

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06603

研究課題名(和文) 2パラメータ変動実験で解明する、「3Dゲノムドメイン」のエンハンサー制御機構

研究課題名(英文) Understanding enhancer allocation by 3D genome "domains" through analysis of two parameters in the regulation.

研究代表者

辻村 太郎 (Tsujimura, Taro)

京都大学・高等研究院・特定講師

研究者番号：90741893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトiPS細胞MYC遺伝子座のスーパーエンハンサー制御をモデルに、どのようにしてエンハンサー相互作用の形成と阻害が制御されているのかを解析した。まず、ATAC-seqによりエンハンサー因子の探索、同定を実施し、さらに、それらを指標にして、スーパーエンハンサー領域の部分欠失やクロマチン高次構造形成阻害のゲノム編集を実施した。また、クロマチン高次構造の新たな検出手法を適用し、特に、MYCがスーパーエンハンサー内の複数エンハンサー領域と同時にコンタクトする様子を検出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子発現の時間的・空間的に正確な制御は、個体のもつ多様な生命機能発現の根幹であり、そのメカニズム解明は重要である。遺伝子の発現パターンは、その周辺ゲノム領域に存在する個々のエンハンサー活性で決まる。ここで、遺伝子と遺伝子の間にあるエンハンサーが、どの遺伝子を選択的に標的とするかは自明ではない。本研究では、エンハンサー標的遺伝子決定の制御機構について本質的理解を得ることを目的として、特に、ゲノム編集を実施した。そして、エンハンサー活性を順次減少させたり、また遺伝子とのコンタクト頻度を順次変化させたりできる一連のゲノムアリルを得ることができた。今後の解析で重要な知見につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：The research aims to understand how the gene-enhancer interaction is formed and disrupted, using the MYC regulation system by its super enhancer in the human iPS cells. First, I performed ATAC-seq in the cell line and explored possible functional elements in the super enhancer region. Then, taking these regions as the landmark, I performed genome editing to serially delete parts of the super enhancer as well as to insert a DNA cassette within the super enhancer that can disrupt the gene-enhancer interaction. Finally, I applied an emerging method to detect single-molecule multi-contacts among genomic regions for the MYC locus, which could confirm presence of contacts between multiple regions within the super enhancer and the MYC promoter.

研究分野：ゲノム機能解析

キーワード：ゲノム エンハンサー 相互作用

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現の時間的・空間的に正確な制御は、個体のもつ多様な生命機能発現の根幹であり、そのメカニズム解明は重要である。ある遺伝子の発現パターンは、その周辺ゲノム領域に存在する個々のエンハンサー活性の重ね合わせで決まるとされている。ヒトなどの哺乳動物や他の脊椎動物では、遺伝子と遺伝子の間のゲノム領域が広大で、1Mb以上に及ぶ場合も多々ある。その中には多くのエンハンサーが存在し、それにより複雑な遺伝子発現パターンが規定される。

ここで、遺伝子と遺伝子の間に、あるエンハンサーが存在するとして、それがどちらの遺伝子を選択的に標的とするかは自明ではないが、研究開始当初以前の研究で、クロマチンの3次元構造の形成によりその選択が大きく決定されていることが示されていた。特に、ゲノムは3次元構造レベルでドメイン状に分画されていて、それぞれのドメイン(TADやコンタクトドメインなどと呼ばれる)の内部でクロマチン同士のコンタクトが選択的に形成される。そして、エンハンサーの標的遺伝子が、ほとんどの場合において、このドメインの内部の遺伝子に限定されることが示された。さらには、CTCFというタンパク質のゲノムへの配向的かつ特異的な結合パターンによりドメイン構造が規定される仕組みもほぼ明らかとなった。しかしながら、そもそも「ドメイン」の実態が定かではなく、なぜエンハンサーの標的がドメイン内部の遺伝子に限定されるのかについては、実は明らかではないという状況であった。

重要な事実として、Hi-Cのデータからも明らかである通り、ドメインの境界を超えたゲノム領域の間にもコンタクトは存在する。当研究代表者も、ドメイン境界領域を欠失させてもドメイン間のコンタクト頻度は精々2倍にしかならないことを実験的に確認し、ドメイン境界によるコンタクトの阻害自体は、半分程度であることを示した。しかし一方で、エンハンサーはドメイン境界で強く阻害され、ドメイン境界を越えての作用程度はほとんど0に近いものとなる。

では、コンタクト頻度の半分程度の阻害が、どうしてエンハンサー活性のほぼ完全な阻害につながるのだろうか。この問いは、エンハンサー標的制御機構の本質に迫るものであるが、その答えは不明であった。

2. 研究の目的

上記問題がよくわかっていない理由の一つに、「ドメイン」の実態の不確かさがあると考えられる。そこで本研究では、コンタクト頻度と、遺伝子発現レベルとの関係を、「ドメイン」という曖昧な概念を介さずに、直接定量的に解析して、そこに現れる相関性から得られる数理モデルから、両者の関係性を理解することを目的とした。これにより、エンハンサーの標的遺伝子決定機構について重要な知見を得る。

3. 研究の方法

当研究代表者はこれまでに、「ドメイン」を人為的に分断できるDNAカセットを開発し、それをヒトiPS細胞で、MYC遺伝子とエンハンサーの間に挿入した。そして、そのカセットに様々な変異導入をすることで、遺伝子とエンハンサーのコンタクト頻度を細かく調節した。すると、遺伝子発現レベルがコンタクト頻度のおよそ4乗に比例するという関係が観測されていた。そこで、本研究では、エンハンサーの分割とコンタクト頻度の調節という2次元のパラメーター変動実験を遂行し、本べき乗則についてさらなる検証をすることとした。また、新しく登場したクロマチン高次構造のマルチコンタクト解析手法を適用し、エンハンサーと遺伝子のコンタクトをより正確に捉えることを目指した。

