化変異領域の同定を行っています。末梢血を用いた解析では、網羅的メチル化解析に加え BDNF、セロトニントランスポーター遺伝子といった神経機能に重要な遺伝子に着目した候補遺伝子解析を行っています。脳組織における解析ではゲノム全体としては低メチル化になる変化を、末梢血における解析では解析した候補遺伝子で高メチル化を示すことを見出しています。また、薬剤投与の効果を検討するため、主に培養細胞を用いた検討を行いました。

以上のようなゲノムの修飾状態を調べる研究に加えて、統合失調症患者神経細胞でトランスポゾン LINE-1 の過挿入がおきていることを見出し、精神疾患患者では脳神経系ゲノムの配列自体に変化が生じていることを明らかにしました。トランスポゾンはゲノムの中を飛び回ることができる可動性因子であり、ヒトゲノムの約半分はトランスポゾン関連の配列で構成されることが知られています。トランスポゾンの中でも LINE-1 と呼ばれるトランスポゾンは現在の人間でも転移活性を保っていることが知られています。LINE-1 配列の過挿入は神経機能に重要な遺伝子に起きており、統合失調症の病態と密接に関係していることが示唆されました。また、細胞・動物モデルを用いた研究により、過挿入は遺伝要因と環境要因どちらの要因によっても生じることを明らかにしました。環境要因の検討には、妊娠マウスにウイルス感染を模した 2 本鎖 RNA アナログである poly(I:C)を投与するモデルを用いました。この動物モデルでは、産まれてきた仔マウスは生後統合失調症様の症状を呈することが知られています。仔マウスにおいても LINE1 の過挿入が認められたことから、妊娠期の母体環境が仔の脳神経系細胞のゲノム構成に影響を持つことが示唆されました。

（2）詳細

1）双極性障害患者死後脳 DNA メチル化状態の解析

本研究開始前に神経細胞核マーカーNeuN を用いたセルソーティングにより神経細胞、非神経細胞を分離し、プロモータータイリングアレイによる解析を行っている。詳細なデータ解析を行い、双極性障害患者神経細胞・非神経細胞におけるメチル化変異部位を同定した。また、双極性障害患者神経細胞において顕著な低メチル化傾向を認めており、同様に既に取得済みの遺伝子発現データとの参照により、これらの領域での遺伝子発現量増加を認めた。

2）1 塩基レベルでの DNA メチル化状態の解析

健常者神経細胞、非神経細胞における全ゲノムバイサルファイト解析を行い、得られたデータの解析を行った。細胞種特異的な DNA メチル化状態について明らかにすると共に、神経細胞における非 CpG 部位のメチル化状態についての解析を行った。また、双極性障害(N=5)および健常者死後脳(N=5)について reduced representation bisulfite sequencing 法による解析を行い、DNA メチル化状態に差異のある領域の同定を行った。これらのメチル化データはマイクログラムオーダーの DNA を用いた検討を行っており、微量 DNA でのデータ取得の際の reference データとして活用する。微量 DNA での検討は当初、市販キットを用いて行っていたが、九州大学伊藤隆司先生との共同研究による PBAT 法での解析に切り替えており、多数検体でのデータ取得中である。

3）ハイドロキシメチル化状態の解析

健常者神経細胞、非神経細胞において、グルコシル化によりハイドロキシメチルシトシン(hmc)の修飾を行い、Chip-Seq に類する手法により hmc を含む DNA 断片を濃縮、次世代シークエンサーを用いた解析を行った。GeneOntology 解析などにより hmc が濃縮されている遺伝子領域の同定を行った。また、最近開発された酸化バイサルファイト法により1塩基レベルでの hmc 解析を行い、オリゴデンドロサイト転写因子 SOX10 について詳細な hmc 解析を行った。現行では微量 DNA での検討が困難であることから、代表的なサンプル群について酸化バ

イサルファイト法を用いて解析を行っていく予定である。

4) 投薬効果の検証

解析に用いた患者群が実際に服薬していた気分安定薬(リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン)について、DNA メチル化に与える影響を検討するため、ヒト神経系細胞株 SK-N-SH を気分安定薬存在下で培養し、DNA メチル化に与える影響を検討した。Illumina HumanMethylation platform を用いた網羅的解析からはリチウムによるメチル化変化量が最も大きく、リチウムによって誘導されたメチル化変化の中に、他の2剤による変化の大部分が含まれていた。また、プロモータータイリングアレイによる検討を行ったところ、死後脳で認められたメチル化変動の約 20%程度が気分安定薬投与によって変動しうることを明らかにした。

5)抹消血試料での検討

先行研究により気分障害患者死後脳・培養リンパ芽球においてセロトニントランスポーター SLC6A4 のメチル化変化を同定している。疾患特異性を検討するため、統合失調症患者末梢血での検討を行ったところ、気分障害患者と同様のメチル化変化が認められた。また、多施設大規模研究により、気分障害患者末梢血を用いた検討を行ったところ、先行研究の追試ができた。これらの結果により、精神疾患に共通するメチル化変化が末梢血試料で検出できることが示唆された。

6)トランスポゾン LINE-1 配列のコピー数の検討

精神疾患患者死後脳前頭葉および肝臓から抽出したゲノム DNA 中の LINE-1 量を qPCR により定量比較したところ、患者群で有意な上昇が認められた。特に顕著な上昇が認められた統合失調症群について、独立した死後脳セットを用い、神経細胞と非神経細胞に分離した後、神経細胞のゲノムコピー数定量を行ったところ有意な上昇が再現された。

コピー数増大の背景を探るために、polyI:C 投与動物モデルから産まれた仔マウス、およびマカク新生児に対して EGF を連続投与したモデルについて、LINE-1 コピー数を検討したところ、これらの動物モデルでもコピー数の増加が認められた。また、染色体 22q11 領域を欠失し、統合失調症を併発している患者から樹立した iPS 細胞を神経細胞に誘導後、コピー数の測定を行ったところやはり有意な増大が認められた。

LINE-1 の新規挿入部位を探索するため、健常者・患者各 3 名の前頭葉および肝臓ゲノム DNA について全ゲノム解析を行った。脳特異的挿入箇所を同定後、GeneOntology 解析を行うと、患者側ではシナプス関連遺伝子や統合失調症に以前から関連が疑われている遺伝子群に新規挿入が認められた。これらの結果により、妊娠期の母体環境などの環境要因や 22q11 欠失のような強い遺伝的負因を持つ場合に LINE-1 のコピー数が増大し、神経機能に重要な遺伝子に影響を与えることが示唆された。

３． 今後の展開

本研究課題によって、環境要因によって生じる脳神経系のエピゲノムやゲノム構成が変化し、各人個別の遺伝的背景と合わせて、双極性障害や統合失調症発症の閾値や病態に影響を与えていると考えられました。今後は脳神経系ゲノムにおけるエピジェネティクス制御機構やゲノムの動的な側面について、さらに詳細に検討を行って行きたいと考えています。

４． 評価

（1）自己評価

（研究者）

脳神経系でのシトシン修飾状態が予想をはるかに超えて複雑であり、未だ全体像が明らかにされていないこと、また、DNA 修飾状態の解析手法が日進月歩で進んでいることなどから、今後も新しい現象を最新の技術で再解析していく必要があると考えています。そのような中で、本研究課題では、脳神経系ゲノムのエピゲノムおよびゲノム配列自体が、環境要因によって変動を受け、疾患と関連していることを明らかにしてきました。これまで疫学研究で確立されてきた環境要因について、トランスポゾン動態やメチル化状態を指標として、環境要因の作用機構を分子レベルで検証できることを示せたことから、研究開始時の課題設定を大きく超えた研究成果を得ることができたと考えています。本研究課題で得られたデータにより、病因の根本理解と新たな創薬戦略につながる研究が今後展開できると考えています。また、将来的には末梢血由来試料を用いた診断マーカーの開発を進めていきたいと考えていきます。

（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）

気分障害患者から神経細胞核を分離し DNA メチル化解析を行った結果，脳組織における解析ではゲノム全体として低メチル化になる変化を見出している。抹消血解析では候補遺伝子のプロモーター領域での高メチル化を見出している。また、統合失調症患者の神経細胞で、レトロトランスポゾンである LINE-1 の過挿入が起きていることを見出した。LINE-1 の挿入は神経機能に重要な遺伝子に起きており、統合失調症と密接に関係していることが示唆された。細胞・動物モデルを用いた研究により、過挿入は遺伝要因と環境要因によって起ることを明らかにした。統合失調症による L1 コピー数の増加は興味深い発見であるが、疑問もたくさん残っており、今後多角的にモデルを検証するなど慎重で着実な展開を期待したい。なお、当初計画の気分障害患者のゲノムワイドなメチローム解析は腰を据えてしっかり進めて欲しい。

５． 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H,

	Yoshikawa T, Kato T, **Iwamoto K**. Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. ***Neuron*** 2014,81:306-313.
2.	Hayashi-Takagi A, Vawter MP, **Iwamoto K.** Peripheral biomarkers revisited: integrative profiling of peripheral samples for psychiatric research. ***Biological Psychiatry*** 2014,75:920-928.
3.	Asai T, Bundo M, Sugawara H, Sunaga F, Ueda J, Tanaka G, Ishigooka J, Kasai K, Kato T, **Iwamoto K**. Effect of mood stabilizers on DNA methylation in human neuroblastoma cells. ***International Journal of Neuropsychopharmacology*** 2013,16:2285-2294.
4.	Nishioka M, Bundo M, Kasai K, **Iwamoto K**. DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. ***Genome Medicine*** 2012,4:96.
5.	Bundo M, Sunaga F, Ueda J, Kasai K, Kato T, **Iwamoto K**. A systematic evaluation of whole genome amplification of bisulfite-modified DNA. ***Clinical Epigenetics*** 2012,4:22.

（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）
プレスリリース

- 2014 年 1 月 3 日 Bundo M et al., Neuron 2014,81:306-313. 「統合失調症患者の神経細胞でレトロトランスポゾン配列が増大」
http://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/press_archives/20140102.html

（掲載誌）

Nature, Science, Nature Medicine, Scientific American, Schizophrenia Research Forum, The Scientist, SfN Neuroscience news, Faculty of 1000, マイナビニュース, 日経プレスリリース, QLifePro 医療ニュース, The Brain & Behavior Research Foundation Discoveries, RIKEN Research Highlights, 日経産業新聞, ルモンド(仏), 共同通信社による配信（埼玉新聞、神戸新聞、山梨日日新聞、福井新聞、信濃毎日新聞、熊本日日新聞、岐阜新聞、中国新聞、山形新聞、千葉日報、福島民報など）

研　究　報　告　書

「エピジェネティック治療を目指した心不全の病態解明」

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：　金田　るり

1.　研究のねらい

慢性心不全は、高血圧、虚血性心疾患、心筋症、弁膜症などの様々な循環器疾患の終末像であり、重症心不全の予後は、悪性腫瘍と同様極めて不良である。β遮断薬やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系抑制薬は慢性心不全の予後を改善するが、重症例に対しては、補助循環装置や心臓移植などの非薬物療法に頼らざるを得ないのが現状である。人口の高齢化に伴い、心不全による死亡率のさらなる上昇が予測され、心不全の新規治療法の開発は急務の課題である。

不全心筋では、正常心筋と比較し、心筋構造蛋白の胎児型アイソフォームへの変換やミトコンドリア機能関連遺伝子・酸化的リン酸化・線維化などに関与する多数の遺伝子発現変化が観察される。本研究者は、この多数の遺伝子発現変化の背景として、エピジェネティック制御が重要なのではないかと考えた。これまで、心肥大・心不全の基礎研究領域では、エピジェネティックな変化のうち、ヒストンのアセチル化を中心に研究が進められてきた。治療への応用に関しても、ヒストン脱アセチル化酵素（histone deacetylase: HDAC）阻害薬は、心肥大や線維化などの心臓リモデリングを抑制すると報告されている。しかしながら、我々がこれまでに行った疾患モデル動物の左室心筋を試料とした解析結果では、不全心筋では正常心筋と比較し、ヒストンのアセチル化よりもヒストン H3 リシン 4 のトリメチル化（H3K4me3）あるいはヒストン H3 リシン 9 のトリメチル化（H3K9me3）の分布が大きく異なっていた。そこで、この H3K4me3 あるいは H3K9me3 を慢性心不全特異的エピジェネティック変化ととらえ、これらを制御することが、慢性心不全の予後改善につながるのではないかと考えた。

2.　研究成果

（1）概要
慢性心不全特異的エピジェネティック変化の 1 種ととらえた H3K9me3 の制御が心不全モデル動物の予後を改善し得るか否か検討した。*Chaetomium* 種の真菌から抽出された chaetocin（H3K9me2 から H3K9me3 へ変換するメチル基転移酵素である Suv39h1 の活性阻害薬)は、Dahl ラットの血圧には影響を及ぼさず、心肥大から心不全への移行を遅らせることにより、心不全ラットの累積生存期間を有意に延長した。DNA マイクロアレイ解析では、不全心筋で発現低下し、chaetocin 投与で復する遺伝子群に、ミトコンドリア機能に関与する遺伝子や酸化還元反応に関与する遺伝子が多数含まれており、全体として、chaetocin 投与は不全心筋において ATP 産生方向へ遺伝子発現変化を向かわせることが示唆された。ChIP-seq 解析では、慢性心不全時に局所的に生じる、ミトコンドリア機能関連遺伝子近傍を含めたリピート領域の過剰なヘテロクロマチン形成を、chaetocin が復することで、予後改善に繋がったと思われた。ミトコンドリア呼吸鎖の respiratory control rate (RCR)でみる実際のミトコンドリア機

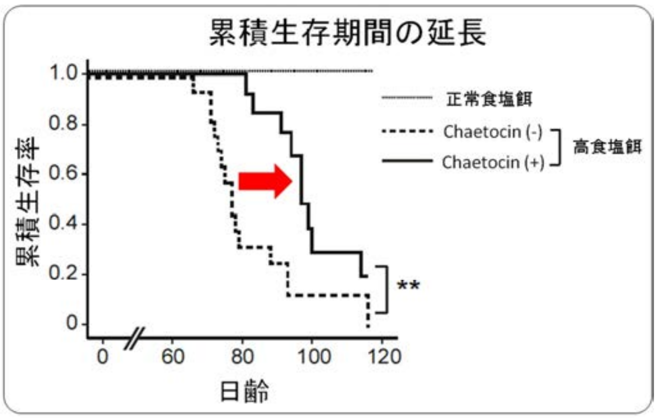
能も chaetocin 投与群で有意な改善を示した。

これまで、エピジェネティックな変化のうち、ヒストンのアセチル化に着目されてきた心肥大・心不全領域において、H3K9me3 変化も病態に重要であり、H3K9 メチル基転移酵素阻害薬も HDAC 阻害薬に加え心臓リモデリング抑制に有望であることが示唆された。

（2）詳細

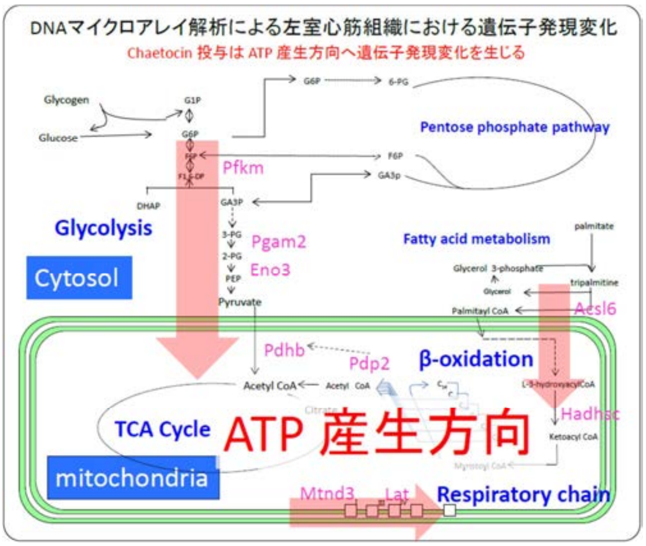
疾患モデル動物における chaetocin の心不全予後改善効果

以前に行った、心不全の疾患モデル動物である Dahl ラットの左室心筋を試料とした ChIP–chip 解析の結果では、正常心と不全心間で、全プローブの H3K9me2 のシグナル強度の相関係数は保たれていたが、H3K9me3 は相関係数が低下した。そこで、H3K9me2 から H3K9me3 へ変換するメチル基転移酵素活性を阻害する薬剤を使用することで、心不全の予後改善効果が得られるのではないかと考えた。*Chaetomium* 種の真菌から抽出された chaetocin は、H3K9me2 から H3K9me3 へ変換するメチル基転移酵素である Suv39h1 の活性を阻害する。Chaetocin を Dahl ラットに腹腔内投与し、予後改善効果を検討した。Chaetocin は、Dahl ラットの血圧には影響を及ぼさず、心不全期の心重量・体重比の増加を抑制し、心不全のバイオマーカーとして知られる左室心筋内の心房性ナトリウム利尿ペプチド遺伝子（*Nppa*）の発現亢進を抑えた。心臓超音波では、chaetocin 投与により、左室の壁厚は変化させず、左室収縮末期経を縮小することにより、左室収縮能を改善し、心不全ラットの累積生存期間を有意に延長した。これらの結果から、chaetocin は、心肥大から心不全への移行を遅らせることにより、予後を改善したと考えられた。

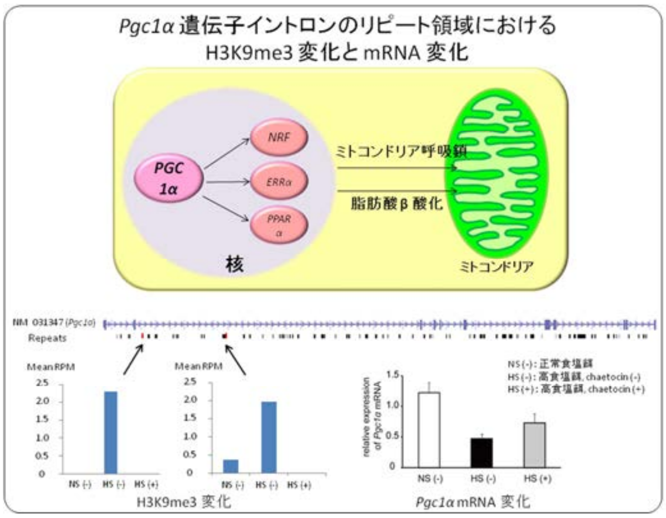


Chaetocin の作用機序解明

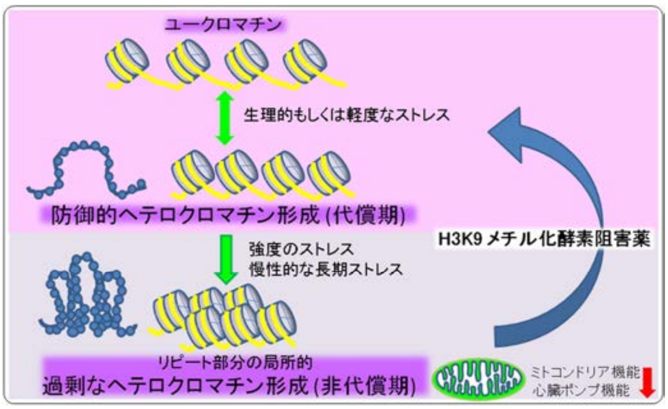
H3K9 のメチル化はヘテロクロマチン形成に関与し、遺伝子発現は低下する方向に働くことから、chaetocin の作用機序解明を目的に行った DNA マイクロアレイ解析では、不全心筋で発現低下し、chaetocin 投与で復する遺伝子群を抽出した。その結果、ミトコンドリア機能に関与する遺伝子や酸化還元反応に関与する遺伝子が多数含まれていた。全体として、chaetocin 投与は不全心筋においてATP 産生方向へ遺伝子発現変化を向かわせることが示唆された。



