

研究報告書

「新規ポリコーム群・トリソラックス群の探索」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 西岡 憲一

1. 研究のねらい

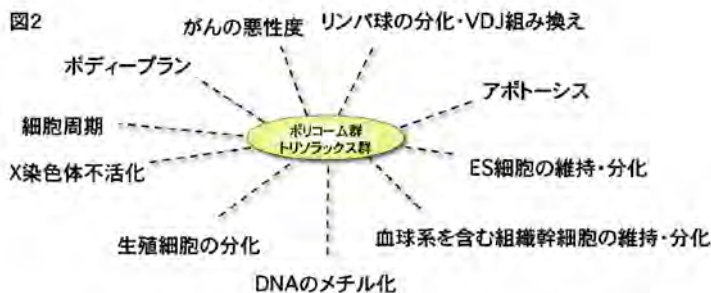
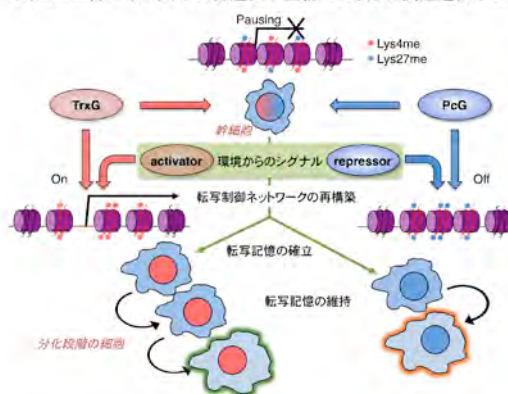
ヒトをはじめとする生物の体の組織は、それぞれ役割が異なる多くの細胞の協調の上に成り立っている。それでは個々の細胞はどのようにしてそれぞれの役割を記憶しているのだろうか？細胞記憶の本体はそれぞれの細胞に特異的な転写制御ネットワークであると考えられる。近年、iPS細胞を含む幹細胞研究の成果から、この転写制御ネットワークを支える基盤的な役割を担う遺伝子群が明らかになってきた。これらの中心的な役割を担う遺伝子群は、ポリコーム群・トリソラックス群と呼ばれる多細胞生物に特有の一連の遺伝子群で、もともとはショウジョウバエ個体の前後軸パターン形成における異常を示す変異遺伝子の遺伝学的解析から同定されたものである(図1)。一般にポリコーム群遺伝子産物は標的遺伝子の抑制を行い、トリソラックス群遺伝子産物は標的遺伝子の活性化を行うとされている。それら多くの特徴としては、いずれも標的遺伝子を含むクロマチンを足場としてその構造を制御し、転写調節に寄与しているということである。

ポリコーム群・トリソラックス群遺伝子の解析が進むにつれて、これら遺伝子産物は予想以上に多くの生物現象に関与していることがわかってきた

(図2)。これは幹細胞におけるこれら遺伝子群の基盤的役割からすれば、当然のことなのかもしれない。したがってこれからは、臨床等への種々の応用を踏まえ、これら遺伝子産物の詳細な機能とそれが寄与する転写メカニズムの解明が急務となるだろう。

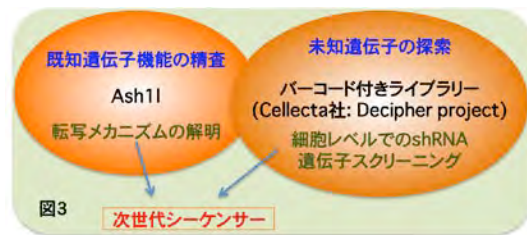
前述の通り、転写の抑制・活性化という大まかな役割はわかっており、また近年の生化学的解析の進展のおかげでメカニズムの一部もわかってきた。しかし、その情報は断片的で、全体のメカニズムを理解するにはまだまだ十分な情報が得られておらず、全容が明らかになったわけではない。例えるとこれは、パズルにおいて一部のピースが欠落しているのと、一方である特定のパズルピースの台紙への組み込み方がわからないの

図1 ポリコーム群・トリソラックス群遺伝子産物による分化関連遺伝子の制御



と類似している。

本研究課題においては(図3)、まず欠落したピースを探す方法として、レンチウイルスによるshRNA 発現ライブラリー(Collecta 社)を用いた遺伝子スクリーニングを細胞レベルで行った。ここではもちろん、ショウジョウバエ個体で行われた古典的なスクリーニング方法によるバイアスを避けることがひとつのポイントである。しかし、



