

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07241

研究課題名(和文) 初期胚の核構造変化と細胞分化におけるゲノム動態のイメージング解析

研究課題名(英文) Imaging analysis for nuclear dynamics in structural change of nuclei in early embryo and differentiation.

研究代表者

坂本 尚昭 (Sakamoto, Naoaki)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授

研究者番号：00332338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は複数の初期型ヒストン遺伝子座が発現の活発な桑実胚期に集積することを見出し、この遺伝子座の集積には転写活性化状態が関与することが示唆された。この遺伝子座のライブイメージング解析のために、CRISPR-Cas9系を用いたシステムの確立を試み、CRISPR-Cas9を用いてウニ胚における100%のノックアウト効率を実現した。現在このCas9を基盤としたツールを作製し、イメージングのためのチューニングを進めている。また、蛍光タンパク質を利用してウニ胚における核内構造を観察し、セントロメアが核内で偏ってRabl配向に近い分布を示すこと、核小体の複数のスポットが近接する傾向があることなどを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子を取り巻く核内環境の変化が劇的に変化するウニ初期胚において、遺伝子の活性状態と染色体間相互作用が関連しているのは、非常に興味深いと思われる。また、CRISPR-Cas9システムによる効率的ゲノム編集法がパフウニで確立できたことは、各種海産動物の育種においてもこのCRISPR-Cas9システムが応用可能であることを示唆しており、興味深い。

研究成果の概要(英文)：We found that early histone genes are transcriptionally active during morula stage and that multiple early histone gene loci interact each other during this stage. Furthermore, transcriptional active state of these gene loci is involved in this chromosomal interactions. For live imaging analysis of these loci, we attempted to establish the CRISPR-Cas9 system and achieved 100% knockout efficiency in sea urchin embryos using CRISPR-Cas9. Currently, we constructed a imaging tool based on this Cas9 that is available for sea urchin and the tuning of this tool is still ongoing. In addition, we analyzed the intranuclear structure of sea urchin embryos by using fluorescent proteins and found that the centromere showed a biased distribution in the nucleus like Rabl configuration and that multiple spots of the nucleolus tended to be close together.

研究分野：分子生物学

キーワード：ウニ 核内構造 ゲノム編集 CRISPR-Cas9

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の各染色体は、間期核内で特定の領域に配置されて染色体テリトリー(Chromosome Territory)を形成するが、各テリトリー間には相互に入り混じった領域もあり、動的な相互作用も観察される。また、染色体内の遺伝子も、核内で固有の位置を占めることが知られているが、このような個々の遺伝子の配置も発生・分化により変化する。このように、細胞核内のクロマチンは非常に動的なものであり、染色体上の遺伝子は発現にともなってダイナミックに動くものである。

このようなクロマチン動態の研究は、単細胞の酵母や平面的に増殖する培養細胞を中心に行われてきた。それに対して動物の初期発生は、三次元的な増殖・細胞分化による形態形成過程を含んでおり、細胞の増殖速度が速く、さらに細胞の位置情報や細胞間相互作用も関与する。このような環境下においてクロマチンの動態を制御し、遺伝子を時期特異的・組織特異的に発現させる仕組みは、非常に興味深い。

棘皮動物であるウニは、脊椎動物と同じ新口動物に属する動物群であり、核構造・遺伝子発現機構の基本的な仕組みは脊椎動物と同じである。ウニは古くから発生学の研究材料とされ、胚の細胞系譜が明らかになっており、その誘導・分化の機構も概ね明らかになりつつある。また、大量の同調胚を容易に得られるうえに、胚の透明度が高く、蛍光タンパク質の細胞内局在の観察も容易に行うことができる。さらに、遺伝子導入技術が確立されており、モルフォリノオリゴによるノックダウンも可能なことから、ウニ胚は核内構造とクロマチン動態の解析及びその分子機構の解析には適した実験系と考えられる。

ウニの初期発生過程では、以下に示すような核構造およびクロマチン構造のダイナミックな変化が見られる。①初期胚期の核は非常に大きく、発生の進行に伴い小さい通常の核になっていく。核の大きさは、ヘテロクロマチン/ユークロマチンの分布にも影響すると予想される(引用文献 1)②卵割期の細胞周期は非常に速く 30 分に一度分裂をするため、核の崩壊と再構築が高頻度に繰り返される。③初期胚期の核は全体的に高いヌクレアーゼ感受性を示すが、孵化胚期以降は核全体としてのヌクレアーゼ感受性は低くなる。④初期発生には 4 タイプのヒストンバリエーション(精子特異的・卵割期特異的・初期型・後期型)が関与する。⑤ヌクレオソームリピート長が、発生にともない変化する。このような劇的な核環境の変化の中で、発生というプロセスは進行する。