ChIP-seq 解析では、H3K4me3 は、これまでの報告と同様、転写開始点（transcriptional start site: TSS）近傍でピークを有し、mRNA の発現変化とパラレルに変動していたのに対し、H3K9me3 では mRNA 発現と逆相関するような TSS 近傍の著明な変動は観察されなかった。H3K9 のメチル化はペリセントロメアやテロメア形成などのヘテロクロマチン形成に関与し、リピート領域における H3K9 のメチル化の変化は、癌化やストレス応答反応にも関与することが知られていることから、リピート領域に焦点を当て、H3K9me3 変化の解析を行った。Input（RPM）に対し、不全心筋の H3K9me3（RPM） が 100 倍以上で、かつ、不全心筋において、正常心筋よりも H3K9me3 レベルが高いリピート領域は、6550 リピート認められたのに対し、input（RPM）に対し正常心筋の H3K9me3（RPM）が 100 倍以上で、かつ、正常心筋において、不全心筋よりも H3K9me3 レベルが高いリピート領域は、335 リピートのみであった。これらのうち、chaetocin 投与により、正常心と同方向へ K9me3 レベルが復するリピートの割合は、不全心で K9me3 レベルが増加するリピートに関しては、99%以上であるのに対し、不全心で K9me3 レベルが低下するリピートに関しては 10%であった。不全心筋で K9me3 の増加がみられ、chaetocin 投与で抑制がみられたリピート領域には、ミトコンドリア機能関連遺伝子近傍が複数含まれていた。特に、ミトコンドリア生合成やエネルギー産生の鍵因子である *Pgc1α*遺伝子のイントロン部分のリピート領域の二か所で不全心筋において H3K9me3 レベルが上昇し、chaetocin 投与で抑制されるのに逆相関して、mRNA の発現変化が伴っていたのは、興味深い結果と考える。ミトコンドリア呼吸鎖の respiratory control rate（RCR）でみる実際のミトコンドリア機能も chaetocin 投与群で有意な改善を示した。



本研究成果から、慢性心不全時の左室心筋では、リピート領域の過剰なヘテロクロマチン形成が生じ、ミトコンドリア機能関連遺伝子のサイレンシングを伴って、ポンプ機能低下に関与している可能性があると考えられた。H3K9 のメチル基転移酵素阻害薬は、過剰なヘテロクロマチン状態を抑制することで、慢性心不全の予後改善に寄与する可能性が示唆された。



これらの結果は、HDAC 阻害薬に加え、ヒストン H3K9 のメチル化制御も心臓リモデリング抑制に有望であることを示す新知見となった。

3.　今後の展開

ヒストン H3K9 メチル基転移酵素阻害薬である chaetocin は、心肥大から心不全への移行を遅らせ、疾患モデル動物において慢性心不全の予後を改善した。本研究成果により、HDAC阻害薬に加え、ヒストン H3K9 メチル化の制御による“エピジェネティック治療”も心不全新規治療として、有望であると推測される。しかしながら、臨床応用を視野に入れた場合には、克服すべき問題点、解明すべき課題も残る。第一に、chaetocin は毒性を有するため、可能な限り毒性を抑える工夫が必要である。また、chaetocin の作用機序として、ヒストン H3K9 メチル化抑制のほかに、マイルドな酸化ストレス刺激として、ROS を産生し、プレコンディショニング効果を生じた可能性もあり、それぞれの寄与について明らかにする必要がある。さらには、chaetocin 以外のエピジェネティック修飾薬の中にも、正常心に近い核内クロマチン状態の保持に寄与する類似薬剤が存在する可能性もあり、広く探索を行う価値があると考える。

これまで、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系抑制薬やβ遮断薬などで長期予後の改善がみられなかった症例や、長期薬剤投与で耐性を示した心不全症例の中にも、作用機序の異なる新規“エピジェネティック治療”に感受性を有する症例があるのではないかと推測する。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

疾患特異的エピジェネティック変化を標的としたヒストン修飾酵素阻害薬による予後改善効果の評価と作用機序の解明に関しては、一定の成果が得られたと考える。これまで、心臓リモデリング抑制に対しては、HDAC 阻害薬の有効性のみが報告されるなか、本研究成果により、H3K9 メチル化の制御も有望であることを示すことができた。また、H3K9me3 の ChIP-seq 解析の結果からは、心不全時に生じるクロマチン状態の変化について、新たな仮説を打ち立てることができた。本研究で使用した阻害薬（chaetocin）は毒性を有するが、毒性の少ない類似薬剤が使用可能となれば、慢性心不全の新規治療法として有望であり、臨床応用に向け新たな展開が見込まれる。

一方、研究課題立案当初のアイディア通りには成果が得られなかった部分もある。ヒストン修飾酵素阻害薬は広範囲のクロマチン領域に作用し、好ましくない副作用を生じることが予想されたため、より時空間的に選択性・特異性の高いエピジェネティック制御をめざし、疾患特異的エピジェネティック変化を制御し得る機能性 RNA の同定も試みる計画を立てた。しかしながら、CLIP 法を用いた（ヒストン修飾酵素に結合する）RNA の同定やバイオインフォマティクス解析技術を用いた様々な方向からのアプローチを試みたものの、当該機能性 RNA の同定には至らなかった。

（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）

心不全モデルラットにおいて、H3K9me3に分布の変化が認められることから、SUV39阻害薬（ケトシン）を投与することで治療効果が得られることを見出した。効果があった理由として、ケトシン投与でミトコンドリア機能に関する遺伝子群や酸化還元反応に関与する遺伝子の発現が回復することを観察した。ミトコンドリア関連の遺伝子近傍のリピート領域において不全心筋でH3K9me3の増加が見られ、ケトシン投与でその抑制が見られた。得られた結果は状況証拠であり、リピート配列が心不全を引き起こす因果関係を検証する必要がある。In vivoのみの結果は評価が困難であり、場合によっては評価が可能な系に持ち込み検証する必要がある。また、ケトシンに関して毒性を抑えた誘導体が開発されているので試みることを勧めます。今後ともエピジェネティクな治療の可能性を探って欲しいと思います。

５． 主な研究成果リスト

（１） 論文（原著論文）発表

1. Liu Y*, **Kaneda R*** (* equal contribution), Leia TW, Subkhankulova T, Tolmachov O, Minchiotti O, Schwarz RJ, Barahona M, Schneider MD. *Hhex* and *Cer1* mediate the Sox17 pathway for cardiac mesoderm formation in embryonic stem cells. ***Stem Cells*** 2014, 32(6), 1515-1526.
2. Nishiyama T, **Kaneda R,** Ono T, Tohyama S, Hashimoto H, Endo J, Tsuruta H, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Fukuda K. miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 2012, 425(4), 755-761.

（２）特許出願

特記事項なし

（３）その他の成果（主要な学会発表）

1. **Kaneda R,** Ono T, Fukuda K. Histone methyltransferase inhibitor to reduce mitochondrial dysfunction in failing heart. The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria from molecular mechanisms to physiological functions and diseases, October 28 ~ November 1, 2013, Japan
2. **Kaneda R,** Ono T, Fukuda K. Histone methyltransferase inhibitor improves prognosis in chronic heart failure. ~Analysis of histone H3 lysine 9 methylation-status on repetitive loci ~ Keystone Symposia Conference, C5: Chromatin Mechanisms and Cell Physiology (Workshop), March 23~28, 2014, Germany
3. **Kaneda R,** Ono T, Fukuda K. A naturally occurring product isolated from fungi of Chaetomium species improves prognosis in chronic heart failure. Crossing Boundaries: Linking Metabolism to Epigenetics (Short talk), May 1-2, 2014, USA
4. **金田るり**、小野智彦、福田恵一. Epigenetic therapy as a potential novel treatment for chronic heart failure. 第18回 日本心不全学会学術集会 （シンポジウム）, 2014年10月10

日, 大阪
5. <u>**金田るり**</u>、小野智彦、福田恵一. 慢性心不全特異的エピジェネティック変化を標的とした心不全新規治療法開発の試み. 第 18 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会（シンポジウム), 2014 年 11 月 22 日, 横浜

研　究　報　告　書

「X 染色体再活性化ライブメージング技術を用いた幹細胞研究」

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：　小林　慎

1.　研究のねらい

近年、ヒト iPS 細胞の樹立が報告され、幹細胞を用いた再生医療への応用に期待が集まっている。しかし、一口に幹細胞といっても複数の種類があり分化能に違いがあることが分かってきた。幹細胞の分化能を表す新しい表現として、naïve 状態とprimed 状態という区別が用いられるようになっている。マウスのES（mES）細胞はnaïve 状態を示す細胞で、非常に高いキメラ形成能を持ち、生殖細胞へも寄与しうる。一方、これまでヒトES 細胞（iPS 細胞）として同定された「幹細胞」は、マウスの ES 細胞が持つ多能性（naïve 状態）はなく、限られた細胞種にしか分化できずキメラへの寄与率もほとんど認められない primed 状態を示すことが分かってきた（図 1）。ヒトES(iPS)細胞は、むしろマウスのEpiSC（epiblast stem cell）として報告されたmES 細胞より分化の進んだ状態の幹細胞と似た性質を持つ。ヒトの再生医療への応用を考えると、primed 状態から naïve 状態のヒト iPS 細胞を作製することが、医療応用範囲が広く望ましい。一方マウスを用いた実験から、EpiSC は特定の遺伝子（Klf4 など）を一過性に過剰発現させることにより、naïve 状態の iPS 細胞にリプログラミングできることが報告された。このリプログラミングの過程を分子レベルで理解することが、真の多能性を持ったヒト naïve 状態 iPS 細胞を効率よくかつ安全に作出する為の基礎的知見として重要である。しかし EpiSC 及びマウス ES 細胞はどちらもいわゆる幹細胞マーカーを発現しており、これまでのマーカーでは両者を区別することは難しい。そこで本研究では epiSC と、mES /iPS 細胞の大きな違いである X 染色体の再活性化に注目した。X 染色体再活性化の状態をモニタリングすることにより、これまで不可能であった多能性幹細胞の識別が細胞を生かしたまま簡単かつ正確に行える実験系を構築することを目指した。

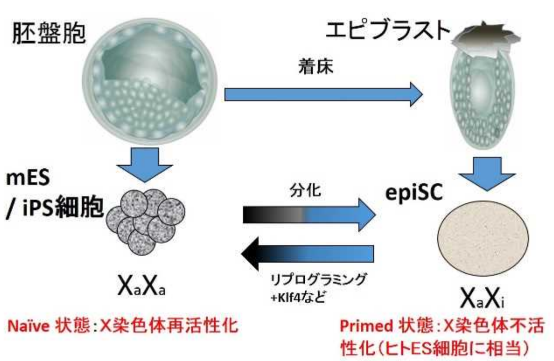


図1、幹細胞でもmES/iPS細胞とepiSCではX染色体の不活化状態が異なる
（注） Xa: 活性化しているX染色体、Xi: 不活性化されたX染色体

2.　研究成果

（1）概要

　本研究では幹細胞の多能性と密接な関連が指摘されている X 染色体再活性化に注目し、再活性化状態を簡便に Live imaging で検出できる系を開発する点に特徴がある。X 染色体の不活性化は、雌の発生で 2 本ある X 染色体の内 1 本が不活性化され、雄と雌の間で活性を持つ X 染色体の本数が揃う機構である。これまでの研究から、いったん X 染色体の不活性化が成立すると、その記憶は分化した全ての細胞で維持されるが、内部細胞塊/mES 細胞や始原生殖細胞といった多能性をもつ幹細胞では、不活性化された X 染色体が再活性化されることが報告されている。また、iPS 細胞樹立過程で、いったん分化した体細胞を人工的に幹細胞にリプログラミングしても X 染色体の再活性化が観察されることが分かってきた。このように、幹細胞の持つ多能性（pluripotency）と X 染色体の再活性化は密接に関連していると考えられている。本研究ではマウスを材料に、X 染色体の再活性化の状態を生きた細胞でモニタリングするため、図2に示すように 2 本ある X 染色体それぞれに赤（mCherry）と緑（eGFP）のレポーター遺伝子を挿入した（それぞれの X 染色体を X^{RED}, X^{GFP} と表記）。これにより、これまで区別が困難であった naïve 状態と primed 状態の幹細胞を生かしたまま簡単に区別することが可能となった。この系を用いると、一端起きたランダムな不活性化（1 本の X 染色体が不活性化、一本が活性化: 赤又は緑の細胞）がリプログラミングを受け再活性化（2 本の X 染色体が活共に性化: 黄色の細胞）される過程が検出できるようになると期待できる。

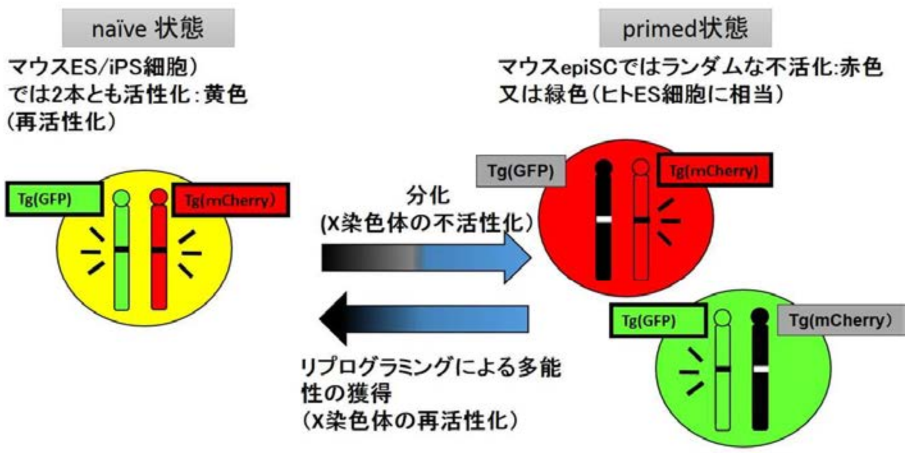


図2、赤緑レポーター遺伝子（$X^{RED}X^{GFP}$)による
X染色体の再活性化イメージング

（2）詳細

　X 染色体へのレポーター遺伝子の挿入はマウス ES 細胞を用い相同組み換えを利用し行った。1copy の遺伝子を目的部位に挿入することによりモニタリングの系が定量性を持つことが期待できる。更に目的の相同組み換えを起こした ES 細胞を用い、遺伝子組換えマウスを作製することに成功した。得られたマウスを用い、レポーター遺伝子がどれだけ X 染色体の状態

を忠実に検出できるか新生児 1 日目の雄と雌の臓器について緑色蛍光の発現を調べた結果が図 3 である。雄では 1 本ある X 染色体は活性化状態にあり、予想通りほぼ全ての細胞で緑色蛍光が検出できた。一方、雌の臓器では 1 本が活性化され、もう一本が不活性化されることが予想される。実際の蛍光は、予想通り約半数の細胞で緑色蛍光が検出でき、臓器レベルで X 染色体の状態を忠実にモニタリングできることが分かった。更に、作製した赤及び緑色レポーター遺伝子を持つマウス($X^{RED}X^{GFP}$)から、ES 及び EpiSC を樹立し、X 染色体の活性化状態の観察を行った(図 4)。その結果、期待通り ES 細胞(naïve 状態)では X 染色体は再活性化され赤と緑の 2 色が共に陽性の黄色の細胞を、EpiSC(primed 状態)では 2 本の X 染色体の片方が不活性化され、赤または緑単色の細胞を検出することに成功した。これにより、X染色体の再活性化を指標に、異なる種類の幹細胞を生かしたまま見た目で区別することが初めて可能となった。

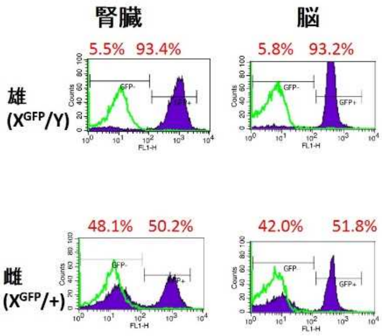


図3、新生児1日目におけるX^{GFP}マウスのFACS解析

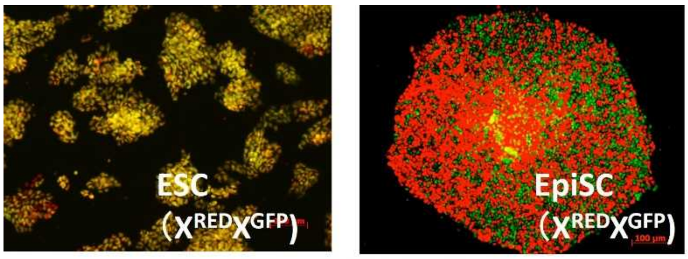


図4、X染色体の再活性化イメージング($X^{RED}X^{GFP}$)による幹細胞多能性の新しい評価系。

3. 今後の展開

本研究では X 染色体の再活性化を連続的に Live imaging として検出する方法を開発することに成功した。これにより、これまで判別が困難であった複数の「幹細胞」を生きたまま簡便に分類することが可能となった。この系は、「幹細胞」の多能性を評価できる新しい技術であり、今後幹細胞の性質を理解する上で有用なツールとなる。細胞を生かしたまま X 染色体の再活性化状態を観察出来れば、iPS 細胞樹立におけるリプログラミング過程が追跡でき、各段階で起きていることの詳細な解析が可能となる。その成果は、将来的に真の多能性を持ったヒト naïve 状態 iPS 細胞を効率よくかつ安全に作出する為の基礎的知見として役に立つと考える。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

当初の目標であった「X 染色体再活性化のライブイメージングする方法を確立し、幹細胞の多能性を簡便に評価できる系」の開発は達成できたと考えている。この系を用いることにより、これまで不可能であった異なる種類（naïve 状態と primed 状態）の幹細胞を生かしたまま見た目で区別することが初めて可能となった。今後、幹細胞の性質やリプログラミング過程を理解する上で有用なツールであると考える。また現在マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞よりキメラ能が低い細胞が多いことが分かっており、一口にリプログラミングと言っても細胞内で起きていることは種々雑多で幹細胞の分化能にばらつきがあることが分かってきた。しかし、幹細胞の品質を管理する定量的なマーカー遺伝子などの基準は殆どない。今後、リプログラミングの実体が分かれば、雑多な幹細胞集団からより分化能の高く、安全な「質」の良い幹細胞を選別する技術開発に繋がる可能性も考えられる。これら知見は、将来様々な細胞に分化できる真のヒト iPS/ES 細胞の効率的な作出方法を確立する基盤となるだけではなく、その安全性基準を科学的に決める為に必須な情報となる点で発展性があると考える。