今回最も重要なポイントは、対象遺伝子の同定に次世代シーケンサー解析を組み合わせることによって、ハイスループットな定量性を得ることである。ライブラリーの組み換えウイルスのコンストラクト中にバーコード配列が挿入されており、この配列を解析することによって対象となるshRNA コンストラクトが同定・定量できるという仕組みである。選抜したサンプルのバーコード配列のリード数を解析し、母集団からの濃縮率を計算することによって、同定した対象遺伝子のランキング化を行う。本方法によってこれまでの方法によるものと異なるものが見えてくるのか、検討・考察する。

また今回、特定のパズルピースの解析として、まだ転写制御メカニズムにおける役割が確立されていないトリソラックス群遺伝子産物のひとつ、マウス Ash11 について解析を行った。その詳細は割愛するが、遺伝学的・生化学的解析に加えて、これについても次世代シーケンサー解析を導入することによって、データの深みが飛躍的に向上し、主張の一般化ができた。本件についてはすでに論文を投稿中である。

2. 研究成果

(1) 概要

前述のように、ポリコム群・トリソラックス群遺伝子産物は幹細胞の維持・分化に重要な役割を担っている。この性質を踏まえ、マウス F9 幹細胞を用いてその表現型を解析することによってスクリーニングを行うこととした。F9 細胞は分化誘導実験において比較的好くモデル細胞として用いられるマウス胎仔性癌細胞株であり、レチノイン酸によって内胚葉系細胞へすみやかに分化する。ここでは分化マーカーとして4型コラーゲンを検出した。

今回用いた shRNA ライブラリーは 4,520 種類の疾患関連遺伝子に対する 27,122 種類の shRNA をコードしたレンチウイルスコンストラクトである。F9 細胞に shRNA ライブラリー由来のレンチウイルスを感染させ、ある一定の条件下で培養した。細胞を固定・4型コラーゲン蛍光染色後、FACS にかけて蛍光強度に従って細胞を分離した。細胞よりゲノム DNA を採取し、感染したレンチウイルスを特定するために PCR で組み換えウイルスに付けられたバーコード配列を増幅し、これを次世代シーケンサーで解析した。実験はウイルス感染から 3 回繰り返した。

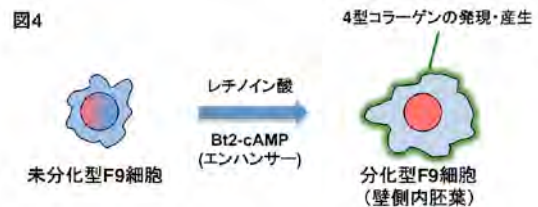
各 shRNA コンストラクトについて投入群と選抜群のリード数の比率を算出し、3 回分を平均した。この値によって shRNA コンストラクトの ID を並べ直し、ランキング化した。これまでの報告をもとに、既知ポリコム群・トリソラックス群遺伝子との関連が明確に示唆されていない核タンパク質をコードする新規候補として、数種類の遺伝子を同定した。

Ash11については、in vitro および in vivo レベルでの基本的な解析を行った。

(2) 詳細

研究テーマ A「新規ポリコム群・トリソックス群の探索」

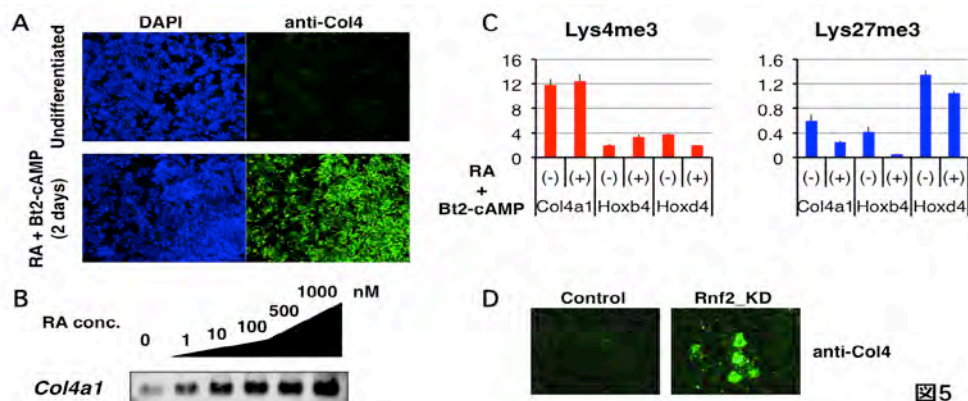
F9 細胞は分化誘導実験において比較的良好なモデル細胞として用いられるマウス胎仔性癌細胞株で、未分化幹細胞としての性質を持っている。レチノイン酸によって内胚葉系細胞へすみやかに分化誘導することができる。この時よく用いられる分化マーカーとして4型コラーゲンがある(図4)。ここではこの内在性4型コラーゲンをレポーターとして検出し、FACS を使用してスクリーニングを行うこととした。方法論の考察は後述する。



