

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06610

研究課題名(和文) In vivo単一細胞解析から明らかにする染色体機能ドメインの可塑性とその意義

研究課題名(英文) Stability and flexibility of the DNA replication program revealed by single-cell DNA replication sequencing in vivo

研究代表者

竹林 慎一郎 (Takebayashi, Shin-ichiro)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50392022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞の染色体複製ドメイン構造(DNA複製の開始や複製フォークの進行が協調して制御される染色体構造単位)を単一細胞で、かつゲノム網羅的に調べることができる申請者独自の技術 single-cell DNA replication sequencing (scRepli-seq)法を用い、これまでアプローチが困難であった個々の細胞レベルでの染色体構造制御を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでDNA複製制御を単一細胞レベルで、高解像度、広範囲にわたって詳細に解析した例はなく、本研究で得られた成果は今後のDNA複製研究に大きく貢献することは確実である。DNA複製に着目することで、これまでアプローチの難しかった個々の細胞レベルでの染色体構造の安定性や揺らぎの実体を明らかにしたことは、巨大な染色体分子の動態を理解するためのモデリングやシミュレーションにとって非常に有用で、関連学問分野への波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated structural characteristics of mammalian chromosomes at the level of individual cells using a novel technique for analyzing replication timing domains (chromosomal unit defined by DNA replication timing). To our surprise, cell-type-specific replication timing domain organization was remarkably conserved between individual cells and even between homologous chromosomes. A small degree of cell-to-cell variation was also detected in specific genomic regions where replication timing shifts during cell differentiation. Thus, our study uncovered the previously unrecognized dynamic and static properties of chromosomal domains.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：DNA複製 染色体 シングルセル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝的に同じ細胞であっても、個々の細胞間でクロマチン構造に大きなバリエーションがあることが示唆されている。これらの知見は主に FISH 法などの細胞生物学的なアプローチにより得られたもので、特定の染色体領域に焦点をしばった解析が中心であった。そのため、ゲノムワイドに見たときにどれほど共通性のあるものなのか、分化や発生における細胞状態と関連があるのかと言った問題は、研究の端緒についたばかりにすぎない。また、これらの課題に取り組むための技術基盤の整備も進んでいないのが現状である。申請者が 2012 年 6 月まで所属したフロリダ州立大学 David Gilbert 研究室は、複製ドメイン構造 (DNA 複製開始やフォークの進行が協調して制御される染色体単位) をゲノムワイドに調べることができる簡便な手法を確立し、これまでヒトやマウスの ES 細胞を含む種々の細胞において詳細な複製ドメイン地図を作製してきた。その結果、複製ドメインのサイズは 400 キロから数メガベースであり、一本の染色体は、S 期初期、後期に複製される染色体ドメインのモザイク構造になっていることなどが明らかになった。興味深い事に、複製ドメイン構造は発生過程で変化し、細胞種に特異的なドメイン構造を形成していることがわかった。このことは、エピジェネティックなクロマチン構造変化が DNA 複製制御の一因であることを示唆している。実際に申請者は、ES 細胞分化で見られる複製ドメイン構造の変化が、クロマチンの高次折り畳みパターンの変化を反映していること、クロマチンリモデリング因子である BAF 複合体が複製ドメイン形成に関与していることなどを明らかにしてきた。このような DNA 複製制御とクロマチン構造の密接な関係から、複製ドメイン構造にも個々の細胞レベルで見た場合に大きなバリエーションが存在するのではないかと推測されているが、その詳細は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、クロマチン構造変化とも密接な関係がある DNA 複製制御に着目し、哺乳類細胞の染色体複製ドメイン構造を個々の細胞レベルで、かつゲノムワイドに調べることができる新しい手法を用いることで、これまで知られていなかった染色体構造のダイナミックな制御を明らかにすることを目指した。従来の複製ドメイン解析法は、BrdU でラベルした細胞集団を S 期初期と後期のフラクションに分離、それぞれから BrdU ラベル DNA を免疫沈降で回収し、マイクロアレイや次世代シーケンサーで解析するというもので、得られた結果は、細胞集団の平均値でしかなかった。最近、申請者は、複製ドメイン構造を単一細胞でゲノムワイドに解析できる新しい手法を確立した。この技術を用いることで、これまでアプローチが難しかった個々の細胞レベルでの染色体構造制御を明らかにできるだけでなく、細胞分化や遺伝子発現との関係も体系的に明らかにできると考え、本研究の着想に至った。

### 3. 研究の方法

申請者は、DNA 複製の過程でおこるコピー数変化 (ゆるんだ染色体領域は、凝縮した領域よりも早く複製されコピー数が早く 2 倍になる) を検出することで、単一細胞レベルで網羅的に染色体複製ドメイン構造を調べることができる single-cell DNA replication sequencing (scRepli-seq) 法を確立しており、これを用いた (図 1)。出生前診断で染色体のトリソミー (2 倍体と比較して 1.5 倍のゲノム量差) を検出する方法と原理的には同一であるが、個々の染色体ドメインのサイズである数百 kb というレベルでのコピー数の差を検出するために、単一細胞からのゲノ

ム増幅を可能な限り均一に行うことができる独自の条件を採用している。これにより、単一細胞の複製ドメイン構造を集団細胞のデータに匹敵する精度で解析することが可能になっている。さらに、父母間で異なる SNP 情報を利用することで 1 細胞中の各染色体について父方由来と母方由来の染色体を識別した。まず、マウス ES 細胞とその分化系をモデルとして用い、複製ドメイン構造が個々の細胞でどれほど厳密に制御されているのかについて体系的に調べた。次に、実際の生体由来の細胞（マウス胎児細胞）を用いた解析も行った。

