

【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、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。

【方法】 骨発生エンハンサー候補選定のため、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用いた。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の作製のため、CROPseq ベクターを用いた。10x Genomics 社の Chromium システムを用いて一細胞 RNA-seq 解析を行った。

【結果】 エンハンサースクリーニングのため、エンハンサー候補領域群を標的とするガイド RNA を有する CROPseq ベクター由来ウイルスライブラリーを作製した。本ライブラリーを、Cas9 恒常骨芽細胞株に感染させた後、骨誘導シグナル因子の rhBMP2 を一週間曝露し骨芽細胞の分化を誘導した。その後、酵素処理により細胞を単離し、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。本サンプルで一細胞 RNA-seq 解析を行うことで、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) を対応付けた。これにより、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み、有望なエンハンサー候補が同定した。さらに、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。その結果、エンハンサー領域のノックアウトにより標的遺伝子および骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現が減少することが確認された。以上より、骨格発生における転写制御ネットワークの一端が明らかになった。

同定したエンハンサーの骨芽細胞分化に与える影響

