

研 究 報 告 書

「細胞多様性決定要因の網羅解析技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研 究 者: 落 合 博

1. 研究のねらい

哺乳類の胚性幹(ES)細胞を含む多能性幹細胞は、各々の細胞の性質に大きな多様性が認められる。この質的多様性は、各細胞において種々の遺伝子発現量の細胞間多様性に起因し、多能性幹細胞から特定の細胞種へと均質に分化誘導させることを困難にすると考えられている。本現象は、遺伝子調節ネットワークおよび細胞間相互作用によるフィードバックに加えて、不連続な転写活性状態の切り替わりによる(転写バースト)によって引き起こされる TBi ノイズ (Transcriptional Bursting-induced noise)などによって主に誘引されることが知られている。TBi ノイズは、特定遺伝子の各々の対立遺伝子上に異なるレポーター遺伝子を挿入するなどし、1細胞レベルで各対立遺伝子の発現量を区別して定量することで求めることができる。しかし、遺伝子ターゲティングが比較的容易な酵母などではレポーターノックインによって複数の報告例があるが、哺乳類細胞ではほとんど報告されていない。一方我々は、マウス ES 細胞において多能性維持に重要で、細胞間で発現量の多様性が比較的大きい *Nanog* 遺伝子において、レポーター細胞を樹立することによって、TBi ノイズが細胞間の発現量多様性に十分影響を与えていることを示してきた(Ochiai *et al.*, *Sci Rep*, 2014)。このことから、マウス ES 細胞において、*Nanog* 以外の遺伝子においても TBi ノイズによって発現量の多様性がもたらされている可能性が十分存在し、それらが多能性幹細胞の性質的多様性を引き起こす一因である可能性が考えられる。しかし、TBi ノイズに関しては転写バーストの性質(頻度およびサイズ)がによって決まることが理論的研究から示唆されているが、TBi ノイズの大きさを網羅的に解析する技術はこれまでに報告されておらず、転写バーストがなぜ生じるのか、TBi ノイズの大きさは何が規定するのか、ほとんど明らかになっていない。

本研究課題の目標は、A)TBi ノイズの網羅的同定技術の確立、B)高効率に各々の対立遺伝子へ異なるレポーター遺伝子を導入する技術の確立、C)対立遺伝子間の発現量多様性に関連する素因を同定し、その機能を制御することにより、発現量の細胞間多様性を調節することである。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、TBi ノイズを網羅的に明らかにするために、1細胞完全長 Total RNA-Seq 法である RamDA-seq を用いてハイブリッドマウス ES 細胞で 1細胞 RNA-Seq を実施した(二階堂 ユニトリリーダー(理化学研究所)との共同研究)。得られたデータから細胞ごと、アレルごとの発現量を区別することによってゲノムワイドに TBi ノイズの大きさを定量化した。25 種類の遺伝子に関して、純系マウス由来の ES 細胞のそれぞれの対立遺伝子に GFP または iRFP をノックインした細胞株を樹立し、1細胞 RNA-Seq で得られた TBi ノイズの大きさの妥当性を確認

した。Tbi ノイズの大きさとプロモーター領域の特徴を調べたところ、polycomb repressive complex 2 (PRC2) 関連因子がプロモーター領域に局在する遺伝子は高い Tbi ノイズレベルを示す傾向があることがわかった。さらに、ゲノム編集を利用して、特定の遺伝子では PRC2 関連因子のプロモーター局在が Tbi ノイズレベルと関連していることを確認した。また、CRISPR ノックアウトライブラリーを用いて Tbi ノイズに関連する因子を網羅的に探索したところ、Akt および MAPK シグナル伝達経路が Tbi ノイズレベルの調節に関与することを見出した。これらシグナル経路を同時に阻害することで、転写伸長因子の発現量増加していることがわかった。転写伸長を阻害すると Tbi ノイズの上昇が認められたことから、転写伸長が Tbi ノイズと密接に関係し、ゲノムワイドにその大きさをコントロールできる可能性を秘めていることがわかった。

(2) 詳細

研究テーマ A「Tbi ノイズの影響が大きい遺伝子の網羅的同定技術の確立」

ゲノムワイドに Tbi ノイズを決定するために、129/CAST ハイブリッド ES 細胞を利用して G1 期細胞の 1 細胞 RNA-Seq を実施した。ここでは、1 細胞レベルで転写産物全長を決定できる高感度 RNA-Seq 法である RamDA-Seq を利用し、475 細胞を解析し、419 サンプルが十分なクオリティを示した。これらの情

