

論文の内容の要旨

論文題目 メジャーサテライトの転写によるクロマチン構造制御の解析

氏 名 木下隆太

【序論】

生命の遺伝情報は DNA によって保持されているが、その DNA は高度に折り畳まれた構造を形成しており、この構造を一般的にクロマチン構造と呼ぶ。クロマチン構造には、その凝集度を変化させることで、DNA への転写因子のアクセスを調節するという役割が存在する。これにより、状況に応じた遺伝子発現制御を可能にし、細胞の多様性の形成や、外的刺激への対応といったことに貢献している。よって、クロマチン構造がどのように制御されているかを明らかにすることは、生物学的に重要なことであるが、その全貌は明らかになっていない。

メジャーサテライト DNA はマウスに存在するタンデムなリピート配列の一種である（図1）。この領域からはノンコーディング RNA が転写されていることが分かっていたが、その機能は未知であり、そもそも生物学的意義があるか疑わしいとすら考えられていた。一方で、近年の研究によりクロマチン構造との関連性が指摘されている (Saksouk et al., 2015, Shirai et al., 2017) が、リピート配列という特徴から遺伝子操作が困難という特性を持ち、具体的な役割はわかっていない。そこで、私はメジャーサテライトの転写を遺伝子的に操作する手法を開発し、それを用いてメジャーサテライトからの転写がクロマチン構造に対してどのような役割を持つかについて検討した。

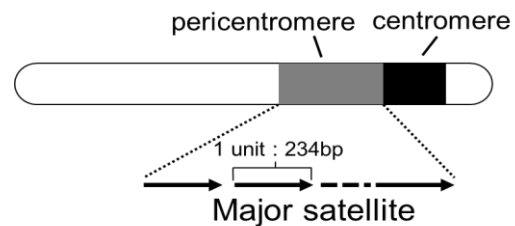


図1：染色体におけるメジャーサテライトの位置

【実験方法・結果】

1. メジャーサテライトの転写を操作する手法を確立した

メジャーサテライト RNA はリピート配列由来であるという特徴から、これまで転写量の操作が困難であった。これを克服するため、私は CRISPRa (CRISPR activation) と呼ばれる技術を用い、ゲノムからのメジャーサテライト RNA の強制的な転写を試みた（図2）。CRISPRa とは、guide RNA とともに dCas9 (Cas9 のゲノム切断活性を喪失させた変異体) に転写活性化

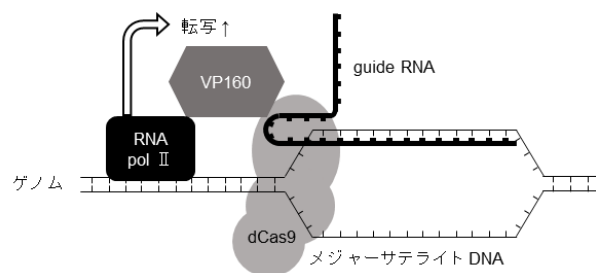


図2：CRISPRa の概念図

因子を融合させたタンパク質を発現させることで、guide RNA の配列依存的に転写を制御するシステムのことである。マウス繊維芽細胞において、CRISPRa を用いて実際にメジャーサテライトの強制的な転写を試みたところ、2 種類の guide RNA でメジャーサテライト RNA の量が増加した。すなわち、ゲノムが

らメジャーサテライト RNA を強制的に転写させることに成功した。

2. メジャーサテライトの強制転写により、DNA 染色像の劇的な変化が観察された

メジャーサテライトの転写がクロマチン構造にどのような役割を持つかについて検討する

ため、前述の系によってマウス線維芽細胞においてメジャーサテライトを強制転写させたのちに、Hoechst により DNA を染色した。その結果、dCas9 とともにコントロールの guide RNA (Luc#1, Luc#2) を導入された細胞では、核内で粒上のシグナルが観察された。しかしながら、一方でメジャーサテライトをターゲットした guide RNA (Masat#1, Masat#2) を導入した細胞では、粒上のシグナルははっきりと観察されなかった(図3)。この粒上のシグナルは一般的に「クロモセーター」と呼ばれ、DNA 染色試薬が強く染まることから DNA が密に凝集しているヘテロクロマチン領域であると考えられている

(Ostromyshenskii et al., 2018)。このことから、メジャーサテライトの強制転写によってクロマチン構造に何らかの影響が出たと考えることができる。

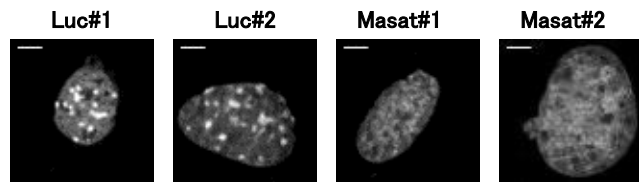


図 3：メジャーサテライト強制転写後の DNA 染色像 (scale bar 5μm)



