

令和 2 年 4 月 1 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 H30

受付番号 201860765

氏 名 川口 茜

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

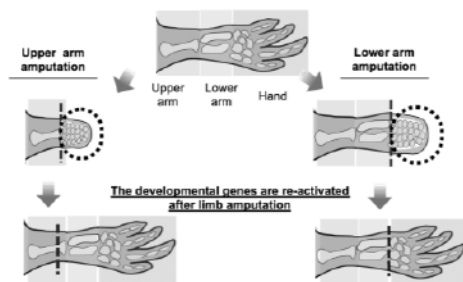
記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：オーストリア分子病理学研究所（国名：オーストリア）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
細胞記憶を司るクロマチン制御機構の包括的解明とその器官再生研究への応用
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
オーストリア分子病理学研究所 Molecular mechanisms of vertebrate regeneration
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可）**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

[目的の遂行状況及び成果]

脊椎動物の器官再生能力には種間で大きな違いがある。体の付属器官、例えば、手足の一部を失った場合に、ヒト・マウスでは欠損してしまった部位を元に戻すことは非常に困難である。一方で、両生類に属する特に有尾両生類は手足を失った場合、機能的・構造的にほぼ相同な手足を再生する。その優れた有尾両生類の再生能力を支える分子機構として、有尾目に属するアホロートルの四肢の再生過程を調べた報告から、発生段階で活性化された分子機構が繰り返し使われていることが示唆されてきた (Tanaka EM., 2011; K. Agata., 2007)。これは、四肢再生における発生終了と再生開始の間に、一度終了したその細胞特異的な発現履歴を細胞記憶として維持し、再度活性化する過程において、再生を可能にする分子機構が存在すると考えられる。例えば、アホロートルでは、手首を切断するとその先端構造である手を、上腕で切断した場合にはその先端部の上腕から手までの過不足ない損失部分の構造を再生させる。これは切断面に残された細胞が、一度記憶した腕や手といった自身の位置記憶を正しく書き出すことで、失われた構造を正確に再構成することを示唆する (図 1)。

過去の研究から、位置情報の細胞記憶は可逆的な分子実態 (エピゲノム修飾や高次クロマチン構造) であることが示唆された (Thoms SD., et al., 1984; Yakushiji N., et al., 2005; Hayashi S., et al., 2015)。さらに、エピジェネティック制御に伴う高次クロマチン動態が、発生四肢での位置値を司る *HoxD* 遺伝子群の発現制御に重要であることが示された (Andrey G., et al., 2013)。これらは、前述の再生細胞における位置値の記憶・保存・再活性化においても、エピジェネティック制御と、それに伴う高次クロマチン構造の制御が作用することを示す。本課題では、四肢再生における *HoxD* 遺伝子群のクロマチン制御機構に着目し、器官再生を担う細胞記憶の分子機構の解明を目指し、派遣期間の二年にわたり以下のことを達成した。



(図1) How do axolotl blastema cells "know" whether they should regenerate only the hand, or the entire arm?

成果 1) High-throughput chromatin conformation capture (Hi-C)を用いたアホロートルのゲノム情報整備・基盤構築

成果 2) Hi-C により確立したアホロートルゲノム情報を基にした巨大 Topological Association Domains (TADs)の同定とその解析