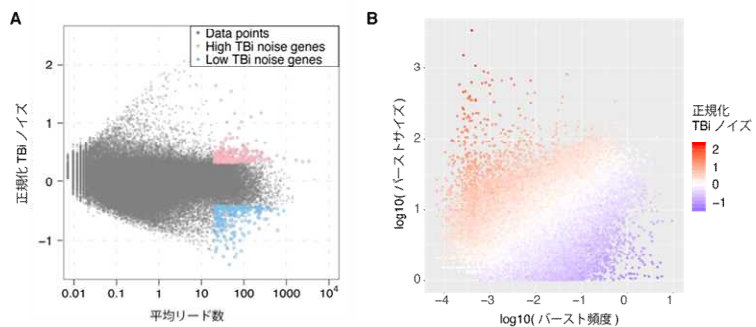


図 1 Tbi ノイズの網羅的同定。(A) 1 細胞 RNA-Seq から明らかとなった正規化 Tbi ノイズと平均発現量の関係。(B) 正規化 Tbi ノイズ、バーストサイズ及び頻度の関係。

報から網羅的に Tbi ノイズの大きさを決定した。理論研究から Tbi ノイズは発現量に依存すること、また RNA-Seq 解析では遺伝子長にデータが影響を受けることから、発現量および遺伝子長で Tbi ノイズを正規化した。発現量が低いものは、技術的または生物学的なノイズを判別できないため、本解析では平均リード数が 20 以下のものは解析から除外した (図 1A)。また、Tbi ノイズ、平均発現量、mRNA 分解速度(Sharova *et al.*, *DNA Res*, 2009)から転写バーストサイズおよび頻度を見積もることができる(図 1B)。バーストサイズと頻度の関係をプロットしてみると、正規化 Tbi ノイズはバーストサイズが高く頻度が低いものほど高いことがわかった(図 1B)。

研究テーマ B「高効率に各々の対立遺伝子へ異なるレポーター遺伝子の導入技術の確立」

上記の 1 細胞 RNA-Seq の結果はハイブリッド ES 細胞を使用して得られた結果である。これらの細胞には対立遺伝子間に多数の多型を持っており、これらが Tbi ノイズに何らかの影響を与えている可能性が考えられた。それを検証するために、純系マウス由来の ES 細胞で複数の遺伝子を標的として、各対立遺伝子に GFP および iRFP を導入した細胞株を樹立する

ことにした。当初の計画では染色体が 1 セットしかないハプロイド(1 倍体)ES 細胞を利用した手法を提案していたが、想定通りに進まなかった。そこで、2 倍体の純系マウス由来のマウス ES 細胞にゲノム編集技術を利用して GFP および iRFP を同時にノックインし、GFP 及び iRFP ポジティブ細胞を FACS で分取する方法に切り替えたところ、効率よくノックイン細胞が得られることがわかった。本手法を利用し、様々な発現量および TBI ノイズを示す 25 種類の遺伝子を標的とし、各対立遺伝子に GFP または iRFP を挿入した ES 細胞株を樹立した。ハイブリッド ES 細胞を利用した 1 細胞 RNA-Seq から算出された正規化 TBI ノイズと、ノックイン細胞株の 1 分子蛍光 RNA-FISH 法によって得られた正規化 TBI ノイズは有意な相関を示したことから ($\rho = 0.422$, $P = 0.041$)、ハイブリッド ES 細胞の 1 細胞 RNA-Seq のデータは信頼できると考えた。

研究テーマ 3「TBI ノイズの影響が大きい遺伝子の網羅的同定

次に、正規化 TBI ノイズの大きさに関連するプロモーターの特徴を抽出するために、様々な ChIP-Seq データ(多能性関連因子、ヒストン修飾、転写関連因子など)から、高および低 TBI ノイズ遺伝子のプロモーター領域における結合度を計算し、正規化 TBI ノイズ、バーストサイズおよび頻度の大きさととの相関を計算した。その結果、PRC2 関連因子(Ezh2, Suz12 H3K27me3)のプロモーターでの局在と TBI ノイズの大きさが比較的高い相関を示すことがわかった。PRC2 は Suz12, Ezh2, EED などから成る複合体で、クロマチンに結合して H3K27me3 の修飾を導入し、遺伝子発現を負に制御することが知られている。一方で、Suz12 をノックアウトすることによって、この複合体が不安定化し、H3K27me3 の修飾能が完全に失われることがわかっている。そこで、PRC2 が TBI ノイズに如何に関与するか調べるために、比較的プロモーター領域に H3K27me3 マークが多い *Dnmt3L*, *Dnmt3b*, *Peg3*, *Ctcf* 遺伝子の各対立遺伝子に GFP および iRFP をノックインした細胞株において Suz12 をノックアウトした(図 2)。*Dnmt3L* および *Dnmt3b* では Suz12 ノックアウトによって正規化 TBI ノイズの減少が確認された(図 2)。一方で、*Peg3* では正規化 TBI ノイズが上昇し、*Ctcf* に至っては変化が認められなかった。このことから、PRC2 による TBI ノイズの大きさの制御は遺伝子特異的である可能性が考えられた。

