

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06943

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた9p21に存在するヒト疾患に関連する機能多型の同定

研究課題名(英文)Identification of functional variant associated with human common diseases in 9p21 using zebrafish

研究代表者

木村 哲晃(Kimura, Tetsuaki)

国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・特任研究員

研究者番号：60465250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障と関連する一塩基多型(SNP)からヒトの9p21領域にあるものをリスト化し、43の候補SNPsを含む38のエンハンサー候補領域を特定した。これらをGFP遺伝子の上流にクローニングしたレポーターコンストラクトを38種類作成した。これらのレポーターコンストラクトを1細胞期のゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションすることで候補領域のエンハンサー活性をin vivoで解析した。その結果、17の領域が目においてGFPの発現を誘導することができた。

ヒトの培養細胞を用いて17の候補領域から真の緑内障の原因となる領域を同定しようと実験を行ったが、原因領域の特定には至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム全域関連解析(GWAS)によりこれまでに多くの病気と関連する一塩基多型(SNP)が報告されている。GWASで同定されたSNP (GWAS SNP)は遺伝子の転写調節に関与する事が示唆されているが、生物学的な裏付けはほとんどなかった。本研究ではGWAS SNPを含む領域のエンハンサー活性を解析するためのプラットフォームの開発に成功した。GWAS SNPを含むレポーターコンストラクトをマイクロインジェクションしたゼブラフィッシュの受精卵は、体を構成するすべての細胞種へと自律的に分化する。その結果、GWAS SNPを含む領域のエンハンサー活性を一度に様々な細胞種で解析することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：From the single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with glaucoma, those in the human 9p21 region were listed, and 38 candidate enhancer regions were identified, including 43 candidate SNPs. These were cloned into the upstream of the GFP gene, and 38 reporter constructs were generated. These reporter constructs were microinjected into zebrafish eggs at the one-cell stage, and the enhancer activity of the candidate regions was analyzed in vivo. As a result, 17 regions were able to induce GFP expression in the eye.

研究分野：遺伝学

キーワード：エンハンサー ありふれた病気 ゼブラフィッシュ 9p21

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに GWAS により 5 万を超えるヒトの疾患や量的形質と SNP の関連が報告されている。しかし、GWAS で同定された SNP は単なるタグであり、連鎖不平衡にある多くの多型を代表しているにすぎない。一方で、情報学的解析から GWAS SNP やそれと連鎖する多型の大部分がオープンクロマチンに位置し、エンハンサー活性に関与することが示唆されている。しかし、エンハンサーは細胞種特異性が高いことが知られ、GWAS SNP とエンハンサー活性との関係は明らかでない。そのため、GWAS SNP がいかにして疾患の発症に関与するかに関してはほとんど明らかになっておらず、GWAS と疾患の治療の間には大きな隔たりがあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、9p21 にある GWAS SNP と連鎖不平衡にある多型から真の機能多型を同定することである。そしてそれをシステムティックに解決する手法を提供することにある。

GWAS によりこれまでに多くの病気や量的形質と関連する一塩基多型(SNP)が報告されている。しかし、GWAS SNP がいかにして疾患の発症に関わるのかはほとんど不明である。GWAS SNP はそのほとんどが非翻訳領域のオープンクロマチンに位置し遺伝子の転写調節に関与する事が示唆されているが、GWAS SNP のエンハンサー活性に関する生物学的な裏付けはほとんどない。そこで、GWAS のホットスポットである 9p21 領域を対象にゼブラフィッシュを用いて GWAS SNP が含まれる領域のエンハンサー活性を *in vivo* で解析する。次にヒト培養細胞を用いてエンハンサーとその標的プロモーターの相互作用を解析し、GWAS SNP と連鎖不平衡にある多型の中から真の機能多型を同定し、疾患のリスクアレルにおける機能変化を検討する。これにより、GWAS の結果を発展させ疾患発症機構解明に向けた基盤を構築する。