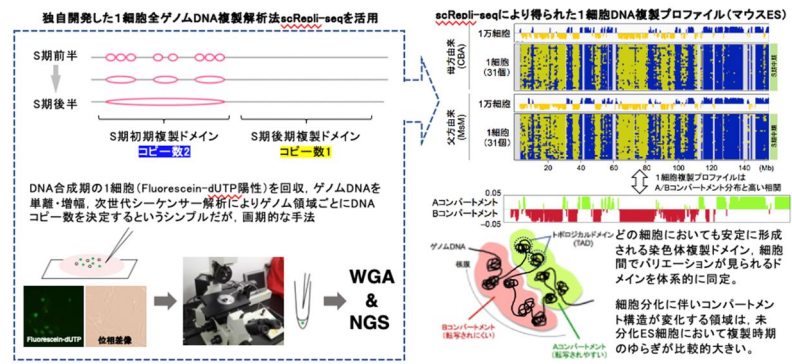


図1 scRepli-seq法の概要とそれを用いた複製ドメイン構造の解析

#### 4. 研究成果

マウスES細胞をモデルとして用いた実験により、どの細胞においても安定に形成される染色体複製ドメイン、細胞間でバリエーションが見られるドメインを体系的に同定することに成功した。さらにこのバリエーションの高いドメインは、細胞分化の過程でHi-Cで検出されるA/Bコンパートメント構造に変化を起こし、複製のタイミングも変化するようなゲノム領域であることを見出した。これまで技術的な限界から数万個の細胞の平均像として見えていた染色体複製ドメイン構造を、個々の細胞レベルでどれほど厳密に制御されているのかを明らかにし、染色体構造の安定性と細胞の分化制御との密接な関係を示したこれらの成果については、すでに論文として発表済みである (Miura et al. Nature Genetics 2019)。また、生体由来の希少細胞などのサンプルにも対応できる改良型のscRepli-seq法 (蛍光標識したヌクレオチド類似体の Fluorescein-dUTPを細胞に取り込ませてDNA合成期の細胞を標識し、マイクロマニピュレーターシステムを利用して複製中の一細胞を単離・回収する方法) の確立にも成功し、論文として発表した (Miura et al. Nature Protocols 2020)。E9.5マウス胚から単離したシングルセルに対してscRepli-seq解析を行ったところ、すでに培養マウスES細胞で確認されていたようなMbサイズの複製ドメインを検出することに成功した。scRepli-seq法が、培養細胞だけでなく生体由来細胞の解析にも有効であることを示したこの成果の意義は大きい。また、この計画を進める過程で、DNAコピー数の検出を本質とするscRepli-seq法が、ゲノムコピー数異常検出の非常に強力なツールとしても利用できることも見出した。

#### <引用文献>

Miura H, Takahashi S, Poonperm R, Tanigawa A, Takebayashi S I, and Hiratani I. Single-cell DNA Replication Profiling Identifies Spatiotemporal Developmental Dynamics of Chromosome Organization. *Nat. Genet.* 51: 1356-1368, 2019.

Miura H, Takahashi S, Shibata T, Nagao K, Obuse C, Okumura K, Ogata M, Hiratani I, and Takebayashi S I. Mapping replication timing domains genome wide in single mammalian cells with single-cell DNA replication sequencing. *Nat. Protoc.* 15:4058-4100, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka Hiroshi, Igata Tomoka, Etoh Kan, Koga Tomoaki, Takebayashi Shin ichiro, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 The NSD2/WHSC1/MMSET methyltransferase prevents cellular senescence associated epigenomic remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 e13173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ace1.13173	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
1. 著者名 Miura Hisashi, Takahashi Saori, Shibata Takahiro, Nagao Koji, Obuse Chikashi, Okumura Katsuzumi, Ogata Masato, Hiratani Ichiro, Takebayashi Shin-ichiro	4. 巻 15
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 Takebayashi Shin-ichiro, Ryba Tyrone, Wimbish Kelsey, Hayakawa Takuya, Sakaue Morito, Kuriya Kenji, Takahashi Saori, Ogata Shin, Hiratani Ichiro, Okumura Katsuzumi, Okano Masaki, Ogata Masato	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 ~ 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 該当する
1. 著者名 Ikuno A, Akeda K, Takebayashi S I, Shimaoka M, Okumura K, and Sudo A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Genome-wide Analysis of DNA Methylaton Identifies Differentially Methylated Loci Associated With Human Intervertebral Disc Degeneration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0222188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0222188	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 Miura H, Takahashi S, Poonperm R, Tanigawa A, Takebayashi S I, and Hiratani I.	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木梨乃、奥村克純、竹林慎一郎
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 を用いた複製ドメイン形成に関わるシスエレメントの探索
3. 学会等名 第 84 回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早川琢也、大河内七海、籠谷和弘、竹林慎一郎、奥村克純
2. 発表標題 脂肪細胞分化時に起こるDNA複製制御に関する研究
3. 学会等名 第 84 回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木梨乃、奥村克純、竹林慎一郎
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 を用いた複製ドメイン形成に関わるシスエレメントの探索
3. 学会等名 第187回 日本農芸化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木梨乃、高橋沙央里、奥村克純、平谷伊智朗、竹林慎一郎
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 を用いた複製ドメイン形成に関わるシスエレメントの探索
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木梨乃、奥村克純、竹林慎一郎
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 を用いた複製ドメイン形成に関わるシスエレメントの探索
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 竹林慎一郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 690
3. 書名 遺伝学の百科事典	

〔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	平谷 伊智朗  (Hiratani Ichiro)  (40583753)	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・チームリーダー   (82401)	

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			
米国	New College of Florida			