

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06124

研究課題名(和文)非コードDNAをコアとする核内構造体による転写制御のライブ観察駆動型数理研究

研究課題名(英文) Mathematical study of transcriptional control by nuclear structures with non-coding DNA

研究代表者

粟津 暁紀 (Awazu, Akinori)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授

研究者番号：00448234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では真核生物の核内構造や動態の特徴とその発現機序について考察し、以下のことを明らかにした。(1) 核小体の構造維持と動態の制御機序、(2) DNA二本鎖切断時の酵母核内ゲノム構造変化の機序、(3) 雌マウスES細胞の細胞分化開始に伴うX染色体対合形成の機序、(4) 細胞内環境依存的な核スペckル構造の変化機序、(5) ウニCTCFの機能と動物におけるCTCFの機能の進化的側面、(6) 白い被毛をもつイエネコ固有のゲノム配列の特徴と疾患への関与の可能性。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記は全体として、生物の活動の基盤となる転写翻訳の制御機序に関するさらなる研究の進展を促進する成果である。特に(1)(4)の解明は、近年注目されている細胞内液滴群の研究に対し、知見を提供する。また(2)(3)の解明は、発癌とも関連するDNA損傷修復、及び遺伝子量補償による正常な発生に関連した成果であり、ゲノム構造動態に基づく医療研究を促進する将来がある。(5)の解明は、分子機能の進化のみならず、ウニという資源生物に対する深い知見を提供している。そして(6)の解明は、ネコの獣医学研究の進展を促すものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we considered the structural-dynamical features of intra-nuclear structure of eukaryotes and their mechanisms, and clarified the following. 1) Regulation mechanism of nucleolus structure maintenance and dynamics, 2) Mechanism of changes in yeast nuclear genome structure upon DNA double-strand break, 3) Mechanism of X chromosome pairing formation associated with initiation of cell differentiation in female mouse ES cells, 4) Mechanism of changes in nuclear speckle structure depending on intracellular environment, 5) Function of sea urchin CTCF and evolutionary aspects of CTCF function in animals, 6) Characteristics of unique genomic sequence of domestic cat with white coat and its potential involvement in disease.

研究分野：ゲノム・エピゲノム科学、理論生物学

キーワード：ゲノム構造・動態 エピゲノム 核内構造体 遺伝子制御 ウニ イエネコ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

例えばヒトゲノムの 98.5%ほどは、タンパク質をコードしない非コード DNA 領域である。非コード領域にはエンハンサーやインスレーターなど転写制御やゲノム構造制御に関わる様々な特異的ゲノム配列が存在する。さらに細胞内や核内には、そのような転写制御配列を含む様々な非コード DNA 領域から転写された非コード RNA も存在する。近年これらの非コード核酸は様々なタンパク質と共に、細胞内や核内に形成される脂質膜を持たない液滴状のコンパートメント様構造を形成するコアとなることが知られてきた。特に核内では、このような構造が染色体上に形成されることや、これらの因子が染色体と相互作用することで転写やゲノム損傷修復などが制御されることも知られるようになった。しかしこれらの構造の多くに対し、その形成機序や形態制御機序、及びその構造の機能とその機序について、十分な理解が進んでいるとは言えない状況であった。特に、構造を構成する因子の同定が進む中、それらに因子群の中での各因子の役割、因子間相互作用について、不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ゲノム上の非コード DNA やそこから転写された非コード RNA がコアとなり形成される、様々な核内構造の未知の機能が転写活性やゲノム構造制御へ及ぼす寄与、及びその機序を、分子生物学的実験とデータ駆動型物理モデルより考察し、局所ゲノム領域の構造変化から核内大域的な染色体間動態に至る様々な時空間スケールにわたる、遺伝子制御系設計原理を浮き彫りにすることである。

3. 研究の方法

(1) 核小体の構造維持と動態の制御機序に関する研究：rDNA 領域及び核小体の主要構成タンパク質の粗視化分子動力学モデルの構築とそのシミュレーション。及びシミュレーション結果の共同研究者による遺伝子ノックダウン実験及びライブイメージング観察との比較。

(2) DNA2 本鎖切断時の酵母核内ゲノム構造変化の機序に関する研究：公共公開 MNase-seq データに基づく出芽酵母ゲノムの粗視化分子動力学モデルの構築とそのシミュレーション。及びシミュレーション結果と先行実験研究との比較。