成果 3) クロマチン免疫沈降法を用いた CTCF の結合サイトの同定と、それを用いた TAD boundary の同定

成果 4) Hi-C により確立したアホロートルゲノム情報を基にした *Hox* 遺伝子群のアノテーションと領域の特定

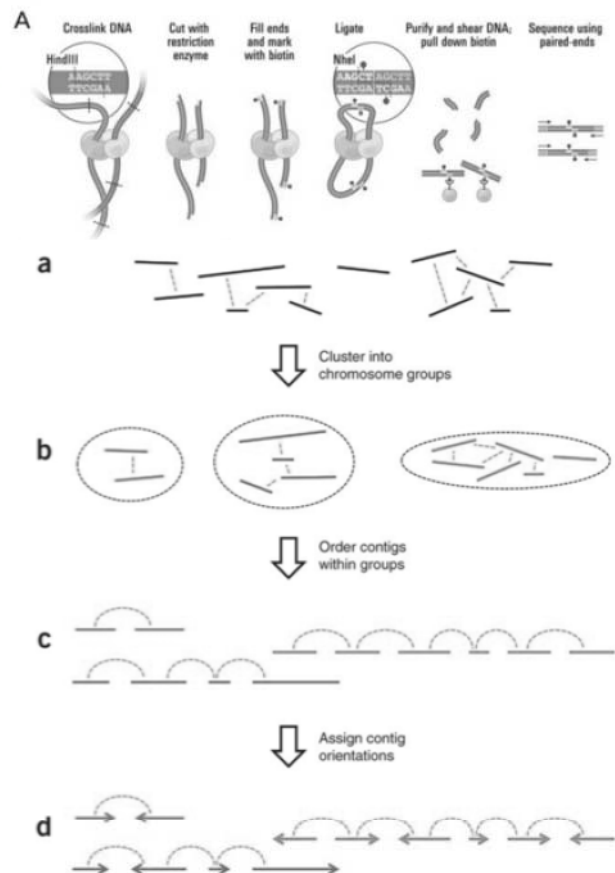
成果 5) ATAC-seq 法を用いた、アホロートルのオープンクロマチンの同定、四肢再生過程に伴い変化するオープンクロマチン領域の同定、RNA-seq による、遺伝子産物の網羅的同定、四肢再生過程に伴い発現が変化する遺伝子産物の網羅的同定

以下に、それぞれの成果を説明を加える。

成果 1) High-throughput chromatin conformation capture (Hi-C)を用いたアホロートルのゲノム情報整備・基盤構築

派遣先研究室は世界でもトップクラスのアホロートルを用いた再生研究では世界を牽引している。さらに次世代技術（次世代シーケンスや一細胞レベルでの解析）を見据えた上で、世界に先駆けてアホロートルのドラフトゲノム配列を解読した (Nowoshilow S., et al., 2018)。しかしながら、この報告でのアホロートルのゲノム情報は平均 25000bp の解像度で読み取られた PACBIO (Pacific Bioscience sequencing) を 125,000contigs にまで繋げた非連続的なクロマチン情報であった。これはアホロートルの予測されるゲノム長が、マウスや哺乳類のゲノム長の 10 倍 (32Gb) とされており、かつ各種トランスポゾンに由来する反復配列が 70%以上存在することからアッセムブリの技術的限界による。研究モデルとして利用可能な状態にするためには、この断片集を正しく繋げる必要があった。申請者は本課題を遂行するために、Hi-C (High-throughput chromatin conformation capture) を用いたアホロートルの *de novo* ゲノムアッセムブリとゲノム情報の基盤確立を目的としたゲノムプロジェクトを開始し、研究基盤の立ち上げを行うことを行った。

先に述べたように、ドラフトゲノムの段階で想定されたアホロートルのゲノム長は 32Gb、染色体数は 14 対 (diploid) である。アホロートルの核にはヒト (2.7Gb)、マウス (3.2Gb) より 10 倍以上長いゲノムが圧縮され、納められている。Hi-C 法は、核の中で近接するゲノム領域同士をホルムアルデヒドによってクロスリンクし、そのゲノム同士の接触や距離を同定する方法で、プロモーターと遠位エンハンサーの距離を同定する目的や、さらに *de novo* の染色体同定に用いられる (E. Lieberman-Aiden, et al., 2009; J. N. Burton, et al., 2017) (図 2)。申請者はアホロートルのゲノム配列の決定にこの技術のアホロートルの長鎖ゲノムに用いるため改良し、次世代シーケンサーを用いて近接する DNA 同士を同定した。さらに Bio Informatician である Siegfried Schloissning 博士と共同し、Schloissning 博士の開発した高解像度ゲノムアッセムブリアルゴリズム MARVEL (Nowoshilow S., et al., 2018; Grohme MA., et al., 2018) を用いてアホロートルの染色体レベルでの配列決定を成功させた。加えて、次世代シーケンサーを用いたゲノム情報のエラーコレクションを行い、ゲノム情報をさらに精査されたものに確立した。