GWAS のホットスポットである 9p21 領域を対象に、ゼブラフィッシュを用いて GWAS SNP が含まれる領域のエンハンサー活性を *in vivo* で解析する。次にヒト培養細胞を用いてエンハンサーとその標的プロモーターの相互作用を解析し、GWAS SNP と連鎖不平衡にある多型の中から真の機能多型を同定し、疾患のリスクアレルにおける機能変化を検討する。これにより、GWAS の結果を発展させ疾患発症機構解明に向けた基盤を構築する。

3. 研究の方法

本研究はゼブラフィッシュを用いた *in vivo* エンハンサー解析とヒト培養細胞を用いたアレル間のエンハンサー活性の解析を組み合わせることで、High throughput な機能多型の同定を可能にする。ヒト培養細胞の研究からエンハンサーは高度に細胞種特異的であることが報告されている。このため、ある領域のエンハンサー活性を測るには様々な細胞種を用いる必要がある。この問題を避けるためにゼブラフィッシュを利用する。トランスジェニックゼブラフィッシュの受精卵は体を構成するすべての細胞種へと自律的に分化するため、ゲノムに挿入された GWAS SNP のエンハンサー活性を一度に様々な細胞種で解析することが可能となる。すなわち時空間での検討が可能となる。加えて、レポーター遺伝子の発現パターンから GWAS SNP エンハンサーが機能する細胞種及びその標的プロモーター(遺伝子)が推測される。これらの情報をもとに適切なヒト培養細胞を用いて真の機能多型とその標的プロモーターを同定し、機能多型のアレル間におけるエンハンサー活性の差異を同定する。

4. 研究成果

ゲノムワイドな関連解析の結果を集めたサイトである GWAS Catalog を利用して緑内障と関連する SNP からヒトの 9p21 領域にあるものをリスト化し、それらと連鎖不平衡にある SNP を全て抜き出した。これらのうち、UCSC ゲノムブラウザの情報をもとにエンハンサー領域と予想されるオープンクロマチン領域や転写因子の ChIP-Sep シグナルの領域にある SNPs を選択し、ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* enhancer analysis を行った。しかし、このような領域にないネガティブコントロールとした領域がゼブラフィッシュの目において GFP の発現を誘導できたことから、9p21 領域の緑内障の GWAS SNPs と連鎖不平衡にある全ての SNPs へと対象を広げた。その結果、43 の候補 SNPs を含む 38 のエンハンサー候補領域を特定した。これらをマウスの *cfos* 遺伝子のミニマムプロモーターの制御下に置いた GFP 遺伝子の上流にクローニングしたレポーターコンストラクトを作成した。これらのレポーターコンストラクトを 1 細胞期のゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションすることで候補領域のエンハンサー活性を *in vivo* で解析した。その結果、17 の領域が目において GFP の発現を誘導することができた。

目におけるエンハンサー活性を持つ 17 領域から真の緑内障の病因となる領域を探す目的で、網膜色素上皮細胞株と線維柱帯細胞株を用いた ATAC-seq を行った。残念ながら ATAC-seq の結果マッピングされたリードが少なく、9p21 にはっきりとしたピークを検出できなかった。そのため、17 領域から候補領域を絞り込むことができなかった。

なお、近年 CRISPR/Cas9 システムを利用したノックインが培養細胞で可能になってきて

いる。そこで、目的の SNP がヘテロ接合型になるような多型を導入するために網膜色素上皮細胞株を用いて 1 本鎖オリゴデオキシヌクレオチド(ssODN)を鋳型とした Cas9 によるノックインを行なった。その結果、150 細胞のうち 5 細胞でノックインが起っていた。5 細胞のうち 3 細胞が ssODN 由来のアレルと元のアレルのヘテロ接合型であった。これにより 17 領域にある SNP のヘテロ接合型を持つ細胞を自由の構築することが可能となった。今後は作成した細胞を利用し、下流の遺伝子発現に影響する真の病因の同定を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木村 哲晃
2. 発表標題 In vivo enhancer analysis with zebrafish
3. 学会等名 アメリカ人類遺伝学会2018年会（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------	---------