

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21407

研究課題名（和文）1細胞エンハンサー解析法の確立による新たな機能性ゲノム学の開拓

研究課題名（英文）Development of a new functional genomics method to perform single-cell enhancer identification

研究代表者

村川 泰裕（Murakawa, Yasuhiro）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50765469

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：エンハンサーは遺伝子の発現スイッチである。一細胞レベルでのエンハンサー解析を可能にするために、我々は新しいReapTEC法を確立した。このアプローチを約50万個のCD4陽性T細胞に適用することにより、同定された100種以上の細胞種における約7万個のエンハンサーの活性化状態をプロファイリングした。このエンハンサー活性マップを大規模なヒト遺伝学データと統合し、自己免疫疾患および感染症に関するDNA変異を系統的に解釈することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、1細胞レベルで各々の細胞のエンハンサー活性を解析できる画期的な新技術を確立した。将来的には、ヒトの全身の様々な細胞でのエンハンサーマップを高精細に作成するための基盤技術になりえる。病気SNPやがんゲノム変異の大部分はエンハンサー領域に存在するため、こうしたエンハンサーマップとヒトゲノム解析結果を統合していくことで、ヒトの病気の発症メカニズムの理解に大きく貢献することが期待される。また、これにより新しい治療標的やバイオマーカーが発見される可能性がある。

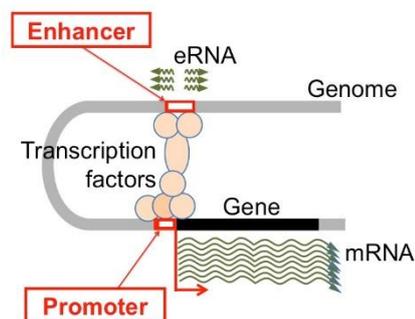
研究成果の概要（英文）：Enhancers are one of the key cis-regulatory elements that control gene expression in a cell type-specific manner. To enable enhancer analysis at single-cell level, we established a novel ReapTEC approach. By applying this approach to approximately 500,000 CD4 positive T cells, we profiled the activation states of approximately 70,000 enhancers in over 100 cell types identified. We integrated this enhancer activity map with large-scale human genetic data to provide a systematic functional interpretation of DNA variation associated with autoimmune and infectious diseases.

研究分野：ゲノムサイエンス

キーワード：エンハンサー シングルセル解析 遺伝子発現制御 ヒトゲノム解析

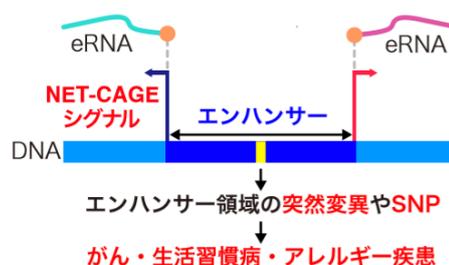
1. 研究開始当初の背景

エンハンサーは、非コーディング領域に存在し、極めて時空間特異的に活性化し、遠位から標的遺伝子の発現を強力に増強するゲノム領域である。本研究では、1細胞レベルで各々の細胞のエンハンサー活性を解析できる画期的な新技術を確立することに挑戦した。これにより、将来的には、ヒトの全身の様々な細胞でのエンハンサーマップを高精細に作成したり、遺伝子の発現に影響を与える機能的な病気 SNP やがんゲノム変異を特定できることを目標とした。従来の全ゲノム配列解析を、より機能的な方向性に転換・発展させ、新たな機能性ゲノム学の潮流を生み出すことを将来的な目標とするための基本要素技術の開発に取り組んだ。