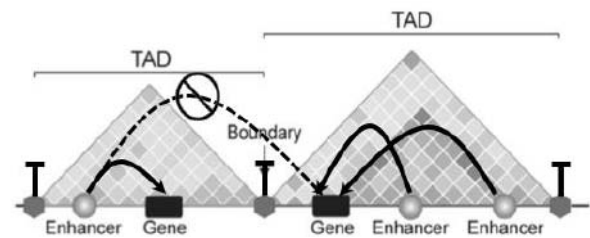
(図 2) Hi-Cの原理とそこから得られた近接する断片同士を同一染色体としてつなげる模式図
近接するゲノム同士はホルムアルデヒドで架橋され、その後特定の制限酵素によって断片化される。その切断面はビオチンで標識され、その後ビオチンで免疫沈降される。免疫沈降された二つのゲノム断片を次世代シーケンサーで同定し、断片同士をつなげることで、染色体の同定を行う。

上図：E Lieberman-Aiden, et al., *Science* (2009)

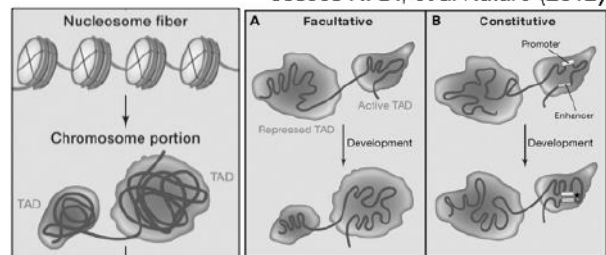
下図：J. N Burton, et al., *Nature Biotech* (2017)

成果 2) Hi-C により確立したアホートルゲノム情報を基にした巨大 Topological Association Domains (TADs)の同定とその解析

核内における染色体の収納は、一見して無秩序に起こっているように考えられるが、実際には高度に整頓された状態で存在する。つまり、一本の染色体上でも非常に近接しているゲノム領域は区切られ、近接していないその他のゲノム領域とは干渉し合わないよう存在することが知られる。このクロマチンの相互作用単位を Topological Association Domains (TADs)と呼び、一つの TAD の内部でのゲノム領域の近接は起こるが、その外側のゲノム領域とは接近しない(図 3, 4)。それは染色体上に存在する無数の遺伝子とそれぞれに特異的に作用するエンハンサー群が遠くに離れすぎないように、また非特異的な遺伝子とエンハンサーの相互作用による非特異的遺伝子発現が引き起こされないような仕組みを取っていると考えられる。我々が Hi-C によるアホートルゲノムの近接図 (Heat-map) を解析した結果、一本の染色体上でも非常に近接しているゲノム領域は区切られて存在することがわかった。興味深いことに、マウスや人において報告されている TAD の平均サイズは 2-3Mb、最大のものでも<5Mb であるが、アホートルの最大の TAD サイズは現在わかっているところでは平均して 10-15Mb、最大の TAD は 30Mb に達することがわかった。TAD を核内で維持する機構は現在のところ明らかになっていないが、物理的な作用力を考えると、TAD が大きくなれば、細胞分裂を乗り越えて娘細胞群で TAD を維持することは難しいと予想される。このことから、巨大な染色体の相互作用 (染色体ループ) を力学的に維持・安定させる染色体安定性のための独自の分子メカニズムが存在することが示唆される。



(図3) TAD structures which is occupied with CTCF are observed over the specific promoter-enhancer interactions
Robson M., et al., *Mol cell* (2019)
Jesses R. D., et al *Nature* (2012)



(図4) Chromatin domain in nuclei territory have correlation underlying the activated or suppressed saturation: Topological associated domain (TAD)
Tom Sexton., et al., *Cell* (2015)

