

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01407

研究課題名(和文) CRISPRを利用した4Dヌクレオーム解析

研究課題名(英文) CRISPR-mediated 4D nucleome analysis

研究代表者

伊藤 隆司 (Ito, Takashi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：90201326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,200,000円

研究成果の概要(和文)：核内高次構造を探る新しい方法として、標的ゲノム部位から空間的に一定の距離内に存在するゲノム領域を同定する方法および単一コピー遺伝子座の生細胞可視化法の開発に取り組んだ。前者については、dCas9のgRNAにMS2-MCP相互作用を介してテザリングしたDamメチラーゼによる周辺部位のメチル化に成功したが、空間近接部位のメチル化の確証は得られなかった。後者については、クロマチン上でシグナルノイズ比の高い生細胞イメージングを行うためのdCas9を介した二分子蛍光補完法の改良が進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい核内高次構造解析技術の開発のための貴重な基盤情報が整備された。関連技術として開発された新規6mA解析法、BiFC可能な蛍光タンパク質の拡張、およびBiFCシグナル増強法は、本課題を越えて幅広い分野への波及効果が期待できるものである。また、本課題の過程で、従来、安全と考えられていたdCas9が、複製フォークの進行を停止し、局所的なゲノム不安定性を誘導することを見出した。この知見は、dCas9の様々な応用において留意すべき点であり、特に社会的影響の大きな医療応用については重要な警鐘となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To explore the higher order structure of the nucleus, we intended to develop a method to detect any genomic regions within a certain spatial distance from a genomic locus of interest and a method for live-cell imaging of a single-copy genomic locus. For the former, we succeeded in methylation of the vicinity of a target site bound by a dCas9 to which Dam methylase is tethered to the gRNA through the MS2-MCP interaction. However, we have failed to obtain evidence for methylation at genomic regions spatially proximal to the dCas9-bound site. For the latter, we improved the method for dCas9-mediated bimolecular fluorescence complementation, which enables live cell imaging on chromatin with high signal-to-noise ratio.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：核内高次構造 dCas9 Dam 生細胞可視化 BiFC

1. 研究開始当初の背景

ゲノム配列中に記された遺伝情報は、それを広義に捉えると、RNA への転写のみならず、複製・組み換え・修復や染色体の構築・配置・分配という形でも発現されている。ゲノムから発現される多種多様な遺伝情報を内外の環境変化・刺激に応答して選別する仕組みをエピジェネティクスと総称することができる。エピジェネティクスの2大分子機構は DNA とヒストンの化学修飾であり、その制御には転写因子と非コード RNA が大きな役割を果たしている。次世代シーケンサーの登場によってエピジェネティック修飾の解析はゲノムワイド化し、エピゲノミクスと呼ぶに相応しい網羅性を備えるに至った。エピゲノムデータは、通常、ゲノムブラウザ上でエピジェネティック修飾レベルのゲノム配列軸に沿った一次元的分布パターンとして表示される。しかし、実際の核内におけるゲノム DNA の存在様式は、ゲノムブラウザで一次元的に表示しただけで済まされるような単純なものではない。クロマチンループの形成を介したエンハンサーとプロモーターの相互作用に代表されるように、ゲノムの機能発現には3次元的な配置が極めて重要な役割を果たしており、ゲノムの機能発現を核内におけるクロマチンの空間配置の動的変化の観点から捉えることの重要性への認識が急速に高まりつつある。それを反映して、米国は 4D Nucleome program を開始し、EU と日本の間でも同様の計画が提唱されている。

核内におけるゲノムの空間配置を解析する方法として重要なものは、Chromosome Conformation Capture (3C) に基づく一連の技術(4C, 5C, Hi-C, ChIA-PET, Micro-C 等)である。これらの方法は、一次配列上は離れていても空間的には近接している部位同士を、仲介するタンパク質群との分子架橋を利用して同定する。その結果、核内におけるゲノムの空間配置の予測が可能になり、それを時間軸に沿って行うことが 4D ヌクレオーム解析の大きな柱となっている。しかしながら、ここで捉えられる近接とはあくまでホルムアルデヒドで架橋できる範囲のものである。部位 A と B との相互作用が検出されなかった場合、両者の近傍にホルムアルデヒドで架橋できるような形で近接した部位がなかったことは示唆されるが、両部位がどれくらい離れていたのかは分からない。またホルムアルデヒド固定に伴う種々の問題も不可避である。したがって、ゲノム上の任意の部位から様々な空間距離内に存在する領域を網羅的に探索できる新しい技術が必要である。