図 4：クロマチン構造の全体像

3. メジャーサテライトの強制転写により、コンパートメントの凝集度に変化が生じた

近年、計算科学的なシミュレーションによりクロモセーターがコンパートメント構造の形成に重要であることが示唆されている。コンパートメント構造とは、ゲノムの広範な領域が集合している構造のことであり、それぞれ大きく分けて核内に 2 種類存在していると思われる。一つは、転写が活性化している領域同士の集合体 (A コンパートメント) であり、転写が不活性な領域同士の集合体 (B コンパートメント) である(図4)。私は、2.の結果から「メジャーサテライトの強制転写はコンパートメント構造にも影響を及ぼす」可能性を考え、メジャーサテライトの強制転写を行ったマウス線維芽細胞を用いて Hi-C を行い、得られたデータを解析した。Hi-C 法とは、ゲノム上の任意の 2 点の相互作用の頻度を調べることで、3 次元

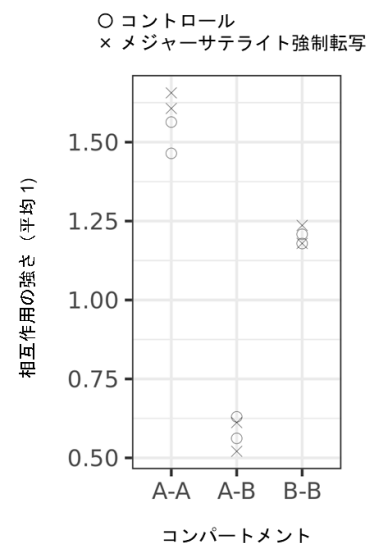


図 5：メジャーサテライトの強制転写によるコンパートメント同士の相互作用の変動

ると、意外なことに、メジャーサテライトの強制転写によってそれぞれのゲノム領域が所属するコンパートメントはほとんど変化しなかった。しかし一方で、メジャーサテライトの強制転写によって、A コンパートメント同士の凝集度が増加する傾向が再現的に見られた(図5)。この結果から、メジャーサテライトの強制転写により A コンパートメントと B コンパートメントの分離が進んだと考えられる。

4. メジャーサテライトの強制転写により、TAD 構造が弱まった

3. の結果によりコンパートメントの分離が進んだことが示唆されたが、この結果がより小さなクロマチン構造構成単位である TAD 構造にどのような影響を及ぼすかについて調べた。

TAD (topological associated domain) 構造は、Hi-C 法によって見出されたクロマチン構造の形態の一種であり、染色体上である程度近接している領域が形成している(Dixon et al., 2012)(図4)。すると、メジャーサテライトの強制転写によって、TAD 内部の平均シグナルが再現的に減少した(図6)。このことから、メジャーサテライトの転写は、TAD 構造を弱める働きがあることが示唆された。

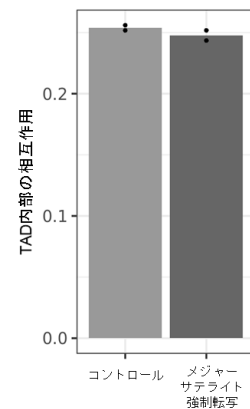


図6：メジャーサテライトの強制転写によるTAD 内部の相互作用の変動

5. メジャーサテライトの強制転写により、長距離間相互作用が増加した

3.の結果からコンパートメントの分離がより進むことが示唆されたことから、私は相互作用の距離に注目した。なぜなら、相互作用のうち長距離のものは主に同一コンパートメント同士の相互作用に主に起因しているからである。そこで、私は染色体の1次配列上の距離に注目して Hi-C のデータを解析した。すると、予想通りメジャーサテライトの強制転写によって相互作用のうち長距離のものが増加することが分かった(図7)。