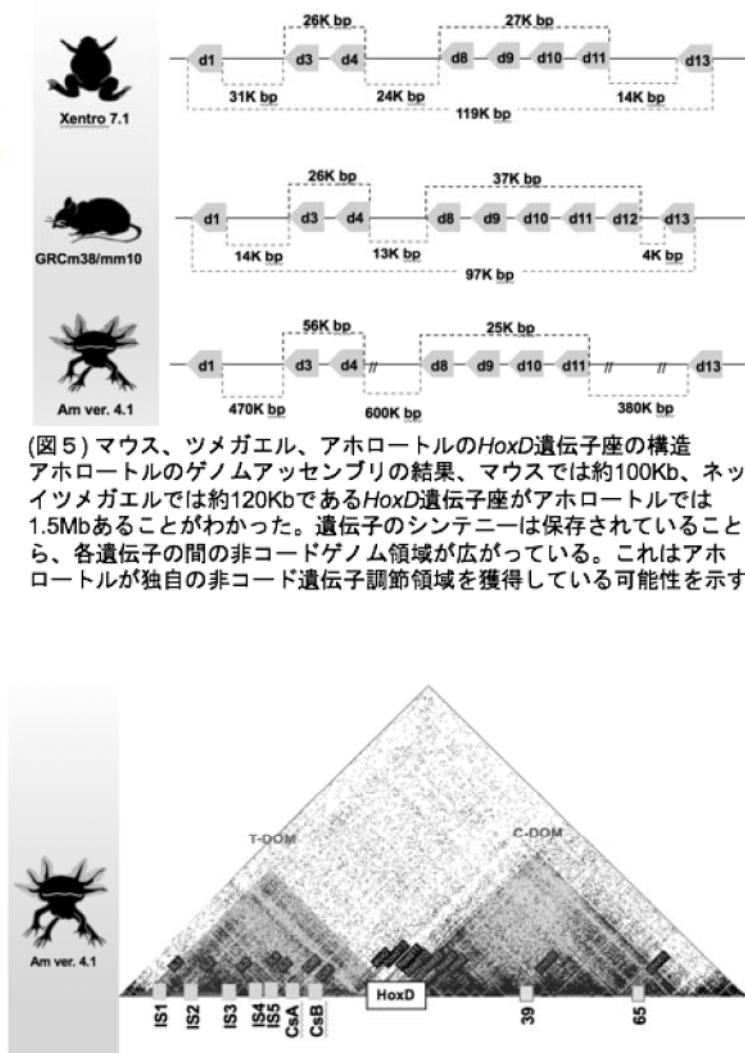
成果 3) クロマチン免疫沈降法を用いた CTCF の結合サイトの同定と、それを用いた TAD boundary の同定

上記のように、ゲノムの相互干渉単位を TAD と呼ぶが、転写因子 CCCT 結合因子(CTCF)が隣接する TAD の境界に結合し、TAD boundary として役割を持つ (Robson M., et al., 2019; Jesses RD., et al., 2012. 図 3)。我々はこの TAD boundary を同定し、より精密なアホートルゲノムの TAD 解析を行うため、免疫沈降法による CTCF の結合領域の同定をおこなっている。

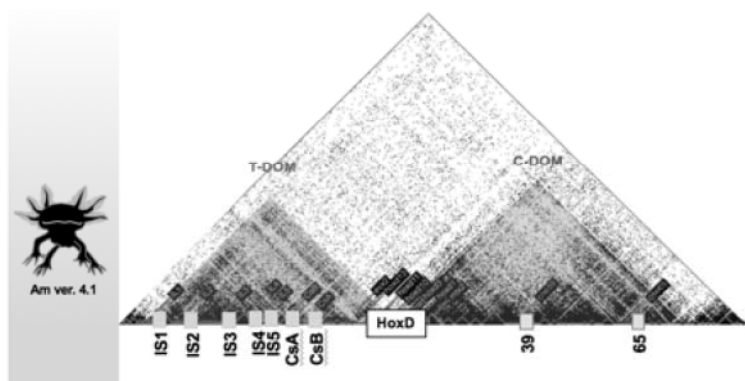
申請者は予備実験から、アホートルのゲノムには Sonication resistance regions が多く存在することを見出していた。つまり、一般的に ChIP 法で用いられるゲノム DNA を物理的に剪断する方法では、大部分のゲノムが切れ残った状態になり検出できない。またアホートルの再生芽から通常の ChIP 解析に用いる細胞数を集めることは難しい (1 匹のアホートルの両手の再生芽から集められる標的細胞の数は 2500-3000 程度である)。そのため、申請者は、必要細胞数が少なく、また酵素処理による DNA の消化を用いた Ultra-low input ChIP 法と、さらに免疫沈降の効率と精度を上げるために Transposase による DNA のタグメンテーション法を合わせた ULI-ChiPmentation をアホートルの細胞に適応した (J. Brind' Amour., et al., 2015; C. Schmidl., et al., 2015)。現在、そこから得られた次世代シーケンスの結果について解析を続けている。