（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）

X 染色体の再活性化と幹細胞の関係に注目して、新しい幹細胞の多能性を評価する系を確立することを目標にした。そのために 2 本の X 染色体の活性が異なる蛍光でモニターできるマウスを作成した。目標としていた X 染色体の再活性化をライブイメージングでモニターできる系であることを確認し、系の有用性を示した点は評価できる。今後この系を用いて、リプログラミングのライブでの可視化やその機構解明、多能性幹細胞の品質管理、あるいは組織幹細胞、がん幹細胞の研究など具体的活用が求められる。

５．　主な研究成果リスト

（１）論文（原著論文）発表

1. Soma M, Fujihara Y, Okabe M, Ishino F, **Kobayashi S***. Ftx is dispensable for imprinted X-chromosome inactivation in preimplantation mouse embryos ***Sci Rep.*** 2014 4:5181. (doi: 10.1038/srep05181. PMID: 24899465)
2. **Kobayashi S***, Totoki Y , Soma M, Matsumoto K, FujiharaY, Toyoda A, Sakaki Y, Okabe M , Ishino F . Identification of an Imprinted Gene Cluster in the X-Inactivation Center ***PLosOne*** 2013 8(8):e71222. (doi: 10.1371/journal.pone.0071222. PMID: 23940725)

*は corresponding author を示す。

（２）特許出願

研究期間累積件数：0 件

特許出願準備中

（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）

- <u>小林　慎</u>、十時　泰、相馬未來、松本和也、藤原祥高、豊田敦、榊佳之、岡部勝、石野史敏 「X 染色体不活化中心領域に発見した雌でのみ発現するインプリント遺伝子群の解析」 第 8 回年会日本エピジェネティクス研究会　2014 年 5 月 25-27 日　伊藤国際学術研究センター
- <u>小林　慎</u>、十時　泰、相馬未來、松本和也、藤原祥高、豊田　敦、榊　佳之、岡部　勝、石野史敏 「X 染色体不活性化中心(Xic)領域に発見したインプリント遺伝子のクラスター」 第 36 回日本分子生物学会年会　2013 年 12 月 3-6 日　神戸国際会議場
- <u>小林　慎</u> 「X染色体上に発見したインプリント遺伝子のクラスター」 信州生命科学サマーセミナー2013　2013 年 7 月 23 日　長野
- 相馬未來、十時　泰、松本和也、藤原祥高、豊田　敦、榊　佳之、岡部　勝、石野史敏、<u>小林　慎</u> 「マウス着床前胚において雌でのみ発現する small RNA の探索」 35 回日本分子生物学会年会　2012 年 12 月 11-14 日 （ワークショップ口頭発表）
- <u>小林　慎</u> 「雌雄の発生と X 染色体上のインプリント遺伝子」 第 5 回生殖研究若手の会　2012 年 7 月 26-28 日　神奈川
- <u>Kobayashi S</u> "Discovery of female specific small RNAs in preimplantation embryos" The 22nd CDB Meeting RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II　2012/06/11-13 Kobe

研　究　報　告　書

「ヒストン修飾の動態を可視化検出するための系の確立」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 24 年 1 月～平成 27 年 3 月
研　究　者：　佐々木　和樹

1.　研究のねらい

エピジェネティクスは、遺伝子の塩基配列によらない発現制御機構であり、主に DNA のメチル化やヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化などの化学修飾がその中心を担っていると考えられています。個体内では、遺伝子情報は共通しているにもかかわらず、器官ごとに異なる蛋白質が発現しており、細胞の分化の際にエピジェネティックな変化が起きている、また、近年、精力的に研究されている細胞のリプログラミングの過程において、細胞を初期化するために、エピジェネティックな変化が起きていると考えられています。しかし、ダイナミックに動いているヒストン修飾の変化を評価する方法は、共通して解析のために細胞を破砕もしくは固定する必要があるため、エピジェネティクスの変化がいつ起こっているのか、どのように起こっているのかといった詳細な解析は、今まで行われてきませんでした。また、癌、神経変性疾患、生活習慣病などの疾患に伴って、エピジェネティクスの異常が観察されており、エピジェネティクスの異常は疾患の原因となり得ると考えられています。そのため、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤などエピジェネティックな変化を人為的に誘導する化合物は、治療薬として期待されており、すでに HDAC 阻害剤である SAHA は、2006 年に皮膚 T 細胞性リンパ腫(CTCL)の治療薬として米国で承認されています。そのため、生きた細胞内でヒストン修飾の変化を追うことが可能な検出技術は、薬剤スクリーニングや薬剤の細胞内での作用機序を調べる上での有効なツールになると考えています。

ヒストン修飾を可視化検出するために、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した蛍光プローブ「Histac」を開発し、生細胞内でのエピジェネティクスの変化をリアルタイムに解析することを可能にしました。この蛍光プローブ開発を発展させ、ヒストン修飾蛍光プローブのシリーズ化及びスクリーニング系への応用を行っていきます。

2.　研究成果

（1）概要

生細胞内のヒストン修飾の動態をリアルタイムに可視化検出するために、蛍光プローブ「Histac」を開発しました。「Histac」は、黄色蛍光蛋白質 Venus、修飾ヒストン結合ドメイン、フレキシブルなリンカー、ヒストン、青色蛍光蛋白質 CFP を順に繋ぎ、ヒストン修飾の変化を CFP と Venus 間の FRET の変化によって検出する蛍光プローブで、ヒストン H4 の N 末端の 4 か所のリジン(K5、K8、K12、K16)のうち K5 と K8 のアセチル化を検出するために、BRDT のアセチル化リジン結合ドメインであるブロモドメインを用いています。この BRDT を他のヒストン修飾結合蛋白質の結合ドメインに換えることで他のヒストン修飾を検出する蛍光プローブに変更することが可能です。この原理を用いて、ヒストン修飾を検出する蛍光プローブのシリーズ化を行いました。BRD2 のブロモドメインを用いてヒストン H3K9/K14 のアセチル化、HP1αのクロモ

ドメインを用いてヒストン H3K9 のトリメチル化の蛍光プローブを作製しました。
蛍光プローブを薬剤スクリーニングに応用するためには、定常的に蛍光プローブを発現する細胞を作製し、ハイスループットな測定系を構築する必要があります。そこで、定常的に蛍光プローブを発現する細胞の樹立を試みました。piggyBac のトランスポゾンを用い、HeLaS3 もしくは COS7 細胞に導入し、Venus の蛍光を指標にフローサイトメーターにより回収しました。Histac はヒストンを含む大きな蛋白質であるため、Histac の発現により細胞に異常がでないか確認した。細胞周期、遺伝子発現解析ともに異常がないことがわかりました。

（２）詳細

研究テーマ A「Histac」のシリーズ化

1. Histac-H3K9/K14ac の開発

染色体の転座によって NUT タンパク質との融合タンパク質 BRD4-NUT をつくり、NUT midline carcinoma（NMC）という致死性の高い悪性腫瘍を生じさせることが知られている BRD4 のブロモドメインをヒストン修飾結合ドメインに用いて、ヒストン H3 のアセチル化蛍光プローブを作製しました。各ドメインを入れ替えたプローブを 9 種類作製し、アセチル化誘導に対し、蛍光強度比変化が大きいものを探しました。アセチル化の誘導には、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A(TSA)を用いました。最も応答の大きかったものは、培地交換により TSA を除いても応答が戻らず、不可逆的なプローブだったため、再度、蛍光プローブのスクリーニングをし、可逆性のある蛍光プローブを見つけました。アセチル化サイトの置換によって、作製した蛍光プローブの応答がヒストン H3K9 または K14 がアセチル化したときに応答するプローブであることがわかり、Histac-H3K9/K14 と名付けました。Histac-H3K9/K14 はアセチル化依存的に FRET が解離する方向に構造変化する蛍光プローブであることが分かりました。最近、BRD4 阻害剤が強力な抗癌活性を有することが報告され、BRD4 は抗癌剤開発の新規標的分子として大変着目されています。そこで、Histac-H3K9/K14 を用いて、ブロモドメイン阻害剤(+)-JQ1 の生細胞での評価を行い、ブロモドメイン阻害剤の探索に用いることができることを示しました。

2. Hismet-H3K9me3 の開発

修飾ヒストン結合ドメインに、トリメチル化ヒストン H3K9 と特異的に結合する HP1αを用いることで、ヒストン H3K9 のトリメチル化を認識する蛍光プローブ Hismet-H3K9me3 を作製しました。ヒストンメチル化酵素阻害剤を用いて、細胞内のこの蛍光プローブ内のヒストン H3 の脱メチルを誘導すると FRET が上昇する方向に構造変化していく様子が観察できました。H3K9 以外のメチル化サイトのリジンをアルギニンに置換してもヒストンメチル化酵素阻害剤処理による脱メチル化の応答が観察できることから、作製した蛍光プローブがヒストン H3K9 のメチル化反応特異的に応答していることがわかりました。ヒストンメチル化酵素阻害剤として Chaetocin があるが、Chaetocin は他のメチル化酵素阻害剤と同様に細胞毒性が強く、ヒストンメチル化阻害活性のみられる 24 時間の観察に細胞が耐えられなかったため、新規合成された Chaetocin 類縁体を用いてスクリーニングしたところ、細胞への毒性が低く、ヒストンメチル化酵素阻害活性を持つ化合物を見出しました。また、この蛍光メチル化プローブを用いて、細胞分裂の際のヒストンメチル化の増減を調べたところ、細胞分裂前期に急速な蛍光強度比の上

昇が見られ、分裂前中期で一度減少した後、分裂中期で一度下げどまり、分裂後期で再び減少し、分裂終期で間期と同じレベルに戻りました。作製したヒストン H3K9 メチル化プローブは、ヒストン H3K9me3 と HP1αのクロモドメインとの結合に基づくものであり、この結合はメチル化サイトに隣接する H3S10 のリン酸化によって解離するため、分裂前中期での蛍光強度比の減少は H3S10 がリン酸化をされていく過程を示しています。蛍光プローブの応答が H3K9 のメチル化もしくは H3S10 のリン酸化の影響を除くために蛍光プローブ内のヒストン H3K9 をアルギニンに置換した K9R と、ヒストン H3 の 10 番目のセリンを置換した S10A、S10E を作製したが、どの変異体も HP1α との結合能がなくなるため、分裂前中期に蛍光強度比が減少し、分裂終期に間期の値に戻りました。

研究テーマ B 蛍光プローブを定常的に発現する細胞の確立

蛍光プローブを薬剤スクリーニングに応用するためには、定常的に蛍光プローブを発現する細胞を作製し、ハイスループットな測定系を構築する必要があります。そこで、定常的に蛍光プローブを発現する細胞の樹立を試みました。これまで、CFP と YFP を用いた FRET 型の蛍光プローブは、CFP と YFP の配列が似ているため相同組み換えを起こしてしまい、定常的に発現する細胞を作製することができませんでした。今回、piggyBac のトランスポゾンを用いて細胞に導入することによって、Histac が定常的に発現する細胞を樹立することができました。Histac を含むトランスポゾンベクターとトランスポゼーズを同時に細胞に導入した後、Venus の蛍光を指標にフローサイトメーターにより回収しました。ゲノム DNA の PCR 解析から相同組み換えを起こしていないことを確認し、DNA 染色試薬である Hoechst33342 染色にて染色体異常がないことも確認し、さらに遺伝子発現解析から蛍光プローブを発現しても遺伝子発現異常がないことも確認しています。Venus の強度から蛍光プローブの発現量は G2/M 期でやや上昇していることがわかりました。ウェスタンブロット解析から Histac は相同組み換えを起こしておらず、さらに TSA によってアセチル化を誘導されることがわかりました。また一過性に Histac を発現させたときと同様に、アセチル化誘導により蛍光強度比変化が起こることも確認しています。

3. 今後の展開

完成した蛍光プローブを用いて、筋肉細胞や神経細胞の分化過程でのヒストン修飾の変化を観察します。ヒストン修飾化状態が分化誘導に関与しているかを調べるため、分化誘導時のヒストン修飾状態変化の時間経過を詳細に解析します。蛍光プローブの発現量が異なる細胞間では、基質と修飾酵素及び脱修飾酵素の比が異なり、応答の速度と変化量が異なってしまうという問題点がありました。そのため、蛍光プローブを薬剤スクリーニングに応用するためにハイスループットな測定系を構築するには、定常的に蛍光プローブを発現する細胞を作製する必要がありました。今回の成果として 蛍光プローブを定常的に発現する細胞を作製することに成功しました。この細胞を用いて化合物ライブラリーの生細胞内での評価を行っていきたいと考えています。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

申請した研究課題は、他のヒストン修飾を標的とする蛍光プローブの開発し、Histac をシリーズ化すること、アセチル化蛍光プローブ Histac の感度向上、蛍光プローブを用いたスクリーニング系の確立、局在マーカー蛋白質と Histac シリーズの同時観察、分化誘導・再生の際に細胞内で起きているヒストン H4 アセチル化の動態変化の観察、を挙げました。Histac のシリーズ化に関しては他のヒストンのアセチル化(H3K9/K14)及び、ヒストンのメチル化まで蛍光プローブを展開しました。感度向上とスクリーニング系の確立のための定常安定発現株の樹立ですが、蛍光プローブ内のリンカーの長さの調節と各ドメインの順列組合せを入れ替えたものを作製しましたが、劇的に応答を大きくすることができませんでした。しかし、従来できていなかった蛍光プローブを発現する定常発現細胞の樹立がトランスポゾンの系を用いることで可能になりました。作製した蛍光プローブの発現が核に一様に発現し、応答も局所的なものが観察できなかったため、局在マーカーとの共発現は実現できませんでした。

蛍光プローブの候補が多数あったため、マルチウェル対応の XY 電動顕微鏡の購入が、研究を遂行する上で大いに貢献しました。備品や消耗品の購入も効率よく執行していたと評価しています。修士学生 2 人との研究実施体制でしたが、蛍光プローブのセレクション及び検証を学生に任せ、申請者はその応用を分担しました。その成果としてヒストン H3 のアセチル化蛍光プローブに関しては BRD2 の阻害剤の評価系を作製でき、H3K9 トリメチル化プローブに関しては細胞分裂の際に、ヒストン H3 と HP1 の一過性の結合の上昇を観察することができました。

Histac を定常的に発現する細胞の作製に目途がついたことで、将来的には、シリーズ化した蛍光プローブを定常的に発現する細胞を用いて、ケミカルライブラリーをはじめとする大量の薬剤のスクリーニングや薬剤効果のモニタリングを行いたい。新規の治療薬の開発への一助となることを期待しています。

（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）

生細胞内でのエピジェネティックな変化をリアルタイムで解析できるヒストンH3アセチル化蛍光プローブ、ヒストンメチル化蛍光プローブを開発し、その有用性を確認した。トランスポゾンベクターを用いて組換えを克服し、蛍光プローブを安定に発現する細胞を樹立した。今までHistacをはじめ複数プローブのシリーズ化、スクリーニング系の確立などを試み、その結果、抗がん剤開発の新規標的分子探索プローブを開発するなど一定の成果を納められた。これらプローブはエピジェネティック創薬に応用できると思われる。今後ともエピジェネティクス医薬品の研究開発や基礎研究に役に立つ技術開発を引き続きお願いしたい。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Sasaki K., Ito A., and Yoshida Y. Development of live-cell imaging probes for monitoring histone modifications. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, 20, 1887-1892

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（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）

学会発表

- 佐々木和樹　ヒストン修飾の動態を可視化検出するための蛍光プローブの開発　第 87 回日本生化学会大会　2014 年 10 月，京都
- 佐々木和樹，伊藤昭博，吉田　稔　ヒストン H3 アセチル化蛍光プローブと BRD4 ブロモドメイン阻害剤評価系の開発　第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会，2014 年 6 月，仙台
- 佐々木和樹，鈴木律裕，伊藤昭博，新家一男，袖岡幹子，中尾洋一，吉田　稔　Development of novel FRET-based fluorescent probes for visualizing histone methylation in living cells　第 65 回日本細胞生物学会大会，2013 年 6 月，名古屋
- 佐々木和樹，鈴木律裕，伊藤昭博，新家一男，袖岡幹子，中尾洋一，吉田　稔　Development of FRET-based probe for imaging of histone H3 trimethylation in living cells　第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会，2013 年 5 月，奈良

受賞

第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会　若手優秀演題賞

「ヒストン H3 アセチル化蛍光プローブと BRD4 ブロモドメイン阻害剤評価系の開発」

佐々木和樹

2014 年 6 月 27 日

第 4 回　理研　研究奨励賞

Development of Imaging System for Epigenetics Dynamics

佐々木和樹

2013 年 3 月 14 日

著作物

- Sasaki K. and Yoshida M. Genetically Encoded FRET Indicators for Live-cell Imaging of Histone Acetylation, Fluorescent Protein-Based Biosensors: **Methods in Molecular Biology**, 1071: 151-161

・ **佐々木和樹**, 吉田　稔（2013）エピジェネティクスの可視化技術と創薬, **遺伝子医学 MOOK,** 25: 266–270

研　究　報　告　書

「複合体解析から挑む動的エピゲノム制御と多様性」

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：　田上　英明

1．　研究のねらい

DNA メチル化およびヒストン化学修飾を介したクロマチン高次構造制御が、DNA 配列に依存しないエピジェネティクスの分子基盤である。細胞メモリーとしての機能を持つエピゲノム情報は可塑的であると同時に、非常にダイナミックであることが明らかとなってきた。静的なクロマチン修飾状態を網羅的に解析するだけでなく、ヒストン分子も含めた動態制御の理解が今後の課題であろう。本研究「複合体解析から挑む動的エピゲノム制御と多様性」では、動的なエピゲノム情報の形成・維持・変換機構およびその破綻の分子メカニズムとその分子戦略の多様性を理解するために、クロマチン制御の反応中間体である可溶性（クロマチンに挿入されていない）ヒストンと相互作用する因子群を機能複合体として解析する。動的エピゲノム制御因子として作用する候補因子を可溶性ヒストン複合体として生化学的なスクリーニングを行い、その機能解析より複雑で機能重複性やバックアップ機構が絡むネットワークの理解を目指すものである。特に、分裂酵母における可溶性ヒストン H3 結合因子として新規に同定した HiTAP1(Histone H3(Three) associated protein 1)に着目し、その分子機能と生理的意義を明らかにする。さらに、様々な条件における複合体制製法の確立など新技術の創成を狙うと同時に、クロマチンダイナミクスに関与する機能因子群や可溶性ヒストンの量的バランス制御が、核内のみならず細胞質での代謝系や細胞増殖制御、細胞寿命と如何に関連するか、という新しい課題にも挑戦する。酵母から植物、ヒト培養細胞、マウスまで様々なモデルシステムを用いて、分子生物学・生化学的手法を中心に、細胞生物学、構造生物学、分子遺伝学を組み合わせることにより多角的に解析を進め、クロマチン制御の共通基盤と多様性について理解したい。