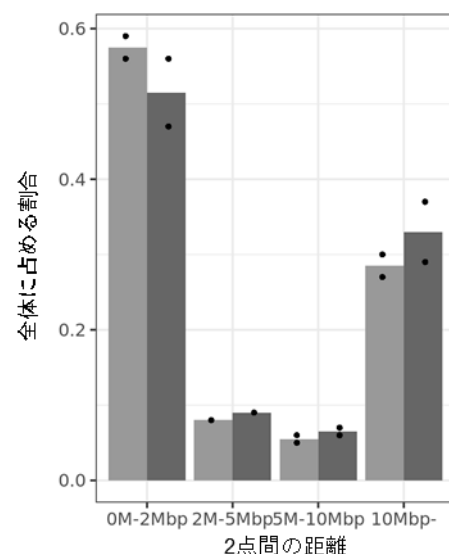


図7：メジャーサテライトの強制転写による長距離間相互作用の変動

6. 内在のメジャーサテライトの発現についても、メジャーサテライトの強制転写によって観察された傾向が得られる。

メジャーサテライトの強制転写によって、コンパートメント構造の変化を観察したが、内在のメジャーサテライトの発現についても同様のことが言えるかについて検証した。そのために、私は ES の分化の系に注目した。ES 細胞から神経系前駆細胞(NPC)に分化する過程において、メジャーサテライトの発現量が減少することが知られている(Efroni et al., 2008)。私は、公共のデータベースを用いることで、ES から NPC に分化する過程で、メジャーサテライトの発現量の傾向と、コンパートメント構造と TAD 構造の状態について調べた(Bonev, 2017)。すると、確かにメジャーサテライトの発現は ES で NPC より高かった。このとき、コンパートメント構造の凝集度は A コンパートメント同士の凝集度が ES で高く、また TAD 内の平均シグナルは ES で低かった(図8, 図9)。このことは、メジャーサテライトの強制転写によって観察された結果と傾向が一致する。このこと

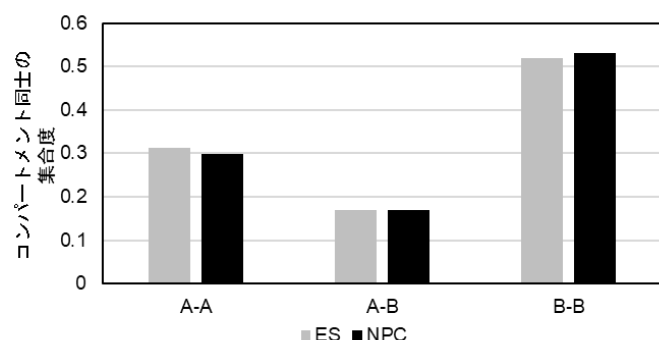


図8：ES と NPC におけるコンパートメント同士の集合度

と、確かにメジャーサテライトの発現は ES で NPC より高かった。このとき、コンパートメント構造の凝集度は A コンパートメント同士の凝集度が ES で高く、また TAD 内の平均シグナルは ES で低かった(図8, 図9)。このことは、メジャーサテライトの強制転写によって観察された結果と傾向が一致する。このこと

から、内在のメジャーサテライトの転写によっても、コンパートメント構造の変化や TAD 構造の変化が引き起こされている可能性があると考えられる。

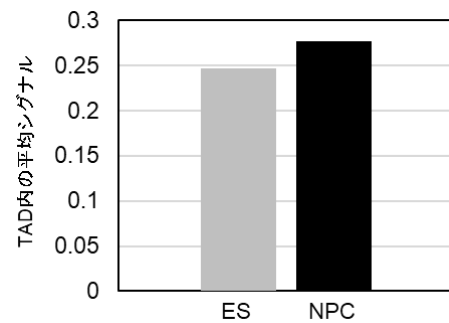


図9 : ES と NPC における TAD 内の平均シグナル

【まとめと考察】

本研究においては、メジャーサテライトの転写を強制的に行う系を確立し、それを用いてこれまで関係性が不明確であった、メジャーサテライトとクロマチン構造の関係について検討した。すると、クロモセンターの様子が不明瞭なものになり、またコンパートメント構造や TAD 構造が変化することを見出し、また染色体の 1 次配列上では大きく離れた 2 点間の相互作用が増えることを見出した。

メジャーサテライトの強制転写によりクロモセンターの様子が変化した、近年クロモセンターは相分離により形成されていること、およびメジャーサテライトの転写産物が相分離を弱める方向に関与していること、が示唆されている。また、クロモセンターはこれまでコンパートメント構造の形成に重要であるということが計算科学的なシミュレーションにより示唆されている (Falk et al., 2019)。以上のことからメジャーサテライトの転写は、相分離の変化によりクロモセンターの变化を誘起し、コンパートメントの変化を惹起したのではないかと考えられる。また TAD 構造は、一般的にコンパートメント構造に内包されるものである (図4)と考えられているが、一方でこれら構造は独立しており、互いに競合しているという知見もあり (Rowley et al., 2018)、コンパートメント構造が強まったことにより、TAD が弱まった可能性が考えられる。

メジャーサテライトの転写は、細胞の分化、細胞老化、細胞周期、ストレス刺激などの多様なコンテキストで上昇することが知られている。そこでメジャーサテライトからの転写がコンパートメント構造や TAD 構造の制御を介して、これらの現象に寄与している可能性があり、クロマチン構造レベルでこれらの現象の理解が進むことを期待している。