成果 4) Hi-C により確立したアホロートルゲノム情報を基にした *Hox* 遺伝子群のアノテーションと領域の特定

本課題で解析のモデルとして *HoxA* 及び *HoxD* 遺伝子座についてもアッセムブリに成功した。*Hox* 遺伝子群はまたゲノム重複にともなって生じた遺伝子群であるため、*HoxA*、*HoxB*、*HoxC* そして *HoxD* 遺伝子群はそれぞれが非常に酷似した配列を持つ。そのため、既存のアノテーションアルゴリズムでは高度に保存された領域が原因となりそれぞれの *Hox* 遺伝子群を正しくアノテーションすることができなかった。そのため、最終的な *Hox* 遺伝子座については申請者自身が One on One BLAST によってアノテーションを行なった。そこから明らかになったことは、アホロートルの *HoxD* 遺伝子座は約 1.5Mb にも及ぶ巨大な遺伝子座であり、遺伝子間の非コード領域がマウスやネッタイツメガエルと比べて 15 倍程度大きい遺伝子座であることである (図 5)。さらに構築した染色体から TAD の解析をおこなったところ、本研究課題のモデルである *HoxD* 遺伝子座のクロマチン構造は遺伝子座に対してセントロメア側とテロメア側の両側に存在すること、また *HoxD* 遺伝子座のほぼ中心 (*HoxD10* 遺伝子領域) が TAD boundary を形成していることがわかった (図 6)。



(図 5) マウス、ツメガエル、アホロートルの *HoxD* 遺伝子座の構造
アホロートルのゲノムアッセムブリの結果、マウスでは約100Kb、ネッタイツメガエルでは約120Kbである *HoxD* 遺伝子座がアホロートルでは1.5Mbあることがわかった。遺伝子のシンテニーは保存されていることから、各遺伝子の間の非コードゲノム領域が広がっている。これはアホロートルが独自の非コード遺伝子調節領域を獲得している可能性を示す。



(図 6) Hi-C によって同定された *HoxD* 遺伝子座領域 Heat map
アホロートルのゲノムアッセムブリの結果、*HoxD* 遺伝子座には2つのTADがセントロメア側とテロメア側が存在することがわかった。2つのTAD構造は *HoxD10/D11* の遺伝子領域によって分断されている。これはマウスで報告されている四肢発生におけるTAD構造と酷似している。また、マウスで報告された *HoxD* 遺伝子の発現を四肢特異的に制御するエンハンサー群 (IS1-5, Csa/B, CNE39 and CNE65) が高度に保存されていることを同定した。

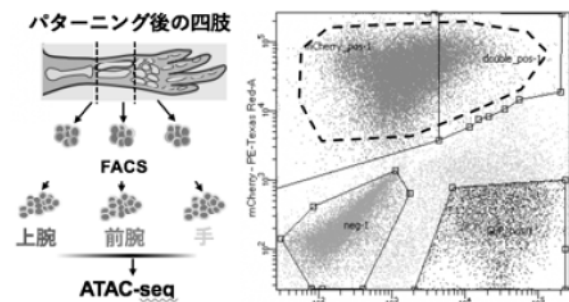
成果 5) ATAC-seq 法を用いた、アホロートルのオープンクロマチンの同定、四肢再生過程に伴い変化するオープンクロマチン領域の同定、RNA-seq による、遺伝子産物の網羅的同定、四肢再生過程に伴い発現が変化する遺伝子産物の網羅的同定

