

平成 31 年 6 月 24 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 715

氏

名

西判 国平

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1 用務地(派遣先国名) 用務地. モンペリエ (国名. フランス)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

新規エピゲノム制御因子解析法の確立

3. 派遣期間 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 25 日

4. 受入機関名及び部局名

フランス国立科学研究センタ 人遺伝学研究所 (Institute of Human Genetics, CNRS)

5. 所期の目的の遂行状況及び成果・書式任意

書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入)

も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10 別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

<要約>

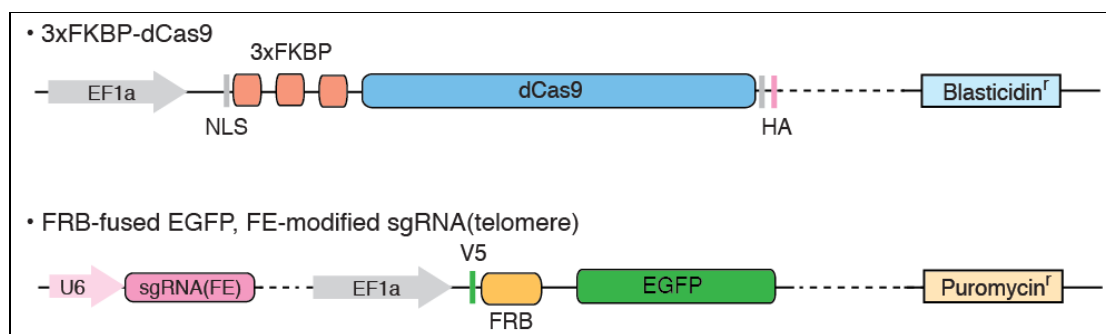
派遣先での研究は、概ね計画通り行った。ただし ChIP-seq など一部の実験については、研究を進める上で不必要であると判断し実施しなかった。本研究では、新規エピゲノム制御因子解析法の確立を最終目標とし、初年度に誘導性のテザリングシステムとレポーターアッセイ系の確立を行い、年目にこれらのシステムを用いて詳細な解析を行った。本研究内容について国際学会で二度ポスター発表を行い、日本国内の学会でも口頭発表を二度行った。また、研究内容について派遣期間内に論文を発表することはできなかったが、論文投稿に必要な実験は終えており、現在論文投稿準備中である。以下に研究内容とその実施状況の詳細について示す。

<研究の概要>

本研究では、エピゲノム制御因子の直接的な機能を検証するために、特定のゲノム領域にクロマチンタンパク質を任意のタイミングで局在化させる手法を確立することを目的として研究を行った。また、この技術をレポーター遺伝子アッセイと組み合わせることで、既存の解析手法とは異なる新しい実験法を確立することを最終目標とした。研究のステップは、① CRISPR/Cas9 システムとラパマイシン依存的に二量体を形成する技術を応用した特定のゲノム領域へ任意のタイミングで結合させる手法の確立、② アブシシン酸依存的に転写を誘導できるレポーター遺伝子を保有する ES 細胞株の作成、③ レポーター遺伝子の転写開始上流領域やイントロン領域にクロマチンタンパク質を局在化させた時のレポーター遺伝子の発現量の変化を定量的に解析する手法の確立、の 3 つに分けることができる。最初の一年間で①と②の研究内容がほぼ完了した。二年目の期間で③の研究を行った。実施した研究についてそれぞれ詳細を後述する。