上記における、既知の情報(ChIP-Seq データ)との相関解析では、TBI ノイズをゲノムワイドに制御する因子は見いだせなかった。そこで、

TBI ノイズの大きさに関連する遺伝子を網羅的に探索するために、CRISPR ノックアウトライブラリを利用した。比較的 TBI ノイズの高い遺伝子である *Nanog*, *Dnmt3L*, *Trim28* ノックイン細胞株に、マウスゲノム中の遺伝子を標的とする CRISPR レンチウィルスライブラリを導入して培養、GFP/iRFP 発現量が小さい細胞を FACS で分取し、ゲノム DNA を回収、コントロールと比較して増減のあった sgRNA 配列を NGS 解析した。GO 解析から、mTOR や MAPK シグナルに関与する遺伝子群がコントロールと比較して減少していることがわかった。これらシグナル

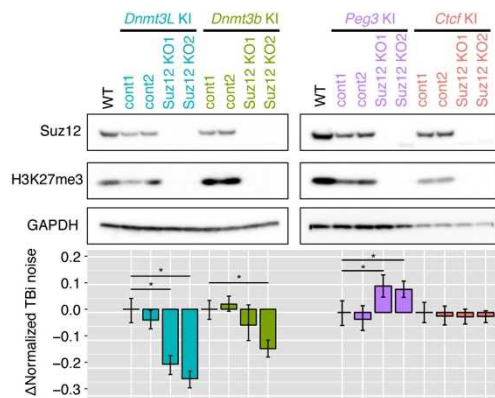


図 2 PRC2 は遺伝子特異的に TBI ノイズを制御する。

経路は PI3/Akt 経路を介して互いにクロストークしていることがわかっている。様々な組み合わせでこれら経路の阻害剤で *Nanog*, *Dnmt3L*, *Trim28* ノックイン細胞株を処理し、正規化 TBI ノイズの大きさの変動を調べた。その結果、Akt および MAPK 阻害剤を組み合わせることにより顕著に正規化 TBI ノイズの減少が見られることがわかった。ここではこれらを PD-MK 条件と呼ぶ。その他のノックイン細胞株(計 24 細胞株)についても PD-MK 条件で培養することによって、一般的な ES 細胞培地と比較して正規化 TBI ノイズがほとんどの遺伝子で減少することがわかった(図 3A)。これらのことから、PD-MK 条件では多くの遺伝子で TBI ノイズを低減させることができることがわかった。一方で、PD-MK 条件でも多能性細胞マーカーはしっかりと発現が見られ、PD-MK 条件で培養した細胞からキメラマウスを作製できたことから、PD-MK 条件でも多能性を維持できることがわかった。

次に、PD-MK 条件の特殊性を調べるために、RNA-Seq 解析を行った。その結果、PD-MK 条件では他の培養条件に比べて、転写伸長関連因子の発現量が特に上昇していることがわかった。転写は開始、伸長、終結の主な 3 ステップに分かれている。不明な点は多いものの、転写バーストは転写伸長との関係性が報告されていたことから、PD-MK 条件におけるこれら転写伸長関連因子の発現上昇と多数の遺伝子における TBI ノイズの減少は理にかなった関係であることが示唆された。そこで、転写伸長が TBI ノイズに関与しているかを調べるために、転写伸長のステップにおいて重要な P-TEFb を阻害する DRB と Flavopiridol(Fla) でノックイン細胞を処理し、TBI ノイズを計測した。その結果、これら転写伸長阻害剤で処理することで、多くの遺伝子で TBI ノイズが上昇することがわかった(図 3B)。これらのことから、転写伸長が効率的に起こることで、バースト頻度が上昇し、TBI ノイズが減少すると考えられる。