2．　研究成果

（1）概要

酵母をモデル系として、内在性ヒストン遺伝子 C 末端に FLAG/HA エピトープタグを付加した細胞株から様々な条件（対数増殖期、定常期、細胞周期同調系、クロスリンクの有無や固定法、抽出法）で各種ヒストン複合体を精製する解析系を構築している。このような生化学的スクリーニングにより、これまでに既知のヒストンシャペロン以外に多くのヒストンパートナーを得ている。本研究では、分裂酵母の可溶性 H3 複合体の構成成分として新規に単離した HiTAP1(Histone H3(Three) Associated Protein 1) に焦点を絞り、分子機能解析を進めることで、以下の点を明らかにした。

HiTAP1 は H3 と優先的に結合し、3 ヘリックスバンドル構造を持つ C 末端領域が、新規 H3 結合モチーフである。細胞内で HiTAP1 と結合する H3 は新規合成ヒストンマークである 56 番目のリジンのアセチル化が見られず、転写活性と関連する 4 番目のリジンがメチル化されこ

とより、細胞内においても H3/H4 を分離させることが示唆される。また、HiTAP1 の酸性領域および C 末端領域のみを核で大量発現させると著しい増殖阻害が見られるが、この阻害には H3 相互作用部位が必要であることを明らかにした。

種間を通して高度に保存された HiTAP1 の機能について、植物、マウスといった多細胞系においても、それぞれ根の生長や生殖への関与を見いだし、共通性と多様性について今後さらに解析を進める手がかりを掴むことに成功している。

ヒストン H3 量的制御に関与する候補因子として SPBC776.07 を同定し、その相互作用解析から核ー細胞質ーミトコンドリアの機能連携やクロマチンと代謝との関連性を示唆する結果を得ている。

可溶性ヒストン複合体の機能解析から新規に見いだした因子群の機能解析とその共通性や多様性を理解することにより、動的エピゲノム制御の分子基盤の解明につながることが期待される。

（２）詳細

研究テーマ A「HiTAP1 の分子機能と生理的意義の解明」

HiTAP1 は分裂酵母からヒトまで高度に保存されたタンパク質で、分裂酵母においてその過剰発現によって染色体分配異常を引き起こし、致死性を持つ因子(Mlo2, *N.A.R.*(1996))として報告されているが、その分子機能は全く不明であった。我々は、H3/H4 二量体と結合する既知のヒストンシャペロン Asf1 と比較することにより、細胞内で HiTAP1 は H3 と優先的に結合することを見いだした。HiTAP1 と共精製される H3 には新規合成ヒストンに特異的な 56 番目のリジン残基のアセチル化（K56Ac）が見られず、転写活性と関連する 4 番目のリジン残基のメチル化(K4Me2/3)が見られることから、H4 と解離した古い H3 であることが示唆された。*in vitro* において、リコンビナント HiTAP1 は複数部位で H3/H4 と結合するものの、C 末端 50 アミノ酸は H4 を解離し、H3 と優先的に結合することが明らかとなった。従来、H3/H4 は安定で二量体/四量体がユニットとされてきたが、H3/H4 を解離させる活性が初めて見い出された。何故ヘテロ二量体というシステムがすべての真核生物に保存されているか、解く鍵になるかもしれないと期待される。

in vitro における結合実験により、HiTAP1 C 末端断片はヒトでも保存されている Y288A および K292A 変異で H3 結合活性が低下した。NMR 構造解析により、HiTAP1 C 末端断片は新規の 3 ヘリックスバンドル構造であり、上記の部位は同一の表面に位置することを明らかにした。NLS-GFP を付加した酸性領域を含む HiTAP1 C 末端領域を大量発現すると強い増殖阻害を引き起こし、上記の H3 結合部位の点変異により抑圧されることを明らかにし、HiTAP1-H3 相互作用が核内で機能をしていることが示唆された。

研究テーマ B「HiTAP1 機能の共通性と多様性」

HiTAP1 は高度に保存されており、ヒトの可溶性 H3 複合体にも含まれることを確認し、HiTAP1-H3 相互作用の共通基盤が示唆される。植物モデルであるシロイヌナズナでは、根で多く発現し、その生長に関与することが確認された。現在、KO マウスを作成しているが、生殖への関与が示唆されている。多細胞生物における HiTAP1 の機能についてはこれからの課

題であるが、個体レベルでの表現型を初めて示すことに成功している。

研究テーマ C「ヒストン量的制御に関与する因子の探索」

DNA 複製時にクロマチン構造も倍加するため、ゲノム DNA とヒストン分子間の量的バランスは厳密に制御される必要がある。このバランスが如何に制御されているのか、破綻が何を引き起こすのか、H3 過剰発現時の複合体解析を行った。その結果、機能未知の SPBC776.07 を同定した。SPBC776.07 は、主にミトコンドリアマトリックスや細胞質に局在する Mam33 ファミリータンパク質で、出芽酵母からヒトまで保存されている。出芽酵母では、ミトコンドリア内での酸化的リン酸化や翻訳への関与が報告されており、ヒトでは、補体 C1q に結合する受容体 gC1qR としても報告されているが、ヒストンとの関連性については全く不明である。

内在性 SPBC776.07 にエピトープタグを付加して相互作用因子を探索したところ、脂肪酸合成(Fas1, Lsd1)やクエン酸回路（SPBP4H10.15）に関与するタンパク質を同定した。分裂酵母の脂肪酸合成酵素 Lsd1 は、核分裂異常の示す変異体としても報告されているが、ヒストン H3 過剰発現と代謝や呼吸といった細胞機能が如何に関連づけられるのか、今後の課題である。

3.　今後の展開

クロマチン高次構造はゲノム・エピゲノム統合性と関連して厳密に制御されるもので、その破綻が細胞がん化などにおけるゲノム不安定性と密接に関わる。また、クロマチン修飾の供与体は、アセチル-CoA や S-アデノシルメチオニン(SAM)という非常に重要な中間代謝産物であり、クロマチン制御と細胞の代謝、増殖、寿命とは密接に関わる。

可溶性ヒストン複合体の機能解析から新規に見いだした HiTAP1 や SPBC776.07 の機能解析とその共通性や多様性を理解することにより、動的エピゲノム制御の分子基盤の解明を目指してさらに研究を展開したい。また、動的な複合体精製法の確立やクロマチン動態の解析手法をについてさらに改良を重ねることにより、新技術の創成や新しい研究展開を目指す。これらの基礎研究から得られる成果は、エピゲノム制御に基づく細胞リプログラミングやがんなどの疾患に対するポストゲノム医療やバイオテクノロジー技術開発のためのシーズとなることも期待される。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

本研究の目的に対しては、有効的に研究備品を活用して多角的な解析を進めることで一定の成果を上げることができたと感じている。特に、および領域内外の共同研究により単独で解析すべてを行うのではなく、有機的な連携により効果的に研究展開できたと考えている。一方で、小さい研究室で博士後期課程に進学するなど研究者を目指す学生がいない中、1, 2 名の研究補助者だけで研究を実施することの難しさも改めて痛感した。年 2 回の領域会議で毎回成果を出すことに余裕なく追われてしまったという反省もある。納得するまでできることはやり

きるために生化学の地道な解析の積み重ねは当然必要であるが、より戦略的に研究を進めて成果を論文という形で連続的に世界に発信する努力をしたい。研究成果を論文として広く発信することが、サイエンスの進歩に欠かせないことは言うまでもないが、社会に対する大きな責任であり、一番の社会貢献であると考える。今後はこの経験を糧にして、モチベーションを持つ学生を指導して次代を担う人材育成ができるような研究室運営を目指したいと考えている。基礎研究は、すぐに役立つものではないものの、一般社会への波及効果を常に意識して研究を進めたいと考える。

（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）

可溶性ヒストン複合体から動的エピゲノム制御を理解するとの考えのもと、新規 H3 結合因子 HiTAP1 を見出し、その分子の生化学的性質、分子機能, 生理的意義、量的制御などについて解析した。その結果、この分子は真核生物で保存され、H3 と優先的に結合し、H3/H4 を解離させる活性が見出された。さらに、HiTAP1 の C 末領域を過剰発現すると増殖阻害を起こすこと、ノックアウトマウスでは生殖や発育にも関わること、また、過剰発現時の複合体解析より、代謝や呼吸機能に関わることも示唆されている。このように多くの結果が得られているので現状で取りまとめることを進める。今後得られたデータをもとに、HiTAP1 の生理機能にせまるストーリーを構築する必要がある。

5．　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1.	Gohei Nishibuchi, Yukimasa Shibata, Tomohiro Hayakawa, Noriyo Hayakawa, Yasuko Ohtani, Kaori Sinmyozu, <u>Hideaki Tagami</u> and Jun-ichi Nakayama. Physical and Functional Interactions between the Histone H3K4 Demethylase KDM5A and the Nucleosome Remodeling and Deacetylase (NuRD) Complex. (2014) ***J. Biol. Chem.*** 289, 28956-28970
2.	Gohei Nishibuchi, Shinichi Machida, Akihisa Osakabe, Hiromu Murakoshi, Kyoko Hiragami-Hamada, Reiko Nakagawa, Wolfgang Fischle, Yoshifumi Nishimura, Hitoshi Kurumizaka, <u>Hideaki Tagami</u> and Jun-ichi Nakayama.N-terminal phosphorylation of HP1α increases its nucleosome-binding specificity.(2014) ***Nucl. Acids Res.*** *in press.*

（2）特許出願

研究期間累積件数:0 件

（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）

・ <u>Hideaki Tagami</u>, Yuko Sakakura, Maki Kato, Role of a new histone H3 binding protein in chromatin regulation., International symposium “Message from yeast to Epigenetics～

Yeast clarifies the frontiers of life science～", Fukui, Sep.2–4.2013

- Hideaki Tagami, Role of a new histone H3 binding protein in chromatin regulation., Cold Spring Harbor Asia conference "Epigenetics, Chromatin & Transcription", Suzhou, China, May 5–9, 2014
- Hideaki Tagami, A novel histone H3 associated protein 1 (HiTAP1) is involved in histone level/balance control. 11th EMBL Conference: Transcription and Chromatin, Heidelberg, Germany, August 23–26, 2014

研　究　報　告　書

「FACT を介したクロマチンリモデリング機構の構造基盤」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 24 年 10 月～平成 27 年 3 月
研 究 者： 津中　康央

1.　研究のねらい

ヒトなどの多細胞生物においては、本質的には同じゲノムが個々の細胞に存在するにもかかわらず、発現する遺伝子の違いによって多様な細胞へ分化し、全体として統制のとれた一つの個体となる。このようなエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を解明することは分子細胞生物学における最も重要な研究課題となっている。真核生物では、遺伝子の発現制御はクロマチンの動的構造変化に依存して行われる。それゆえ、この過程で中心的役割を果たすリモデリング因子やヒストン化学修飾などがクロマチン構造をいかに巧妙に変化させて、遺伝子の働きを調節しているのか、その分子機構を理解する事が急務である。しかし、これまで多くの生化学的、分子遺伝学的研究結果が報告されているにもかかわらず、この分子機構は未だに不明な点が多い。その主な理由は、クロマチンの構造変化を引き起こす要因が非常に多岐にわたることに加えて、エピジェネティクス制御の際のクロマチン構造変化の道筋さえも解明されていない事実にある。

この問題を解決する方策として、構造生物学的手法が考えられる。立体構造解析は分子を直接的に‘観る’事を可能にする唯一の手段である。これまでにもこのアプローチが生命現象の具体的な発見、理解に導き、また医学・生物学の基礎的分野、産業に関連したバイオテクノロジーの分野に大きなインパクトを与えてきた。しかし、クロマチンの構造変換とエピジェネティクス制御の関係を解明する研究では、顕著な構造生物学的成果が少ないことも事実である。そこで、本研究ではエピジェネティクス制御に起因したクロマチンリモデリングの分子機構を立体構造の観点から明らかにすることに狙いを定める。本研究では具体的な研究対象として、階層的クロマチン構造と関連し、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関与しているリモデリング因子 FACT を選択し、FACT とその関連因子がクロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのかを立体構造の観点から解明する事を研究目的とする。本研究の目的が達成されれば、エピジェネティクス制御の分子機構解明に貢献する事ができる。

2.　研究成果

（1）概要

まず、FACT 機能ドメインの探索を行ったところ、立体構造が未決定であった SPT16 サブユニットの Mid ドメインの結晶化に成功し、分解能 1.92 Å の立体構造解析に成功した。この FACT-Mid ドメインの立体構造は他の生物種間でも強く保存されていた。次にヒストンとの相互作用解析は、Human Mid ドメインが Chaetomium thermophilum 由来のものとは異なり、ヒストン H2A/H2B 二量体と強く結合しない事を示した。さらに、Human において H2A/H2B 二量体と強く相互作用する FACT の領域は、Mid ドメインではなく、酸性天然変性領域である事がわ

かった。また、ゲルろ過解析の結果は、FACT の酸性領域が H2B 塩基性領域と相互作用する事を示した。以上の結果をもとに、FACT 酸性領域がヌクレオソーム中の H2B 塩基性領域と相互作用する事でクロマチンリモデリング反応を誘起する事がわかった。このように、クロマチンリモデリング因子 FACT がクロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのかを立体構造の観点から明確にした。

（2）詳細

Human 由来 FACT を H2A/H2B 二量体、H3/H4 四量体、ヒストン八量体と複合体を形成させ、立体構造解析を行った。まず、X 線結晶構造解析については、結晶化及び複合体形成に最適な FACT 機能ドメインの探索を行ったところ、立体構造が未決定であった SPT16 サブユニットの Midドメインの結晶化に成功した。SPring8 にてこの結晶の回折データを収集し、X 線結晶構造解析を行ったところ、分解能 1.92 Å の立体構造解析に成功した（Figure 1)。その構造は、二つの PH ドメイン構造から構成され、さらに、C 末端にこれまで例のなかった U-turn とよばれる短い α-ヘリックス 3 本からなる構造体が発見された（Figure 1)。この構造は内部の疎水的なコアで安定化している点が特徴的である。静電ポテンシャルマップを作製したところ、Mid ドメインの分子表面が表側と裏側で電荷状態が正負、全く逆になる事がわかった。これは、他の PH ドメイン構造をもつ蛋白質には見られない特徴である。さらに、形成させた FACT-ヒストン複合体のストイキオメトリーや構成因子をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで詳細に解析した。その結果を踏まえた上で、ヒストン H2A/H2B 二量体との複合体の X 線結晶構造解析を試みたが、構造決定にはいたらなかった。

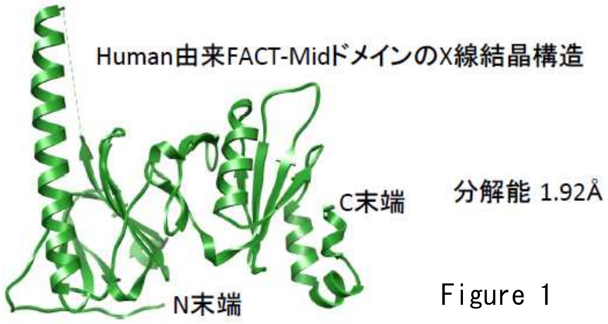


Figure 1

ところで、ほぼ同時期に Saccharomyces cerevisiae と Chaetomium thermophilum 由来の Mid ドメインの X 線結晶構造が報告された。これらの構造を我々のもの(human 由来)と比較したところ、ループ構造でいくつか相違が見られるものの、骨格となる構造はほとんど同じであった。Human で決定された U-turn 構造は、S. cerevisiae では認められなかったが、C. thermophilum ではほぼ同じ構造が存在した。静電ポテンシャルマップも同様に比較したところ、分子表面の電荷状態はほとんど同じであった。

上記の報告に加えて、C. thermophilum 由来 FACT-Mid ドメインと H2A/H2B 二量体の複合体の X 線結晶構造が報告された。この結晶構造において、さきほどの U-turn 構造が H2B の N 末端 α ヘリックスを認識していることが明らかとなった。その相互作用の中心は、疎水性残基であった。しかしながら、human 由来の U-turn 構造では、それらの相互作用を構成している疎水性残基の一つが塩基性残基(K904)に置換されており、ヒストンとの疎水的相互作用が弱められている可能性がある(Figure 2)。そこでまず、この変異(K904V)を human 由来 Mid ドメインに導入し、ヒストンとの相互作用解析を行った。ゲルろ過解析の結果、H2A/H2B 二量体に対して、この変異体は野生型と同様に安定な複合体を形成せず、ほとんど相互作用しない事

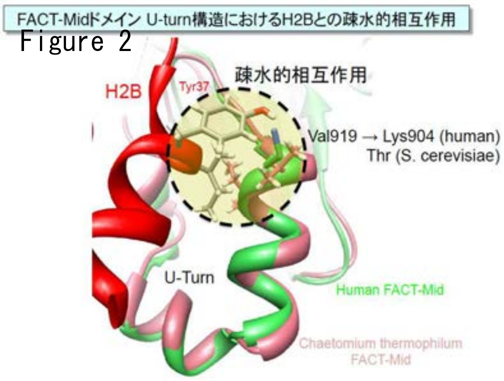


Figure 2

がわかった。また、この他にもMidドメインに様々様々な変異を導入し、ヒストンとの相互作用を調調べたが、有意に親和性が上昇する変異は見つからなかった。つまり、C. thermophilum 由来 FACT と human ではヒストン H2A/H2B 二量体との結合様式が異なる可能性が示唆された。

最近、yeast H2B の N 末端の塩基性領域は、yeast FACT がヌクレオソームに結合し、H2A/H2B を除去するために重要な役割を果たす事が報告された。それに対して、C. thermophilum 由来 FACT-Mid ドメインと Xenopus 由来 H2A/H2B 二量体の立体構造解析で示された相互作用領域は、上記の塩基性領域とは異なり、より内部の α ヘリックスを形成している Ile39 などの疎水性残基であった。そこで、human FACT と human H2A/H2B 二量体の結合でも、同様の塩基性領域が必要であるか否かを調べた。ゲルろ過解析の結果、human ではこの塩基性領域が結合に必要である事がわかった。また、相互作用解析の結果は、Human において H2A/H2B 二量体と相互作用する領域は Mid ドメインではなく、その C 末端側にある酸性天然変性領域である事を示した。つまり、この FACT 酸性領域がヌクレオソーム中の H2B 塩基性領域と相互作用する事でクロマチンリモデリング反応を誘起する事が示唆された。

以上のすべての結果を基に、クロマチンリモデリング因子 FACT がクロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのかを立体構造の観点から明確にした。

3. 今後の展開

エピジェネティクス制御に関連した階層的クロマチン構造はいまだに不明な点が多い。発生初期においては、おそらく多数のクロマチンリモデリング因子や転写因子が階層的なクロマチンの領域を正確に制御しながら生物個体として分化させ、その状態を維持するために機能している。本研究アプローチは、これらの因子の研究にも十分適応可能なものであり、将来モデルケースとなる可能性がある。例えば、未だ全容が明らかとなっていないポリコーム複合体による階層的クロマチン形成メカニズムの解明にも本研究アプローチを適応する事で、立体構造の観点から分子レベルで明確にしたい。さらに壮大なプロジェクトとして、核内受容体がクロマチン上の特異的な遺伝子配列に結合するところから、Coactivator-medicator 複合体をリクルート→初期的なクロマチンリモデリングを誘発→RNA pol II complex をリクルート→本格的なクロマチンリモデリングによる転写伸長に至るまでの転写活性化の全過程も同じ研究アプローチでいつの日か解明できるかもしれない。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

X 線結晶構造解析及び、生化学的実験手法を用いて、クロマチンリモデリング因子 FACT によるヌクレオソーム構造変換機構の構造基盤の一端を明らかにすることができた。本研究結

果は、Human 由来 FACT が真菌などの他の生物種のものとは異なるヒストン認識機構をもつ事を明確にした。この事により、リモデリング因子 FACT が高等真核生物の生体内階層的クロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのかについて、有用な知見を与える事ができた。今回の研究を今後発展させることでクロマチン構造が影響する遺伝子発現制御の分子機構解明に十分貢献する事ができると考えられる。

（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）

エピジェネティックな遺伝子発現制御に関係しているリモデリング因子がクロマチン構造にどのように結合し、影響を及ぼしているのか、構造生物学的なアプローチにより解析を行なった。FACT の機能ドメイン SPT16 サブユニットの Mid ドメインの結晶化に成功し、分解能 1.92 Å の立体構造解析を行った。ヒトにおいて H2A/H2B 二量体と強く相互作用する FACT の領域は、C 末に存在する酸性天然変性領域であり、この領域が H2B の N 末テールにある塩基性領域と相互作用することを明らかにした。競争はし烈であるが、構造を基盤にした研究は重要であり、今後とも着実な研究姿勢を続け欲しい。

５．　主な研究成果リスト

（１）論文（原著論文）発表

1.	Manami Hashimoto*, Noriyuki Kodera*, <u>Yasuo Tsunaka*</u>, Masayuki Oda, Mitsuru Tanimoto, Toshio Ando, Kosuke Morikawa, and Shin-ichi Tate. Phosphorylation-Coupled Intramolecular Dynamics of Unstructured Regions in Chromatin Remodeler FACT. ***Biophys J.*** (2013) 104, 2222-2234. (*First equal contribution)
2.	Yong-Woon Han, <u>Yasuo Tsunaka</u>, Hiroaki Yokota, Tomoko Matsumoto, Gengo Kashiwazaki, Hironobu Morinaga, Kaori Hashiya, Toshikazu Bando, Hiroshi Sugiyama, and Yoshie Harada. Construction and characterization of Cy3- or Cy5-conjugated hairpin pyrrole-imidazole polyamides binding to DNA in the nucleosome. ***Biomater. Sci.*** (2014) 2, 297-307.