<① CRISPR/Cas9 システムと小分子二量体化技術を応用した特定のゲノム領域へ任意のタイミングで局在化させる手法の確立>

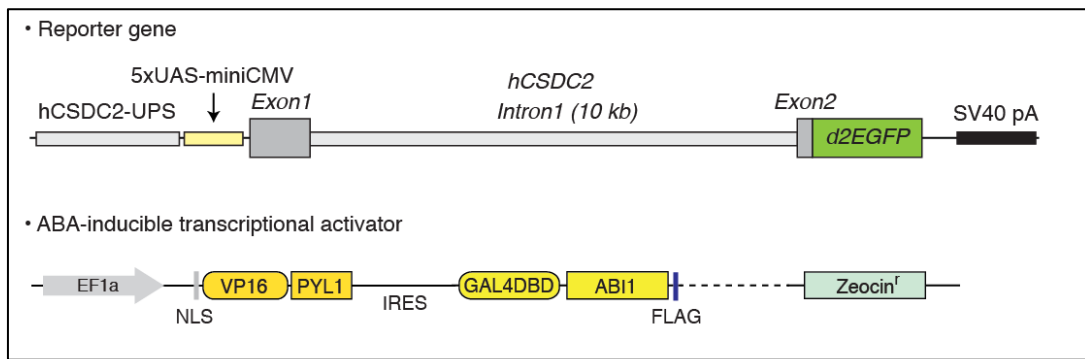
CRISPR/Casシステムはバクテリアが持つ外来遺伝子に対する獲得免疫システムであるが、これを他の生物に応用することでゲノム編集が簡便にできるようになった。またDNAの切断活性を欠いたCas9 (dCas9)を用いることでPAM配列を含む任意の領域に特定のタンパク質を結合させることが可能である。放線菌から単離されたラパマイシンはFKBP (FK506 binding protein) と複合体を形成し、mTOR (mammalian target of rapamycin) 内のFRB (FKBP-rapamycin binding domain) ドメインと相互作用する。そして、この現象を応用して異なる2つのタンパク質をラパマイシン存在下でのみ結合させる技術が確立された。自身の研究では、これら2つの技術を組み合わせ、任意の場所、タイミングで特定のタンパク質を局在化する技術の開発を試みた。これまでに、dCas9に直接蛍光タンパク質を融合することで、テロメア領域の生細胞での可視化を行った研究例が報告されている (Chen et al., 2013, *Cell*)。そこで、二量体化が特定のクロマチン領域で起こっているかどうかを評価するために、ラパマイシンによる蛍光タンパク質のテロメア局在化実験を行った。まず、dCas9タンパク質にFKBPドメインを、EGFPタンパク質にFRBドメインをそれぞれ融合し発現するコンストラクトの設計を行った。また、テロメア配列に対するガイドRNAの発現に必要な配列をEGFP-FRBのプラスミドに組み込んだ。ガイドRNAはCas9タンパク質との親和性を増したシングルガイドRNA (FE-modified sgRNA)を用いた。さらに、毒性の低いラパマイシンアナログの検討などを行った。各ドメイン配列の場所、個数、リンカー配列などの検討を行い、最終的に使用したコンストラクトの模式図を以下に示す。それぞれのタンパク質の発現にはEF1aプロモーターを用いた。



これらのコンストラクトを、レンチウイルスを用いてES細胞内に導入し、各選択マーカーを用いて発現細胞を選抜した後、dCas9タンパク質のテロメア局在、ラパマイシンの有無によるEGFP局在の変化を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、dCas9 が正常にテロメアに局在し、細胞内で拡散した状態のEGFPがラパマイシン存在化ではテロメア上に集積することが確認できた。