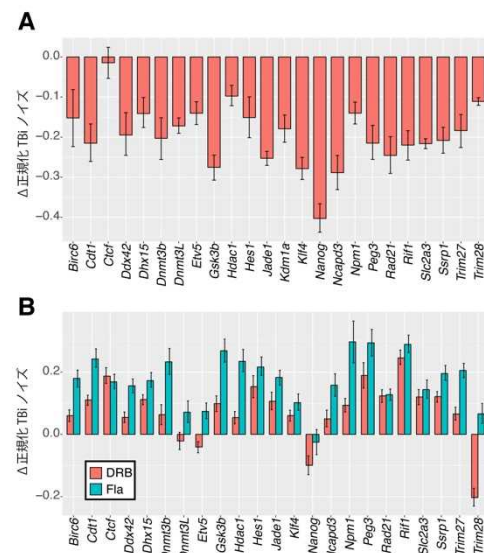


図 3 阻害剤処理による TBI ノイズの変動。(A) PD-MK 条件によるコントロールと比べた正規化 TBI ノイズの差。(B) 転写伸長阻害剤処理によるコントロールと比べた正規化 TBI ノイズの差。

3. 今後の展開

本研究では、多能性幹細胞であるマウス ES 細胞において、遺伝子発現量多様性を引き起こす一因である TBI ノイズを初めて網羅的に解析した。また、Akt/MAPK シグナル経路を同時に阻害する事によって、転写伸長因子の発現量が増加し、転写バーストサイズ/バースト頻度の比が低下し、結果的に TBI ノイズが減少することがわかった。Akt/MAPK シグナルの阻害によって多能性を維持できることが確認されたことから、これらシグナル阻害剤を使用することで、多能性幹細胞の質的均質性を高め、特定細胞種への分化誘導効率を高めることができる可能性が示唆された。また、マウス ES 細胞以外の細胞種では Akt/MAPK シグナル阻害は全く異なった反応を示すことが予想されることから、これらのシグナル阻害剤は細胞種によって効果が異なることが予想される。本研究では、転写伸長ステップが TBI ノイズに深く関与している

ことが示唆されており、何らかの方法で転写伸長の効率を上げることで、様々な細胞種でも TBI ノイズを低下させることができる可能性が示唆された。

4. 評価

(1) 自己評価

[研究目的の達成状況]

テーマ A は目標を十分達成できたと考えている。一般的な 1 細胞 RNA-Seq で使用される手法では RNA の 5' 末端側の情報を取得することが困難である。一方で今回使用した RamDA-Seq (Hayashi et al., *Nat Commun*, 2018) は RNA の全長に渡って情報の取得が可能な特徴がある。今回はハイブリッド ES 細胞を対象とし、各対立遺伝子の転写産物を、系統間の多型を利用して分類する必要があるが、RamDA-Seq を利用することで 5' 側に存在する多型も分類に使用することができ、極めて高感度な解析が可能となった。また、マウス ES 細胞においては mRNA の分解速度がすでに網羅的に解析されており (Sharova et al., *DNA Res*, 2009)、この情報と今回得られた平均発現量および TBI ノイズの大きさから、網羅的に転写バーストサイズおよび頻度も決定できた。これにより各遺伝子の転写バースト特性を把握し、発現量、ノイズの大きさがどのようにして決まるのかを詳細に解析できるようになった。

テーマ B に関しては、当初計画していた方法がうまく行かなかったものの、代替法で問題なく実施することができ、最終的な目的は達成できたと考えている。

テーマ C に関しては、既知の情報 (バンクに登録されたマウス ES 細胞の ChIP-Seq データ) と TBI ノイズの相関解析では PRC2 関連因子のプロモーター局在が相対的に高い相関を示したが、相関係数の絶対値はそれほど高いものではなかった ($\rho \approx 0.2$)。実際に PRC2 の機能阻害は遺伝子によって応答が異なり、あくまでも遺伝子特異的な制御がかかっていると考えられた。CRISPR ライブラリを使用したスクリーニングから Akt/MAPK シグナル経路という一見 TBI ノイズとは無関係そうにないものに関連する遺伝子群が TBI ノイズを上昇させる効果がある候補として選抜された。結局これらのシグナル経路は転写伸長関連因子の発現量を抑制しており、転写伸長の効率が低下することでバーストサイズ/バースト頻度の比が大きくなり、結果として TBI ノイズを上昇させることがわかった。これらシグナル経路の阻害剤でマウス ES 細胞を処理することで、多くの遺伝子で TBI ノイズの減少が認められた。このように、TBI ノイズの導出機構を網羅的に解明し、その大きさを制御する方法を見出すことができたことから、目標を達成できたと考えている。

[研究の進め方 (研究実施体制及び研究費執行状況)]

研究費執行は基本的に計画通りに進め、テーマ B など一部想定どおりに進まなかった部分は柔軟に対応し、最終的に目標を達成できた。研究開始時に、本研究を進める上で必要不可欠だった FACS を導入させていただくことで、研究を滞りなく進めることができた。基本的に研究は研究者自身で実施したが、多くの共同研究者にサポートいただいた。