（２）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（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）

特になし

研　究　報　告　書

「始原生殖細胞の内因性リプログラミング機構による幹細胞制御」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 23 年 10 月～平成 26 年 3 月
研 究 者：　林　克彦

1.　研究のねらい

生殖細胞系列は個体を形成する全細胞系列の中において、唯一エピゲノムを書き換えること（リプログラミング）により、新しい個体を作る能力（全能性）を獲得する細胞系列である。生殖細胞系列の起源である始原生殖細胞(Primordial Germ Cells: PGCs)は、その分化過程においてゲノムワイドなヒストン修飾の変換や DNA の脱メチル化など特徴的なエピゲノムリプログラミングをおこす。本研究は生理的条件下でエピゲノムリプログラミングを実行する生殖細胞系列の分化過程を体外培養で再現し、その分化メカニズムを明らかにするとともに、内因性のリプログラミング機構が iPS 細胞のエピミューテーションを消去する手段として有効であるかについて検討することを目的とした。

2.　研究成果

（1）概要

本研究ではまず多能性幹細胞（ES 細胞/iPS 細胞）からすべての生殖細胞のもとである PGCs を分化誘導させる培養方法を構築した。この分化誘導系により得られた PGC 様細胞（PGCLCs）では胚内の PGCs と同様の遺伝子発現パターンやエピゲノムリプログラミングの特徴（DNA のメチル化の減少、ヒストン H3K27 のメチル化亢進と H3K9 のジメチル化減少、X 染色体の再活性化）が観察された。PGCLCs の機能性（配偶子への分化能および個体発生能）を評価した結果、雌の ES/iPS 細胞から分化誘導した PGCLCs は胎仔生殖巣の体細胞とともに卵巣に移植すると受精可能な卵子に分化し、それらの受精卵からは健常な個体が得られた（論文発表(3)）。本研究は世界で初めて ES/iPS 細胞から分化させた PGCLCs から機能的な卵子が誘導されることを示した研究成果である。

次に ES/iPS 細胞から PGCLCs への分化誘導系を用いて、PGCs の分化機構について解析した。PGCs に特異的に発現する転写因子の強制発現系による機能的スクリーニングにより、PGCs の分化には転写因子 Prdm14 が中心的な働きがあることを明らかにした（論文発表(5)）。Prdm14 は de novo DNA メチル化酵素である Dnmt3a/b の発現を抑制することが示唆されており、これまで不明であったエピゲノムリプログラミングを制御する遺伝子発現ネットワークを解明するための糸口を掴んだ。

（2）詳細

多能性幹細胞から生殖細胞系列を分化誘導する培養方法の確立のためには、得られた生殖細胞系列の機能性の検証は必須である。本研究では雌の ES/iPS 細胞から分化誘導した PGCLCs の卵子への分化能を卵巣に移植することにより評価した。これまでの研究では PGCs の卵巣への移植方法は確立されていなかったため、関連する先行研究を参考に

PGCLCs を単独ではなく、卵子形成を補助する顆粒膜細胞の前駆体を含む胚齢 12 日目の雌の生殖巣の体細胞と再凝集させたのちに、その細胞塊（再構成卵巣）を免疫不全マウスの卵巣嚢内に移植した。その結果、移植後約1ヶ月目の再構成卵巣には多数のPGCLC由来の卵母細胞が確認された。これらの卵母細胞は体外成熟培養により受精可能な卵子にまで分化し、これらの卵子を用いた体外受精により得られた受精卵は仮親の卵管に移植することにより健常な新生仔に発生した（図１）（論文発表(5)）。得られた新生仔のゲノムインプリントはBisulfite 解析した遺伝子座において正常であり、胎盤の重量も野生型のマウスと同様であった。これらの新生仔は野生型のマウスと同様に発育し、雌雄ともに妊孕生をもつ個体となった。得られる次世代の個体数や健常性に異常は認められなかった。これらことから雌のES/iPS 細胞から分化誘導したPGCLCsは機能的な卵子に分化する能力をもつことが証明され、体外培養における多能性幹細胞から生殖細胞の源であるPGCs（PGCLCs）の分化培養系が確立されたと考えられた（論文発表(2、4、5)）。

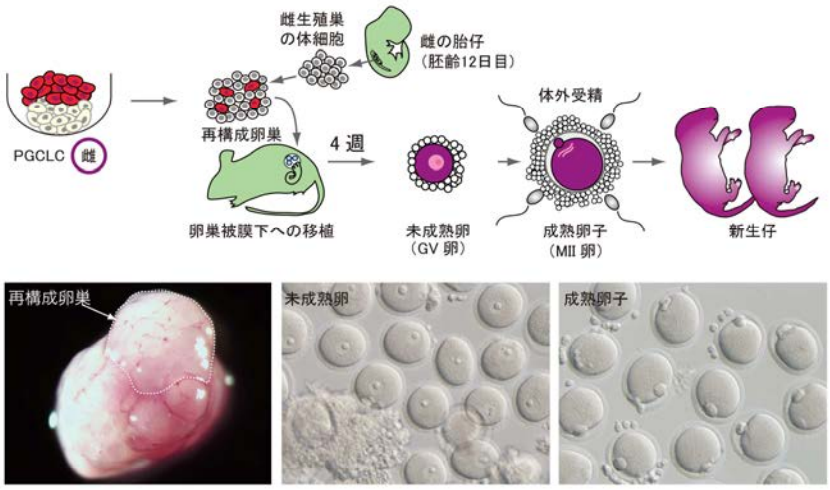


図１　PGCLCs の移植による卵子への分化
（上段）雌の PGCLCs は胚齢 12 日目の雌の生殖巣の体細胞と共に免疫不全マウスの卵巣嚢内に移植した。移植された体内において未成熟卵まで分化し、その後体外培養により受精可能な成熟卵子まで分化させた。これらの卵子は野生型の精子と受精させることにとり個体発生能をもつ受精卵となった。（下段）移植された再構成卵巣（左）から得られた未成熟卵子（中）と体外成熟培養後の成熟卵子（右）。スケールは（左）500μm,（中および右）50μm

上述したPGCLCsの分化培養系の確立はPGCsの数的制限を排除し、PGCsの分化過程を解析する上で重要なツールとなった。実際に、この分化培養系を利用して PGCs の分化に十分な転写因子群を同定した。PGCs の発生に必須な転写因子 Blimp1、Prdm14、Tfap2c を、ドキシサイクリン誘導系を用いて PGCLCs の前駆細胞であるエピブラスト様細胞（EpiLCs）に発現させた結果、ほぼ全てのEpiLCsがPGCLCsに分化することを明らかにした（論文発表(3)）。転写因子の発現により誘導されたPGCLCsは精巣に移植すると精子にまで分化し、それらの精子からは健常な個体が得られた。また興味深いことに、Prdm14 のみを発現させるだけでも、3 種類の転写因子を同時に発現させた場合より分化の効率は落ちるものの、精子に分化する能力をもった PGCLCs に分化することが明らかになった。これらのことにより Prdm14 がPGCsの分化において中心的な役割を担っていることを明らかにした。Prdm14はPGC特異的遺伝子や多能性遺伝子の発現、さらには DNA メチル化酵素遺伝子の発現を制御していることが示唆されており、PGCs の初期分化を制御する転写因子とエピゲノムリプログラミングの制御との接点が初めて明らかとなった。

3.　今後の展開

これらの一連の研究により確立された PGCLCs の分化誘導系を用いて、以下の研究の展

開が期待される。

（1） 生殖細胞系列の分子メカニズムとエピゲノムを制御する遺伝子ネットワークの解明

PGCLCs の分化培養系により、通常胚あたり数百個しかないエピブラストや 50 個程度しかない分化初期の PGCs と同等の細胞を 10^6 レベルで調整することが可能となった。また培養の開始点が ES/iPS 細胞であるために、遺伝子改変が容易であり、遺伝子欠損による解析を迅速に行える。今後はこの分化培養系を用いて、PGCs の分化に必須な転写因子やエピジェネティック関連因子の機能を解析することにより、PGCs の分化メカニズムやエピゲノム制御する遺伝子ネットワークの詳細が明らかになると考えられる。

（2） iPS 細胞を用いた不妊症の病態解明（ヒトへの応用も含む）

突然変異で配偶子欠損などの不妊症を呈する動物については、その系統を維持することが困難であり十分な解析が行われない。本分化誘導系では iPS 細胞から機能的な生殖細胞系列を分化誘導が可能なため、突然変異体から iPS 細胞を樹立することにより生殖細胞系列での詳細な解析が可能となる。このことは機能的に未知の遺伝子の同定につながると考えられる。またマウス ES/iPS 細胞から機能的な PGCLCs を分化誘導する方法はヒトへ応用できる可能性をもつ。ヒト ES/iPS 細胞から生殖細胞系列を分化させることが可能となれば、より具体的に不妊症の原因究明にも貢献できることが考えられる。

4． 評価

（1）自己評価

（研究者）

本研究の遂行によって、当初の目的のひとつである「生殖細胞系列の分化過程を体外培養で再構築」はほぼ達成できたと考えられる。またこの再構築の利用による PGCs の形成メカニズムの解明においてもほぼ満足のいく結果を得られたと考えている。ただし生殖細胞系列でおこる自律的リプログラミングによる iPS 細胞のエピミューテーション消去については検討にまでは至らなかった。この要因として、卵子の再構築に関して新聞等にも大きく取り上げられたために（いずれも平成 24 年 10 月 5 日付朝日新聞（１面、３面）、読売新聞（１面、２面）、毎日新聞（１面、２面）、産経新聞（１面、３面）、日本経済新聞（38面）、東京新聞（１面）、中日新聞（１面）、京都新聞（１面、３面））、そのテーマの進展に関する社会的要求が大きくなり、それに対応するために研究テーマを絞り込んだことが挙げられる。研究の実施はほぼ研究者が一人でおこなっており、多岐にわたる研究テーマの遂行は困難であった。しかし個人研究であるさきがけ研究の理念には則したものであると考えられた。また研究費執行状況に関しては、平成 26 年度に新しく研究室を主宰するために増額を申請した以外については、ほぼ予定どおりの執行になった。以上のことから研究の達成状況、研究費の執行状況、研究成果の社会的波及効果において概ね良好に研究を遂行できたと思われる。

（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）

多能生幹細胞（ES細胞/iPS細胞）から始原生殖細胞(PGCs)を分化誘導させる培養方法を構築した。この系より得られたPGC様細胞(PGCLCs)を胎仔生殖巣の体細胞とともに卵巣に移植することで受精可能な卵子に分化させ、その受精卵から健常な個体を得た。これは世界初の快挙であり、波及効果のある成果である。次に、PGCの分化機構について、PGCLCsの分化誘導系を用いて解析し、PGCの分化には転写因子Prdm14が中心的な働きをすることを明らかにした。分化培養系ができたことにより、発生初期の生化学的解析が可能になり、PGCsの分化機構の解明が進む。また、マウスでのES/iPS細胞による分化誘導系の確立はヒトへの応用の可能性が高まり、不妊症の原因解明にもつながる。本さきがけ研究の成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本分野のトップランナーとして注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1.	Aramaki S, Hayashi K, Kurimoto K, Ohta H, Yabuta Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Kato Y, Shirahige K, Saitou M.A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants.***Dev Cell.*** 2013; 27: 516–529.
2.	Hayashi K and Saitou M. Stepwise differentiation from naïve state pluripotent stem cells to functional primordial germ cells through an epiblast-like state. ***Methods Mol Biol.*** 2013; 1074: 175–183.
3.	Nakaki F, Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y, Saitou M. Induction of the mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. ***Nature*** 2013; 501: 222–226.
4.	Hayashi K and Saitou M. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. ***Nature Protoc.*** 2013; 8: 1513–1524.
5.	Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. ***Science.*** 2012; 338: 971–975.

（2）特許出願

研究期間累積件数：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）

学会発表

- 林 克彦、斎藤通紀 「Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell specification in mice」 第 45 回日本発生生物学会 2012 年 5 月 30 日
- Hayashi K「Producing sperm and oocyte from pluripotent stem cells」 The 3rd International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue & Organs (CRYO) 2013 年 3 月 21 日
- 林 克彦 「iPS 細胞からの生殖細胞作製−技術開発とその意義−」 上廣倫理研究部門

開設記念シンポジウム　2013 年 7 月 26 日

・ <u>林　克彦</u>「生殖細胞系列の体外培養による再構築」 第 25 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム　2013 年 8 月 29 日
・ <u>Hayashi K</u>「Germ cell differentiation from stem cells in mice」17th World Congress on IVF　2013 年 9 月 7 日
・ <u>林　克彦</u>「始原生殖細胞の分化を体外で再現する培養系の確立と利用」 第 85 回日本遺伝学会　2013 年 9 月 19 日
・ <u>林　克彦</u>「生殖細胞系列の再構築培養系の確立と生殖巣の役割」 第 21 回日本ステロイドホルモン学会　2013 年 11 月 16 日
・ <u>Hayashi K</u>「Prospects of gamete production from pluripotent stem cells」The 45th meeting of the Dutch Society of Obstetrics and Gynaecology 2014 年 5 月 23 日
・ <u>林　克彦</u>「In vitro germline formation from pluripotent stem cells」 第47 回日本発生生物学会 2014 年 5 月 30 日
・ <u>林　克彦</u>「Generation of eggs from mouse embryonic stem cells」 Society of Reproductionand Fertility 2014 年 9 月 21 日

プレスリリース

・ 朝日新聞（1面、3面）、「iPS細胞で卵子　出産」、平成24年10月5日掲載、
・ 読売新聞（1面、2面）、「iPS細胞から卵子　マウスで成功　子も誕生　京大チーム」、平成24年10月5日掲載
・ 毎日新聞（1面、2面）、「iPS細胞:卵子作成、マウス誕生　京大が世界初、精子に続き」、平成24年10月5日掲載
・ 産経新聞（1面、3面）、「iPS細胞から卵子　すでに精子も「生命作製」可能に」、平成24年10月5日掲載
・ 日本経済新聞（38面）、「iPS卵子からマウス　京大チーム、不妊症研究へ道」、平成24年10月5日掲載
・ 東京新聞（1面）、「iPS細胞から卵子」、平成24年10月5日掲載
・ 中日新聞（1面）、「iPSから卵子」、平成24年10月5日掲載、
・ 京都新聞（1面、3面）、「iPS 卵子でマウス」、平成24年10月5日掲載
・ 日刊工業新聞（22面）、平成24年10月5日掲載
・ 科学新聞（22面）、平成24年10月26日掲載、
・ 日本経済新聞（38面）、「京大の「iPS卵子」を 12 年 10 大成果に　米科学誌」、平成24年12月21日掲載
・ 日経産業新聞（9面）、「米サイエンス誌　iPS細胞から卵子作製　十大成果に京都大」、平成24年12月21日掲載
・ 毎日新聞（4面）、「米サイエンス誌：今年の 10 大成果に「iPS研究」」、平成24年12月21日掲載

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

<u>(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</u>

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)

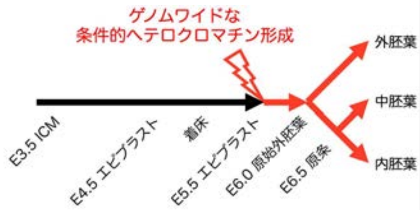


図1.(左)三胚葉形成直前時期(エピブラスト期)にヘテロクロマチン化されるEtoLドメイン(=Early-S から Late-S に複製タイミングが変化、ゲノムの 6%強を占める)に生じる変化とその他の核内変化。(右)エピブラスト期にゲノムワイドに条件的ヘテロクロマチンが形成されると考えられる。

(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クエ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。

<u>（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</u>

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<u>仮定している</u>（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 期後期複製のままで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。

<u>（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</u>

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 細胞分化それ自体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。

