

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06612

研究課題名（和文）高次ゲノム構造が織りなす複雑な遺伝子発現制御動態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of complex gene expression regulation dynamics through higher-order genome structure

研究代表者

落合 博 (Ochiai, Hiroshi)

広島大学・統合生命科学研究科（理）・准教授

研究者番号：60640753

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）：本研究では、マウスES細胞におけるNanog遺伝子とその相互作用領域による転写制御機構を明らかにすることを目的とし、sequential-DNA-RNA-FISH法および特定内在遺伝子の細胞核内局在および転写活性可視化システム（STREAMING-tagシステム）を利用して、研究を実施した。STREAMING-tagシステムを新規に開発し、転写活性状態の時にのみNanog遺伝子の近傍でRBP1およびBRD4がクラスターを形成することを見出し、プレプリントサーバーで論文を公開した (Ohishi et al., bioRxiv, 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、独自に開発した遺伝子イメージング技術を利用して、遺伝子活性状態依存的に特定因子が遺伝子近傍でクラスターを形成することを見出した。本成果は遺伝子発現動態がどのように制御されているかを解く鍵となりえる成果である。遺伝子発現制御機構はあらゆる生命現象に関わる基本的なプロセスであり、大きな学術的意義があるといえる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanism of transcriptional regulation by Nanog genes and their interacting regions in mouse ES cells by using sequential-DNA-RNA-FISH and a STREAMING-tag system for visualizing the nuclear localization and transcriptional activity of specific endogenous genes. We developed the STREAMING-tag system and found that RBP1 and BRD4 cluster in the vicinity of Nanog genes only when the gene is in a transcriptionally active state, and published a paper on a preprint server (Ohishi et al., bioRxiv, 2022).

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム構造 遺伝子発現 多能性幹細胞 転写 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

近年の Chromosome Conformation Capture (3C)法及び Hi-C 法を含むその派生技術の発展によって、間期ゲノム DNA が細胞種特異的な高次ゲノム構造を持つことが明らかとなってきた。また、本技術を利用して、多数の遠距離ゲノム領域間相互作用が特定遺伝子の発現制御に重要な役割を果たすことが明らかにされてきた (Schmit et al., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016)。一方で、相互作用する領域が多数且つ広範囲に散在する場合、当該遺伝子と相互作用する領域による転写制御機構を理解することは容易ではない。その一例として、多能性幹細胞において多能性維持に重要な転写因子をコードする *Nanog* 遺伝子が挙げられる。*Nanog* はマウス ES 細胞において細胞間で発現量多様性が認められる。研究代表者はこれまでに、転写のライブイメージングを利用した定量解析から、本遺伝子のプロモーター活性状態の確率的な遷移およびその遷移速度の遅さ (低頻度のバースト状転写発現) が、発現量多様性に有意に寄与していることを明らかにしてきた (Ochiai et al., *Sci Rep*, 2014)。さらに、本現象の誘引機構を調べる目的で、生細胞内で特定遺伝子の核内局在とその転写動態を同時に定量する技術、ROLEX システムを確立した (Ochiai et al., *Nucleic Acid Reserach*, 2015)。本技術を利用した解析から、転写活性状態では遅い核内流動性を、転写不活性状態では早い核内流動性を示すことが明らかとなった。また、1) 研究代表者らは、転写活性状態では *Nanog* はほぼ一定速度で転写することを明らかにしており、さらに 2) *Nanog* プロモーター領域が多数のゲノム領域と相互作用するという報告 (de Wit et al., *Nature*, 2013) から、プロモーター活性状態依存的に相互作用の程度が大きく変化している可能性が考えられた。これはすなわち、遠方転写調節領域とプロモーターの確率的な相互作用が *Nanog* 遺伝子の低頻度のバースト状転写発現および *Nanog* 発現量の細胞間多様性の背景にある可能性を示唆している。*Nanog* 発現量の細胞間多様性は ES 細胞と同様の性質を持つマウス初期胚における内部細胞塊細胞の分化方向性の決定に重要な役割を担っていると考えられているが、その出現機構は不明である。そのため、*Nanog* 遺伝子と遠方転写調節候補領域の相互作用と転写の関係を明らかにすることは、遠方ゲノム領域との相互作用を介した転写活性化機構を理解することに加えて、哺乳類の初期発生過程を理解する上で極めて重要である。しかし、*Nanog* プロモーターと相互作用する領域全てが *Nanog* の発現調節に関与するのか、またそれらとの相互作用と転写活性化の関係は依然として不明である。

