

令和 3 年 6 月 6 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：18K14681

研究課題名(和文)1細胞DNA複製タイミング解析による発生分化過程の核内コンパートメント動態予測

研究課題名(英文) Prediction of the nuclear compartment dynamics during embryonic development by single-cell replication sequencing

研究代表者

高橋 沙央里 (Takahashi, Saori)

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・研究員

研究者番号：80748856

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)：本研究では、1細胞全ゲノムDNA複製タイミング解析(scRepli-seq解析)を行うことで、マウスES細胞分化や着床前初期胚発生に伴うゲノムの核内コンパートメント分布(ゲノム三次元構造)の変化を予測した。その結果、ES細胞分化に伴って核内コンパートメント分布は徐々に変化するが、変化の度合いは細胞集団内の細胞間ではほぼ均一である可能性が示唆された。マウス初期胚でのscRepli-seq解析は現在も継続中であり、アレル分け解析や遺伝子発現解析との同時解析も実現している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ゲノム三次元構造の時系列変化の包括的な理解を目指す「4Dヌクレオーム」研究が国内外で注目されている。本研究では、我々が開発した1細胞全ゲノムDNA複製タイミング解析法(scRepli-seq法)を用いることで、1細胞レベルでマウスES細胞分化過程における核内コンパートメント変化の予測に成功した。また、初期胚発生過程での変化の様式も明らかに出来つつある。ゆえに、本研究は、生体外(in vitro)での細胞分化実験と生体(in vivo)の発生過程における4Dヌクレオームの共通点と差異を解明できるだけでなく、ゲノム三次元構造が規定する新たな生命現象を見出す可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we predicted the nuclear compartment (3D genome organization) dynamics during mouse ES cell differentiation and early pre-implantation embryogenesis by single-cell DNA replication sequencing (scRepli-seq) analysis in a genome-wide manner. The results suggested that the nuclear compartment profiles changed gradually but uniformly within a differentiating population. The scRepli-seq analysis in early mouse embryos is still ongoing, but we have successfully established haplotype-resolved scRepli-seq analysis. We have also acquired scRepli-seq and scRNA-seq from the same single cell.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：DNA複製タイミング 核内コンパートメント 初期胚発生 1細胞解析 ES細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

胚発生や分化に伴い、ゲノム三次元構造(ゲノムの核内配置や凝縮度)は変化する。近年、ゲノム三次元構造のゲノムワイド解析手法として、ゲノム DNA 領域間の相対的な核内配置を解析する Hi-C 法が開発された (Lieberman-Aiden et al., *Science* 2009)。Hi-C は、各ゲノム領域が、ユークロマチン・ヘテロロマチンに対応する A・B コンパートメントに振り分けられる様子をゲノムワイドに明らかにできる。これをマウス初期胚の解析に応用すれば初期発生に伴うゲノム三次元構造の変化を明らかにできるが、高解像度の Hi-C データを得るには大量の細胞が必要のため、Hi-C は細胞数に限りのある初期胚の解析には不向きで、1細胞解析も不得手である。一方、我々は、DNA 複製タイミングのゲノムワイド解析結果が、Hi-C から得られる A・B コンパートメント分布に非常に高い相関を示すことを明らかにしてきた (Ryba et al., *Genome Res* 2010; Miura et al., *Nat Genet* 2019)。このことは、DNA 複製タイミングの解析結果から、核内コンパートメント分布が予測できることを意味している。また、我々は最近、哺乳類培養細胞を用いたゲノムワイド 1細胞 DNA 複製タイミング解析法 scRepli-seq の開発に成功した (Takahashi et al., *Nat Genet* 2019; Miura, Takahashi, Shibata et al., *Nat Protoc* 2020)。分化前後のマウス ES 細胞で scRepli-seq を行うと、任意の分化状態においては細胞間で均一な scRepli-seq 結果が観察され、これらの細胞間では核内コンパートメント分布も均一である可能性が示唆された。では、この安定性は細胞分化の過程で継続的に維持されているのだろうか? また、初期胚発生の過程ではどのようなコンパートメント変化が観察できるのだろうか? このような課題に取り組むことで、発生・分化に伴う核内コンパートメント変化の全容を明らかにしたいと考え、本研究計画に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