まず、スクリーニングを実施する前にいくつかの予備的な確認実験を行った。

- ① 4型コラーゲンの発現レベルはレポーターとして十分か？
- ② 4型コラーゲンの発現はレチノイン酸濃度に依存するか？
- ③ 4型コラーゲンの発現のダイナミックレンジは十分広いか？
- ④ 4型コラーゲン遺伝子はポリコム群遺伝子産物の制御下にあるか？

図5は上記①②③④を確認したものである。図5Aはレチノイン酸およびエンハンサーであるジブチリル cAMP を用いて分化誘導後に免疫染色で4型コラーゲンを検出した。図5Bはレチノイン酸の濃度を変えて分化誘導を行い、RT-PCRで4型コラーゲンの $\alpha 1$ アイソフォームの発現を検出したものである。図5Cはクロマチン免疫沈降-定量 PCR 解析で、4型コラーゲンの $\alpha 1$ アイソフォーム遺伝子クロマチンにおけるヒストン修飾パターンを調べたものである。特にポリコム群遺伝子産物の標的遺伝子のマークであるヒストン H3 Lys27 のトリメチル化が存在するかどうかを調べた。図5Dは代表的なポリコム群遺伝子である Rnf2 のレンチウイルス shRNA ノックダウン実験を行い、免疫染色で4型コラーゲンを検出した。ただし全ての細胞ではなく、一部の細胞でのみ、4型コラーゲンの脱抑制が見られた。このことについては後で考察する。以上の実験結果から、4型コラーゲンをレポーターとした本研究課題のスクリーニングは可能であると判断した。また、ここでは示さなかったが、細胞密度やエンハンサーの有無によっても分化誘導に影響が出現することも確認し、スクリーニングとして最適な条件を調整した。



次に、ライブラリーウイルスの感染条件を検討した。ただし、これは一般的なものである。

① ウイルスは単純に Polybrene を使って濃縮し(100X)、PBS-3%血清に懸濁して凍結・保存。

② 解凍したウイルスを使って MOI<0.2 となるように細胞とウイルスの濃度を調整した。

この条件ではおよそ 20%弱の細胞が感染し、そのほとんどがウイルスひとつだけに感染する。今回の場合はウイルス濃度を 0.1X で使用し、Polybrene (5 μ g/ml)存在下で 2×10^6 個の細胞を 100mm プレートに撒いた。

27,122 種類の各 shRNA コンストラクトはそもそも 100-200 倍程度の存在比のバラツキがある。それゆえ、最も少ないコンストラクトでもこれを含む細胞が最低1個存在するようにするには、独立感染クローンをおよそ 5×10^6 種類得る必要がある。今回は上記 100mm プレートを 18 枚準備した。さらに実際には Puromycin 選択の過程で細胞数はこの 100 倍ほどに増幅される。一旦およそ 10^8 個程度ずつをストックし、これを各一回の実験に使用することとした。

次に、機能試験の条件を選定した。以下を検討する必要があった。

① 総細胞数は濃縮率を計算するために独立クローン数 5×10^6 の 20 倍以上の数が必要。

② 細胞密度は低い方が望ましいが、上記必要細胞数との兼ね合いがある。

③ 培養期間は長い方が総細胞数を確保しやすいが、細胞密度との兼ね合いがある。

④ レチノイン酸やエンハンサーを使用するかどうか。

今回は最終総細胞数が 2×10^8 個超(独立クローン数の 40 倍以上)となるように、 2×10^6 個の細胞を 100mm プレートに撒いたものを 70 枚(計 1.4×10^8 個の細胞を播種)準備し、全てを翌日(24 時間以内)に回収した。本条件により、各細胞は比較的ばらけており、均一な条件下で培養できていると推察する。これ以上細胞密度を上げると細胞間接触が増えることにより分化誘導が阻害されるようである。また、本条件下では意外に、レチノイン酸を使用しなくてもごく軽度の分化誘導がかかり、4 型コラーゲンが発現することがわかった。したがって、レチノイン酸は用いる必要がないと考え、エンハンサーのみを用いることとした。これでポリコム系・トリソラックス系の両方が一度にスクリーニングできる。