[研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果 (今後の見込みを含む)]

本研究で得られた成果は、これまで不明な点の多かった転写バーストの分子機構解明に向

けた情報基盤を提供するとともに、転写バーストに伴って生じる遺伝子発現量の細胞間多様性の理解を促進し、関連分野に大きく貢献する。また、本研究ではマウス ES 細胞において多様性を減少させることが可能な新たな培養条件を見出し、将来的に効率的な分化誘導法の確立が期待され、再生医療分野への大きな波及効果が見込まれる。

- (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

ハイブリッドマウス ES 細胞を用いて 1 細胞 RNA-Seq を実施し、細胞毎に各アレルの発現量を計測することによってゲノムワイドに TBi ノイズの大きさを定量化しました。このデータの妥当性を純系由来の ES 細胞の 25 種の対立遺伝子に各々 GFP または iRFP をノックインした細胞株で確認しました。また、PRC2 関連因子の結合配列がプロモーター領域に局在する遺伝子は、高い TBi ノイズレベルを示す傾向があることを見出し、ゲノム編集を利用してこの関連性を確認しました。さらに、CRISPR ノックアウトライブラリーを用いて TBi ノイズに関連する因子を網羅的に探索し、Akt および MAPK シグナル伝達経路が TBi ノイズレベルの調節に関与することを明らかにしています。これらのデータのしっかりとした validation をとるとともに、Akt/MAPK シグナルとの関連をさらに突き詰めて、論文化することを期待します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Matsushita M, Ochiai H, Suzuki KT, Hayashi S, Yamamoto T, Awazu A, Sakamoto N., Dynamic changes in the interchromosomal interaction of early histone gene loci during early development of sea urchin, Journal of Cell Science, 2017, 130(24):4097-4107
2. Ishihara S, Kotomura N, Yamamoto N, Ochiai H. Ligation-mediated PCR with a back-to-back adapter reduces amplification bias resulting from variations in GC content, Anal Biochem., 2017, 531:37-44

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

平成 28 年度 広島大学長表彰

主要な学会発表

1. 落合 博, 梅田 茉奈, 林 哲太郎, 芳村 美佳, 原田 哲仁, 大川 恭行, 山本 卓, 二階堂 愛, マウス胚性幹細胞における遺伝子発現量多様性の制御機構の包括的解析, 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 2018 年 9 月 26 日

2. 落合 博, 梅田 茉奈、林 哲太郎、芳村 美佳、原田 哲仁、大川 恭行、山本 卓、二階堂 愛, マウス胚性幹細胞における内因性遺伝子発現ノイズの制御機構の包括的解析, 第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会, 札幌, 2018 年 5 月 24 日
3. 落合 博, 多能性幹細胞における遺伝子発現量多様性の制御機構, 日本大学文理学部生命科学科セミナー 細胞核機能の発現と制御, 東京, 2017 年 6 月 24 日

主要な著作物

1. Hiroshi Ochiai, Imaging Gene Expression: Methods and Protocols, Second Edition (ed. Yaron Shav-Tal), 担当:分担執筆, 範囲: Real-time Observation of Localization and EXpression (ROLEX) system for live imaging of the transcriptional activity and nuclear position of a specific endogenous gene, Springer, 2019, in press
2. 落合 博, 医療応用をめざすゲノム編集 最新動向から技術・倫理的課題まで 真下 知士/金田 安史 編, 担当:分担執筆, 範囲: 生細胞内の特定ゲノム領域のライブイメージング技術, 化学同人, 2018, ISBN: 978-4-7598-1729-4
3. Hiroshi Ochiai, Takashi Yamamoto, Genome Editing in Animals (ed Hatada Izuhu), 担当: 分担執筆, 範囲: Construction and Evaluation of Zinc Finger Nucleases, Springer, 2017, ISBN: 978-1-4939-7128-2
4. 落合 博, All About ゲノム編集 “革命的技術”はいかにして私たちの研究・医療・産業を変えるのか? 真下知士, 山本 卓／編, 担当:分担執筆, 範囲: ゲノム編集技術の細胞核内ライブイメージングへの応用, 羊土社, 2016, ISBN: 978-4-7581-0359-6
5. 落合 博, 実験医学別冊「論文だけではわからない ゲノム編集成功の秘訣 Q&A—TALEN, CRISPR/Cas9 の極意」(山本 卓 編), 担当:分担執筆, 範囲: 哺乳類培養細胞でのゲノム編集, 羊土社, 2015, ISBN: 978-4-7581-0193-6