2. 研究の目的

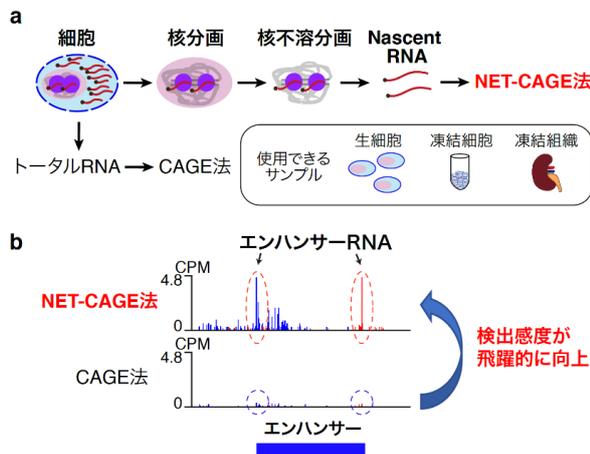
遺伝子から RNA への転写を制御するゲノム領域として、遺伝子近位のプロモーターや遠位のエンハンサーがある。とりわけ、エンハンサーは、時空間特異的に活性化し、遠位から標的遺伝子の発現を強力に増強し、様々な細胞や機能を生み出す。エンハンサーの機能的な重要性は、ヒトの病気に関連するゲノムの一塩基多型が、エンハンサーに最も濃縮している (Trends in Genetics 2016, Cell Reports 2017) ことからわかる。活性化したエンハンサーの両端からは、エンハンサー RNA (eRNA) と呼ばれる non-coding RNA が転写される。しかし、eRNA は核内で数分という極短時間で分解される。我々はこの短寿命の eRNA を超高感度に検出し、高精細に機能的な活性化エンハンサーを同定する NET-CAGE 法を開発した (国際特許 WO/2017/130750, Nature Genetics 2019) (図 2,3)。



本研究課題では、bulk の細胞/組織から eRNA を高感度検出する NET-CAGE 法を更に発展させ、1細胞レベルでエンハンサー活性を解析できる画期的な新技術 single-cell eRNA sequencing 法の確立に挑戦する。近年、数千から数万個もの細胞に対して、1細胞レベルでトランスクリプトーム解析を行えるようになった。しかし、eRNA は mRNA に比べて発現量が低く、通常1細胞レベルでは解析困難であったため、新しい工夫の必要性があった。本研究課題では、種々の工夫や新しい要素技術を開発することで、シングルセルエンハンサー解析法を確立する。

3. 研究の方法

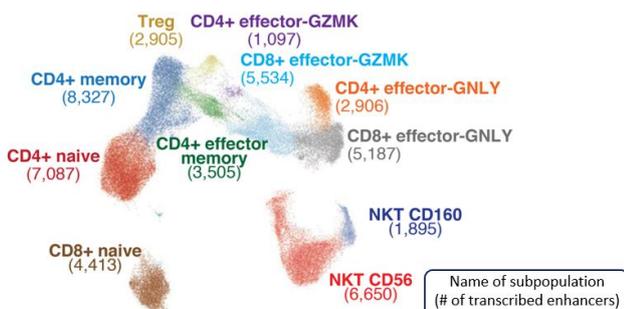
本課題で開発する single-cell eRNA sequencing 法は、10X 社の droplet-barcoding sequencing 法の 5' kit をベースにして、eRNA の検出力を高める工夫を施す。具体的には、下記のような工夫が考えられる。通常の1細胞解析では「細胞」をインプットに用いるが、本法では「細胞核」を用いる。細胞から効率的に細胞核を抽出するプロトコルは前述の NET-CAGE 法 (Nature Genetics 2019) で開発しており、同じバッファーを用いる。これにより、細胞質内に蓄積された mRNA が除去され、核内の eRNA が濃縮される。また、こうした実験的な工夫だけでなく、ドライ解析における工夫も有用である。検出感度を高めるためには、ノイズを徹



底的に除去する必要がある。eRNA のリードとそうでないものを明確に識別するためのバイオインフォマティクス技術を開発する。また、最新型の次世代シーケンサー (NovaSeq や MGISEQ) を用いて、従来の約 10 倍の超深達度でシーケンスする。さらには、RNA の 5' 末端を解析するバイオインフォ解析において、エピジェネティクスのデータベース情報を取り入れ、eRNA を効率的に識別しカウントする。こうした様々な工夫を組み合わせる新しい 1 細胞エンハンサー解析法を確立する。