ウニの初期発生については、形態形成機構を担う遺伝子制御ネットワークの研究が進められてきた。我々もこれまで、バフンウニ(*Hemicentrotus pulcherrimus*)を研究材料として遺伝子発現調節機構の研究を行ってきた。また、ウニの初期型ヒストン遺伝子は、ヒストン H1, H2A, H2N, H3, H4 遺伝子がタンデムに並んだユニットが数百回反復した構造をしており、この遺伝子座は桑実胚期に発現のピークを迎えることが知られている。上記のような核環境の変化の中でいかにして遺伝子発現を厳密に制御し遺伝子制御ネットワークを構築するかは、発生という現象の本質を理解する上で重要であると思われる。

近年、Zinc Finger Nuclease (ZFN), Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN), CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術が発展し、さまざまな生物種に適用できるようになっている。バフンウニ研究においても、これまでに ZFN や TALEN によるゲノム編集が報告されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、核内環境の劇的な変化を伴うバフンウニ(*Hemicentrotus pulcherrimus*)の初期発生をモデルとして、遺伝子を取り巻く核内環境の変化と遺伝子制御ネットワークの基盤となる核及びクロマチン構造の動態とその分子機構を実験的・数理的に解析することを目的として研究を行った。そのために、初期型ヒストン遺伝子座をモデルとして、その核内動態の解析を行った。これにより発生を担う遺伝子制御ネットワークの基盤を理解し、その動態と駆動力の分子機構を統合的に理解することを目的とする。

また、CRISPR-Cas9 システムを利用したイメージング解析を目的とし、その基盤となるシステムを確立するために、バフンウニ胚における CRISPR-Cas9 システムを利用したゲノム編集法の確立にも取り組んだ。

## 3. 研究の方法

本研究ではバフンウニ(*Hemicentrotus pulcherrimus*)の初期胚を用いて、ゲノム編集ツールである CRISPR やゲノム FISH を用いて目的の遺伝子座(初期型ヒストン遺伝子, *HpArs* 遺伝子など)を可視化した。また、セントロメア・ヘテロクロマチン・核小体などの核構造を蛍光タンパク質で標識して核の特定の領域を可視化した。得られたシグナルの分布・局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、それらを実験的・数理的に解析した。また発現中の初期型ヒストン遺伝子座を複合体としてクロマチン免疫沈降法により単離し、発現や動態に関連する可能性のある

因子を網羅的に解析した。さらに、バフンウニで CRISPR-Cas9 システムが効率よく機能するよう、ツールの作製および条件設定を行った。

- ・ゲノム FISH による遺伝子座の可視化

テロメアや初期型ヒストン遺伝子のような反復配列を三次元蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (3D-FISH) により検出するために、DIG 標識プローブを作製し、ハイブリダイゼーション後に抗 DIG 抗体および蛍光標識二次交代により検出した。シグナルの画像は共焦点レーザー顕微鏡 (カールツァイス製・LSM700) による断層撮影で取得し、高精細 3D/4D 画像解析ソフトウェア Imaris により解析を行った。

- ・核の特定部位に局在する因子の cDNA クローニング

核構造を可視化するために、HP1 (ヘテロクロマチン), cenpA (セントロメア), nucleolin (核小体) 等、核の特定領域に局在する因子の cDNA を、未孵化胞胚期および間充細胞胚期のウニ胚より抽出した RNA を鋳型とした RT-PCR によりクローニングした。塩基配列を解析後、mCherry などの蛍光タンパク質 cDNA と融合させ、発現ベクターへサブクローニングした。T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* transcription により各融合遺伝子の mRNA を合成し、これをウニ胚へ顕微注入し、ウニ胚における蛍光の分布を共焦点レーザー顕微鏡 (カールツァイス製・LSM700) により解析した。

- ・初期型ヒストン遺伝子発現複合体の解析

桑実胚期の核を RNA ポリメラーゼ II のリン酸化 CTD (Ser5) 抗体で免疫染色すると、初期型ヒストン遺伝子座が特異的に検出されることから、このリン酸化 CTD 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によりこの時期の初期型ヒストン遺伝子座複合体を単離し、その構成成分を質量分析により網羅的に解析した。