前述のように、申請者は『切断面に残された細胞が、一度記憶した腕や手といった自身の位置記憶を正しく書き出すことで、失われた構造を正確に再構成する』と仮定した。すなわち、一つの仮説として『成熟した腕の細胞と手の細胞には異なるエピジェネティックな記憶がクロマチンに残されている』ことが考えられる。申請者はエピジェネティックな記憶の一つはクロマチンのオープンあるいはクローズであると考え、まずは成熟したアホロートルの上腕、前腕と手の細胞を用いて Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing (ATAC-

seq)をおこなった。

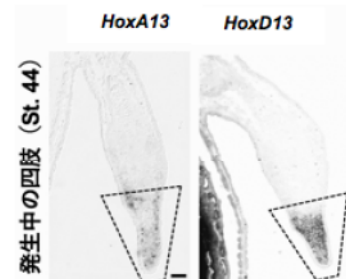
ATAC-seq法とは、トランスポゼースを染色体に作用させ、トランスポゼースが切断したゲノム断片を次世代シーケンサーで読み取ることで、クロマチンが開いている領域（High accessible region）と、閉じている領域（Closed chromatin region）をゲノムワイドに同定することができる（J. D. Buenrostro, et al., 2013）。一般的に、オープンクロマチン領域は、ユークロマチンの状態であるため、特定の転写因子が結合していることを示唆しており、転写が活性化されている遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域に多く見られる。転写が不活性化されている遺伝子領域には、クロマチンが開いている領域は見られない。過去の移植の実験から、アホロートルの腕を形成する複数系譜の細胞の中でもFibroblast細胞のみが四肢の再生時に新たな再生四肢に寄与すること、そしてその系譜の細胞のみが位置情報を持つことが明らかにされている（E. Nacu, et al, 2015; M. Kragl, et al., 2009）。腕を構成する細胞の中でもFibroblast細胞を特異的に回収するために、申請者は派遣先研究室で系統維持されているトランスジェニック系統を細胞単解析に用いた。このトランスジェニックアホロートルは、腕のFibroblast細胞がCRE-loxpによる組み替えシステムにより、特異的にmCherryタンパクにより蛍光ラベルされており、細胞単離技術を用いて特異的に単離をおこなうことができる（図7）

（Mulawara P., et al, 2018）。過去のマウスの四肢の発生についての報告では、発生における四肢のパターニングが完了した後は、抑制状態（Closed-chromatin）になり、遺伝子の発現が抑制されることがわかっている（Andrey G., et al., 2013）。



（図7）フローサイトメトリーによる標的細胞の単離
パターニングが終了した四肢をそれぞれ上腕、前腕と手に切り分け、細胞を単離した。その後、フローサイトメトリーによってmCherryによって標識されたFibroblast Cellのみを単離し、ATAC-seqとRNA-seqに用いた。右図は、実際のFACSによるプロットを示す。標的細胞として黒点線で囲われた細胞を回収した。