(3) 雌マウス ES 細胞の細胞分化開始に伴う X 染色体対合形成の機序に関する研究：公共公開 Hi-C データに基づく、マウス ES 細胞及び分化開始後 2 日目の細胞のゲノム上におけるエピゲノム状態解析と、その結果に基づく粗視化分子動力学モデルの構築とそのシミュレーション。及びシミュレーション結果と先行実験研究との比較。

(4) 細胞内環境依存的な核スペckル構造の変化機序に関する研究：ヒト核スペckルの主要構成タンパク質と非コード RNA の配列・構造データに基づく粗視化分子動力学モデルの構築とそのシミュレーション。及びシミュレーション結果と先行実験研究との比較。

(5) ウニ CTCF の機能と動物における CTCF の機能の進化的側面に関する研究：バフンウニ CTCF mRNA に対するモルフォリノアンチセンスオリゴによる翻訳阻害によって母性 CTCF ノックダウンの影響を観察し、発生初期の CTCF の機能を解析。またゲノム編集によるバフンウニ CTCF 遺伝子ノックアウトにより、胚性 CTCF の転写を阻害し、発生後期における CTCF の機能を解析。蛍光染色、ライブイメージングにより表現型を観察。またバフンウニの遺伝的近縁種であるアメリカムラサキウニの初期発生過程で取得されたシングルセル RNA-seq データの解析によるウニにおける CTCF の初期発生における機能を推定。

(6) 白い被毛をもつイエネコ固有のゲノム配列の特徴と疾患への関与の可能性に関する研究：公共データベースよりイエネコ皮膚のトランスクリプトームデータ、ヒトがん関連遺伝子データ、CTCF 結合サイトデータを取得し、解析。

4. 研究成果

(1) 核小体の構造維持と動態の制御機序に関する研究：核小体の構造維持と動態の制御機序における RPL タンパク質ファミリーの役割の解明：核小体はリボソーム集合の部位であり、液-液相分離によって形成される。核小体には複数のリボソーム DNA (rDNA) アレイがバンドルされているが、そのメカニズムと生理的意義は不明であった。本研究では特定の 60S リボソームタンパク質セット、特に RPL5 を欠く細胞で、核小体内部の rDNA 領域の易動度が上昇し、核小体の球状形態が崩壊する様子が見られた。本研究ではこれらの観察結果を、rDNA やリボソーム構成因子などの核小体形成因子群の粗視化分子動力学モデルの構築とそのシミュレーションによって再現し、RPL5 の役割とその欠落による核小体崩壊の機序を明らかにした。この rDNA アレイのバンドリングにおける RPL5 の役割の解明は、核小体の新規の生物物理学的特性を明らかにした。この成果は、リボソーム症の病因解明に寄与する可能性がある。

(2) DNA2 本鎖切断時の酵母核内ゲノム構造変化の機序に関する研究：酵母 DNA2 本鎖切断時のゲノム修復部位形成による核内ゲノム構造変化機序の解明：放射線などによって生じる DNA 二本鎖切断は、癌などを引き起こす可能性のある最も深刻な DNA 損傷である。真核生物は酵母からヒトまで、DNA 損傷の認識と修復を担う分子集合体をゲノム上に形成する機構を進化的に獲得している。更にこれらの生物では共通して、この修復過程の初期に染色体の運動性が上昇し、構造を大きく再編することも知られている。しかしこの染色体スケールの動態の物理的機序は不明なままであった。本研究では、出芽酵母を用いた実験の知見に着目し、DNA 二本鎖切断によって起こる核大域的なヒストンの分解及び損傷部位局所的なクロマチン状態の変化を考慮した、二本鎖切断発生時の酵母核内染色体の数学的モデルを構築し、そのような核内動態の力学的機序を明らかにした。

(3) 雌マウス ES 細胞の細胞分化開始に伴う X 染色体対合形成の機序に関する研究：細胞の転写制御を担う核内の動的な構造形成の一つの例であり、2006 年の発見・報告以来明らかになっていなかった、雌のマウスの ES 細胞が細胞分化を開始する際に起こす、X 染色体同士の接近について、それを駆動する物理化学的メカニズムを明らかにした。この研究ではまず、公共データの解析から、ES 細胞から分化を開始する際に、X 染色体内でのオープンクロマチン(ユークロマチン)と非オープンクロマチン(ヘテロクロマチン)の空間的配置が大きく変化することを見出した。そしてその事実を踏まえて、ES 細胞及び分化開始後 2 日目の細胞の核内染色体をエピゲノム状態に基づき局所的に物性が異なる高分子モデルとして構築し、シミュレーションにより実験を再現した。更に細胞分化に伴う X 染色体構造の変化が、X 染色体と他の染色体とが接する表面部分を柔らかいものに変化させること、それが高分子の枯渇効果と同様のエントロピー力を生み、X 染色体同士の実効的な引力を惹起することを見出した。