固定・染色方法についても新規に検討する必要があった。以下にポイントを挙げる。

① 固定については 4 型コラーゲンの検出感度と形態の保持がポイントであるが、今回はゲノム DNA の回収も考慮に入れる必要がある。種々の方法を検討した結果、90%メタノールによる固定が最も適当であることがわかった。本方法は同時にウイルスの感染マーカーである TagRFP の構造を破壊するので、FACS の蛍光バックグラウンドを下げることに貢献している。

② 染色において工夫が必要であったのは、染色操作時における細胞の大量喪失をどのように抑えるかであった。細胞が多量にあるので、コニカルチューブを複数使ったり、チューブを移し替えたりする操作が不可欠である。細胞の喪失は、この際に細胞がチューブ壁へ吸着することに起因する。一般的な染色法をそのまま適用すると 90%以上の細胞を喪失することもある。吸着を抑えるには、一般に低吸着のチューブまたはシリコンコートしたチューブを使うこと、Tween などの界面活性剤を 0.1%程度加えることをよく行うが、これらに

よる効果は限定的であった。今回、最も効果が高かったのは血清を 10%混在させることであった。それゆえ、染色操作は常に血清共存下 (10% serum-PBS-EDTA) で行った。また、Tween20はブロッキングの直前の膜透過処理時にしか使用していない。

- ③ 蛍光標識は2次抗体法を採用した。今回は FACS 期間が長いこともあり、可視光による蛍光の減衰率が比較的低い Alexa488 を採用した。

次に、実際の FACS 時のデータを示す (図6)。ネガティブコントロールと比較すると、shRNA 発現サンプル群では全体的に 4 型コラーゲンの発現が少し下がる傾向にあることがわかる (図6Aと6Bを比較)。しかし、若干ではあるが、逆に発現が上がったものも存在するようであった。また図6Cでは、図6Bと比較して細胞密度を5倍高くしたサンプルであるが、上述したように細胞密度の違いによって分化誘導のかかり方に違いがあることがわかる。

結局、母集団細胞群の合計 2×10^8 細胞を2日間にわたって選別し、ここから投入群として 10%、高発現群として 10%、そして低発現群として 10%をそれぞれ回収した。

このような実験をウイルス感染過程より3回行い、ゲノム DNA を抽出、PCR にてウイルスバーコード領域を増幅してライブラリーを作製し、次世代シーケンサーで解析した。

図7は次世代シーケンサーによる解析結果をプロットしたものである。今回の実験では投入群において 27,122 種類の shRNA コンストラクトを全て検出 (8-2,806 リード) できており、実験のスケールとしては適切であったことがわかった。計算上、FACSに投入した 2×10^8 個の細胞の中に同一クローンが少なくとも 100 個程度は存在したことになる。図7はそれぞれ横軸に投入群の正規化したリード数を \log_2 値で示し、縦軸には選抜群の正規化したリード数を投入群の正規化したリード数で割り算してこれを \log_2 値で示した。すなわち、縦軸の 0 は投入群と選抜群とで差がないことを示しており、プラス値は選抜群でより濃縮を受けていることを示す。ここでは示していないが、3 回の実験における各 shRNA コンストラクトの密度分布の差異は顕著ではなかった。これはそれぞれの実験間の誤差が小さいことを示している。実際、ランキング化した場合の標的遺伝子セットは実験間で類似していた。ただし、前項図6における FACS でのヒストグラムの広がり具合からも予想された通り、今回の実験ではそれほど濃縮率が上がっているわけではなく、高々 2~3 倍までだった。