- ・CRISPR を利用した遺伝子座可視化系の確立

*Streptococcus pyogenes* 由来の SpCas9 をバフンウニ研究でよく利用している発現ベクターに挿入し、さらに核移行シグナルを付加した。この発現ベクターを鋳型とし、T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* transcription を行い、SpCas9 mRNA を合成した。sgRNA は、化学合成された DNA を鋳型とした PCR により鋳型を作製し、T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* transcription により合成した。750 ng/μL SpCas9 mRNA および 150 ng/μL sgRNA をバフンウニ受精卵に顕微注入し、24 時間後に 20 個体のウニ胚からゲノム DNA を抽出し、Heteroduplex mobility assay (HMA) およびシーケンス解析により、ゲノム編集効率を調べた。さらに、ゲノム編集されたウニ胚は珪藻 (*Chaetoceros gracilis*) を餌として与えながら、さらに培養を続けた。変態後は天然の付着珪藻あるいは乾燥昆布を餌として与え、さらに培養を続けた。

この SpCas9 を遺伝子座のライブイメージングに利用するために、SpCas9 発現ベクター中で SpCas9 コード領域中に変異を導入して不活性型 dead Cas9 (dCas9) とし、さらに mNeonGreen を融合させた発現ベクターを作製した。

#### 4. 研究成果

バフンウニの初期発生過程におけるクロマチン動態を解析するために、ウニにおける 3D-FISH (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) 実験系を作製し、初期型ヒストン遺伝子座の解析を行った。その結果、初期型ヒストン遺伝子座はバフンウニゲノム中に 2 箇所存在し、二倍体細胞中では FISH により 4 つの蛍光スポットとして検出された。初期型ヒストン遺伝子は発生初期に発現を開始して桑実胚期にピークを迎え、その後発現量は減少し、原腸胚期には完全に抑制される。そこで、各発生段階における初期型ヒストン遺伝子座の核内局在を実験的・数理的に解析したところ、発現の活発な桑実胚期に複数の初期型ヒストン遺伝子座が相互作用して集積することを見出した (図 1)。そこでその分子機構を解明することを目的とし、初期型ヒストン遺伝子座の転写活性化に必要な MBF-1 の作用を阻害するために、MBF-1 結合配列の二本鎖オリゴヌクレオチドをウニ胚に導入した。その結果、桑実胚期における初期型ヒストン遺伝子の発現が減少するとともに、遺伝子座の集積する頻度も減少した。したがって、初期型ヒストン遺伝子座の集積には MBF-1 による転写活性化が関与する可能性が示唆された。また、アマニチンによる転写阻害においても、ヒストン mRNA 量の減少及び集積頻度の減少が観察された。したがって、

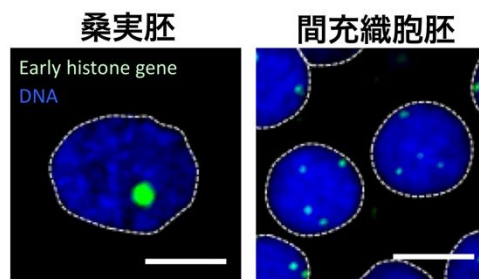


図 1 : 桑実胚期における初期型ヒストン遺伝子座の集積

桑実胚期における初期型ヒストン遺伝子座の集積には、この遺伝子の転写活性化状態が関与することが示唆された。これらの結果については、Journal of Cell Science 誌に発表した。

また、ウニの発生過程で反口側外胚葉特異的に発現し、その発現制御機構が解析されている *HpArs* 遺伝子について、3D-FISH 法による遺伝子座の可視化を試みた。*HpArs* 遺伝子を含む約 150 kb の領域に対して特異性の高い 70 箇所ゲノム領域（各領域の長さは平均 1 kb）を選定し、PCR 増幅により蛍光標識プローブを作製した。固定された原腸胚を用いて 3D-FISH を行ったところ、*HpArs* 遺伝子座と思われる 2 つの蛍光スポットが検出された。現在、蛍光スポットの核内配置と組織との関連について解析中である。

また、核構造を可視化するために HP1(ヘテロクロマチン), cenpA(セントロメア), nucleolin(核小体)の cDNA をクローニングし、mCherry との融合遺伝子の発現ベクターを作製した。塩基配列を確認後、mRNA をウニ胚に導入して核構造の変化について解析した。CenpA-mCherry の発現ではセントロメアに蛍光スポットが検出され、その分布は核内で偏っており、Rabl 配向に近いと分布であると予想された。Nucleolin-mCherry の発現では約 4 個の蛍光スポットが観察され、各スポットが近接する傾向があることが示唆された。HP1-mCherry の発現では、32 細胞期の小小割球では核内に多数の蛍光スポットが観察されたのに対し、他の細胞系譜では核内に均一に分布していた。したがって、小小割球では他の細胞系譜よりも早く組織化(ヘテロクロマチン形成)が進行していると考えられる。

