

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ゲノムスケールの DNA 設計・合成による細胞制御技術の創出」
研究課題「機能的な人工染色体の設計と利用のための革新的研究」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者: 白髭 克彦
(東京大学 定量生命科学研究所 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

・ 動物細胞の転写制御の中心にあるエンハンソームの動作機構の解析を行なった。コヒーシ
ンがエンハンソームの構成因子の一つであること、そして RNA polII の伸長状態への移行に
おいて機能していることを明らかにした。エンハンソームが RNA polII のプロモーターへのリク
ルート以上の役割をもつことを明らかにした重要な発見である。ヒト遺伝学の結果と照らし合わ
せると、CdLS や CHOPS などの先天性発生異常や、急性骨髄性白血病の背景には上述のプロ
セスの異常が共通して存在していることが示唆された。以上の結果は白髭グループの研究に
よるものであり、現在発表論文として取りまとめをしているところである。

・ エンハンサー配列の網羅的同定を企図して染色体高次構造解析手法である Hi-C の高解像
度化を行い、成功した。この手法を用い、さまざまな条件下での染色体構造データを多数取得
した。得られたデータを相互比較したり、ChIP-seq, RNA-seq といった他のゲノム学的データと
統合的に解析したりするためのツール、CustardPy を作製し、公開した。このツールを用い、コ
ヒーシスが果たしているこれまで報告されていなかった機能を発見・報告することができた (Nat
Commun 2022, Nat Commun 2023)。白髭グループによる研究成果である。

・ ヒトゲノム上に大規模な改変を正確に導入するための手法、UKiS 法を開発し、報告した (Nat
Commun 2022, 特許申請済み)。この手法は、ゲノムの両アリルを、薬剤耐性マーカーなどの
「跡」を残さず改変できる点に特徴がある。相澤グループによる研究成果である。

・ エストロジェン誘導性遺伝子 TFF1 を対象に、エンハンサー・シス配列の同定を試みた。Hi-
C/Micro-C により検出されるプロモーターと相互作用のある領域全てを連結した DNA 鎖を合
成し解析したが、十分なエンハンサー活性を示さなかった。構造的な観点だけではシス配列の
網羅的同定に不十分であることが示唆された。そこで、UKiS 法によって染色体上に系統的に
欠失変異を導入するアプローチで未知のシス配列を決定することに現在挑戦している。白髭お
よび相澤グループで共同して取り組んでいる課題である。

・ ゲノムの安定性維持に必要な Smc5/6 複合体が染色体上で結合する部位の特徴解析を行い、
転写によって正の超らせんが蓄積する領域を標的としていることを見出した。In vitro の一分子
解析により、Smc5/6 複合体が確かに正の超らせんを認識、作用することも確かめられた。以上
の成果は白髭グループが Björkegren 研究室(スウェーデン、カロリンスカ研究所)と共同して行
なったものであり、論文として発表することができた (Mol Cell 2024)。

・ 細菌や酵母細胞中で合成した長鎖 DNA に機械的強度を付与するため、プロタミン処理によ
る凝集・安定化を行う系の確立に挑戦した。プロタミン取り込みは、後述する人工核形成の基質
とする上でも重要なステップである。条件検討の末、試験管内である程度プロタミン取り込みを
進行させることはできたが、核形成の基質としては不十分なレベルにとどまっている。そこで、酵
母細胞中でプロタミン高発現により DNA を直接プロタミン化するアプローチにも現在並行して
取り組んでいる。大杉、白髭グループが共同して取り組んでいる課題である。

・ 卵抽出液のような高濃度タンパク質溶液を、活性を保ったままリポソームに内包する技術を確
立した。この系を用い、リポソーム中でカエル精子核と卵抽出液から細胞核形成を行わせること
に成功した。生成した核は、少なくとも核内タンパク質輸送という観点で機能的であった。この
系を用いて、通常とは異なるサイズや膜組成をもつ人工細胞を作成することが可能となった。こ
の成果は竹内グループと大杉グループの共同研究から得られたものであり、特許出願が完了し
ている。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. コヒーシンのエンハンソームにおける機能の解明

概要: DNA モーターであるコヒーシンがエンハンソームの構成因子の一つであること、そして RNA polII の伸長状態への移行において機能していることを明らかにした。動物細胞における転写制御の中心因子エンハンソームが RNA polII のプロモーターへのリクルート以上の役割をもつことを明らかにした重要な発見である。このコヒーシン機能の異常と先天性発生異常や白血病などの疾患の関連についても明らかとなった。

2. コヒーシンが染色体高次構造制御において果たす新規の役割の解明

概要: コヒーシンの機能欠損によって引き起こされる染色体構造異常を高解像度に可視化した大規模データセットを取得した。このデータを、他のゲノム学的データと統合的に解析することで、コヒーシンによる遺伝子発現制御に強く関わる立体構造部位を発見するなど、ゲノムの複雑な立体構造とその機能の一端を解明した。本研究の成果は、がんをはじめとした立体構造の破綻で引き起こされる様々な病気の原因解明に役立つと期待される。

3. ゲノム構造維持における Smc5/6 複合体の機能の解明

概要: ゲノムの安定性維持に必要な Smc5/6 複合体が、転写によって正の超らせんが蓄積する染色体領域を標的として結合していること、ループ形成によって正の超らせん領域の統合をおこなっていることを見出した。Smc5/6 の分子機能の解明へ迫る大きな成果である。また、DNA の超らせん状態の制御がゲノム安定性に関わることを示す重要な発見である。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 大規模ゲノム情報データを統合的に解析する新規立体構造解析手法 CustardPy