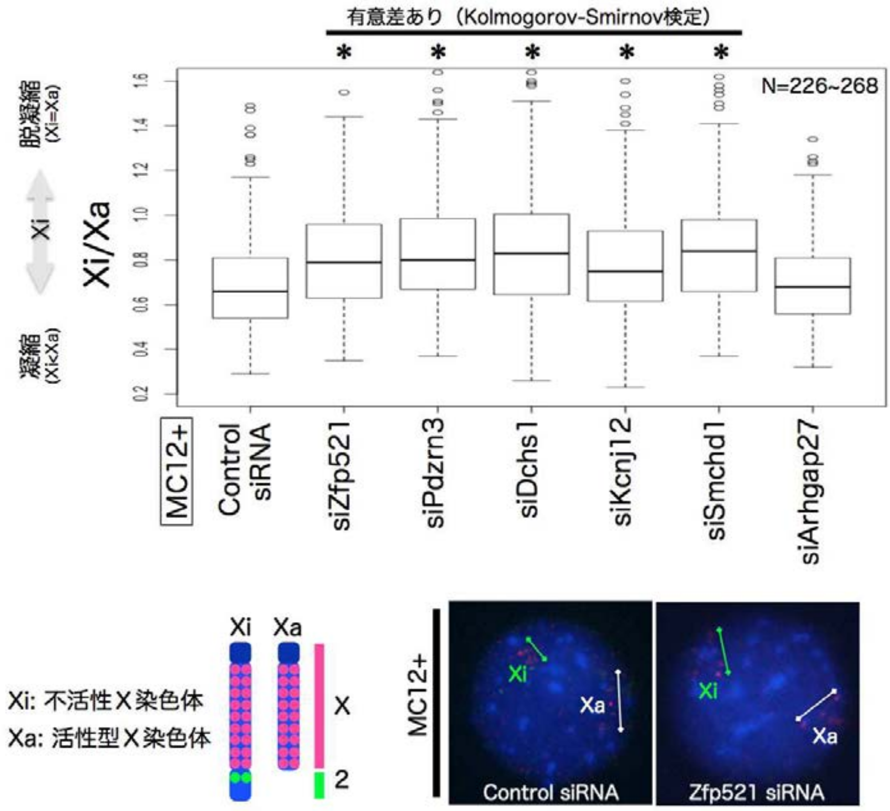


図. MC12 細胞の不活性 X 染色体の S 期後期複製タイミング解除を引き起こした siRNA はいずれも不活性 X 染色体(Xi)の脱凝縮も引き起こした（Dchs1, Zfp521, Pdzrn3, Kcnj12）

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、今後に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, <u>Hiratani I</u>, 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

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

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

研 究 報 告 書

「記憶タグとして機能するエピジェネティクスの解明」

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： 平野 恭敬

1． 研究のねらい

ヒトを含めた動物は、記憶を獲得し、獲得した記憶を保持することで、生存に有利になるよう行動する。よく受け入れられているシナプスタグ仮説では、学習により活性化されたシナプスにタグが誘導されると説明している。そのタグが新たに発現したタンパク、例えば受容体を捕えることにより、記憶が獲得されると考えられている。しかし、獲得した記憶がどのように保持されるのか、記憶研究分野の大きな謎として残っている。私は、記憶保持にはヒストンアセチル化による持続的な遺伝子発現調節が必須であることを示唆するデータを得ていた。従ってシナプスにタグが存在するように、記憶を保持するため、核内にもエピジェネティクスという重要なタグ（記憶タグ）が存在するのではないかと考えた。

長期記憶に関与する遺伝子、およびシグナル伝達経路はショウジョウバエから哺乳類までよく保存されている。本研究では、哺乳類と同様の学習を行うことができるショウジョウバエをモデル生物として選択した。ハエでは網羅的 RNAi 系統が樹立されており、例えば記憶に関与するエピジェネティクスの制御因子を網羅的に探索することが可能である。またエピジェネティクス解析から得られた候補因子の、記憶における関与を調べるうえでもアドバンテージとなる。ショウジョウバエの脳内で、記憶を担う神経は全脳の 4%と考えられており、全脳の解析では記憶を保持する細胞で起きるエピジェネティクスの変化を検出することは困難である。私は 4%の記憶中枢の細胞核を単離する新しい手法を確立し、これを用いて記憶中枢で起きるヒストンアセチル化の変化を網羅的に解析することに成功した。本研究ではこの新規手法を活用し、記憶タグとして機能するアセチル化ヒストンを詳細に解析し、さらにアセチル化ヒストンの維持機構を解明することを目標とした。続いて、他のヒストン修飾も記憶タグとして機能するか、またそれらはアセチル化ヒストンと関連があるかを検証した。これらを明らかにすることで、エピジェネティクスは記憶保持に重要な記憶タグであるという新しい概念を提唱することを目指した。

2． 研究成果

（1）概要

本研究では、1：記憶タグとしてのヒストンアセチル化の詳細な解析、2：ヒストンアセチル化以外のエピジェネティック制御の関与、に焦点を絞った。

記憶タグとして機能するヒストンアセチル化の解析として、記憶保持に重要なヒストンアセチル化酵素の同定、それら標的遺伝子の同定、個々の標的遺伝子の機能を明らかにした。これらの結果より、実際にヒストンのアセチル化が記憶タグとして機能する仮説を支持できた。

ヒストンアセチル化以外のエピジェネティック制御を明らかにするため、ショウジョウバエで明らかになっているエピジェネティクス因子を網羅的に機能阻害し、記憶に関与するものを同定し

た。この結果は、ヒストンアセチル化のみならず他のエピジェネティック制御を視野に入れた今後の解析が重要となることが示唆された。

本研究遂行過程で、本研究で取り扱った記憶保持に重要な転写因子 CREB/CRTC が空腹時に脳内で活性化し、空腹時の記憶形成を促進することを発見し、その詳細メカニズムを明らかにした。

（２）詳細

研究テーマ A「記憶タグとしてのヒストンアセチル化の詳細な解析」

ハエに匂いと電気ショックを同時に与えると（嫌悪学習）、その匂いを嫌いになる。ショウジョウバエの網羅的 RNAi 系統を活用し、嫌悪学習後の長期的な記憶の形成、さらに記憶の保持におけるヒストンアセチル化酵素を探索した。結果、CBP が長期記憶の形成に必要であること、また GCN5 と Tip60 が記憶の保持に重要であることを見出した（図 1）。エピジェネティクス因子が遺伝子発現を誘導するためには、転写因子が必要である。記憶の保持過程で重要な転写因子として、私は CREB/CRTC 複合体を同定した（図 1）。これらの標的遺伝子もまた記憶保持に必要であれば、上記の結果が強く裏付けられる。ヒストンアセチル化酵素と CREB/CRTC 標的を探索するため、私の確立した新規手法を用い、候補遺伝子を同定した。さらに RNAi 系統を用いた遺伝子の機能阻害により、実際にそれら遺伝子が記憶の形成過程、または保持過程に必要であることを明らかにした。

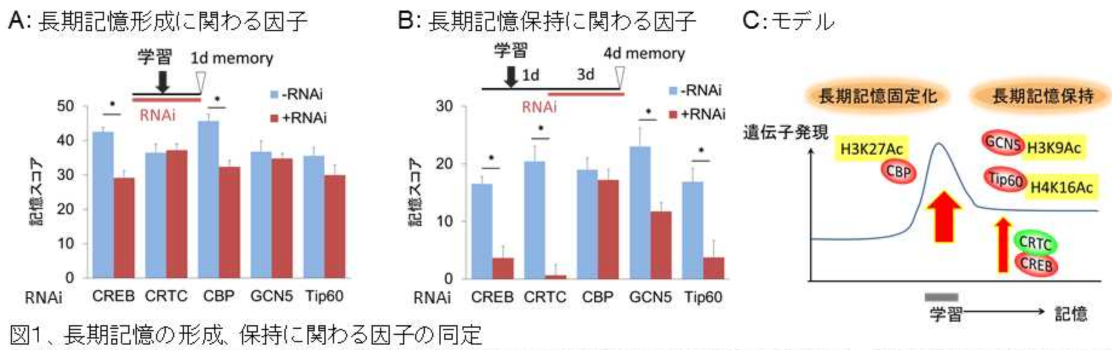
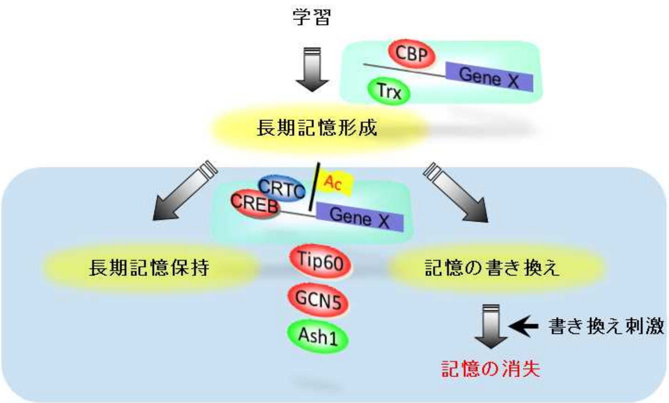


図1、長期記憶の形成、保持に関わる因子の同定
(A) 長期記憶の形成にはCREBとその結合因子CBP(ヒストンアセチル化酵素)が必要である。(B) 長期記憶の保持にはCREB/CRTCとヒストンアセチル化酵素であるGCN5とTip60が必要である。Gal4-UASシステムを改変したMBswを用いて、記憶中枢のキノコ体でのみ一過的にそれぞれ遺伝子のRNAiを誘導した。MBswはハエにRU（薬剤）を摂食させたときにキノコ体で発現誘導させるGal4系統である。(C) 長期記憶の固定化と保持に寄与するHATとCREB/CRTCのモデル。それぞれのヒストンアセチル化酵素は異なるヒストンのリジン残基(K)をアセチル化(Ac)する。（*t*-test: $^{*}P<0.05$）
注：記憶測定は、匂いを電気刺激と連合学習させ、匂いからの逃避行動（記憶）を測定する嫌悪条件付けを用いた。

学習に伴い記憶は作られるが、そのような記憶は間違いであることがあり、記憶の書き換えが必要になることがある。記憶の書き換えはどのような分子により制御されるのか、世界的に研究されていたがいまだ分子レベルの理解に至っていない。CREB/CRTC の解析を進めてみると、CREB/CRTC は記憶の保持とともに記憶の書き換えにも重要であることを見出した。従って、CREB/CRTC の標的遺伝子も記憶の書き換えに機能する可能性が示唆されました。上記の CREB/CRTC とヒストンアセチル化標的遺伝子の中に、記憶の書き換え遺伝子であるか検証したところ、記憶の書き換え遺伝子を同定することに成功した。以上のことから、ヒスアセチル化は当初の私の仮説通り、記憶の保持に重要であることに加え、記憶の書き換えにも必要であることがわかった。記憶の書き換え可能な時期は、学習後 4 日までに限定される。CREB/CRTC とヒストンアセチル化が協調することにより、記憶の書き換え可能な時期を限定され、1:学習で得た情報が間違いならこの期間内に修正する、2:もし正しいなら一定期間後に CREB/CRTC とエピジェネティック制御が変化することで書き換え不可能にする、という合理的な 2 段階の制御が示唆された。

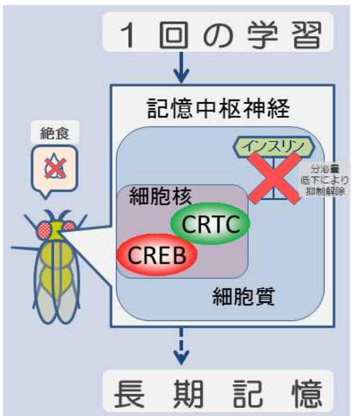


研究テーマ B「ヒストンアセチル化以外のエピジェネティック制御の関与」

上記と同様、嫌悪学習課題を用い、ヒストンアセチル化以外のエピジェネティック制御の関与を明らかにしようと試みた。ショウジョウバエで明らかになっているエピジェネティック制御因子 40 に関してそれぞれをノックダウンし、記憶に対する影響を調べた、その結果、ヒストンメチル化酵素 Trx、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC6、ヒストン脱メチル化酵素 Lid が長期記憶の形成に必要であること、ヒストンメチル化酵素 Ash1、ヒストンユビキチン化酵素 UbcD6 が記憶の保持に重要であることを見出した。このうち、Trxと Ash1 が制御するヒストンメチル化について ChiP-seq 解析を行い、それらの標的遺伝子の候補を得た。ヒストンアセチル化標的として上記で同定したものとほとんど一致は見られず、長期記憶の形成、保持過程においてそれぞれのエピジェネティック制御が独立的に機能することが示唆された。今後、これらの経路を包括的に解析していく必要があるだろう。

研究テーマ C「空腹時の CREB/CRTC 依存的な長期記憶形成の促進」

上記の研究を進める過程で、下記のような新たな CREB/CRTC の機能を見出した。匂いと電気ショックを同時に与えた嫌悪学習後の長期記憶の形成には、1 回だけの学習では不十分で、繰り返し復習させる必要がある。一方、ハエに匂いと砂糖水を同時に与えると、ハエはその匂いが好きに



なる（報酬記憶）。しかしながら、報酬記憶は 1 回の学習でも長期記憶になることがわかっていた。なぜ報酬のみが 1 回の学習でも長期記憶になるのか、原因として、刺激が異なるため、使っている神経回路や神経伝達物質の違いが考えられた。しかし、報酬学習前に効率的に砂糖水を飲ませるため、ハエを空腹状態にしていた。実はこの空腹状態こそが 1 回だけの学習でも長期記憶が形成される要因なのではないかと考えた。実際に、空腹状態が報酬記憶のみならず、嫌悪記憶を促進することを発見した。過去の代謝組織における研究から、空腹時には血糖値が低下し、その結果、インスリンの分泌が低下すること、さらに転写因子である CREB/CRTC はインスリン低下により活性化することが示唆されていた。このようなインスリン低下に伴う CREB/CRTC の活性化が脳内でも起こり、長期記憶の形成を促進していることをつきとめた。また遺伝的に CRTC を脳内で活性化させたハエを構築したところ、このハエでは満腹でも記憶が促進された。このことからも CREB/CRTC の活性化により記憶が促進されることが裏付けられた。以上より、空腹状態はインスリン活性を低下させ、その結果 CRTC が活性化し、1 回の学習でも長期記憶を形成させることが明らかになった。

3. 今後の展開

本研究ではエピジェネティック制御が記憶形成、記憶保持に重要な記憶タグである仮説を検証した。記憶形成、および記憶保持に重要なエピジェネティクス因子とその動態、さらに記憶に重要なエピジェネティック因子の標的を同定したことにより、エピジェネティック制御が記憶タグとして機能する概念は提示することができる。今後、同定してきたエピジェネティクス因子、およびその下流因子の神経ネットワーク内での機能、時間的制御、さらに個々の因子の生理学的意義を追及していくことにより、エピジェネティック因子の神経における役割が明らかになるだろう。このように新しい概念からさらに本質的理解につなげることが今後の課題と見据える。また、ヒストンアセチル化、メチル化、ユビキチン化を包括的に解析することにより、記憶におけるエピジェネティック制御の理解が深まると考えている。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

本研究で、ヒストンアセチル化のみならず他のエピジェネティック制御が記憶形成、記憶保持に重要であることを見出し、またヒストンアセチル化標的遺伝子の記憶における詳細な役割を同定した。これらの結果から、当初の目的であったエピジェネティック制御が記憶タグとして機能するという仮説を強く示唆することができたと考える。脳という複雑な組織では、制御因子から責任因子まで到達することは困難であるが、本研究ではエピジェネティック制御因子からその標的因子の機能を明らかにすることができた。以上より、記憶研究分野のブレークスルーとなり、またエピジェネティクス研究分野の広がりに貢献すると期待している。また、研究遂行過程で見出した空腹時の記憶促進に関して、当初の研究計画にはなかったが成果を報告することができた。以上の結果は、基礎科学における新規知見となるのみならず、高齢化社会の問題となっている認知症治療の創薬標的の提案につながるだろう。研究期間 3 年次より、新た

な研究室を立ち上げ、独自の研究をスタートさせることができた。

（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）

エピジェネティクスは記憶保持に重要な記憶タグであるという新しい概念を提唱し、ショウジョウバエを用いてそれを検証した。長期記憶形成に重要なエピジェネティク因子（CBP, Trx, HDAC6, Lid）、及び記憶保持に重要な因子（GCN5, Tip609, Ash19, UbcD6）、ならびに記憶に重要なエピジェネティクス因子の標的遺伝子も同定した。上記の研究を進める上で記憶の保持に重要な転写因子としてCREB/CRTC複合体を同定している。この複合体は記憶の保持のみならず記憶の書き換えにも重要であることを見出した。また、この研究を進める過程で、CREB/CRTCの新たな機能も見出した。空腹になると記憶が促進するという事実を発見し、すでに報告している。これらの研究成果は当初の目的を十分達成し、顕著な成果である。今後は得られたエピジェネティックス因子の神経ネットワークにおける役割、ならびに生理的な意義を明らかにして行く必要がある。今後の展開を大いに期待している。本さきがけ在籍中に顕著な成果をだしており（発表、未発表データを含む）、研究者としての飛躍につながることを期待している。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1.	Hirano Y, Masuda T, Naganos S, Matsuno M, Ueno K, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M. Fasting launches CRTC to facilitate long-term memory formation in Drosophila. ***Science***. 2013. 339:443-6.
2.	Hirano Y, Saitoe M. Hunger and memory; CRTC coordinates long-term memory with the physiological state, hunger. ***Commun Integr Biol***. 2013. 6, e25152.
3.	Yamazaki D, Horiuchi J, Ueno K, Ueno T, Saeki S, Matsuno M, Naganos S, Miyashita T, Hirano Y. Nishikawa H, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe Y, Honda Y, Kodama Y, Masuda T, Saitoe M. Glial dysfunction causes age-related memory impairment in Drosophila. ***Neuron***. 2014. in press.
4.	Ueno K, Naganos S, Hirano Y, Horiuchi J, Saitoe M. Long-term enhancement of synaptic transmission between antennal lobe and mushroom body in cultured Drosophila brain. ***J Physiol***. 2013. 591:287-302.
5.	Hirano Y, Kuriyama Y, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M. Reactive oxygen species are not involved in the onset of age-related memory impairment in Drosophila. ***Genes Brain Behav***. 2012. 11:79-86.

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（2）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）

主要な学会発表

- 平野恭敬「エピジェネティクス解析から長期記憶分子メカニズムに迫る」記憶回路研究会・個体内記憶回路の同定とその機能解析による学習記憶制御基盤の統合的理解　生理学研究所　2014 年 10 月 8 日

- 平野恭敬「Decoding epigenetics related to distinct phases of long-term memory in Drosophila.」第 37 回日本神経科学大会　シンポジウム　神経発生・発達におけるクロマチン制御（epigenetic 制御）の役割　2014 年 9 月 12 日

- 平野恭敬「長期記憶に関わる遺伝子発現制御；ショウジョウバエから学べること」SK (Shionogi-Kyoto University) プロジェクトシンポジウム （塩野義製薬）2013 年 10 月 31 日

- 平野恭敬「高次脳機能を支えるエピジェネティクス；ショウジョウバエから学べること」JST・NEDO 公開シンポジウム 2013 年 4 月 19 日

受賞

- 2012 年度　包括型脳科学研究推進支援ネットワーク　夏のワークショップ　若手優秀発表賞
- 2013 年 1 月 22 日　東京都医学研職員表彰

著作物

Hirano Y, Saitoe M. "Hunger-driven modulation in brain functions."
(2014)　*Brain Nerve*. 66, 41-48.