ゲノムの空間配置の動的変化をより詳細に把握するには、ゲノム上の任意の部位を生きた細胞内で可視化してその挙動を追跡する必要がある。ハード或いはドライの面では超解像顕微鏡に代表されるイメージング技術が進展する一方、ソフト或いはウェットの面ではゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 の応用でゲノム上の任意の部位を標識する技術が登場した。DNA 切断活性を失った Cas9 変異体 dCas9 と蛍光タンパク質の融合タンパク質は、ゲノム上の任意の部位を可視化できる可能性を持つ。実際にテロメア・セントロメア・サテライト DNA 等の縦列反復領域の生細胞可視化は容易に達成された。その一方で、単一遺伝子座位の可視化は、標的座位に数十分子のガイド RNA を敷き詰める(タイリングする)ことによってしか達成されていない。相当数の dCas9 分子をゲノム上に配置する戦略は、対象がエンハンサー等の制御領域であればある程、そこに作用する転写因子群と dCas9 との間で DNA 結合を巡る競合を招く危険性が高まる。その結果、可視化されたものの生理的機能が大きく歪められたという事態も招きかねない。したがって、できるだけ少ない分子数のガイド RNA で標的ゲノム部位を可視化する技術が求められている。

2. 研究の目的

CRISPR/Cas9 のシステムを利用して、

標的ゲノム部位から空間的に一定の距離内に存在するゲノム領域を同定する方法、

単一コピー遺伝子座をガイド RNA のタイリングなしに生細胞で可視化する方法、

2つの標的ゲノム部位を空間的に一定の距離内に近接させる方法

を開発する。

3. 研究の方法

1) 標的部位の DNA をメチル化するには、その近傍に特異的に結合するように設計した dCas9 タンパク質を用いて DNA メチル化酵素(DNMT)をリクルートする。その際に dCas9 と DNMT を短いペプチドあるいは RNA のリンカーを介して直接的あるいは間接的に連結するのは、結合部位の周辺を選択的に修飾したいからである。我々は、この発想を逆転させて、リンカーを長くすることによって、標的部位から一定の距離内に存在する全ての DNA を修飾することを目指す。

2) 輝度とシグナル-ノイズ比(S/N 比)の双方を向上させる必要がある。前者については dCas9 に付加する蛍光タンパク質分子数の増加が、後者については遊離の蛍光タンパク質数の減少が、それぞれ鍵になる。双方の要求を満たすために、我々がこれまでに培ってきた経験を活かして、伸長した RNA を足場とする多重化二分子蛍光補完(multiplexed BiFC)を試みる。BiFC のバックグラウンドが高い場合や融合タンパク質の性状が良くない場合には、11 枚のシートからなる蛍光タンパク質を 9:1:1 に分割する三分子蛍光補完(TriFC)も試みる。

- 3) Cas9 と Cas12a における sgRNA の方向性の違いに着目して、1 本の RNA の両端が dCas9 と dCas12a の sgRNA として機能する分子を設計して検討する。この分子が 2 つのゲノム領域間のコネクターとして利用可能であれば、リンカー長に応じた様々な距離で 2 つの標的ゲノム部位を相互にテザリングすることが可能になる。

4. 研究成果

- 1) 塩基修飾を利用して空間的に近接するクロマチン部位を検出するための第一歩として、Dam メチレーズ K9A 変異体の利用を試みた。出芽酵母 CUP1 遺伝子を標的とする sgRNA と dCas9-Dam(K9A) 融合タンパク質を発現する株を作成した。単離したゲノム DNA に対してメチル化依存性制限酵素 DpnI とメチル化感受性制限酵素 MboI を用いる qPCR アッセイを行い GATC 配列のメチル化レベルを検討した結果、CUP1 遺伝子近傍に sgRNA 依存性にメチル化の誘導が確認された。次に MS2 リピートを挿入した sgRNA と dCas9 と MCP-Dam(K9A) を共発現する株を作成して、同様の解析を行った。その結果、sgRNA の 3' 末端から伸長した部分に MS2 ループを付加してもメチル化が認められないのに対して、sgRNA 内の 2 つのステムループに MS2 ループを挿入すると、dCas9-Dam(K9A) の場合よりも効率的に CUP1 遺伝子周辺の GATC 部位をメチル化できることが判明した。そこで、テトラループの更なる延長をウイルス由来の dsRNA を用いて試みたが、sgRNA の伸長につれて Cas9 による切断効率も低下することが認められた。そこで dsRNA としての伸長ではなく、CRISPR-Cas9 系の元来の姿である crRNA と tracrRNA に分割した上で ssRNA としての伸長を試みたが、所期の成果は得られなかった。最近、見出された tracr-L は天然の sgRNA で tracrRNA と gRNA が長いループで連結された構造をしており、これも基づくデザインが有用かも知れない。