実際の結果であるが、現時点ではそれらをここに公開することはできないので、具体的なものは非公開項目に示し、ここでは概要を示す。

まずポリコム系遺伝子として、切りのよいところで 34 種類の遺伝子を挙げた。スクリーニン

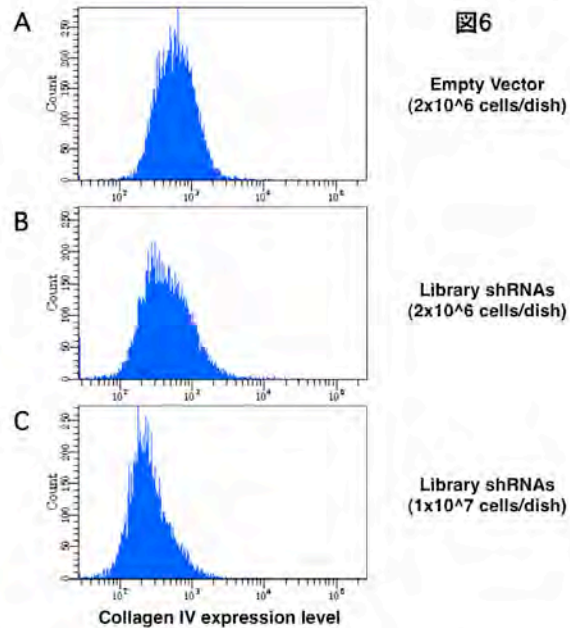


図6

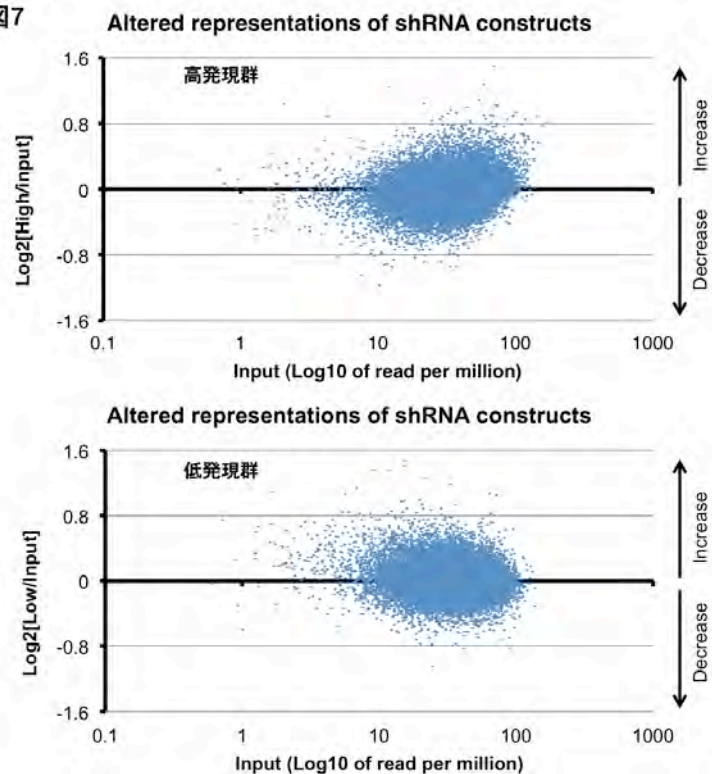
Empty Vector
(2×10^6 cells/dish)

Library shRNAs
(2×10^6 cells/dish)

Library shRNAs
(1×10^7 cells/dish)

グの母集団中には既知ポリコーム群遺伝子に対する shRNA コンストラクトは含まれていなかったので評価は難しいが、これまでに幹細胞の維持に重要であると報告されたものや実際にポリコーム群遺伝子産物と直接的な関係が報告されたものが、かなりの数でトップヒットとして挙がってきている。このことから、微妙な FACS データから想像されるより、思いのほか信頼できる結果が得られているのではないかと考えられる。逆にポリコーム群遺伝子産物と何らかの関係が

図7



報告されていない遺伝子で核タンパク質をコードしているもの、解析報告、特に幹細胞分化制御因子としての報告がほとんどないもの、すなわち、本研究課題の目的である新規ポリコーム群遺伝子の候補遺伝子としては7種類ほどあると思われる。いくつかの遺伝子についてのノックダウンを個別に行い、Col4a1 遺伝子・Hoxd4 遺伝子が脱抑制されることを確認した。

