

■受領No.1355

ゲノム編集・分子バーコード・一細胞解析を融合した機能的転写ネットワーク解析法の開発

代表研究者

北條 宏徳

東京大学大学院医学系研究科 助教



1. 研究目的

個体発生や細胞の運命決定において、マスター転写因子群が中心的な役割を果たす。これらの蛋白質は、エンハンサー領域と呼ばれるゲノム上の特定の転写制御領域に結合することで、標的遺伝子の発現を制御し生物学的機能を発揮する。次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降-シークエンス (ChIP-seq) 法の発展により、マスター転写因子群の結合部位がゲノムスケールで明らかになってきた。しかしながら、数千領域にも及ぶ膨大な数の結合領域の中で、機能的に重要なエンハンサー領域を明らかにする手法はほとんど開発されておらず、その機能解析は未だ困難を極めている。そこで本研究では、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集技術と一細胞RNA-seq解析技術を融合することで、転写制御領域の機能を一細胞単位で解析する新しい研究手法の確立を目指した。研究代表者がこれまで取り組んできた骨発生におけるマスター転写因子群による骨形成転写ネットワークをモデルに、一細胞エンハンサースクリーニング法を開発し、機能的な骨形成転写ネットワークの構築を目指した。

2. 研究内容

2.1 骨発生エンハンサー候補選定

本年度はまず骨形成を担う骨芽細胞において、マスター転写因子群のゲノム結合部位データ、エピゲノムデータ、転写産物データおよび脊椎動物

ゲノム配列保存情報を統合することで、骨発生において特異的にはたらくエンハンサー候補を選定した。公共データベースおよび、研究代表者が別プロジェクトで取得した骨発生マスター転写因子群のChIP-seqデータをもとに、有望なエンハンサー候補を選定した。本研究においては、スクリーニングシステムのproof of conceptを示すため、10種類のエンハンサーに絞り検討を行った。

2.2 ガイドRNA レンチウイルスライブラリー作製

各エンハンサー候補領域を標的とするガイドRNAウイルスライブラリーを作製した。ガイドRNA配列をsingle-cell RNA-seqプラットフォームで解析可能なCROPseqベクターを用いた。当初、分子バーコードを有する別のウイルスベクターを使用予定であったが、文献に基づく検討の結果、CROPseqベクターを用いることとした。これにより、分子バーコードとガイドRNA配列の対応付けにかかる煩雑な実験と解析を回避できることが明らかになった。

各エンハンサー候補に対して3種類、合計30種類の異なるガイドRNA配列を有するベクターを構築後、これらを統合し、ウイルスパッケージング用ベクターおよび組み換え用ベクターと一緒に293T細胞に遺伝子導入し、レンチウイルスライブラリーを作製した。また、Cas9を恒常的に発現する骨芽細胞株を作製し、本レンチウイルスライブラリーを感染させた。CROPseqベクターにはピュ

ーロマイシン耐性遺伝子がコードされているため、ウイルス感染細胞をピューロマイシンにより選別後、リコンビナントヒト Bone morphogenetic protein (rhBMP2)を一週間曝露し骨芽細胞の分化を誘導した。

2.3 一細胞バーコード付与と一細胞 RNA-seq 解析

上記で準備した細胞群から、酵素処理により細胞を単離後、一細胞ごとに10x Genomics社の Chromium システムによる一細胞バーコード (Droplet バーコード) 付与を行った。Total RNA を抽出し一細胞RNA-seq解析を行うことで、各 Dropletバーコードに対する遺伝子発現プロファイルとgRNAプロファイルを得た。今回解析した8,800細胞の内、その大部分が一細胞あたり一種類のガイドRNAが検出された。バイオインフォマティクスの手法を用いて、各細胞におけるGenotype (エンハンサー欠損部位) と、Phenotype (遺伝子発現プロファイル)を対応付けることで、どのエンハンサー候補群が、骨芽細胞の分化に寄与するか絞り込んだ。これにより、有望エンハンサーが同定された。

2.4. 検証実験

これまでに選別された有望エンハンサー候補領域に対して、CRISPR/Cas9システムを用いたエンハンサー欠損骨芽細胞株を作製し、骨芽細胞分化における候補エンハンサーの寄与を検討した。野生型骨芽細胞株において、rhBMP2曝露により骨芽細胞分化マーカーの発現が顕著に上昇したが、候補エンハンサー欠損株においては、そのマーカー発現は有意に減少した。骨芽細胞分化の指標であるアルカリフォスファターゼ染色の結果、野生型骨芽細胞株と比較して候補エンハンサー欠損株においては、染色性の減弱が確認された。また、候補エンハンサーの標的遺伝子に関しても、野生型骨芽細胞株と比較して候補エンハンサー欠損株においてその発現は有意に減少していた。

2.5. 結論

本スクリーニングで得られたエンハンサー領域は骨芽細胞の分化に必要であることが示唆された。

2.6. 今後の予定

現在、よりハイスループットなスクリーニングを遂行するため、エンハンサー候補を増やし、新たなガイドRNAライブラリーを構築中である。将来的にはエンハンサー候補の機能を網羅的に解析することで、骨発生に寄与するエンハンサー群を同定するだけでなく、既知の骨形成転写ネットワークと統合することで、骨形成転写ネットワークモデルの構築を目指す。

3. 発表 (研究成果の発表)

特になし