初期型ヒストン遺伝子発現複合体の解析では、桑実胚期および原腸胚期のウニ胚を用いてリン酸化 CTD 抗体によるクロマチン免疫沈降を行い、桑実胚期の初期型ヒストン遺伝子座に含まれる構成成分をショットガン質量分析法により解析した。その結果、FUBP3, SSAP, POLR2A, SMACA5, SND1 の 5 つの遺伝子が桑実胚で多く検出された。それぞれの詳細な発現パターンおよび機能については、現在解析中である。

遺伝子座の動態をライブイメージングにより解析することを目的とし、ゲノム編集ツールの CRISPR-Cas9 系を用いたシステムを確立するために、まずは CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集系の作製を行った。標的としたのは、ゲノム編集(ノックアウト)の表現型が視覚的に分かりやすいことから、ウニ胚の色素合成関連遺伝子 *PKS1*(ポリケチド合成酵素 *PKS1* をコードする)である。*PKS1* 遺伝子を標的とする 3 つの sgRNA を合成し、150 ng/μL の sgRNA と 750 ng/μL の *SpCas9* mRNA をウニ胚に導入したところ、高効率の変異導入が観察された。3 つの sgRNA のうち、sgRNA#1 を使ったときは変異導入が確認できなかったが、sgRNA#2 では 100%の変異導入効率、sgRNA#3 でも 80%の変異導入効率を得られた。以上より、効率の良い sgRNA を選抜することが重要であると示唆された。また、sgRNA#2 の解析より、*SpCas9* mRNA の濃度を 100 ng/μL まで減少させても効率の良い編集効率が得られることも確認できた。

また本実験において、長期的な観察を可能とするために、ゲノム編集されたノックアウト胚を長期に培養し、研究室内の飼育環境でウニ胚を変態まで維持し、さらに変態後のノックアウト個体を 1 年以上飼育することにも成功した(図 2)。そこで本研究成果を、Development Growth and Differentiation 誌にて発表した。

次に、遺伝子座の動態をライブイメージングにより解析するために、今回確立した CRISPR-Cas9 システムで利用した *SpCas9* に変異を導入して不活性型 dead Cas9 (dCas9) を作製し、蛍光タンパク質遺伝子 mNeonGreen と融合させた。現在イメージング法の確立を目指してシステムのチューニングを行っている。

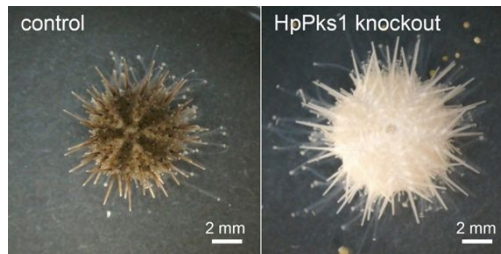


図 2 : *PKS1* 遺伝子ノックアウトウニ

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakade S, Mochida K, Kunii A, Nakamae K, Aida T, Tanaka K, Sakamoto N, Sakuma T, Yamamoto T	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05773-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsushima Y, Sakamoto N, Awazu A	4. 巻 123(5)
2. 論文標題 Insulator Activities of Nucleosome-Excluding DNA Sequences without Bound Chromatin Looping Proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Phys Chem B	6. 最初と最後の頁 1035-1043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.8b10518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsushita M, Ochiai H, Suzuki K, Hayashi S, Yamamoto T, Awazu A, Sakamoto N	4. 巻 130
2. 論文標題 Dynamic changes in the interchromosomal interaction of early histone gene loci during development of sea urchin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 4097-4107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.206862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu D, Awazu A, Sakuma, Yamamoto T, Sakamoto N	4. 巻 61(6)
2. 論文標題 Establishment of knockout adult sea urchins by using a CRISPR-Cas9 system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development Growth and Differentiation	6. 最初と最後の頁 378-388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Liu Daming, 栗津暁紀, 佐久間哲史, 山本卓, 坂本尚昭
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いたバフンウニにおけるゲノム編集
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Liu D, Awazu A, Sakura T, Yamamoto T, Sakamoto N
2. 発表標題 Establishment of knockout adult sea urchin by using CRISPR-Cas9 system
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松島佑樹, 西森拓, 坂本尚昭, 栗津暁紀
2. 発表標題 ヌクレオソーム排他的領域のインスレーター機能の解析
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下将也, 落合博, 鈴木賢一, 林紗弥香, 杉山文香, 山本卓, 栗津 暁紀, 坂本 尚昭
2. 発表標題 Dynamic changes in the interchromosomal interaction of early histone gene loci during development of sea urchin
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安井優平
2. 発表標題 ウニ初期胚発生における核内染色体の動的構造変化および細胞特異的变化
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019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
連携研究者	粟津 暁紀  (Awazu Akinori)  (00448234)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授    (15401)	