2. 研究の目的

本研究では、マウス ES 細胞における *Nanog* 遺伝子とその相互作用領域による転写制御機構を明らかにすることを目的とし、sequential-DNA-RNA-FISH 法 (Wang et al., *Science*, 2016) および改良型 ROLEX システムを利用して、研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究では、マウス ES 細胞における *Nanog* 遺伝子とその相互作用領域による転写制御機構を明らかにするために、研究項目 1) 複数遺伝子座の解析を可能とする改良型 ROLEX システムによって、生細胞内における遺伝子領域間相互作用およびそれに伴って形成されると考えられる転写制御因子と遺伝子発現の動態を解析した。さらに、研究項目 2) sequential- DNA-RNA-FISH 法によって、上記転写調節領域と *Nanog* の相互作用およびその転写活性との関連を 1 細胞レベルで明らかにした。

(1) 研究項目 1. 改良型 ROLEX システムによる複数ゲノム領域の相互作用と標的遺伝子の転写の同時ライブイメージング

研究代表者の研究結果では、*Nanog* の転写活性状態は平均持続時間が約 2 分間と、比較的短いことがわかっていた (Ochiai et al., *Sci Rep*, 2014)。また、エンハンサーとプロモーターの相互作用転写開始複合体の形成 転写開始までには複雑な反応が絡むことが知られている (Allen et al., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015)。そのため、研究項目 2) において *Nanog* の転写活性化と転写調節領域の相互作用の関係が明らかにできる可能性があるが、もし転写調節領域と *Nanog* プロモーター領域との相互作用と転写活性化に時間差がある場合、時間的な位相のずれによって明確な相関が見られない可能性が懸念される。このため、生きた細胞で転写活性と各ゲノム領域の核内局在をリアルタイムに計測することで、初めて相関関係が明らかにできる可能性がある。研究代表者はこれまでに、特定遺伝子の核内局在と転写動態を生細胞イメージングする技術、ROLEX システムを確立していた (Ochiai et al., *Nucleic Acid Research*, 2015)。本技術では、特定遺伝子の核内局在を化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来の dCas9-GFP で、その転写活性を MCP-RFP 及び標的遺伝子にノックインした MS2 リピートで可視化していた。しかし本方法では標的ゲノム領域の可視化精度が低く、他の遺伝子領域の可視化のために dCas9 を利用できないという問題があった。また、MS2 RNA に MCP が結合することによってリボソームによる翻訳が阻害されることが知られているため (Stripecke et al., *Mol Cell Biol*, 1994)、MS2 リピートは基本的に遺伝子の 3' 側へ挿入する必要があった。もし MS2 リピート挿入箇所が転写開始点から 10 kbp 下流に

あり、「平均」転写速度が 2 kbp/min の場合、転写開始から転写の可視化までに 5 分経過することとなる。転写速度は常に一定ではないため(Liu et al., *PLOS Comp Biol*, 2021)、転写開始点近傍における正確な転写開始時の状況を把握することはできない。本研究ではこれら問題点を解決する新規の遺伝子領域および転写活性イメージング技術を確認し、dCas9 を併用して転写調節領域との同時イメージングを実施し、転写活性と構造動態の関係性を明らかにした。

(2) 研究項目 2 .Sequential-RNA-DNA-FISH を利用したゲノム領域間相互作用と転写活性の関係解明

Nanog プロモーターと相互作用する領域と当該遺伝子プロモーター領域の直接的な相互作用の関係を調べるために、sequential-RNA-DNA-FISH (Wang et al., *Science*, 2016; Guan et al., *Biophys J*, 2017; Takei et al., *Nature*, 2021)を実施した。sequential-RNA-DNA-FISH は固定した細胞に対してまず RNA-FISH 解析することで特定遺伝子の転写活性状態を検出し、その後 DNA-FISH を連続的に行うことで、特定遺伝子の転写活性状態と周辺ゲノム領域の空間配置を決定できる手法である。これにより、*Nanog* の転写活性状態と、候補転写調節領域の相互作用の関係を明らかにできる。