(4) 細胞内環境依存的な核スペckル構造の変化機序に関する研究：多細胞生物の核内でスプライシングなどを担う核スペckルが、細胞周期や核内環境に応じて示す様々な形態変化の機序を、ヒト培養細胞で観察された細胞環境に依存した核スペckルの様々な構造変化を再現する数理モデルを構築し、シミュレーションにより考察した。まず実験により核スペckル構造制御の主たる役割を担うと予想されている分子、SRRM2(タンパク質)、SON(タンパク質)、MALAT1(ノンコーディング RNA)、pre-mRNA の粗視化分子モデルを構築した。ここで、これらのタンパク質の大部分の領域が天然変性領域であること、RNA も大きく形状を変化しやすい構造を取ると考えられることから、これらの分子はその実効的な長さに依存した直径と柔らかさを持つ球で表現された。そして粒子間の相互作用を様々に仮定し、シミュレーションにより核スペckルの形態変化の再現を試みた。そして実験結果を再現できる実効的な分子間相互作用を見出し、それら主要成分間による形態制御の機序を説明した。

(5) ウニ CTCF の機能と動物における CTCF の機能の進化的側面に関する研究：ヒトを含む多くの動物種で保存されているタンパク質 CTCF は、これまで哺乳類などの研究から、コヒーシオンと共同してゲノムの局所的なループ構造形成を促し区画化することで、間期染色体の三次元構造を制御していると考えられてきた。一方、哺乳類などと異なる旧口動物では、CTCF 以外にも同様の役割を持つ分子が知られ、その役割が異なる可能性があった。そこで進化系統樹上で旧口動物と新口動物の分岐点近傍にある新口動物ウニの CTCF の機能を解析し、その機能と進化的側面を考察した。その結果まずウニの CTCF は、内包する Zinc Finger ドメイン数が哺乳類などに比べて少ないこと、さらにその部分の配列が旧口動物の CTCF と類似性が高いことなどがわかった。さらにウニでは、CTCF は間期ではなく細胞分裂期後期において分裂期を終える際に、染色体の構造制御に関与していることが見出された。この結果は最近マウスにおいても確認された。これらの事実から、CTCF が本来持つ古来の機能が分裂後期における染色体構造制御であることが推測された。

(6) 白い被毛をもつイエネコ固有のゲノム配列の特徴と疾患への関与の可能性に関する研究：白い被毛をもつイエネコは、白い被毛を持たないネコと異なり、KIT 遺伝子の第一イントロンに FERV1 と呼ばれるウィルス由来配列を持つ。そして全身が真っ白な被毛のネコは、そのうち FERV1 の LTR のみを持つため、この配列が白い被毛を生む原因であると考えられている。これまでに真っ白い被毛を持つネコは、難聴リスクが高いこと、また白を含む薄い色の被毛のネコは、他のネコと比べ扁平上皮癌リスクが高いことも、臨床的に予測されている。そこで、白、オレンジ、茶色の被毛の皮膚細胞から取得されたトランスクリプトームデータ、及び FERV1-LTR の配列特性を解析した結果、この配列が CTCF 結合部位を 6 回繰り返す領域を含むこと、それによるゲノムの区画化により、白い被毛を持つネコでは第一エクソンを欠失した KIT(d1KIT)が転写されること、d1KIT の転写がミニプタで内耳形成に関わると報告されている SOX10 の転写を阻害し、難聴を引き起こす可能性が見出された。また白やオレンジの皮膚細胞では、茶色の被毛の皮膚細胞に比べ扁平上皮癌を抑制する遺伝子の発現が弱まっている可能性も見いだした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Komoto Tetsushi、Fujii Masashi、Awazu Akinori	4. 巻 19
2. 論文標題 Epigenetic-structural changes in X chromosomes promote Xic pairing during early differentiation of mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e190018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v19.0018	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 -
1. 著者名 Shirai Masaki、Nara Takuya、Takahashi Haruko、Takayama Kazuya、Chen Yuan、Hirose Yudai、Fujii Masashi、Awazu Akinori、Shimoda Nobuyoshi、Kikuchi Yutaka	4. 巻 97
2. 論文標題 Identification of aberrant transcription termination at specific gene loci with DNA hypomethylated transcription termination sites caused by DNA methyltransferase deficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 139-152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.21-00092	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 -
1. 著者名 Nakanishi Taito、Awazu Akinori	4. 巻 92
2. 論文標題 Formation of Small-World Network Containing Module Networks in Globally and Locally Coupled Map System with Changes in Global Connection with Time Delay Effects	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Physical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 34801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7566/JPSJ.92.034801	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 -
1. 著者名 Nakahata Shinjiro、Komoto Tetsushi、Fujii Masashi、Awazu Akinori	4. 巻 19
2. 論文標題 Mathematical model of chromosomal dynamics during DNA double strand break repair in budding yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e190012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v19.0012	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 -