4. 研究成果

(1) ヒトiPS細胞でのATAC-seqによる、エンハンサー候補領域の探索

使用するヒトiPS細胞株でのエンハンサー領域を探索するために、ATAC-seqを実施した。その結果、MYC遺伝子スーパーエンハンサー領域内に、オープンクロマチン領域を複数同定することができた(図)。

(2) MYC遺伝子スーパーエンハンサーのゲノム編集

CRISPR/Cas9を利用して、ヒトiPS細胞でMYC遺伝子のスーパーエンハンサー領域の部分欠失、およびドメイン分断DNAカセットの挿入を実施した。細胞株としては、事前にMYC遺伝子座の片アレルを欠失したもの(Tsujimura et al. 2020, PMID: 32369019)を使用し、残存1ア

リルに対してゲノム編集を実施した。DNA カセット挿入箇所は、特に *MYC* プロモーター領域から、67kb, 100kb, 135kb, 238kb とした。ピューロマイシン耐性遺伝子とともに挿入し、薬剤選択を実施し、正しい挿入を確認できた。ピューロマイシン耐性遺伝子は、loxP 配列で挟まれており、Cre 組み換え酵素により除去できるデザインとなっている。それにより、ドメイン分析 DNA カセットのみが挿入されることになる。

また、これら箇所に、ピューロマイシン耐性遺伝子とともに、loxP 配列のみを挿入した。これと、*MYC* から 30kb のところに挿入してある loxP 配列とを組み合わせることで、その間の領域 (30-67kb, 30-100kb, 30-135kb, 30-238kb) を、やはり Cre 組み換え酵素により欠失できる状態とした。

さらに、これらとは別に、*MYC* とスーパーエンハンサーとの間に存在する CpG アイランド領域の欠失をした。これにより、*MYC* とスーパーエンハンサーとの相互作用が増大すると期待される。実際に、*MYC* 発現が上昇することを確認できた。

以上、今後詳細に解析することで重要な知見が得られると期待される、価値の高い細胞株を作成することができた。これらのように、一つのスーパーエンハンサー領域について、連続的な部分欠失、さらにはクロマチン高次構造阻害変異の導入を実施した例はない。現時点では、Cre 組み換え酵素の実施を完了できておらず、今後それを実施して、詳細な解析を進める。

(3) クロマチン高次構造のマルチコンタクト解析の適用

遺伝子やエンハンサーが相互作用するときには、複数の領域が同時にコンタクトしていると考えられる。これを検出することで、相互作用の形成メカニズム、さらにはその阻害メカニズムについて知見が得られると期待される。しかし、これまでもっぱら使用されていたクロマチン高次構造解析手法では、1 分子レベルでは同時に 2 つのゲノム領域のコンタクトを検出できるのみであった。近年、ロングリードシーケンス解析技術を活用することで、複数のゲノム断片同士の同時コンタクトを検出できるようになった。そこで、この技術の本ヒト iPS 細胞に適用した (図)。

その結果、*MYC* 遺伝子がスーパーエンハンサーの複数ゲノム領域と同時コンタクトする様子を確認することができた。これが実際に強い相互作用状態を意味するものであるかについては、さらなる検証が必要であるが、本手法によって、相互作用の性質についてより理解が深まると期待される。特に、上記ゲノム編集されたゲノムアレルに適用することで、どのようにエンハンサーが作用し、また阻害されるのかについて詳細な理解ができるようになると期待される。

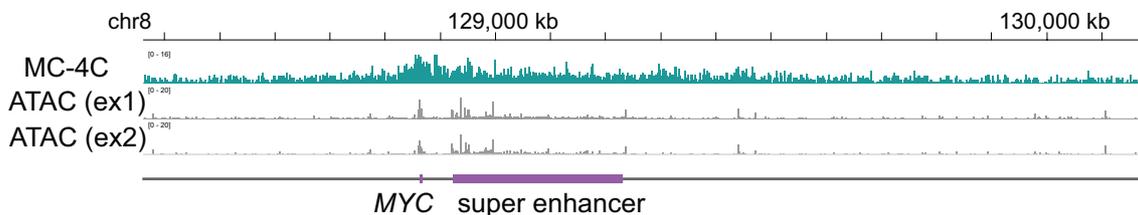


図 MYC 遺伝子座のエピゲノム解析

MC-4C は MYC 遺伝子のマルチコンタクト解析データを、4C-seq 様に表示したもの。

ATAC-seq は 2 回の複製実験を実施した。スーパーエンハンサー領域内に複数のオープンクロマチン領域を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 辻村太郎
2. 発表標題 Modulating enhancer regulation: mechanisms and applications
3. 学会等名 RIKEN IMS Seminar: Mini workshop on Chromatin Regulation (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Tsujimura
2. 発表標題 Regulation of gene activation by long-range enhancers
3. 学会等名 1st ASHBi SignAC Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻村太郎
2. 発表標題 ロングリード解析を活用した長距離ゲノム調節機構の研究
3. 学会等名 NGS EXPO 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻村太郎
2. 発表標題 遺伝子とエンハンサーの相互作用を理解する：新技術によるアプローチ
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻村太郎
2. 発表標題 多層的な長距離エンハンサー制御：メカニズムの研究とその応用
3. 学会等名 最先端循環代謝学の若手研究会（第4回（招待講演））
4. 発表年 2022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
---------	---------