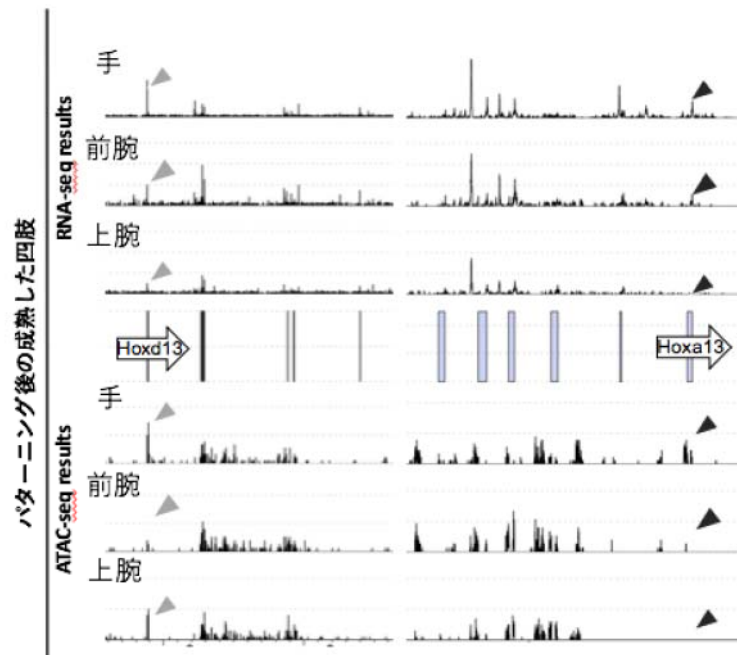
申請者は、パターニングが終了したアホロートルの成熟四肢のそれぞれの腕の位置（上腕、前腕、手）におけるHox遺伝子座のクロマチンの状態を調べるため、成熟したアホロートルの上腕、前腕と手を図7に示したようにそれぞれ切り分け、Fibroblast細胞を単離し、ATAC-seqとRNA-seqによる解析を行なった。興味深いことに、*in situ hybridization*法を用いた発現解析では発生段階では手首より先でしか発現が検出されない（図8）HoxD13遺伝子のプロモーター領域が、上腕、前腕と手のいずれの細胞においてもオープンであることがわかった（図9左、灰矢頭）。さらに、RNA-seqの解析から、上腕、前腕と手のいずれの部位からもわずかながらHoxD13の発現が検出された（図9左、灰矢頭）。同時に、HoxD遺伝子群に相同な遺伝子群と考えられるHoxA遺伝子群のオープンクロマチン領域の解析も行なったところ、HoxD13の相同遺伝子であるHoxA13のプロモーター領域（は*in situ hybridization*法で発生段階において、HoxA13もHoxD13同様に手首より先の領域でのみ発現が検出される（図8））は上腕、前腕ではClosed Chromatinであるが、手の細胞ではOpen chromatinの状態で維持されていることがわかった（図9、右黒矢印）。RNA-seqの結果では、いずれの領域の成熟細胞においてもHoxA13の発現は検出できなかった（図9、右黒矢印）。アホロートルの成熟した四肢の細胞が示す二つのHox13遺伝子群のクロマチン状態の違いは、a)アホロートルの上腕、前腕、



（図8）*in situ hybridization*によるHox13遺伝子群の発現解析
*in situ hybridization*による発現解析では、アホロートルの四肢発生過程では2つのHox13遺伝子は四肢の先端部（手の原基）に相当する領域においてのみ発現が検出される。

手の細胞はマウスの四肢発生パターンニング後の細胞と異なり、*Hox* 遺伝子群のプロモーターはオープンクロマチンを維持している、b) *HoxA13* 及び *HoxD13* 遺伝子は相同遺伝子であるにも関わらずプロモーター領域及び遺伝子の発現状態には大きな違いが見られる、c) 特に *HoxA13* 遺伝子プロモーター領域と mRNA の発現は発生段階の *Hox* のコリニアリティな発現パターンを反映している、d) 一方で、*HoxD13* 遺伝子プロモーター領域は発生段階における *Hox* のコリニアリティな発現パターンを反映したクロマチンの状態ではなく、発生段階において発現した履歴のない上腕、前腕でもオープンクロマチン状態を維持し、さらに遺伝子産物も検出された。この結果は、これまでの *Hox* 遺伝子群の四肢の位置に依存した発現を示す *Hox* のコリニアリティが維持されておらず、

また *HoxA13* と *HoxD13* の発現様式が異なるというこれまでにない全く新規の発見である。 この結果は、他の脊椎動物の四肢発生では相同な機能を持つと捉えられていた二つの *Hox13* 遺伝子が、アホロートルでは異なる機能を持つ可能性を強く示唆している。



(図9) パターンニング後の四肢の各位置における *Hoxa13* と *HoxD13* 遺伝子のクロマチンの状態と mRNA の発現解析
アホロートルの上腕、前腕、手の細胞は、*HoxA13* のプロモーター領域は手より先端の細胞でのみ、オープンクロマチン状態であった（右図中黒矢頭）。また mRNA の発現もクロマチンの状態に相関を見せる。一方、*HoxD13* 遺伝子プロモーター領域は発生段階における *Hox* のコリニアリティな発現履歴を反映したクロマチンの状態ではなく、発生段階において発現した履歴のない上腕、前腕でもオープンクロマチン状態を維持している（左図、灰色矢頭）。mRNA の発現も、四肢の全ての部位で検出された。