次にトリソックス系遺伝子としては25遺伝子を挙げた。ここには転写調節因子、mRNA プロセッシング因子、翻訳因子が比較的多く含まれる。上記ポリコーム系と同様、一見問題ないように思えたが、しかし、スクリーニングの母集団中に含まれるはずの Mll2/Mll3/Ash2l などの代表的な既知トリソックス群遺伝子は選抜群で濃縮されなかった。このことに関して、とりもなおさず今回のスクリーニングがうまくいかなかったという結論にはならない。それはいくつかの遺伝子について幹細胞分化制御に関する報告があるからである。しかしながら、これから新規参入して自らの手で解析を進めるに値する興味深い新規遺伝子候補に乏しかったこともあり、今後のトリソックス系遺伝子としての解析はより慎重にならざるを得ない。

スクリーニング方法論に関する考察

前述のように、今回最も重要なポイントは、対象遺伝子の同定に次世代シーケンサー解析を組み合わせることによって、ハイスループットな定量性を得たことである。

まず、これまでのプール型ライブラリーを用いたスクリーニングにおける問題点であった個々のコンストラクト存在比によるバイアスを克服できるようになった。具体的には、機能試験後に分離・回収した選抜 shRNA コンストラクトの母集団に対する濃縮率を算出することによってランキング化できるようになったのである。例えば、従来の方法で細胞のコロニー形成によって機能試験を行い、各コロニーを分離後、付随する shRNA コンストラクトを同定したとする。この場合、ライブラリー中のもともとの存在比が多い shRNA コンストラクトが機能試験後に分離・

回収した群に相応な量で存在することがある。このコンストラクト存在比のバイアスによって擬陽性を得る場合は実際に少なくなく、このことがスクリーニングの成功率を大きく下げると考えられている。一般にプール型ライブラリーの場合、コンストラクト存在比は数百から、場合によっては数千以上に及ぶので、この問題がどれほど大きいかは容易に想像できるだろう。上述の濃縮率を算出できればこのようなバイアスの効果は極めて低く抑えられる。さらに言えば、これまでは実験者側でライブラリーの質を検証することは困難であったが、次世代シーケンサーを使用することで個々の実験の質的管理が容易にできるようになったことは革新的であろう。

実は、上述のようなコロニー形成させる場合でも、機能試験で非選抜群を同様に播種し、これを母集団サンプル群として濃縮率を計算することが可能である。しかし、対象 shRNA が細胞の生存や分裂能に影響を及ぼす場合、長い期間コロニーを形成させているとそのコンストラクトの全体に対する存在率は刻々と変化していくというバイアスが少なからず発生することが予測される。細胞培養の経験者であれば、細胞密度の違いが播種性・増殖性・生存率に影響を及ぼすことは周知であるので、容易に想像できよう。このような場合は例え選抜 shRNA コンストラクトの濃縮率が算出できたとしても、意味のある結果ではない恐れがある。このような観点から、一般にコロニー形成という機能試験は問題があるとも考えられる。結局、理想的な機能試験とは、種々のバイアス発生を回避するために短期間で施行可能なもので、かつ母集団を代表する投入サンプル群が選抜サンプル群と同一サンプルから回収できる方が望ましいということになる。

選抜 shRNA コンストラクトの濃縮率を算出できることの利点をもうひとつ挙げておく。実は、計算により選抜サンプル群でランキング化ができるようになったことで、細胞集団を機能的にクリアに分離できないような条件、具体的には、細胞周期や生存への影響のために選抜にあまり時間がかけられないような条件下でも、一定の結果が得られるようになったのである。このことは大変な意義があるだろう。

追記

当初の計画では Hoxd4 遺伝子にレポーター遺伝子をノックインして連結した ES 細胞を用いる予定であった。Hox 遺伝子はポリコム群遺伝子産物の代表的な標的遺伝子であるので、以後の解析がスムーズにいくと考えられたからである。また、shRNA ライブラリーも他社製のものを用いる予定であった。しかし、以下の問題点のために変更した。

- ① Hoxd4 遺伝子はレチノイン酸で誘導されるが、結果的なタンパク質発現レベルはスクリーニングで使用できるほど高くなかった。
- ② IRES や 2A 配列などの翻訳に関する制御についても検討したが、レポータータンパク質の発現は十分に検出できなかった。①に関連して、内在性 Hoxd4 プロモーターの使用は困難である可能性が大きくなった。Transgene 利用についても検討を行ったが、うまくいかなかった。
- ③ In situ hybridization 法を用いて Hoxd4 mRNA を検出する系を確立することも試みたが、感度が低く、やはりスクリーニングでの使用に耐えられなかった。この時点で Hoxd4 の使用は断念した。
- ④ スクリーニングではある程度の細胞増殖能が維持された方がやりやすい。幹細胞は分化