概要: さまざまな条件下で取得した染色体構造データ(Hi-C, Micro-C)を、ChIP-seq や RNA-seq など他のゲノム学的手法で得られたデータとともに統合的、横断的に比較解析するためのツール、CustardPy を開発し、公開した。染色体構造データを中心としたマルチオミクス解析を可能とする汎用性の高いツールであると考えている。

2. 大規模かつ正確なゲノム改変のための技術 UKiS の開発

概要: 10万塩基対規模の大きな改変をヒトゲノムに正確かつ自在に導入できる手法、UKiS法を開発した。薬剤耐性遺伝子などの「跡」を残さない改変技術であり、両アリルの改変や、複数箇所にわたる複雑な改変が可能となる。これらの特徴によって、これまで不可能だった組換え細胞株を作成することができるため、産業的応用性も高い。

3. 細胞核を内包するリポソーム生成技術の開発

概要: 機能的な細胞核を内包する脂質二重膜(リポソーム)、すなわち人工細胞を作成することに初めて成功した。この技術の開発には、卵抽出液中のような高濃度タンパク質溶液を活性を保ったままリポソームに収めるためのさまざまなパラメータ調整が必要であった。この技術により、通常とは異なる大きさ、異なる膜組成を持つ人工細胞を作り出すことが可能となり、合成生物学的研究において今後さまざまな展開が期待できる。

<代表的な論文>

1. Large-scale multi-omics analysis suggests specific roles for intragenic cohesin in transcriptional regulation

Wang J., Bando M., Shirahige K., Nakato R.

Nature Communications (2022) 13:3218

概要: ゲノム中のコヒーシン結合部位の中から、遺伝子コード領域中に存在する「転写活性と負の相関を示す」マイナーな結合部位群を見出した。計 100 サンプル以上のゲノムデータを用いた大規模なマルチオミクス解析を実施し、これらの部位でコヒーシンは RNA polII の結合あるいは伸長の阻害という新規の役割を果たしていることを発見した。

2. Context-dependent perturbations in chromatin folding and the transcriptome by cohesin and related factors

Nakato R., Sakata T., Wang J., Nagai L.A.E., Nagaoka Y., Oba G.M., Bando M., Shirahige K.
Nature Communications (2023) 14:5647

概要：大規模なゲノム学的データを統合的に解析する新規立体構造解析手法 CustardPy を開発した。系統的に取得した Hi-C データなど様々なゲノム学的データをもとに、CustardPy による大規模マルチオミクス解析を実施した。その結果、2 Mb を超えるような染色体領域間での相互作用形成にもコヒーシスが機能していることや、遺伝子の発現制御に強く関わる新規の立体構造部位を発見するなど、ゲノムの複雑な立体構造とその機能の一端を解明した。

3. Biallelic and gene-wide genomic substitution for endogenous intron and retroelement mutagenesis in human cells

Ohno T., Akase T., Kono S., Kurasawa H., Takashima T., Kaneko S., Aizawa Y.
Nature Communications (2022) 12:4219

概要：ヒトゲノム中の任意の長大な領域を正確かつ自在に置換する技術 UKiS (Universal Knock-in System) を開発した。UKiS を用いて TP53 遺伝子の最大のイントロンを対象とした様々なゲノム改変を実施し、イントロン中の Alu 配列が TP53 発現に抑制的な機能をもつことを見出した。UKiS は非コード領域を対象としたヒトゲノム改変において標準的なツールとなるものと考えている。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 白髭グループ

研究代表者：白髭克彦(東京大学定量生命科学研究所 教授)

研究項目

- ・発現制御機構の再構築系による研究
- ・染色体脆弱性の分子基盤の解明
- ・酵母細胞内での長鎖 DNA 安定化技術の開発

② 大杉グループ

主たる共同研究者：大杉美穂(東京大学大学院総合文化研究科 教授)

研究項目

- ・長鎖DNAの安定化および核化

③ 竹内グループ

主たる共同研究者：竹内昌治(地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所 研究開発部・実用化実証事業・人工細胞膜システムグループ グループリーダー)

研究項目

- ・人工細胞核のリボソームに対する封入技術の開発

④ 相澤グループ

主たる共同研究者：相澤康則(東京工業大学生命理工学院 准教授)

研究項目

- ・長鎖 DNA 合成系の確立・最適化
- ・ヒト細胞内での染色体大規模改変

⑤ 野澤グループ

主たる共同研究者：野澤佳世(東京工業大学生命理工学院 准教授)

研究項目

- ・コヒーシオン依存的な転写制御とクロマチン構造変換の構造機能解析

⑥ Canela グループ

主たる共同研究者: **Andres Canela** (京都大学白眉プロジェクト 特定准教授)

研究項目

- ・Characterization of the molecular mechanisms of Topoisomerase II in cohesin compaction of chromatin.

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

スウェーデン、カロリンスカ研究所の **Camilla Björkegren** 教授と、ゲノム安定性維持に必要な Smc5/6 複合体の機能解析に関する研究を共同して実施してきた(白髭グループ)。領域内の CREST 香月チームと共同し、ヒトゲノムの縮小化(生育に必須な最小限の遺伝子・機能エレメントからなるゲノムの構成)を志向した研究を実施してきた(相澤グループ)。