

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14680

研究課題名（和文）DNA複製可視化システムを利用した3Dゲノム制御因子の網羅的探索とその機能解析

研究課題名（英文）Genome-wide screening for A/B compartment regulators using a DNA replication reporter system

研究代表者

大字 亜沙美（Oji, Asami）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50803417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：哺乳類細胞では、ゲノムDNAは百万塩基対単位の塊（ドメイン）が数珠つながりになった形で核内に収納されており、各ドメインは遺伝子活性の高い区画（Aコンパートメント）か低い区画（Bコンパートメント）に空間的に分かれている。この空間配置は細胞の種類によって異なるが、その制御様式はほぼ未解明である。私は、マウス胚性幹細胞を使って任意のドメインがAまたはBコンパートメントのどちらに配置されているかを蛍光タンパク質で推定し、可視化するシステムを開発した。また、これを用いてコンパートメント制御因子の網羅的スクリーニングを実施したところ、ゲノムの核内配置制御に関与し得る候補遺伝子を複数同定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

本研究の対象としているA/Bコンパートメントはゲノム階層構造の一つであり、比較的近年発見されたこともあり、その解析に複雑な技術・手法を要する。私が開発した核内コンパートメント可視化システムは、蛍光タンパク質を使って単一細胞レベルで任意のゲノム領域のA/Bコンパートメントを推定できるため、様々な実験との組み合わせが可能となり、今後のA/Bコンパートメント研究を加速する有用なツールになると考えている。さらに、本システムを用いることで、世界でも前例のないコンパートメント制御因子のスクリーニングを実現し、ゲノム三次元構造制御に関わり得る新しい因子を多数同定することができた。

研究成果の概要（英文）：In mammalian cells, genomic DNA is comprised of megabase-sized (106 base pairs) units, or domains, presumably in a beads-on-a-string manner. Each of these domains are spatially separated to form either active A or inactive B compartment. This spatial arrangement varies among cell types, but the underlying mechanisms remain largely unexplored. Using mouse embryonic stem cells, I have developed a system to estimate and visualize whether a given domain is located in the A or B compartment using fluorescent proteins. Using this system, I conducted a comprehensive screening for compartment regulators and successfully identified several candidate genes that may be involved in the regulation of nuclear genome organization.

研究分野：細胞生物学

キーワード：クロマチン DNA複製 3Dゲノム エピジェネティクス ES細胞 スクリーニング 網羅的解析 核構造

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。

1. 研究開始当初の背景

- (1) クロマチンの高次構造は、ヌクレオソームから染色体テリトリーまで様々な階層に分かれており、古くから生化学的手法等を用いて研究されてきた。しかし、2009年に次世代シーケンサーを活用した Hi-C 法という画期的な手法が開発される (Lieberman-Aiden et al., *Science* 2009) というブレイクスルーがあり、ゲノム三次元構造の理解が飛躍的に向上した。
- (2) Hi-C 解析から、ゲノムは遺伝子以上・染色体未満のメガベース単位で TAD (topologically associating domain) というドメインを形成しており、各々の TAD がユークロマチン・ヘテロクロマチンに対応する 2 種類の核内コンパートメント A または B に振り分けられていることがわかってきた。
- (3) 2017 年に TAD の形成を制御する DNA 結合タンパク質が相次いで発見されたが、TAD の形成を阻害しても A/B コンパートメント構造は保存されたままであることがわかった (Nora et al., *Cell* 2017; Schwarzer et al., *Nature* 2017)。したがって、TAD と A/B コンパートメントは独立に制御されていると考えられた。TAD の A/B コンパートメントへの振り分けを何が制御しているのかという問題は、当該分野として全く未解明の大きな課題である。

2. 研究の目的

- 核内コンパートメント制御に関わる遺伝子を全ゲノムスクリーニングによって網羅的に同定するため、単一細胞の核内コンパートメントを簡便にモニターできるシステムを開発し、スクリーニングのリードアウトとして利用する。
- 同定した未知因子の機能解析および哺乳類細胞におけるゲノム三次元構造制御の生物学的意義を解明する。

3. 研究の方法

- (1) 核内コンパートメントを簡便に検出するため、コンパートメント分布とゲノムワイドに相関することが知られている DNA 複製時期を利用する。コンパートメントを検出したい任意領域に GFP 遺伝子を導入し、その領域の DNA コピー数の変化 (=DNA 複製時期) を GFP 発現量によって可視化するシステムを構築し、その妥当性を検証する。
- (2) 構築した DNA 複製時期可視化システムに CRISPR-gRNA ライブラリを導入することで変異体プールを作製し、DNA 複製時期異常を引き起こす責任遺伝子をゲノムワイドにスクリーニングする。得られた遺伝子は核内コンパートメント分布異常も示すと期待される。候補遺伝子群を同定できれば、実際に単一遺伝子欠損細胞を作製してスクリーニング結果の検証を行う。
- (3) DNA 複製時期異常を再現できた遺伝子について、核内コンパートメントに異常が見られるかどうかを Hi-C 等の染色体三次元構造解析技術を用いて検証する。

4. 研究成果

- (1) これまで我々は、染色体構造を反映する DNA 複製タイミングに着目して研究を進め、DNA 複製タイミングが A/B コンパートメント分布と密に関連していることを見出してきた (Ryba et al., *Genome Res* 2010; Miura et al., *Nat Genet* 2019)。そこで、検出に Hi-C 等の複雑な技術を要するコンパートメントの代わりに、DNA 複製時期を可視化することで間接的に核内コンパートメントをモニターするシステムの構築を試みた。