4. 研究成果

我々は、一細胞レベルでのエンハンサー解析を可能にするために、我々は新しい ReapTEC 法を確立することに成功した。このアプローチを約 50 万個もの多様でヘテロな CD4 陽性 T 細胞に適用することにより、100 種以上の CD4 陽性 T 細胞種を同定し、さらにそのそれぞれの細胞タイプにで活性化している合計約 7 万個のエンハンサーの活性化状態をプロファイリングすることに成功した。このエンハンサー活性マップを大規模なヒト遺伝学データと統合解析することで、自己免疫疾患および COVID-19 などの感染症に関する DNA 変異を系統的に解釈することに成功した。ヒト疾患の発症メカニズムは不明な部分が多い。これまで大規模に行われてきた Genome-wide association study (GWAS) 結果を機能的に解析することで、新しいヒト疾患パズルが明らかになることが期待される。そのためには、疾患関連 loci の中から、原因 SNP をピンポイントに同定し、さらにその SNP がどの細胞種において、どの遺伝子の発現に影響を与えているのかを明らかにする必要がある。本研究では、独自に開発した ReapTEC 法を用いることで、ヒトの CD4 陽性 T 細胞の大規模な 5' scRNA-seq により見出された様々な細胞クラスターのそれぞれから、両方向性に eRNA を生産する機能的なエンハンサー候補領域を高い塩基解像度で網羅的に同定することに成功した。これらのエンハンサーのリンクする遺伝子を推測することで、多層的な cis-regulatory map を構築した。これを大規模なヒト疾患 GWAS データを統合解析することで、これまで解析されてこなかった CD4 陽性 T 細胞サブタイプがヒト疾患に関与している可能性を示唆することに成功した。また、疾患に関連する SNP を持っているエンハンサーにリンクした遺伝子にはまだ機能解析が十分に行われていない遺伝子が含まれており、新しい創薬の可能性を示唆している。このように、一細胞エンハンサー解析法を確立し、さらにヒト疾患ゲノムデータと統合し、ヒト疾患メカニズムの理解にも寄与した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hirabayashi Shigeki, Shirakawa Kotaro, Horisawa Yoshihito, Matsumoto Tadahiko, Matsui Hiroyuki, Yamazaki Hiroyuki, Sarca Anamaria Daniela, Kazuma Yasuhiro, Nomura Ryosuke, Konishi Yoshinobu, Takeuchi Suguru, Stanford Emani, Kawaji Hideya, Murakawa Yasuhiro, Takaori-Kondo Akifumi | 4. 巻 546 |
| 2. 論文標題 APOBEC3B is preferentially expressed at the G2/M phase of cell cycle | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 178 ~ 184 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.008 | 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 Takahashi Tomoaki, Kawaji Hideya, Murakawa Yasuhiro, Hayashizaki Yoshihide, Murakami Takashi, Yabushita Yasuhiro, Homma Yuki, Kumamoto Takafumi, Matsuyama Ryusei, Endo Itaru | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 Significance of HMGA2 expression as independent poor prognostic marker in perihilar and distal cholangiocarcinoma resected with curative intent | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology | 6. 最初と最後の頁 394 ~ 400 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejso.2020.08.005 | 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 Ooki Akio, Onodera Shoko, Saito Akiko, Oguchi Akiko, Murakawa Yasuhiro, Sakamoto Teruo, Sueishi Kenji, Nishii Yasushi, Azuma Toshifumi | 4. 巻 141 |
| 2. 論文標題 CAGE-seq analysis of osteoblast derived from cleidocranial dysplasia human induced pluripotent stem cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bone | 6. 最初と最後の頁 115582 ~ 115582 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115582 | 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4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 村川泰裕 |
| 2. 発表標題 A new genomic and computational approach to study human genomic enhancers and its association with diseases |
| 3. 学会等名 1st International Symposium of CCII (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村川泰裕 |
| 2. 発表標題 Identification of Transcriptional Regulators Using Novel Next-generation Sequencing Technology |
| 3. 学会等名 85th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村川泰裕 |
| 2. 発表標題 Decoding functional DNA elements in the human genome |
| 3. 学会等名 1st ASHBi SignAC Workshop (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 村川泰裕 |
| 2. 発表標題 RNAの生死から俯瞰する遺伝子発現制御 |
| 3. 学会等名 IPR Seminar (招待講演) |
| 4. 発表年 2021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 | | | |
|---------|-----------|--|--|--|
| イタリア | IFOM | | | |
| スウェーデン | カロリンスカ研究所 | | | |