した場合に極端に増殖能が落ちることもあり、shRNA コンストラクトの representation の変動が起きやすいと考えられた。加えて、播種効率が極めて悪くなる場合がある。これらに関して、ES 細胞を使う場合においても考慮しなければならず、ある特定の株を使う必要があっただろう。しかし、系をよりシンプルにするため、今回は F9 細胞を用いた。この細胞は幹細胞的性質を持ち、増殖能・播種効率ともに申し分なかった。ゲノムへの変異導入も可能な細胞であるので、後々の解析においても有利であった。また、シンプルな分化誘導の系も確立しているので、解析も容易と考えられた。ウイルスの感染効率も ES 細胞より優れていた。

- ⑤ shRNA ライブラリーに関して、当初は SBI 社製のものを使用予定していた。このライブラリーは Affimetrix のマイクロアレイで解析することによって選抜群の濃縮率を計算できるようになっていることがこれまでのライブラリーになかったポイントである。しかし、薬剤耐性マーカーが CMV プロモーターで制御されるためか、ウイルスは分化型細胞にしか感染できなかった。そうこうしているうちに昨年暮れくらいに Celecta 社の shRNA ライブラリーが入手できた。Celecta 社は SBI 社のスピンオフ会社みたいなもので、ライブラリーの基本コンセプトは踏襲していた。ただし、解析は次世代シーケンサーを用いることができるようにコンストラクト内部にバーコード配列を挿入するという工夫が施されていた。しかも、Celecta 社のライブラリーでは薬剤耐性マーカーが UbiC プロモーターで制御されるので、幹細胞にも使用できる。何より、オープンリソースとなっており、無料で入手できる場所は大変魅力的であろう。

研究テーマ B「Ash1l によるヒストン H3 Lys36 のメチル化の生物学的役割」

詳細は割愛した。これまでは酵母で得られた知見から、一般にヒストン H3 Lys36 のメチル化は転写伸長反応に依存すると考えられていたが、哺乳類では必ずしもそうではなく、両者が独立したメカニズムで生じ得ることを明らかにした。すでに論文を投稿中である。

3. 今後の展開

今回使用した shRNA ライブラリーは、実は 2 部 (Module 1&2) 構成になっており、4,625 遺伝子スクリーニングする別 Module が存在する。この別 Module には、今回コントロールとして用いた Rnf2 など、既知ポリコム群遺伝子を標的とした shRNA コンストラクトが多数含まれているので、これを解析すれば本当にポリコム群遺伝子のスクリーニングに適していたのかどうか分かるだろう。3 月 1 日現在、前回の Module の時と同様に 3 回の実験を完了した。今後、次世代シーケンサー解析を行う予定である。それら結果を見て総合的に判断し、すぐ論文にまとめるのか、または新規遺伝子の解析を進めてからまとめるのか、検討して結論を出す。

もちろん、今回同定した遺伝子についてはさらに慎重に解析の是非を F9 細胞で検討し、その後まずは ES 細胞において未分化性の維持・分化誘導能について RNA-Seq や ChIP-Seq などの次世代シーケンサー解析やプロテオミクス解析を行うことになるだろう。その後はマウスの解析も視野に入れたい。

4. 自己評価

本研究課題のような新規ポリコム群遺伝子を採ろうという遺伝子スクリーニングは、目的がシンプルだけに、これまで多くの研究者が水面下で挑んできたものだろうと推察する。しかしながら、その多くは不毛に終わったようで、これまでにまだ際立った報告がほとんどない。そう言う意味ではかなり挑戦的な課題だったのかもしれないと感じている。

幸い、今回は研究計画にほぼ沿うような形で、結果を出すところまで漕ぎつけることができた。そして、今後の糧となる研究対象を得ることができたことは大変喜ばしいことであると思う。本研究課題ではこれまでに研究者自身が行ってこなかった多くのテクノロジーにチャレンジし、触れることができた。それらの全てが今回の成果に現れているわけではないが、それらを会得できたことはよかったと思う。