本研究では、scRepli-seq による 1細胞全ゲノム解析を行うことで、(1) ES 細胞分化過程における DNA 複製タイミングの経時的变化を明らかにし、この結果にもとづいて (2) マウス初期胚発生過程における核内コンパートメント変化を予測することを目的とした。また、(1) (2) の解析から、*in vitro* と *in vivo* における変化の差異を明らかにすることを目的とした。一方、scRepli-seq は 1細胞解析であるため、細胞間均一性・不均一性の程度も明らかにできる。そこで、発生・分化に伴う複製タイミング変化、即ち核内コンパートメント変化が、細胞集団の中でどの程度均一性を維持して起きるのかについても明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究で行う複製タイミング解析は、我々が開発したゲノムワイド 1細胞 DNA 複製タイミング解析法 (scRepli-seq) を用いて行った。scRepli-seq は、S 期細胞のゲノム上で DNA コピー数の差を検出することで複製ドメインを検出する方法である。個々の 1細胞 (培養細胞の場合はフローサイトメーター (FACS) を利用、初期胚の場合は顕微鏡下で 1細胞を回収) サンプルから抽出したゲノム DNA の全ゲノム増幅を行い、次世代シーケンサー (NGS) を用いてこのゲノム DNA を解読し、ゲノム DNA 上の初期複製ドメイン (複製後、コピー数 2) と後期複製ドメイン (複製前、コピー数 1) を識別した (図 1)。複製タイミング解析からの核内コンパートメント分布の予測は、初期複製ドメイン (Early) を A コンパートメント、後期複製ドメイン (Late) を B コンパートメントと読み変えた (図 1)。

複製タイミング解析には S 期の細胞が必要である。培養細胞の場合は FACS による細胞周期解析で S 期細胞を識別できるが、細胞数に限りのある初期胚では FACS 解析が行えない。そこで、研究開始当初は、EdU の取り込みと複製 foci の顕微鏡観察により S 期細胞を回収する計画であった。しかし、研究の過程で、scRepli-seq の NGS データから事後に S 期細胞を同定する方法を確立できたため (ゲノム複製率を算出)、これを初期胚での解析に利用した。scRepli-seq 法については、実験方法およびデータ解析法の詳細を Nature Protocols 誌に公開した (Miura, Takahashi, Shibata et al., *Nat Protoc* 2020)。

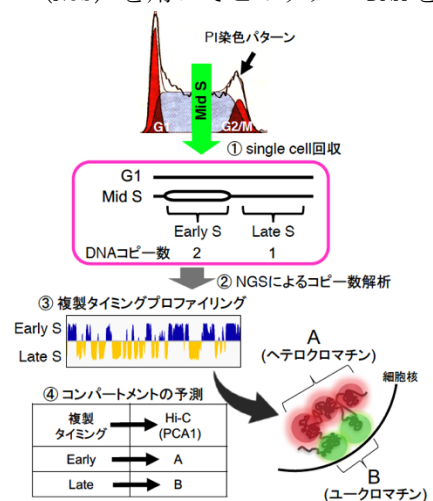


図1: scRepli-seqと核内コンパートメント分布の予測

### 4. 研究成果

本研究では、(i) ES 細胞分化過程における scRepli-seq 解析と核内コンパートメント変化の推定、(ii) 顕微鏡観察による Mid-S 複製細胞の同定方法の確立、(iii) 着床前胚の scRepli-seq、(iv) 着床後胚における三胚葉分化に伴う scRepli-seq 解析、を順に行うことを計画していた。

現在 (iii) を行っている最中であり、(iv)については今後取り組んでいきたいと考えている。なお、(ii)については、この実験自体は成功していたが「3. 研究の方法」で記述した通り、別の効率的なS期細胞の同定方法が確立できたため、そちらを採用することにした。

#### (1) マウス ES 細胞分化における scRepli-seq の経時的解析

初期胚での解析に先立ち、まず ES 細胞分化の過程で DNA 複製プロファイル、即ち核内コンパートメント分布がどのように変化していくのかを調べた。マウス ES 細胞を用いて、分化後 1 週間、経時的 (1 日ごと) に scRepli-seq を行った。複製タイミングの S 期全域に渡る全ゲノムプロファイルは、分化に伴い徐々に変化し、SPRING 解析 (データ間ばらつきの解析手法) の結果、同じ日の細胞はほぼ全て 1 本の軌跡にきれいに乗ることが観察された。そしてその軌跡は、分化に伴って一定方向に動く様子が観察できた。この結果から、分化過程の細胞集団中の個々の細胞は、複製プロファイル、ひいては核内コンパートメントを徐々に変化させるが、変化の度合いは細胞間でほぼ均一であることが示唆された。本研究結果については、インフォマティクス解析を担当研究室の三浦尚研究員が行い、2019 年に論文で発表している (Miura et al., *Nat Genet* 2019)。