まず、マウス胚性幹 (ES) 細胞において DNA 複製時期が S 期前半 (Early-S) であるゲノム領域や、S 期後半 (Late-S) である領域に、それぞれ GFP 遺伝子をノックインした ES 細胞株を樹立した。GFP ノックイン領域の複製時期が Early-S の場合は、Late-S の場合に比べて GFP のコピー数が 2 コピーの時期が長いため、S 期後半における GFP 発現量が高くなると予想した (図 1)。そこで各 ES 細胞株の GFP 強度をフローサイトメーターにより測定した結果、複製時期の早い領域に GFP をノックインした細胞は S 期が進むにつれて GFP 強度が高くなったが、複製時期の遅い領域ではこのような GFP 強度変化は見られなかった。

さらに、最近報告された *Dppa2* 領域の複製時期を制御する DNA 配列 ERCE (Sima et al., *Cell* 2019) を欠損させた ES 細胞株も樹立し、本領域に GFP を導入したうえで *Dppa2*-ERCE 欠損株とコントロール株の GFP 強度を比較した。すると、*Dppa2* 領域が Early-S

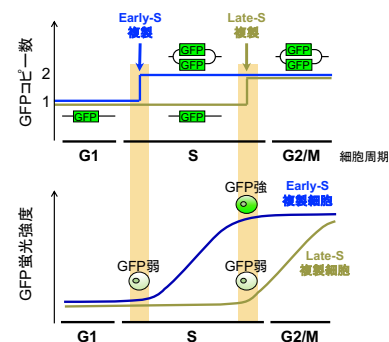


図 1. DNA 複製時期に依存した GFP 発現パターン

期に複製するコントロール細胞では、S 期後半から G2/M 期に GFP 蛍光強度が上昇する一方、Late-S 期に複製する *Dppa2*-ERCE 欠損細胞では S 期全体を通して GFP 強度の変化が見られなかった (図 2)。以上の結果から、樹立した細胞株の GFP 蛍光強度は、GFP 導入領域の複製時期を反映していると結論づけ、ねらい通りの DNA 複製時期及び核内コンパートメントのレポーターシステムが構築できたと判断し、全ゲノムスクリーニングに着手した。

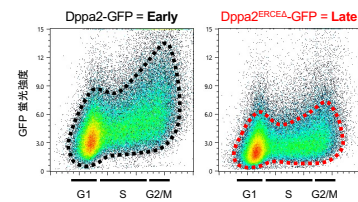


図 2. ERCE 欠損による GFP 蛍光強度変化

- (2) (1)で構築したシステムを用いて、京都大学・遊佐宏介教授の協力の下、CRISPR-gRNA ライブラリを用いたスクリーニング実験を実施した。具体的には、GFP ノックイン細胞株に CRISPR-gRNA ライブラリー (Koike-Yusa et al., *Nat Biotech* 2014) を導入して変異細胞のプールを作製し、GFP 発現量が全体の分布から外れた細胞、つまり、複製時期異常を示したと考えられる細胞を FACS により回収した。まず、ES 細胞で Early-S 期に複製することがわかっている *Rex1* 領域に GFP をノックインした細胞でスクリーニングを行い、S 期後期で GFP 発現上昇が見られない (=複製時期遅延の表現型を示した) 細胞を濃縮し、最終的に 59 個の責任遺伝子候補を得た (図 3)。GO (gene ontology) 解析によると、染色体関連、DNA 複製関連遺伝子が多数含まれていたため、これらが DNA 複製時期および核内コンパートメント制御に関与している可能性は高いと考えている。

スクリーニング実験の再現性を確認するため、まずは同定した責任遺伝子をそれぞれ個別に欠損させた ES 細胞を作製して全ゲノム複製時期解析を行ったところ、標的とした *Rex1* 領域だけでなく、ゲノムワイドに複製時期異常を示す細胞が複数見られた。このことから、本スクリーニング実験によって DNA 複製時期異常を示す変異体を効率よく濃縮できたと考えられた。

- (3) 現在は、DNA 複製時期異常を示した遺伝子欠損細胞を用いて Hi-C による核内コンパートメント解析を行っている段階であり、今後は、ゲノム三次元構造に影響を及ぼす遺伝子を見つけることができれば、詳細な機能解析に踏み込みたい。

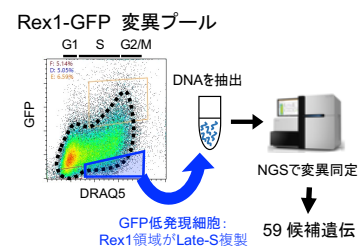


図 3. CRISPR-gRNA ライブラリを用いたスクリーニング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大字亜沙美
2. 発表標題 DNA複製レポーターシステムの開発と、これを用いた核内コンパートメント制御因子の網羅 的 同定
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大字亜沙美
2. 発表標題 核内コンパートメント制御因子の網羅的同定に向けたDNA複製時期可視化レポーターシステムの開発
3. 学会等名 文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究」 遺伝子制御の基盤となるクロマチンポテンシャル 第2回 領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大字亜沙美
2. 発表標題 核内コンパートメント制御因子のスクリーニングに向けたDNA複製タイミング可視化システムの開発
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大字亜沙美、平谷伊智朗
2. 発表標題 DNA複製時期可視化レポーターシステムの構築と核内コンパートメント制御因子の網羅的同定の試み
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大字亜沙美
2. 発表標題 DNA 複製タイミング可視化システムの開発と、これを用いた核内 コンパートメント制御因子の探索
3. 学会等名 第6回X染色体研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asami Oji, Ichiro Hiratani
2. 発表標題 Development of a fluorescent DNA replication reporter system
3. 学会等名 3R&3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asami Oji, Ichiro Hiratani
2. 発表標題 Development of a DNA replication reporter system for genomewide screening of A/B compartment regulators
3. 学会等名 RIKEN Epigenetics in Wako 2019
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
---------	---------