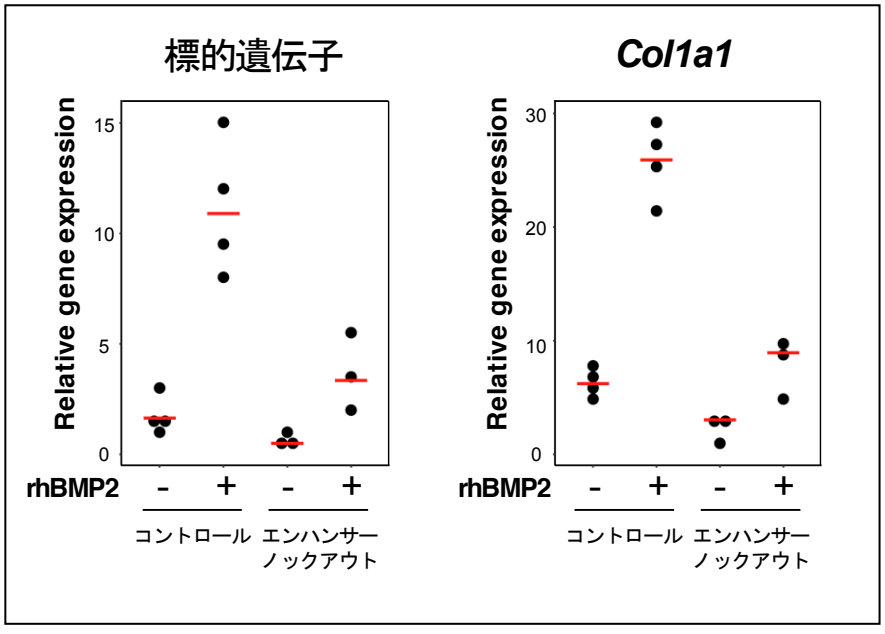
201　ゲノム編集と一細胞解析を用いた転写ネットワーク解析	北條　宏徳

【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



201. ゲノム編集と一細胞解析を用いた転写ネットワーク解析

北條　宏徳

東京大学 大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 臨床医工学部門

Key words：ゲノム編集，転写ネットワーク，エンハンサー，骨芽細胞

緒　言

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。

方　法

1.　骨発生エンハンサー候補選定

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。

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の作製のため、CROPseq ベクターを用いた。

3.　一細胞 RNA-seq 解析

10x Genomics 社の Chromium システムを用いて一細胞 RNA-seq 解析を行った。

4.　検証実験

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。

結果および考察

1.　骨発生エンハンサー候補選定

骨形成を担う骨芽細胞において、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［1］に加え、公共データーベースに登録済みのエピゲノムデータ、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統合解析により、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。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.　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 プラットホームで解析可能な 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。

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。

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顕著に減少した。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。

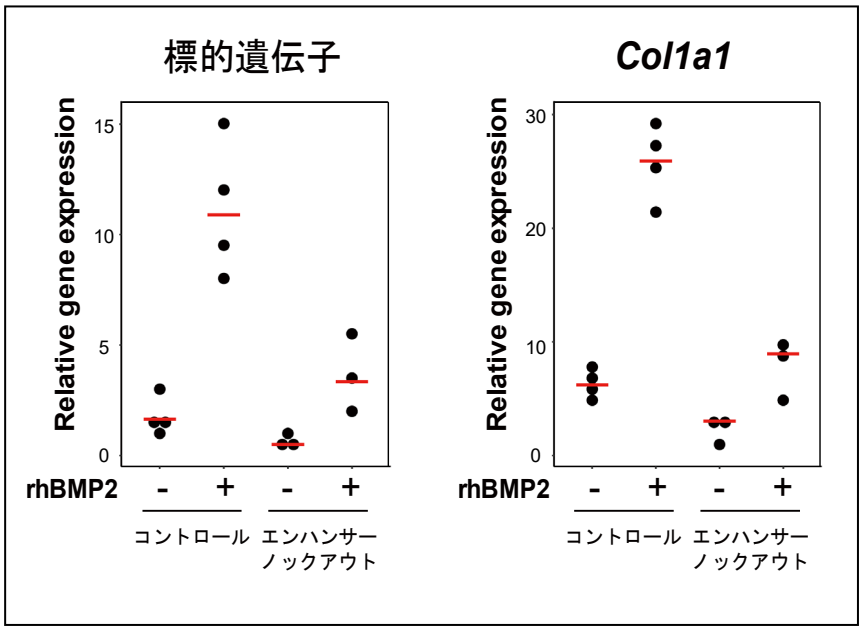


図1. 同定したエンハンサーの骨芽細胞分化に与える影響

骨芽細胞株 MC3T3E1 において Crispr/Cas9 system によりエンハンサー領域をノックアウトした細胞を用いて、リコンビナントヒト BMP2（rhBMP2）含有の骨芽細胞分化誘導培地で 7 日間培養した。その後 RT-qPCR 法によりエンハンサーの標的遺伝子と骨芽細胞分化マーカー*Col1a1* 遺伝子の発現を検討した。その結果、エンハンサーノックアウトにより、標的遺伝子および *Col1a1* 遺伝子の顕著な減少が認められた。

考　察

本研究に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。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。

文　献

1）　Hojo H, Ohba S, He X, Lai LP, McMahon AP. Sp7/Osterix Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a Dlx Co-factor in Osteoblast Specification. Dev Cell. 2016;37(3):238–253. PMID: 27134141 doi:10.1016/j.devcel.2016.04.002