一方、ゲノムワイドな 6mA 検出法として、DamID-seq 変法を開発し、MiSeq によるシーケンシングでメチル化の確認を行った。また、染色体分子内での long-range interaction の検出を目指して、Oxford Nanopore MinION による 6mA の検出も試みた。Dam 変異体(R95A や N126A) がクロマチンアクセシビリティの良好なプローブとなることを示唆する結果も得られている。ナノポアシーケンサーも当初は 6mA の識別が殆ど出来ない状況であったが、ソフトウェアの改善に伴って次第に識別能力が向上しつつあるが、まだ十分とは言えない。

なお、この実験の過程において、2-kb ユニットが十数回反復する CUP1 アレイを標的部位として使用したが、dCas9 が CUP1 リピートユニットのコピー数を減少させることを見出し、dCas9 が複製フォークの進行を阻害して局所的なゲノム不安定性を惹起し、それに対する組換え修復反応によって構造多型が誘導されることを見出した。一分子の dCas9 でも CUP1 アレイは不安定化するため、標的部位周辺に recombinogenic な構造を有する場合には、dCas9 の利用に慎重になるべきことが示された。

- 2) 視覚化については、dCas9 と dCas12a を併用する複数ゲノム座位の生細胞同時視覚化に成功した。後者については、温度の影響を低減すべく enAsCas12a を利用することとし、更に crRNA の 3' 末端に U4AU4 配列を付加して効率を上げるなどの工夫を行った。また、BiFC の感度を向上させるために新たに mNeonGreen、mClover3、mScarlet1、mRuby2/3、mGold について BiFC の系を構築した。また、GFP に由来する蛍光タンパク質については、BiFC シグナルを増強する新しい方法を見出すことも出来た。また、TriFC についても一定の成果が得られた。一方で、上記の通り、gRNA の伸長が dCas9 の性能に悪影響を及ぼすため、当初の構想による BiFC の多重化を実現するには至らなかった。
- 3) 両端が dCas9 と dCas12a の sgRNA として機能する RNA 分子の設計については、上記の通り gRNA の伸長が dCas9 の性能に悪影響を及ぼすため、当初の構想の実現には至らなかった。
- 4) これら一連の実験には in vivo における gRNA の機能評価が欠かせない。これを迅速に行うために DNA 二本鎖切断部位周辺に集積する Rad52 や Rfa1 に蛍光タンパク質を融合した Cas 発現株を作成し、核内の蛍光スポットの定量解析から gRNA の機能を行う系を構築した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Doi Goro, Okada Satoshi, Yasukawa Takehiro, Sugiyama Yuki, Bala Siqin, Miyazaki Shintaro, Kang Dongchon, Ito Takashi	4. 巻 49
2. 論文標題 Catalytically inactive Cas9 impairs DNA replication fork progression to induce focal genomic instability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 954 ~ 968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa1241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤 隆司
2. 発表標題 Novel sequencing methods to read the epigenome
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 悟、中川 志都美、伊藤 隆司
2. 発表標題 Rad52の可視化を利用してガイドRNAのin vivoでの機能性を評価する簡便な顕微鏡手法
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田悟、中川志都美、神野聖也、伊藤隆司
2. 発表標題 CRISPRとBiFCを利用して特定遺伝子座へのタンパク質リクルートメントを視覚化する手法の開発
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okada S, Nakagawa S, Kamino S, Ito T
2. 発表標題 Development of BiFC system based on a bright and photo-stable fluorescent protein for detecting a limited number of protein-protein interactions.
3. 学会等名 ASCB EMBO 2017 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関