4 . 研究成果

(1) 研究項目 1 . 改良型 ROLEX システムによる複数ゲノム領域の相互作用と標的遺伝子の転写の同時ライブイメージング

転写開始点(TSS)近傍の転写活性を測定しつつ、遺伝子機能の阻害効果を最小限に抑えるために、我々は Spliced TetO REpeAt, MS2 repeat, and INtein sandwiched reporter Gene tag (STREAMING-tag)システムを考案した。本システムでは、まず標的遺伝子領域の TSS 近傍に STREAMING-tag を挿入する(図 1)。本 tag には MS2 リピートおよび TetO リピートが含まれている。そのため、MCP-RFP および TetR-GFP を発現させることで、それぞれ転写活性の可視化および遺伝子領域の可視化が可能となる。また、これらリピート配列はスプライスアクセプターおよびスプライスドナー配列によって挟まれている。そのため、これら配列は mRNA の成熟過程でスプライシングによって除去される。また、本 tag はノックイン成功細胞の選抜に利用可能なセレクションマーカーとして G418 耐性遺伝子を含んでいる。さらに、G418 耐性遺伝子はスプリットインティン配列によって挟まれている。これらタンパク質は翻訳後にインティンのタンパク質スプライシング活性によって除去される。インティンの両端にあるペプチドはつなぎ合わされる。そのため、STREAMING-tag は遺伝子領域の可視化および転写活性の測定、ノックインの確認に利用できるが、遺伝子機能を阻害しないことが期待される (Ohishi et al., *bioRxiv*, 2022)。

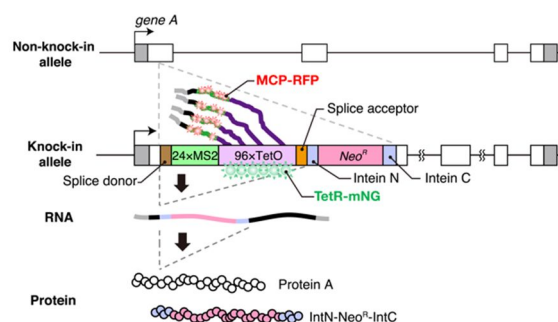


図 1 STREAMING-tag システムの概要

我々は本 tag をマウス胚性幹細胞の *Nanog* 遺伝子にノックインした。その結果、転写量がわずかに減少したものの、転写活性状態の細胞の割合には影響がなかったことから、それは比較的長く(~6 kbp)、余分な RNA スプライシングが必要な STREAMING-tag の挿入による効果の可能性が高いと考えた。

我々はこれまでに、転写活性時の遺伝子近傍で RNA polymerase II ラージサブユニットの RPB1、転写補因子の BRD4 が遺伝子の近傍でクラスターを形成することを見出していた (Li et al., *Cell*, 2019; *Nat Struct Mol Biol*, 2020)。しかし、OFF 状態においてこれらクラスターが形成されないかどうかは明らかになっていなかった。これら細胞株に対して、RPB1、BRD4、メディエーターサブユニットの MED19、MED22 に SNAPtag をノックインし、転写活性依存的なこれら因子の局在と遺伝子との距離を計測した。その結果、RPB1 および BRD4 は転写活性時には *Nanog* 近傍でクラスターを形成するものの、転写非活性時には近傍でクラスターを形成しないことがわかった(図 2)。一方、メディエーターサブユニットに関しては、転写活性状態に関係なく遺伝子の近傍でクラスターを形成することを見出した。これらクラスターの形成はおそらく *Nanog* エンハンサー様領域との相互作用と関係していると考えられる。そこで、*Nanog* STREAMING-tag 細胞に dCas9-HaloTag を発現する細胞を樹立し、特定遺伝子領域の可視化が可能な体制を整えた。今後これら細胞を利用して、高次ゲノム構造動態と転写活性の関係性、各種因子のクラスター