プレスリリース

「空腹状態になると記憶力があがる仕組みを発見」
2013/1/23　Science 誌に掲載の論文についてのプレスリリース

- 平成２５年１月２５日掲載、日本経済新聞（３８面）、「おなかがすくと記憶力アップ」
- 平成２５年１月２７日掲載、毎日新聞（２７面）、「空腹で記憶力アップ」
- 平成２５年１月２５日掲載、読売新聞（１６面）、「記憶力　空腹でアップ」
- 平成２５年１月２５日掲載、東京新聞（３０面）、「空腹時　記憶力アップ」
- 平成２５年１月２５日掲載、共同通信（net）、「空腹で記憶力向上、ハエで実験　人も同じ？」

研 究 報 告 書

「コヒーシンによるクロマチン構造変換の可視化と制御機構の解明」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 24 年 4 月～平成 27 年 3 月
研 究 者： 西山 朋子

1． 研究のねらい

真核生物において、複製されたゲノムを娘細胞に均等に分配するためには、姉妹染色分体間の接着が必須である。この接着を担うコヒーシン複合体（以下コヒーシン）は、ATP 加水分解酵素である Smc1 と Smc3、kleisin サブユニットの Scc1、Scc1 に結合する SA1/2 のヘテロ四量体から形成されるリング状の複合体である。コヒーシンは、その DNA 上でのダイナミクスが接着の確立や解離と密接に関係している。コヒーシンは分裂終期から G1 期にかけてクロマチン上に結合してくるが、この時期の結合はダイナミックなものである。その後 DNA 複製の進行に伴って、コヒーシンとクロマチンとの結合が安定化し、それにより姉妹染色分体間の接着が確立し、分裂期に至るまで姉妹染色分体同士を繋ぎ止めていることが分かっている。しかしながら、コヒーシンのリング構造が DNA 複製の進行に伴って、いつ、どこで、どのように 2 本の姉妹染色分体を接着するようになるのか、またその接着が分裂期においてどのように解離するのか、その詳細は未だに不明である。

また近年の研究から、コヒーシンの転写制御因子としての役割が明らかにされつつある。たとえばコヒーシンは insulator タンパク質 CTCF とゲノム上で共局在し、その insulator 機能に必要である。またコヒーシンやその結合因子の変異による遺伝性疾患 Cornelia de Lange syndrome（CdLS）においては、接着が正常であるにも拘わらず形態形成異常が見られ、コヒーシンが発生に重要な因子の転写制御に関わっている可能性が示唆されている。コヒーシンによる転写制御にはコヒーシン依存的な DNA ループの形成が重要であるという仮説が存在するが、未だその実証はなされておらず、メカニズムは明らかになっていない。

本研究では、(A)細胞レベルにおける接着確立・解除のメカニズムをコヒーシンダイナミクス制御に着目して明らかにすること、次に(B)コヒーシンの一分子レベルでのダイナミクスを明らかにすることで、コヒーシンがクロマチン構造、延いては遺伝子発現を制御するメカニズムの解明を目指した。

2． 研究成果

（1）概要

本研究ではまず、細胞レベルにおける接着確立・解除のメカニズム解明に着手した。脊椎動物においては、コヒーシンの DNA 上でのダイナミクスは細胞周期に応じて多段的に制御されており、たとえば分裂終期から G1 期にかけて DNA 上にリクルートされるコヒーシンは、ダイナミックに DNA との結合と解離を繰り返すのに対し、G2 期のコヒーシンは安定して DNA に結合する。このことは S 期の間に接着が確立することを示唆している。コヒーシン結合因子のひとつで、接着の確立に必須の Sororin は、近年の我々の研究から、DNA 複製依存的にコヒー

シンに結合し、コヒーシン解離因子であるWaplの作用に拮抗することでコヒーシンとDNAとの結合を安定化し、S期における接着の確立に寄与することが明らかになった。一方、一度確立された接着は、分裂期において二段階の解離制御、即ち(1)分裂前期における染色体腕部の接着解離(prophase pathway)および(2)分裂中期におけるセントロメア領域のコヒーシン切断(separase pathway)をうける。我々は、Sororin依存的に確立された接着が、分裂期において、どのような時間的・空間的制御をうけて解消されるのか、そのメカニズムを解明するため、ヒト体細胞およびアフリカツメガエル卵抽出液を用いて解析を行った。その結果、Sororinは分裂期において複数箇所でリン酸化をうけ、このリン酸化により、Pds5を介したSororinとコヒーシンとの結合が分裂期特異的に失われること、Sororinの非リン酸化型変異体が分裂期においてもコヒーシンおよびクロマチンとの結合を維持することが明らかになった。非リン酸化型変異体Sororinは分裂中期に至るまで染色体腕上に局在し続け、その結果、染色体腕部の過度の接着および分裂後期における染色体の不分離を引き起こすことが分かった。さらに *in vivo* の解析から、Sororinのリン酸化による染色体からの解離にはAurora Bが必須であり、この経路は、従来prophase pathwayに必要であることが知られていたPlk1依存的なコヒーシンの解離とは独立した経路であることが明らかになった。

さらに本研究では、コヒーシンの一分子レベルでのダイナミクスからコヒーシン機能を明らかにするため、コヒーシン一分子観察系の構築を行い、コヒーシンの挙動を一分子レベルで観察する系を確立した。

(2)詳細

●研究テーマ(A)「細胞レベルにおける接着解除メカニズムの解明」

分裂期におけるコヒーシンダイナミクスを細胞レベルで理解するため、ヒト体細胞においてSororinに着目し、分裂期染色体腕部の接着が解消されるメカニズムの解明に取り組んだ。質量分析の結果、Sororinは分裂期において複数箇所でリン酸化をうけ、このリン酸化によりSororinとコヒーシンとの結合が分裂期特異的に失われること、Sororinの非リン酸化型変異体(Sor-11A)が分裂期においてもコヒーシンおよびクロマチンとの結合を維持することが明らかになった。Sor-11A発現細胞では染色体腕部の過度の接着および分裂後期における染色体の不分離が引き起こされた(図1)。一方、ツメガエル卵抽出液中で、恒常的リン酸化状態を模した変異体Sor-11Eのクロマチンへの結合を調べたところ、間期においてクロマチンに結合できるが、その結合安定性が野生型に比べて低いことが分かった。さらに *in vivo* の解析から、Sororinのリン酸化によるコヒーシンからの解離および染色体からの解離には、Aurora Bが必須であることが明らかになった。以上のことから、Sororinのリン酸化が分裂期におけるコヒーシンの不安定化と接着解離に重要な役割を担っていることが明らかとなり、その成果を発表した(Nishiyama et al., 2013)。研究テーマ(A)については当初の研究目標を達成できた。

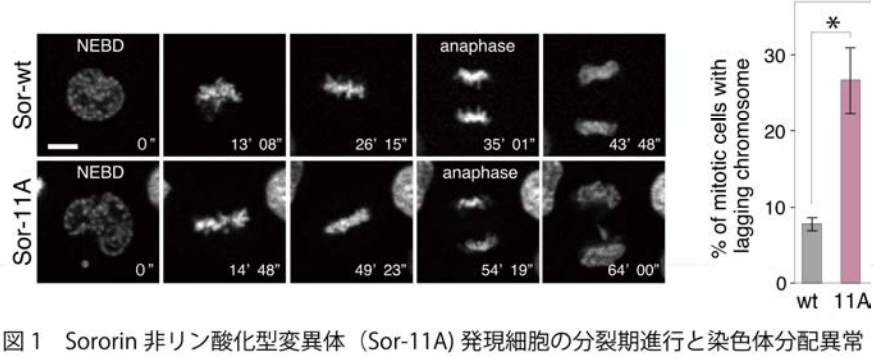


図1　Sororin非リン酸化型変異体(Sor-11A)発現細胞の分裂期進行と染色体分配異常

●研究テーマ（B）「コヒーシン一分子観察系の構築」

従来の細胞レベルまたは生化学的な解析では、コヒーシンのダイナミクスを分子集団としてしか捉えることができなかった。そこで本研究では、コヒーシンのダイナミクスと DNA の状態を一分子レベルの解像度で解析するため、全反射顕微鏡を用いたコヒーシン一分子観察系の構築に取り組んだ。

コヒーシン複合体は、MultiBac 及び昆虫細胞発現系を用い、FLAG タグと His タグを利用した 2 段階精製法により、純度の高いコヒーシン複合体を精製することに成功した。蛍光観察のため、コヒーシン Scc1 サブユニットの C 末端に Halo タグを付加し、種々の蛍光色素が結合した Halo タグリガンドで標識した。またコヒーシンが結合するターゲットとなる DNA は、約 50kbp のバクテリオファージ λ 由来の DNA を用い、この両端あるいは一端をビオチン化し、Streptavidin コートしたガラス基板上に結合させた（図 2）。ガラス基板上に幅 1 mm 長さ 17 mm 厚さ 100 μm のチャネルを設計し、溶液に任意の流速を与えながら DNA を基板上に結合させたり、蛍光標識タンパク質や細胞抽出液を連続的に導入できるようにした（図 2）。

この系を用いてガラス基板上に直鎖 DNA の両端を結合させた状態で蛍光標識したコヒーシン分子を導入したところ、DNA にコヒーシンが結合する様子が観察できた。更に詳細な解析から、コヒーシンが DNA 上で、ATP 加水分解活性に依存しない一次元自由拡散運動を示すことが明らかになった。興味深いことに、コヒーシンとゲノム上で共局在することが知られている CTCF を DNA の端に結合させると、コヒーシンは CTCF 部位に蓄積し、拡散運動を停止した。この結果は、ゲノム上で CTCF とコヒーシンが共局在するという過去の報告を支持している。以上、コヒーシンの一分子観察系の確立と、それを用いたコヒーシンの運動性の観察、および他のクロマチン結合タンパク質との相互関係を観察することができるようになり、研究テーマ（B）については目標を達成できた。

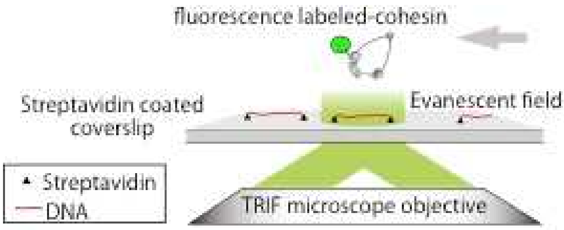


図 2　全反射顕微鏡を用いたコヒーシン一分子観察系

3.　今後の展開

本研究で確立したコヒーシン一分子観察系は、これまで細胞生物学的、生化学的に解析または推測されてきたコヒーシンの動態および機能に、より高いレベルの解像度で直接的な解答を与えるものである。現在、DNA 複製をリアルタイムでモニターする系を開発中であり、DNA 複製の進行と共に接着が確立する瞬間を捉えることを目指している。リアルタイムで複製をモニターすることで、従来、接着確立への必要性が示唆されてきた因子が、具体的にいつ、何処でその役割を果たしているのかを知ることが出来る。また DNA 複製のみならず、DNA 上で転写を誘起することで、コヒーシンの転写制御における機能を一分子レベルで理解することも可能となる。

本研究を応用し、一分子の解像度を維持しながら、より細胞内環境に近い状態を再現することで、コヒーシンだけでなく、種々のクロマチン関連因子の *semi-vivo* 高解像度観察が可能になると期待される。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

当初の研究目標は、コヒーシンダイナミクスを細胞レベルおよび一分子レベルで理解すること、そしてコヒーシンによるクロマチン構造変換を可視化することでコヒーシンが遺伝子発現を制御するメカニズムを明らかにすることであった。前者のコヒーシンダイナミクスの細胞レベルでの理解については、当初の目標を達成できた。後者の一分子レベルでの観察系については、系を構築するという目標は達成できたが、クロマチン構造変換の可視化については、当初想定していた単純な条件ではコヒーシン依存的なクロマチンループの形成を観察できないことが明らかになり、今後更なる検討が必要である。一方、この研究過程で、コヒーシンが DNA 上でダイナミックに位置を変える性質があるという新しい発見があり、この性質とコヒーシン機能における重要性は、今後明らかにすべき課題の一つである。

研究の遂行は研究者本人が行い、動物飼育管理やタンパク質精製など、必要に応じて技術補佐員の援助を受ける体制で、研究の遂行には支障を来すことなく、適切であったと考えている。研究費執行状況についても、購入した大型備品等はいずれも研究に不可欠なものであり、適切な執行であったと考えている。

本研究においてコヒーシン一分子のダイナミクスを明らかにする系を開発し、コヒーシン病と呼ばれる種々の遺伝性疾患の原因変異の性質を解析する系を構築したことで、今後、これらの遺伝性疾患の病因究明に対して多くの基礎的知見を提供するとともに、一分子レベルでの解析で得られた知見が、将来の治療薬開発を加速するものと期待している。

(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)

分裂期における接着解離のメカニズムは西山氏の長年のテーマである。接着を担うコヒーシン複合体の転写制御に焦点を当て研究を進めている。ここではその機能を明らかにするために*in vitro*系で再構築・可視化しその実証をめざしている。1分子イメージングにより、ATP加水分解活性に依存しないコヒーシンがDNAに結合し、DNA上を自由拡散運動すること、CTCFをDNAの端に結合させるとコヒーシンはCTCF部位に蓄積し、拡散運動を停止することを見出した。コヒーシンの一分子観察系の確立と、それを用いたコヒーシンの運動性の観察、および他のクロマチン結合タンパク質との相互作用が観察できるようになった。チャレンジングなテーマであり、成果を上げつつある。今後転写制御への寄与、DNA複製系の確立、コヒーシン病の原因解明など、この系を使って独創的な研究を展開されることを期待する。

５． 主な研究成果リスト

（１）論文（原著論文）発表

1.	Nishiyama T(*), Sykora MM, Huis In 't Veld PJ, Mechtler K, Peters JM. Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 110, 13404-9 (2013). (*責任著者)
2.	Tedeschi A, Wutz G, Huet S, Jaritz M, Wuensche A, Schirghuber E, Davidson IF, Tang W, Cisneros DA, Bhaskara V, Nishiyama T, Vaziri A, Wutz A, Ellenberg J and Peters JM. Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation ***Nature*** 501, 564-8 (2013).
3.	Peters JM. Nishiyama T. Sister Chromatid Cohesion. "DNA replication" (eds Stephen D. Bell, Marcel Méchali, and Melvin L. DePamphilis), ***Cold Spring Harb Perspect Biol.*** 2012 Nov 1;4(11).

（２）特許出願

研究期間累積件数：0件

（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）

- Nishiyama T: Regulation of cohesin dynamics in entry into mitosis. The 18th IMCB Symposium;"SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) proteins from molecule to disease" Tokyo, 29th Nov. 2013
- 西山朋子：姉妹をつなぐ：姉妹染色分体間接着のしくみ. 平成 25 年度 遺伝研研究会、三島、2013 年 10 月
- 西山朋子：姉妹染色分体間接着の確立と解離の時空間制御. 第 65 回日本細胞生物学会、名古屋、2013 年 6 月
- 西山朋子：分裂期における姉妹染色分体間接着解離のメカニズム. 第 35 回日本分子生物学会、博多、2012 年 12 月
- Nishiyama T : How sisters get together; Mechanisms of sister chromatid cohesion. Kumamoto University, Liaison Laboratory regular seminar, Kumamoto, 2012, May

研　究　報　告　書

「Long non-coding RNA による転写抑制機構の解明」

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：　増井　修

1.　研究のねらい

近年の研究から、RNA の中にはタンパク質へと翻訳を受ける mRNA（または coding RNA）の他にも、タンパク質に翻訳されることなくしてその機能を発揮する一群があることが明らかになっており、non-coding RNA と呼ばれている。それらの中にはゲノム DNA からの転写を調節してその機能を制御する物も数多く存在しており、「non-coding RNA による転写の調節」というエピジェネティクスの一分野を形成して、生物の発生段階や疾病の発症に密接に関係している。従って、この non-coding RNA によるゲノム DNA からの転写調節のメカニズムを明らかにすることは、生物の基本を理解することにつながるだけでなく、がんや不妊症などの疾患の治療法の作用点となることが期待される。

「Non-coding RNA による転写の調節」の一例として、「Xist long non-coding RNA による X 染色体不活性化」という現象が挙げられる。すなわち、我々を含む哺乳類では性染色体である X 染色体と Y 染色体が大きく異なっており、X 染色体が 1000 個近い遺伝子を含むのに対して Y 染色体は 100 個程度の遺伝子しか含まないことから、その転写される遺伝子産物の量を補正して雌（XX）と雄（XY）の間で同一にする必要があり、実際に哺乳類の雌の各細胞では2つある X 染色体のうちの１つがその染色体全体の転写を遮断されて不活性化を受けていることが知られており、X 染色体不活性化と呼ばれている。この X 染色体不活性化は X 染色体上にコードされる *Xist* (X-inactive specific transcript) 遺伝子座から転写される Xist RNA が、細胞核内に留まり、自身が転写された X 染色体を覆うように巻き付くことで不活性化を行っているが、その不活性化の分子メカニズムについてはよく分かっていない。

本研究では Xist RNA にタグ配列を付加することによって、RNA の可視化や、 RNA 結合タンパク質の同定といった、non-coding RNA を解析するための新しい技術開発を行うと同時に、Xist RNA が標的遺伝子や染色体全体の転写を不活性化する分子メカニズムを明らかにすることを目標とする。Xist long non-coding RNA の作用メカニズムが明らかになることで、他の non-coding RNA による転写調節機構にも共通する作用原理が明らかになるものと期待される。

2.　研究成果

（1）概要

我々は内在性 Xist 遺伝子座に、タグ配列である MS2 ステムループ配列を挿入したメスのマウス胚性幹細胞を作製し、このタグ配列に特異的に結合する蛍光蛋白質を発現させることで Xist RNA を生細胞で GFP シグナルとして可視化できる細胞を作製した。細胞周期において、分裂期では各染色体が凝集した後に娘細胞に分配されるというダイナミックな過程を経るが、この時の Xist RNA の挙動はよく分かっていなかったことから、我々はこの細胞を用いて

細胞周期の各時期での Xist RNA の形態を詳細に調べた。その結果、間期の細胞では Xist RNA は不活性 X 染色体全体に局在するのに対し、分裂期では Xist RNA は不活性 X 染色体から排除されるがその辺縁部に留まることが明らかになった。このように Xist RNA が分裂期においても不活性 X 染色体の辺縁に留まるのは、娘細胞が次の間期に入る時に再度迅速に不活性 X 染色体を包み込み、不活性化状態を安定に維持することに寄与していると考えられる。

また、我々はこの Xist RNA 可視化系を用いて SIM(構造化照明法)に基づく超解像顕微鏡による解析を行った。通常の蛍光顕微鏡を用いて解析されていた Xist RNA は、数マイクロメートルの「Xist RNA domain」と呼ばれる大きな構造体を形成するものとして知られていたが、超解像顕微鏡を用いることで実際にはさらに微細な粒子状構造の集合体であることが明らかとなった。