[現在進行中の解析]

1) CTCF の結合配列予測とゲノム上におけるそのクラスター群の同定

現在我々の ChIP の結果から、アホロートルにおける CTCF のコンセンサス配列の同定、さらに実際にゲノム上において CTCF 結合配列がクラスターを領域を探している。クラスター、すなわち TAD boundary として機能する可能性が高い領域が見出されたのち、Hi-C の Heat-map と重ね合せながら解析を進めることで、アホロートルの巨大なゲノムにおける高精度な TAD map を作成する。そこから特異的な遺伝子とエンハンサーの相互作用の規則性を見出すことを目的に解析を続ける。

2) ATAC-seq から同定された Open chromatin の生物学的意義についての in vivo での解析

我々が ATAC-seq 解析から同定した Open Chromatin 領域は、四肢の発生に関与する可能性が高い遺伝子発現制御領域（推定エンハンサー領域）である。この Open Chromatin 領域が、四肢発生において本来機能を持つものであるかどうかを、アホロートルのトランスジェニック法を用いてエンハンサー活性を評価することで定義する。レポーター遺伝子の上流に、ATAC-seq から同定された推定エンハンサー領域を結合させ、相同組み換えを引き起こす制限酵素 (I-SceI) と共に、アホロートルの受精卵に導入する。導入されたレポーター遺

伝子とエンハンサー領域は I-SceI によってゲノム中に組み込まれるため、推定エンハンサー領域が活性があるエンハンサーであった場合には、レポーターの発現が観察できる (REF 荻野)。

3) CRISPR-Cas9 法による *HoxA13* と *HoxD13* の機能欠損アホロートルの作成とその解析

アホロートルの *HoxA13* と *HoxD13* の発現の違いを再生における役割の違いであると仮定した。その仮説を示すため、申請者は CRISPR-Cas9 法を用いて、*HoxA13* と *HoxD13* の機能欠損アホロートルを作成した。現在、それらの機能欠損 F1 個体の四肢を切断し、再生への影響を観察している。

[共同研究の進行の程度について]

申請者は、アホロートルの Hi-C 法を確立する間に、多くの技術を学ぶことができた。そのことから、主に二つの共同研究の依頼を受け、現在進めている途中である。

1) 肺魚のゲノム解読プロジェクト

肺魚は、脊椎動物の進化を考える上で非常に重要な脊椎動物である。つまり、本来水中に存在していた祖先型の脊椎動物が、水中か陸上かに生存する領域を分岐させたところの性質を未だに残す脊椎動物として知られている。しかしながら、そのゲノムはまだ解読されておらず、ゲノム情報に刻まれた脊椎動物の進化の鍵はまだ明らかになっていない。そこで現在、オーストラリア・中国・ドイツと派遣先研究室が合同で、オーストラリアで採取される Australian lungfish についてゲノム解読と、さらに染色体レベルでのアッセムブリを行なっている。現在までに、Hi-C によるアッセムブリやエラーコレクションは終了し、投稿準備中である。

2) ヒメイカゲノムをモデルとしたクロマチン動態とマイクロシンテニーの研究

ヒメイカは、二枚貝を祖先とする甲殻類である。興味深いことに、二枚貝のゲノム上の離れた領域、あるいは別の染色体上に存在している遺伝子群が、ヒメイカまでの進化の過程で一つのゲノム上にクラスターを形成していることがわかっている。別の染色体に渡るゲノムの入れ替えが引き起こす遺伝子クラスターの形成（マイクロシンテニー）は未だ報告が少ない。これは、非脊椎動物をモデルとしたゲノムの進化と多様性を解析する上で非常に興味深いモデルである。申請者は、University Wien の Oleg Simakov 博士から共同研究の依頼を受け、ヒメイカをモデルとした Hi-C の確立と、ATAC-seq の確立を行なった。そのプロジェクトでは、PhD の学生をメンターし、現在までに、Hi-C によるアッセムブリ、TAD 解析、Open Chromatin の解析は終了し、投稿準備中である。