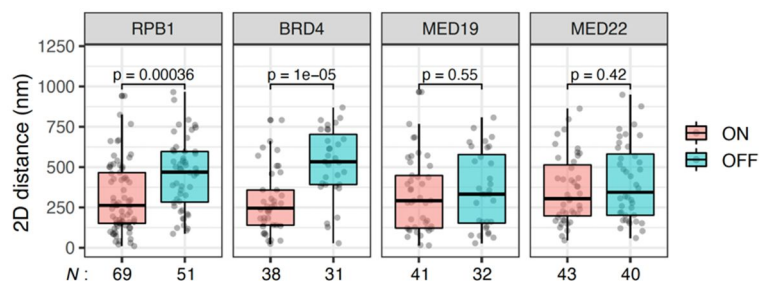


図 2 転写活性状態ごとの *Nanog* 遺伝子と各種転写制御因子クラスターとの距離の分布

ー形成との関係性を明らかにしていく予定である。

(2) 研究項目 2 .Sequential-RNA-DNA-FISH を利用したゲノム領域間相互作用と転写活性の関係 解明

高次ゲノム構造を推測する技術として Hi-C 法がよく利用される。しかし、これら派生技術では特定遺伝子の転写活性状態ごとに特異的な高次ゲノム構造を知ることは困難である。そこで本研究では sequential RNA-DNA-FISH 技術を利用する (Takei et al., *Nature*, 2021)。本方法では、細胞を固定後、RNA に対して特異的な 1 本鎖 DNA プローブでハイブリする。プローブには特殊なアダプター配列が付加されており、特定の蛍光基質のついた readout probe で染色し、蛍光顕微鏡で撮影する。その後 readout probe を剥がし、別の readout probe で染色、という作業を繰り返す。これにより、複数の RNA 分子の細胞内数および転写活性状態を知ることができる。さらに、RNase 処理後にゲノム DNA を変性させ、1 次プローブをハイブリさせる。その後、RNA-FISH と同様に readout probe をハイブリ、撮影を繰り返すことで多数のゲノム DNA 領域の空間座標を計測できる。本研究では、*Nanog* 遺伝子領域周辺 (55 Mbp) で、*Nanog* 遺伝子領域と相互作用する領域、しない領域、また比較的発現量の高い遺伝子領域を含む 120 ゲノム領域を DNA-FISH の標的とした。また、*Nanog* 遺伝子領域周辺で比較的発現量の高い遺伝子 80 種類を RNA-FISH の標的とした。マウス ES 細胞を対象にして、sequential RNA-DNA-FISH を実施し、データ取得を行った。解析手法を現在検討中ではあるものの、*Nanog* 遺伝子の転写活性状態および非活性状態の高次ゲノム構造が取得されており、それぞれで違いが認められている。今後これらの違いが転写活性状態にどう影響するかについて詳細な解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Li Jieru, Hsu Angela, Hua Yujing, Wang Guanshi, Cheng Lingling, Ochiai Hiroshi, Yamamoto Takashi, Pertsinidis Alexandros	4. 巻 27
2. 論文標題 Single-gene imaging links genome topology, promoter?enhancer communication and transcription control	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1032 ~ 1040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-020-0493-6	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 Ochiai Hiroshi, Hayashi Tetsutaro, Umeda Mana, Yoshimura Mika, Harada Akihito, Shimizu Yukiko, Nakano Kenta, Saitoh Noriko, Liu Zhe, Yamamoto Takashi, Okamura Tadashi, Ohkawa Yasuyuki, Kimura Hiroshi, Nikaido Itoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Genome-wide kinetic properties of transcriptional bursting in mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaaz6699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aaz6699	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 Miyamoto Tatsuo, Hosoba Kosuke, Itabashi Takeshi, Iwane Atsuko H, Akutsu Silvia Natsuko, Ochiai Hiroshi, Saito Yumiko, Yamamoto Takashi, Matsuura Shinya	4. 巻 39
2. 論文標題 Insufficiency of ciliary cholesterol in hereditary Zellweger syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e103499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019103499	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 Shinkai Soya, Nakagawa Masaki, Sugawara Takeshi, Togashi Yuichi, Ochiai Hiroshi, Nakato Ryuichiro, Taniguchi Yuichi, Onami Shuichi	4. 巻 2
2. 論文標題 PHi-C: deciphering Hi-C data into polymer dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NAR Genomics and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 lqaa020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nargab/lqaa020	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 Seirin-Lee Sungrim, Osakada Fumitaka, Takeda Junichi, Tashiro Satoshi, Kobayashi Ryo, Yamamoto Takashi, Ochiai Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Role of dynamic nuclear deformation on genomic architecture reorganization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1007289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pcbi.1007289	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 Li Jieru, Dong Ankun, Saydaminova Kamola, Chang Hill, Wang Guanshi, Ochiai Hiroshi, Yamamoto Takashi, Pertsinidis Alexandros	4. 巻 178
2. 論文標題 Single-Molecule Nanoscopy Elucidates RNA Polymerase II Transcription at Single Genes in Live Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 491 ~ 506 .e28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.05.029	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 Akutsu Silvia Natsuko, Miyamoto Tatsuo, Oba Daiju, Tomioka Keita, Ochiai Hiroshi, Ohashi Hirofumi, Matsuura Shinya	4. 巻 17
2. 論文標題 iPSC reprogramming-mediated aneuploidy correction in autosomal trisomy syndromes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0264965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0264965	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/lsa.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 該当する

