

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06396

研究課題名（和文）神経幹細胞特異的なエンハンサーによる遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of gene expression control mechanism by neural stem cell-specific enhancers

研究代表者

佐野坂 司（SANOSAKA, Tsukasa）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：40588472

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、神経幹細胞特異的なエンハンサーを同定する為に、エンハンサー領域から転写されているenhancer RNA（eRNA）に着目し、そのeRNAとゲノムに結合している転写因子を統合的に解析することでエンハンサー候補領域を705箇所同定した。また、複数の領域においてそのエンハンサーの標的となる遺伝子の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンハンサー領域の同定は、ゲノムの種間での保存割合や、ゲノムにおける転写因子の結合位置の同定といった過去の報告から予測されていたものの、実際に活性のあるエンハンサー領域の同定には至っていなかった。本研究課題ではエンハンサー領域の同定とその標的遺伝子の同定したことにより、組織特異的遺伝子の発現制御機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this research project, in order to identify neural stem cell-specific enhancers, we focused on enhancer RNA (eRNA), which is transcribed from enhancer regions, and identified 705 enhancer candidate regions. We also succeeded in identifying potential genes targeted by the enhancer in multiple regions.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：エピジェネティクス エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エンハンサーと呼ばれるゲノム領域は数百塩基の長さからなるが、そこに組織、および時期特異的に異なる転写因子が結合することで、エンハンサーは遺伝子の時空間的な発現制御を行なっている。エンハンサーには様々な病気に関連する一塩基多型 (SNP) が存在することや、エンハンサー領域のゲノム変異が発がんに関わることが報告されており、ヒトゲノム上に存在するエンハンサーを効率的に同定することが急務となっている。エンハンサー領域には多くの転写活性化因子が結合するため、それら転写因子の結合領域を同定することでエンハンサー領域の予測が可能であり、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immuno-Precipitation, ChIP) と次世代シーケンサーを組み合わせた方法 (ChIP-Seq) の技術革新により、様々な転写因子の結合を指標にエンハンサー領域の同定が行われてきた。しかしながら、同定された領域に必ずしもエンハンサーとしての機能 (エンハンサー活性) がある訳ではないことが以前から分かっており、研究代表者等の解析でもエンハンサー活性のある領域の絞り込みが課題となっていた。また、エンハンサーがどのようにして標的遺伝子の転写を促進するかという活性化メカニズムも統一された結論は出ていない。そのため、エンハンサー領域の同定に加え、エンハンサー活性の制御メカニズムに関する研究は国内外で非常に注目されているものの、その全体像が明らかにされたとは言い難い。

2. 研究の目的

ゲノム解析の結果、ヒトには10万を超えるエンハンサーが存在すると見積もられており、組織特異的なエンハンサーは次々と同定されているが、実際に同定されている数は少なく、特定の遺伝子に限られているのが現状である。近年では、複数のエンハンサー領域が協調的に働いているということが報告されており、1領域の解析ではなく、ゲノム全体でエンハンサー領域を網羅的に捉えることが必須である。研究代表者等は、これまで神経幹細胞の性質維持に必須であるエンハンサーを次世代シーケンサーを用いて同定してきた。本研究課題では、それらエンハンサーによって制御されている遺伝子を同定するとともに、そのエンハンサーの活性自体を制御するメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

エンハンサー活性のある真のエンハンサー領域の同定

エンハンサー領域に結合する転写因子 (EP300 や BRD4) やエンハンサー領域で見られるヒストンアセチル化状態に加え、eRNA の発現領域を総合的に判断し、エンハンサー領域の絞り込みを行う。この際、エンハンサー領域に共通配列があるか等の *in silico* 解析も行う。

エンハンサーの標的遺伝子の探索

一般的に、網羅的解析では、同定したエンハンサーに対して最も近傍に存在する遺伝子を標的遺伝子として解析することが多いが、このようにして同定された候補標的遺伝子は半分が間違っていることが報告されている。研究代表者自身も、実際に近傍に存在しない標的遺伝子を過去に複数見出しているため、1細胞 RNA-Seq のデータを用い、エンハンサーの ON/OFF を1細胞レベルで把握し、標的候補遺伝子の発現変化を見ながら標的遺伝子を同定する。

4. 研究成果

神経幹細胞におけるエンハンサーの同定

エンハンサー活性のある真のエンハンサーを同定する為に、その指標としてエンハンサーRNA (eRNA) の発現部位を解析した。近年、エンハンサー領域から eRNA と呼ばれる non-coding RNA が双方向に転写されること、さらに、この eRNA の発現量とエンハンサー活性に相関があることが報告された。そこで、non-coding RNA を含めた全ての RNA の転写開始点を検出できる CAGE-Seq を行った結果、神経幹細胞において705箇所の eRNA 転写領域を同定した。この際、eRNA の発現領域と、エンハンサーの指標である EP300 の結合や、ヒストン修飾 (H3K27 アセチル化) といった複数の指標を統合的に判断し、エンハンサー領域を絞り込んだ。

エンハンサーの標的遺伝子の同定

エンハンサーの標的遺伝子は、エンハンサーの近傍に存在する場合もあるが、近傍でない場合や数 Mbp 離れているものも存在する。このような標的遺伝子を探索するためには、エンハンサー活性 (eRNA の発現) と標的遺伝子 (mRNA) の発現を1対1の対応で比較する必要があるが、通常の RNA-Seq では、eRNA や標的遺伝子の発現は平均化されてしまう為、1細胞レベルでのトランスクリプトーム解析が必要であった。1細胞 RNA-Seq の技術は急速に普及してはいるもの

の、その手法のほとんどが mRNA をキャプチャーする方法であるため、eRNA を含めた non-coding RNA は検出できていない。そこで本研究では、全ての転写産物を検出可能な RamDA-Seq を導入し、1 細胞レベルで eRNA の検出を行った。その結果、mRNA に加えてエンハンサー領域からの転写産物 (eRNA) も検出可能であり、さらにその eRNA の量は細胞ごとに異なる発現パターンを示していることが明らかとなった。この RamDA-seq の結果を基に、複数の標的候補遺伝子を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukasa Sanosaka, Hironobu Okuno, Noriko Mizota, Tomoko Andoh-Noda, Miki Sato, Ryo Tomooka, Satoe Banno, Jun Kohyama, Hideyuki Okano.	4. 巻 12
2. 論文標題 Chromatin remodeler CHD7 targets active enhancer region to regulate cell type-specific gene expression in human neural crest cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 22648-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-27293-6	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	裏山 悟司 (URAYAMA Satoshi) (90609976)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	

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