我々はこの Xist タグ化システムを用いて、Xist RNA に結合するタンパク質を同定するための実験系の開発を行った。それらの Xist RNA 結合タンパク質の中には Xist RNA による標的遺伝子の転写抑制に関与しているタンパク質が含まれることが予想される。変異型ビオチンリガーゼを Xist RNA のタグ部分に結合した細胞を作製し、Xist RNA の近傍に存在しているタンパク質群にビオチン化修飾を導入できる実験系を構築した。この実験系によりビオチン化されたタンパク質は、ビオチン―アビジンの特異的な結合を利用して精製することが可能となる。我々はこの実験系を用いて実際に多くのタンパク質がビオチン化を受けることを確かめたので、現在これらのビオチン化されたタンパク質が何なのかを質量分析器を用いて同定する実験を進めている。

本さきがけ研究により我々は、これまでに明らかになっていなかった Xist RNA の生細胞での挙動に新しい知見を与え、また Xist RNA に結合して標的遺伝子のサイレンシングに関わるタンパク質群を同定するための新しい実験系の開発を行った。これらを用いて Xist RNA の作動機構が明らかになるだけでなく、今後、他の long non-coding RNA にも共通する作動原理を明らかにできるものと期待される。

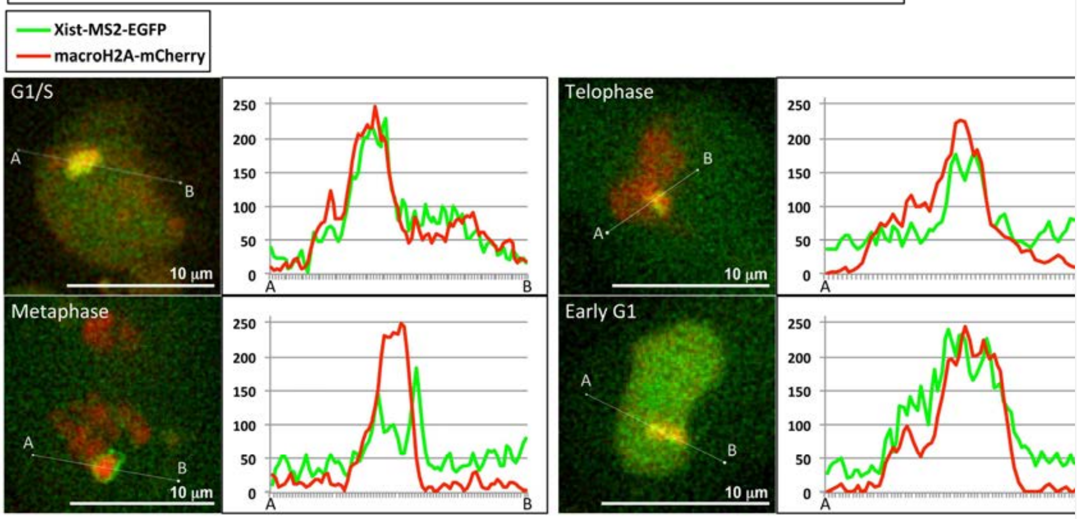
（2）詳細

（研究テーマ1） Xist RNA のライブイメージング

Xist RNA は細胞周期が間期の細胞では X 染色体を覆うように細胞核内に局在しており、その状態は細胞分裂を経て娘細胞にも安定に受け継がれることが分かっている。ところが細胞分裂中の Xist RNA の挙動は明らかになっておらず、この点を明らかにすることはエピジェネティック修飾が細胞分裂を経て親細胞から娘細胞にどのように伝達されるのかという観点からも重要であると考えられる。これまでの研究では化学的に固定した細胞を用いた解析しか行われておらず上記の疑問に対する答えははっきりと出ていなかったことから、我々はまず Xist RNA をライブで観察できる実験系を構築してその細胞分裂中の挙動を明らかにすることを試みた。雌のマウス ES 細胞の内在性 Xist 遺伝子座に RNA タグ配列である MS2 stem loop をノックインしたものを作製し、さらにこの細胞に MS2 stem loop に特異的に結合する MS2CP-GFP を安定に発現させることによって、Xist RNA を GFP シグナルとして蛍光顕微鏡で検出できる実験系を構築した。この細胞を用いて12時間程度の長さのライブイメージングを行い、細胞分裂を行っている細胞での Xist RNA の挙動を観察した。その結果、Xist RNA は

分裂期の細胞でも不活性 X 染色体上に局在することが観察されたが、間期の細胞と大きく異なる点として、Xist RNA は間期では不活性 X 染色体全体に局在するのに対して、分裂期では染色体部分から排除されてはいるがその辺縁部に留まっていることが観察された（図1）。このことから、Xist RNA は分裂期の凝集した染色体部分から排除されるが、直接または間接的な結合を介して X 染色体辺縁部に留まることが示唆された。このことにより Xist RNA は細胞分裂直後の娘細胞で迅速に X 染色体を包み込んで不活性化状態の安定的な維持に関与しているものと考察された。これらの研究成果は当初さきがけ研究の計画として提案していたものであり、所定の目標を達成できたものと考えている。

図1：細胞周期を通した Xist RNA の長時間ライブイメージング解析

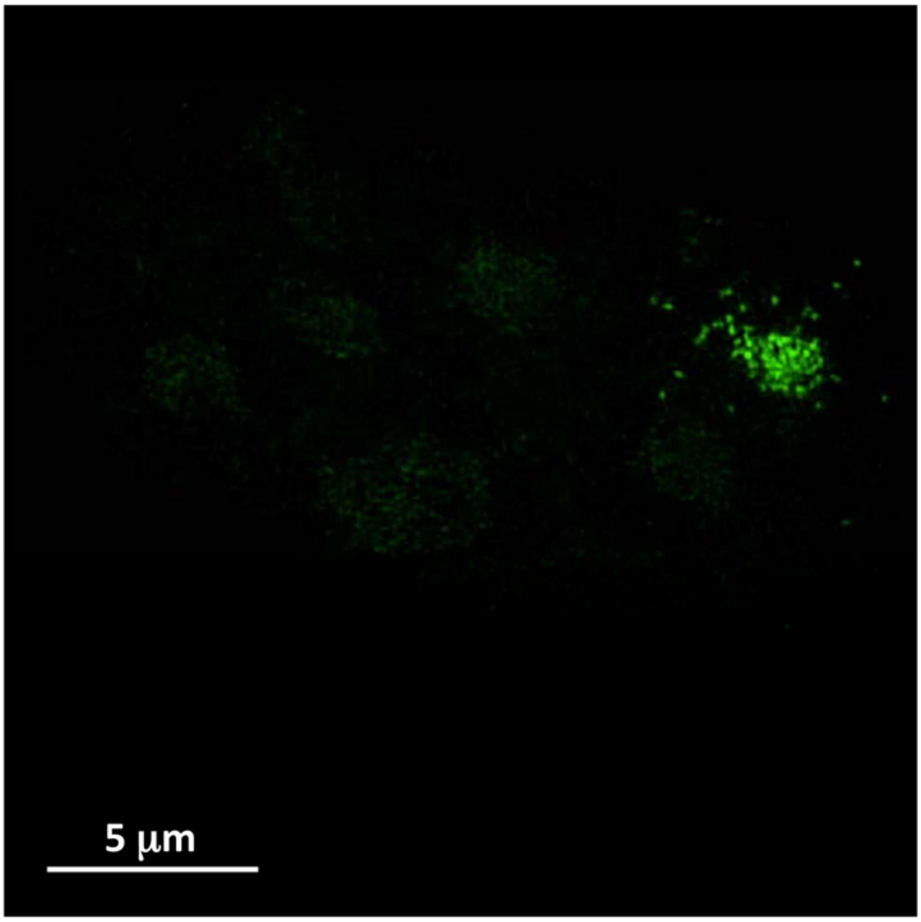


Xist-MS2-GFP ES 細胞を9日間分化させて 不活性 X 染色体を形成させた後に、20分間隔で13時間のライブイメージングを行った。それらの動画から分裂を行った細胞を選別して、細胞周期の各フェイズを抜粋してラインヒストグラム解析を行った。macroH2A は不活性 X 染色体のマーカーとして用いた。
間期では Xist-GFP は不活性 X 染色体全体の上に局在するが、分裂期では染色体の中心部から排除されて辺縁部に局在することが分かる。

次に我々は、この Xist RNA を GFP として可視化できる実験系を発展させる形で、超解像顕微鏡を用いた解析を行った。上述のように Xist RNA は間期の細胞では不活性 X 染色体全体を覆うような存在しており、この Xist RNA が形成する構造体は Xist RNA domain と呼ばれている。我々を含めた複数のグループのこれまでの解析から Xist RNA domain は連続した大きな核内構造体であると考えられていたが、これらの結果は主に通常の蛍光顕微鏡を用いて行われて来たものであり、そこには光学上の空間分解能の限界である 200 nm （水平方向）という制限が常に付随している。この限界を克服するために、ここ数年の間に超解像顕微鏡という一連の顕微鏡システムが実用化されてきたことから、我々はこの超解像顕微鏡を用いて Xist RNA を解析してその詳細な構造を明らかにすることを試みた。超解像顕微鏡はその原理の違いから大きく3種類ほどが存在しているが、それらの中から我々は生細胞イメージングにも使用でき、比較的扱いやすい構造化照明法（Structured illumination: SIM）に基づく顕微鏡を使用した。固定した細胞、Xist-MS2-GFP 生細胞、の双方を解析した結果、どちらにおいても Xist RNA domain はこれまでに観察されていたひと塊の集合体からさらに解像され、細かい粒

子状の構造体が集合して形成されていることが明らかになった（図2）。我々はさらにこれらの構造体が不活性 X 染色体を構成するクロマチン因子のどれかと共局在しているかどうかを、主に超解像顕微鏡を用いて解析したが、これまでのところポリコーム複合体や Smchd1 といったタンパク質は Xist RNA の粒子状構造とは強い共局在を示さないことが判明している。これらの超解像顕微鏡による一連の解析は、当初のさきがけ研究計画には含まれてはいなかったが、「Xist RNA のライブイメージング」を発展させる形で取り組み、一定の成果を挙げることができたと考えている。

図2：Xist-MS2-GFP の超解像ライブイメージング像



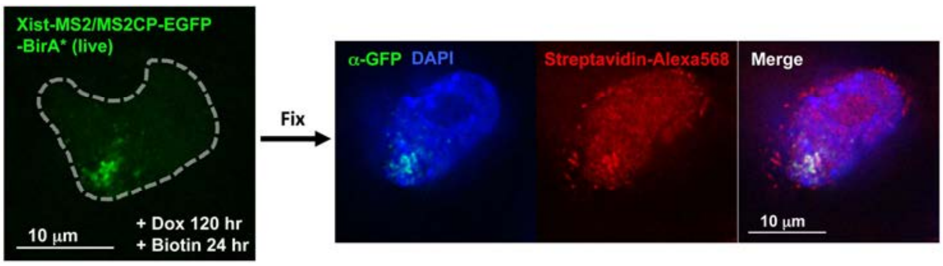
Xist-MS2-GFP ES 細胞を7日間分化させて 不活性 X 染色体を形成させた後に、超解像顕微鏡 OMX で構造化照明法による超解像画像を取得した。
Xist RNA が微細な粒子状の構造が集合したものであることが分かる。

（研究テーマ2）Xist RNA 結合タンパク質の同定

Xist RNA による X 染色体不活性化のメカニズムはこれまでにほとんど分かっていない

が、その大きな理由として Xist RNA に直接結合してその下流の不活性化に関わっているであろう因子の同定が行われていないことが挙げられる。このことは Xist RNA が極端に不溶性であり、通常の生化学的な複合体精製を困難していることに起因していると考えられる。この点を回避するために、本研究では BioID という方法を用いて Xist RNA に結合するタンパク質因子を同定するための実験を行った。BioID は Kyle J. Roux らによって開発された方法で、標的とするタンパク質に変異型ビオチンリガーゼを融合させておくことで、そのタンパク質に隣接するタンパク質のリジン残基をビオチン化する方法であり、それらのビオチン化されたタンパク質はビオチンとアビジンの特異的な結合を用いて精製同定することが可能である。我々は、我々の開発した Xist-MS2 システムを用いて Xist RNA に変異型ビオチンリガーゼを結合した細胞を作製した。この細胞を用いて Xist RNA domain でのタンパク質のビオチン化が誘導されることを確かめたので(図3)、現在これらのビオチン化されたタンパク質を精製して同定する作業を進めている。この Xist RNA 結合タンパク質の同定実験は、当初は RNA タグを用いて単純に沈降精製する実験系を計画していたが、Xist RNA が不溶性であることから断念し、それに変わる方法として開発を行った。その分より時間を消費することとなり、最終目標である Xist RNA に結合するタンパク質の同定にまではまだ至っていない。予想以上に時間を消費することとなったが、目標に向けて進んでおり、さきがけ研究期間終了後も目標の達成を目指して行く。

図3:Xist-BioID による Xist RNA domain へのビオチン化の導入



Dox 添加により XistWT-MS2 を発現するマウス ES 細胞を Dox 存在下で5日間分化誘導した。
最後の24時間に Biotin を培地中に加えておくことで変異型ビオチンリガーゼ(BirA*) による Xist 近傍タンパク質のビオチン化を行った。図ではまずライブイメージングにより Xist-MS2-GFP の画像を取得し、その直後に細胞を固定して免疫染色を行い Biotin 化されたタンパク質を検出した。緑と赤のシグナルがほぼ一致することが見て取れる。

3. 今後の展開

本研究ではマウス ES 細胞を用いて Xist RNA の可視化解析を行ったが、本来 X 染色体不活性化が生じるマウス初期胚では、他の多くのエピジェネティック修飾がそうであるように、その形成はよりダイナミックに制御されている。例えば、受精後には4細胞期から必ず父親由来の X 染色体が不活性化を受け(インプリント型)、その後に内部細胞塊においてこのインプリント型の X 染色体不活性化が解除された後に、再び今度はランダムに父親由来か母親由来のどちらかの X 染色体が不活性化を受ける(ランダム型)ことが知られている。これらの過

程には Oct4/Nanog/Sox2 などの万能性因子や Rnf12 などが関与することが分かっており、複雑かつ精巧な制御システムを構築しているものと考えられる。今回我々が作製した Xist RNA 可視化の実験系を現在マウス個体に導入しており、将来はこのシステムを用いることでマウス初期胚での Xist RNA の発現のリアルタイム解析と、それを制御する因子の発現との相関関係を明らかにすることができるであろう。

また、我々が今回行った超解像顕微鏡によるライブイメージングは、現存の超解像顕微鏡を用いた研究を、固定細胞を用いた 3D（XYZ）のレベルから、4D （3D ＋ Time）、さらには 5D （4D ＋ multi-color） へと進化させる先鞭的な研究となるものと期待される。これらの研究にはハードウェア面の進歩が平行して進むことが欠かせないが、それを見越した研究を進めていき、RNA に対する今後のスタンダードな解析手法の１つとして確立させることを目指す。

今回のさきがけ研究では期間内に Xist に結合するタンパク質の同定にまでは至らなかったが、今回我々が構築した Xist-BioID のシステムを用いてビオチン化したタンパク質を質量分析器で同定し、それらの機能の解析を行っていく予定である。これによって Xist を始めとする non-coding RNA による標的遺伝子の制御メカニズムが明らかになっていくと期待される。

４． 評価

（１）自己評価

（研究者）

当初提案したさきがけ研究の目的のなかで、「Xist RNA のライブイメージング」についてはほぼ達成できた物と考えている。さらにそれを発展させて「超解像ライブイメージング」の実現に端緒を付けることも達成した。「Xist RNA 結合タンパク質の同定」については、研究期間の途中で技術的な障壁にぶつかったが、熟考して工夫をすることによってその壁を越えることができた。最終的な目的であるタンパク質種の同定には至っていないが、そこへ向かう道筋を付けることはでき、一定の成果をあげることができたものと考えている。

本さきがけ研究では、RNA のライブイメージング、RNA 結合タンパク質の新規同定方法、という RNA 分子に対する2つの新しい解析技術を構築することに成功した。今後、これらの技術が non-coding RNA を含む他の RNA 分子にも応用されることが期待され、生体での RNA の果たす役割を明らかにして行くことに貢献するであろう。また、本研究で開発を始めた超解像ライブイメージングの手法は、今後 RNA だけでなくタンパク質分子にも同様に適用されて行くと考えられ、今後は分子生物学の新しい解析手法として定着して行くことが期待される。

（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）

X 染色体の転写を不活性化する分子機構を明らかにするために、Xist RNA のライブイメージングを試みた。先ず検出できる系を確立し、この系を用いて細胞周期の細胞内動態を観察することに成功した。その結果 Xist RNA は周期で局在が変わり、分裂期では不活性 X 染色体の辺

縁部に局在し、間期では全体に広がって存在することが明らかとなった。間期について超解像顕微鏡による観察をおこなったところ、細かい粒子状の構造体が観察された。この構造体とタンパクの局在を調べたところ、H3K27me3 と最も強局在することが分かった。システムが確立されたようなので、今後 Xist RNA がどのようにして染色体の不活性化を起こすのか、その機構の解明に向け全力で取り組んで欲しい。Long non-coding RNA の代表格である Xist RNA が先導して成果がでることを期待する。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1.	Escamilla-Del-Arenal M, da Rocha ST, Spruijt CG, Masui O, Renaud O, Smits AH, Margueron R, Vermeulen M, Heard E. "Cdyl, a New Partner of the Inactive X Chromosome and Potential Reader of H3K27me3 and H3K9me2". ***Mol Cell Biol.*** 2013 vol. 33, 5005-5020.
2.	O'Loghlen A, Muñoz-Cabello AM, Gaspar-Maia A, Wu HA, Banito A, Kunowska N, Racek T, Pemberton HN, Beolchi P, Lavial F, Masui O, Vermeulen M, Carroll T, Graumann J, Heard E, Dillon N, Azuara V, Snijders AP, Peters G, Bernstein E, *Gil J. "MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation". *Cell Stem Cell.* 2012 vol. 6, 33-46.

（2）特許出願

研究期間累積件数：0件

（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）

（学会発表）

・ Masui O, Schulz E, Fuyuko K, Gribnau J, Heard E, Koseki H. "Analysis of Xist RNA using RNA-tagging" 第66回日本細胞生物学会大会（奈良市）2014 年 6 月
・ Masui O, Schulz E, Fuyuko K, Gribnau J, Koseki H, Heard E. "Live-cell imaging of Xist RNA"EMBO Conference Series; Nuclear Structure and Dynamics（L'Isle sur la Sorgue, France）2013 October
・ Masui O, Bonnet I, Le Baccon P, Brito I, Pollex T, Murphy N, Hupe P, Barillot E, Belmont A, Koseki H, Heard E. "Live cell imaging of random X-inactivation" Mouse Molecular Genetics (Pacific Grove, USA) 2012 October

（著作物）

・ 増井 修、古関明彦 "ポリコーム複合体と染色体・核内構造" **細胞工学**. 2012, vol 31, 887-893.

（受賞）

・ 最優秀ポスター賞
Mouse Molecular Genetics (Pacific Grove, USA) 2012 October