#### (2) マウス着床前初期胚を用いた scRepli-seq 解析

着床前初期胚を用いた解析についても、(1)の培養細胞を用いた実験とほぼ同じプロトコール (Miura, Takahashi, Shibata et al., *Nat Protoc* 2020) を用いて scRepli-seq を行った。培養細胞ではエタノール固定をした細胞を解析に用いていたが、初期胚の解析では生細胞を用いた。初期胚の 1 細胞サンプリングについては、胚の扱いに慣れている理研 BDR 北島研究室・京極博久研究員に協力して頂いた。

本研究では、着床直後 (1 細胞期胚) から胚盤胞期までの複製プロファイルの変化を解析したいと考えているが、まずは 1 細胞で S 期細胞を回収しやすい (と予想された) 4 細胞期胚と 8 細胞期胚を用いて scRepli-seq を行った。

様々なタイミング (受精後の時間) で胚を回収し scRepli-seq を行ったところ、4 細胞期胚および 8 細胞期胚で S 期全体のデータが得られ、複製プロファイルの全容を観察することができた (図 2)。得られた結果を見てみると、4 細胞期胚と 8 細胞期胚の複製プロファイルは非常によく似ていることがわかり、この時期の核内コンパートメント分布はほとんど変化しないことが示唆された。

また、マウス ES 細胞の複製プロファイルとも比較的よく似ていることがわかった。現在、他の発生ステージの細胞を用いた scRepli-seq 解析を行っているところである。

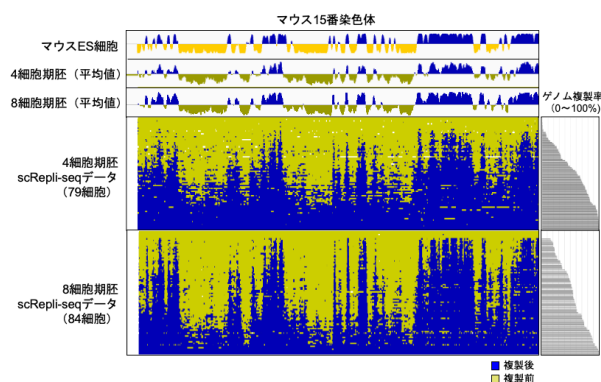


図2: 4細胞期胚および8細胞胚の scRepli-seq結果

#### (3) マウス着床前初期胚の細胞周期

上述したように、4 細胞期胚と 8 細胞期胚の複製プロファイルには大きな違いがなかったが、細胞周期の胚内の同調性には差があった。scRepli-seq からは S 期の時間を算出できるが、4 細胞期胚では 1 つの胚内に存在する 4 つの細胞の細胞周期がほぼ同調しているのに対し、8 細胞期胚では、細胞周期のバラつきが観察され始めた。このバラつきがなぜ生じるのかは興味深い。現在、まず遺伝子発現との関係を調べるために、8 細胞期胚を用いて同一細胞からの scRepli-seq と scRNA-seq (RamDA-seq) を試みている (scRepli-RamDA-seq)。予備的実験では、scRepli-RamDA-seq から得られた複製プロファイルは、単独の scRepli-seq から得られるそれと比べても遜色ないものであった。今後は、RamDA-seq データを詳細に解析し、細胞周期の進行度合いと遺伝子発現にどのような関係があるのかを明らかにしたいと考えている。なお、RamDA-seq については、理研 BDR 二階堂研究室との共同研究で進めている。