1. 著者名 Ohishi Hiroaki, Shimada Seiru, Uchino Satoshi, Li Jieru, Sato Yuko, Shintani Manabu, Owada Hitoshi, Ohkawa Yasuyuki, Pertsinidis Alexandros, Yamamoto Takashi, Kimura Hiroshi, Ochiai Hiroshi	4. 巻 —
2. 論文標題 STREAMING-tag system reveals spatiotemporal relationships between transcriptional regulatory factors and transcriptional activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 —
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.01.06.472721	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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Hiroshi Ochiai
2. 発表標題 クロマチン潜在能による転写バースト制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 落合 博
2. 発表標題 分子の動きを「見る」ためのゲノム編集技術
3. 学会等名 第4回 広島大学先端科学セミナー「“ゲノム編集”で未来社会を拓く」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Ochiai
2. 発表標題 Transcriptional bursting induces gene expression heterogeneity in mES cells
3. 学会等名 Chromosome Dynamics 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Ochiai
2. 発表標題 Transcriptional bursting induces gene expression heterogeneity in mouse embryonic stem cells
3. 学会等名 Single Molecule Imaging of Chromatin Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 落合博、山本卓
2. 発表標題 CRISPR ライブラリスクリーニングによる転写バースト関連遺伝子の探索
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Ochiai
2. 発表標題 STREAMING-tag system: A novel technology to analyze the spatiotemporal relationship between transcriptional regulators and transcriptional dynamics at the single gene level
3. 学会等名 The 30th Hot Spring Harbor International Symposium -Chromatin Potential in Development and Differentiation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Ochiai
2. 発表標題 Genome-wide kinetic properties of transcriptional bursting revealed by single cell analysis
3. 学会等名 The 2nd ASHBi SignAC Workshop, Integrating Single-cell Analysis and Mathematics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Ohishi, Seiru Shimada, Satoshi Uchino, Li Jieru, Yuko Sato, Alexandros Pertsinidis, Takashi Yamamoto, Hiroshi Kimura, Hiroshi Ochiai
2. 発表標題 Single-gene imaging reveals the relationship between the transcriptional activity of single genes and the formation of transcriptional regulatory factor clusters
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Mechanisms of Eukaryotic Transcription (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学・統合生命・分子遺伝・落合グループ https://home.hiroshima-u.ac.jp/ochiai/researchmap https://researchmap.jp/HiroshiOchiai/researchgate https://www.researchgate.net/profile/Hiroshi_Ochiai3
--

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		
米国	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	SBP Medical Discovery Institute	Howard Hughes Medical Institute
オーストラリア	Centenary Institute		