1. 著者名 Watanabe Kaichi, Yasui Yuhei, Kurose Yuta, Fujii Masashi, Yamamoto Takashi, Sakamoto Naoaki, Awazu Akinori	4. 巻 2022
2. 論文標題 Partial exogastrulation due to apical?basal polarity of F actin distribution disruption in sea urchin embryo by omeprazole	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12934	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 -

1. 著者名 Matsumori Haruka, Watanabe Kenji, Tachiwana Hiroaki, Fujita Tomoko, Ito Yuma, Tokunaga Makio, Sakata-Sogawa Kumiko, Osakada Hiroko, Haraguchi Tokuko, Awazu Akinori, Ochiai Hiroshi, Sakata Yuka, Ochiai Koji, Toki Tsutomu, Ito Etsuro, Goldberg Ilya G, Tokunaga Kazuaki, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko	4. 巻 5
2. 論文標題 Ribosomal protein L5 facilitates rDNA-bundled condensate and nucleolar assembly	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101045	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 -

1. 著者名 Nakanishi Taito, Fujii Masashi, Awazu Akinori	4. 巻 91
2. 論文標題 Self-Organization of Diverse Directional Hierarchical Networks in Simple Coupled Maps with Connection Changes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Physical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 23801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7566/JPSJ.91.023801	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 -

1. 著者名 Wakao Shingo, Saitoh Noriko, Awazu Akinori	4. 巻 20
2. 論文標題 Mathematical model of structural changes in nuclear speckle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e200020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v20.0020	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 -

1. 著者名 Watanabe Kaichi, Fujita Megumi, Okamoto Kazuko, Yoshioka Hajime, Moriwaki Miki, Tagashira Hideki, Awazu Akinori, Yamamoto Takashi, Sakamoto Naoaki	4. 巻 65
2. 論文標題 The crucial role of CTCF in mitotic progression during early development of sea urchin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 395 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12875	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 Awazu Akinori, Takemoto Daigo, Watanabe Kaichi, Sakamoto Naoaki	4. 巻 28
2. 論文標題 Possibilities of skin coat color dependent risks and risk factors of squamous cell carcinoma and deafness of domestic cats inferred via RNA seq data	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 893 ~ 905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13076	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 -

1. 著者名 Sakamoto Naoaki, Watanabe Kaichi, Awazu Akinori, Yamamoto Takashi	4. 巻 41
2. 論文標題 CRISPR-Cas9-Mediated Gene Knockout in a Non-Model Sea Urchin, <i>Helicodaris crassispina</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 159-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs230052	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kaichi Watanabe, Yuhei Yasui, Yuta Kurose, Naoaki Sakamoto, Akinori Awazu
2. 発表標題 Exogastrulation due to cytoskeletal polarity distribution in sea urchin embryo
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsushi Komoto, Masashi Fujii, Akinori Awazu
2. 発表標題 Epigenetic-structural changes in X chromosomes promote Xic pairing during early differentiation process from embryonic stem cell of mouse
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shingo Wakao, Masashi Fuji, Akinori Awazu
2. 発表標題 Simulations of structural dynamics of nuclear speckle
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
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
研究分担者	坂本 尚昭 (Sakamoto Naoaki) (00332338)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授 (15401)	
研究分担者	上野 勝 (Ueno Masaru) (90293597)	広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授 (15401)	

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
---------	---------