#### (4) F1 ハイブリッドマウス胚を用いた haplotype-resolved scRepli-seq 解析

着床前初期胚では、父親由来と母親由来のアレル間でエピジェネティック状態が異なっている。数百個の細胞を用いた haplotype-resolved Hi-C 解析によると、1 細胞期胚での核内コンパートメント分布については詳細な解析がされていないものの、アレル間でゲノム三次元構造は異なっている (Du et al., *Nature* 2017)。本研究では、初期胚での 1 細胞 scRepli-seq 解析により、アレル間で核内コンパートメント分布が異なるのかを明らかにしたい。この研究に先立ち、我々は F1 ハイブリッドマウス由来 ES 細胞を用いた haplotype-resolved scRepli-seq 解析に成功しており、各アレルの複製プロファイルを観察できている (Takahashi et al., *Nat Genet* 2019)。初期胚での解析には B6 (雌) と MSM (雄) に由来する胚を用いて haplotype-resolved scRepli-seq を行っている。現在、初期胚でも培養細胞を使用した場合と同程度の解像度の scRepli-seq 結果が得られることが確認できており、様々な発生ステージの胚を用いた解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Shin-Ichiro Takebayashi, Tyrone Ryba, Kelsey Wimbish, Takuya Hayakawa, Morito Sakaue, Kenji Kuriya, Saori Takahashi, Shin Ogata, Ichiro Hiratani, Katsuzumi Okumura, Masaki Okano, Masato Ogata	4. 巻 10
2. 論文標題 The Temporal Order of DNA Replication Shaped by Mammalian DNA Methyltransferases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10020266	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 Tatsuya Ohhata, Kazuki Yamazawa, Asuka Miura-Kamio, Saori Takahashi, Satoshi Sakai, Yuka Tamura, Chiharu Uchida, Kyoko Kitagawa, Hiroyuki Niida, Ichiro Hiratani, Hisato Kobayashi, Hiroshi Kimura, Anton Wutz, Masatoshi Kitagawa	4. 巻 34
2. 論文標題 Dynamics of transcription-mediated conversion from euchromatin to facultative heterochromatin at the Xist promoter by Tsix	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.108912	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 Hisashi Miura, Saori Takahashi, Takahiro Shibata, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Katsuzumi Okumura, Masato Ogata, Ichiro Hiratani, Shin-Ichiro Takebayashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Mapping replication timing domains genome wide in single mammalian cells with single-cell DNA replication sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 4058-4100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-020-0378-5	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 Hisashi Miura, Saori Takahashi, Rawin Poonperm, Akie Tanigawa, Shin-ichiro Takebayashi, Ichiro Hiratani	4. 巻 51
2. 論文標題 Single-cell DNA replication profiling identifies spatiotemporal developmental dynamics of chromosome organization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1356-1368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41588-019-0474-z	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 Yuichi Mishima, Laura Brueckner, Saori Takahashi, Toru Kawakami, Junji Otani, Akira Shinohara, Kohei Takeshita, Garvilles Ronald Garingalao, Mikio Watanabe, Norio Sakai, Hideyuki Takeshima, Charlotte Nachtegael, Atsuya Nishiyama, Makoto Nakanishi, Kyohei Arita, Kinichi Nakashima, Hironobu Hojo, Isao Suetake	4. 巻 25
2. 論文標題 Enhanced processivity of Dnmt1 by monoubiquitinated histone H3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 22-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12732	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 Ichiro Hiratani and Saori Takahashi	4. 巻 10
2. 論文標題 DNA replication timing enters the single-cell era	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 E221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes10030221	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 Saori Takahashi, Hisashi Miura, Takahiro Shibata, Koji Nagao, Katsuzumi Okumura, Masato Ogata, Chikashi Obuse, Shin-ichiro Takebayashi and Ichiro Hiratani	4. 巻 51
2. 論文標題 Genome-wide stability of the DNA replication program in single mammalian cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 529-540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-019-0347-5	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 Hisashi Miura, Rawin Poonperm, Saori Takahashi and Ichiro Hiratani	4. 巻 1861
2. 論文標題 Practical Analysis of Hi-C Data: Generating A/B Compartment Profiles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 221-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8766-5_16	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Saori Takahashi, Hisashi Miura, Takahiro Shibata, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Shin-ichiro Takebayashi and Ichiro Hiratani
2. 発表標題 Single-cell DNA replication sequencing and its application to studies of early mouse embryonic development
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 高橋沙央里, 三浦尚, 柴田隆豊, 長尾恒治, 小布施力史, 竹林慎一郎, 平谷伊智朗
2. 発表標題 1細胞解析で明らかにされたDNA複製ドメインの細胞間の安定性と不均一性
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋沙央里, 三浦尚, 柴田隆豊, 長尾恒治, 小布施力史, 竹林慎一郎, 平谷伊智朗
2. 発表標題 マウスES細胞分化および初期胚発生過程における1細胞全ゲノムDNA複製タイミング解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saori Takahashi, Hisashi Miura, Takahiro Shibata, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Shin-ichiro Takebayashi and Ichiro Hiratani
2. 発表標題 Genome-wide single-cell DNA replication sequencing reveals cell-type specific signatures that are conserved from cell to cell
3. 学会等名 EMBL Symposium: Principles of Chromosome Structure and Function (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋沙央里、三浦尚、柴田隆豊、長尾恒治、小布施力史、竹林慎一郎、平谷伊智朗
2. 発表標題 分化前後のES細胞における複製ドメインは細胞間で極めて均一なプロファイルを示す
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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋沙央里、三浦尚、平谷伊智朗	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 270
3. 書名 実験医学別冊・クロマチン解析実践プロトコール	

〔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
---------	---------