ただ、実績を論文という形で出せなかったのは残念なことだ。しかしながら、そもそもスクリーニングの結果がよい場合にはいずれにせよすぐに論文にまとめることは困難なので、それは覚悟しなければいけなかったことなのかもしれない。

視点を変え、本研究課題が社会へ、または研究者コミュニティーへ如何に貢献できたかを考えてみる。今回のスクリーニングはいわゆる次世代型スクリーニングを採用している。本方法の利点は前述したが、最も重要な点は、これまでの遺伝子スクリーニングにおける基本コンセプトを変えることができたことではないだろうか。これまで選抜群の選抜基準というものはかなり厳密である必要があった。そうでないとスクリーニングがうまくいかないと信じられていたからである。実際、今回のようなFACSによる分離が微妙だと、選抜群の再分離を余儀なくされたり、またそれを提案されたりすることも少なくないだろう。しかしながらこれからは、次世代シーケンサーによるハイスループットな定量性のおかげで、選抜群の分離がそれほど厳密でなくても、煩雑な追加実験をすることなく、濃縮率を計算することで信頼性の高い結果を比較的容易に手に入れることができるようになったのである。一般的に遺伝子スクリーニングは「難しい・運次第」とよく言われる。しかし、結果的に本研究課題は、このような革新的な次世代型遺伝子スクリーニングを採用することによって、これまでスクリーニングそのものを不安視していた研究者たちが割と容易に高精度の機能遺伝学を展開できるようにするための礎を築いたと言える。本報告書を読んだ研究者が、「よし、それなら私も遺伝子スクリーニングをやってみよう」という気持ちがかもし起きたのなら、本研究課題は成功したのだ、と考えてもよいだろうと私は考える。

5. 研究総括の見解

哺乳類の新規ポリコム群・トリトラックス群の遺伝子を得るために新たなスクリーニング系を開発した。開発した方法は次の通りである。F9細胞にshRNAライブラリー由来のレンチウイルスを感染させ、培養後得られた細胞を4型コラーゲン蛍光染色後、FACSにかけ細胞を分離し、ついで細胞よりゲノムDNAを採取しバーコード付きレンチウイルスを増幅し、次世代シーケンサーで解析した。その結果、ポリコム系遺伝子の候補遺伝子として34種類、トリソラックス系遺伝子候補として25種類を取りあげた。方法の確立に時間がかかったが、当初の目的に到達したことは評価したい。

今回のスクリーニングで新規のポリコム遺伝子群が得られたのか、その検証並ならびに能解析はこれからである。今後の解析の進展に期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ken Higashimoto, Yukari Yada, Toshiharu Komori, Masashi Matsuda, Yoko Koseki, Manabu Nakayama, Hidenobu Soejima, Hiroshi Handa, Haruhiko Koseki, Susumu Hirose, Kenichi Nishioka. A Role of Histone Methylation by ASH1L in the Establishment of Transcriptional Memory. Cold Spring Harbor Conferences Asia (Epigenetics, Chromatin&Transcription). 2010,5,17-5,21. P113.
2. Ken Higashimoto, Yukari Yada, Toshiharu Komori, Masashi Matsuda, Yoko Koseki, Manabu Nakayama, Hidenobu Soejima, Hiroshi Handa, Haruhiko Koseki, Susumu Hirose, Kenichi Nishioka. Histone H3 Lys36 methylation by Ash1l triggers a regulatory cascade of the chromatin reprogramming that counteracts Polycomb silencing. 第34回・日本分子生物学会年会・シンポジウム. 2011,12,13-12,16. 4S1pII.
3. Hitomi Miyazaki, Ken Higashimoto, Yukari Yada, Toshiharu Komori, Masashi Matsuda, Yoko Koseki, Manabu Nakayama, Hidenobu Soejima, Hiroshi Handa, Haruhiko Koseki, Susumu Hirose, Kenichi Nishioka. Ash1l Methylates Histone H3 Lys36 Independent of Transcriptional Elongation to Counteract the Polycomb Silencing. Cold Spring Harbor Meeting-Asia (Epigenetics, Chromatin & Transcription) 2012,4,23-4,27. P87.
4. 西岡憲一: 第12章 トリソラックス群タンパク質による転写制御, エピジェネティクス, 269-290, 培風館. 東京. 2010.

(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)