<② アブシシン酸誘導性レポーター遺伝子の作成とその検証>

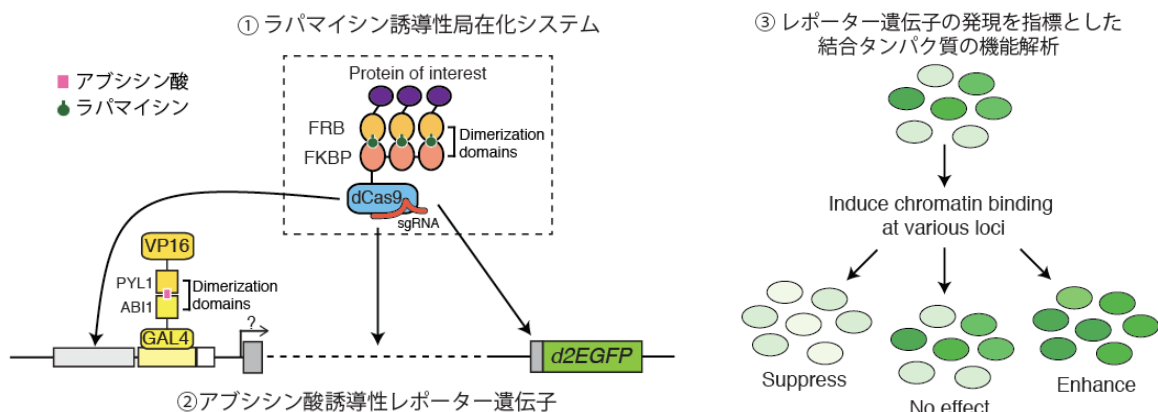
これまでに種々のレポーター遺伝子を用いたアッセイ系が構築され利用されているが、本研究の遂行に必須な要素は3つ存在する。まず一つ目にガイドRNAのターゲットがゲノム中に存在しないこと、さらに転写の活性化と抑制化を検証するために、転写レベルを調節できかつリアルタイムで発現量を観察できること、そしてプロモーターだけでなく遺伝子領域内のエピジェネティック修飾の転写やスプライシングへの影響を検証するためにイントロン領域を組み込むことである。それらの条件を満たすために、エキソン1と2の間に長いイントロンを持つヒト由来の遺伝子 (CSDC2) をクローニングし、loxP配列を含む導入プラスミドにクローニングした。またレポーター遺伝子にはdestabilized-EGFP (d2EGFP)を用いることでよりリアルタイムの転写に近い発現がモニタリングできるようにした。さらに、転写を誘導できる転写活性化装置として、アブシシン酸で二量体化を誘導されるタンパク質 (ABI1, PYL1) に、UAS (upstream activating sequence)に結合するGAL4タンパク質と転写を活性化するVP16タンパク質をそれぞれ融合したコンストラクトを作製した。以下に作製したレポーター遺伝子と転写活性化装置を発現させるためのコンストラクトの図を示す。



loxP 組み換え配列が β -globin 領域に導入されたマウス ES 細胞株を用いて、レポーター遺伝子を細胞に導入し、細胞株を樹立した。さらにアブシシン酸誘導性の転写活性化装置を発現するコンストラクトをこの細胞株に導入し、新たに細胞株を樹立した。そして、レポーター遺伝子がアブシシン酸で誘導発現することを蛍光顕微鏡や定量的な逆転写 PCR 解析さらに Flow cytometry を用いて確認した。その結果いずれの手法においても GFP シグナル(または GFP 遺伝子)がアブシシン酸 (ABA) 存在下でのみ発現していることが確認できた。さらに ABA 濃度依存的に発現量が変化することや ABA を培地から取り除くと速やかに発現が抑制される事が明らかとなった。

＜③レポーター遺伝子の特定の場所にクロマチンタンパク質を局在化させた時の遺伝子調節の検証＞

最後に、作製したラパマイシン依存的な特定のクロマチン局在システムとレポーターアッセイシステムを組み合わせ、ヘテロクロマチン関連因子の機能について検証した。最初にヘテロクロマチンの主要な構成因子である HP1 を用いた解析を行った。その結果、HP1 がラパマイシン依存的にターゲット領域に局在化できること、そして HP1 がヘテロクロマチンの代表的なヒストン修飾である H3K9me3 化を誘導することが確認できた。次に転写開始点付近に局在させた場合に転写抑制活性があるかどうかをレポーター遺伝子の発現で確認した。その結果、HP1 の局在化によって誘導されたヘテロクロマチン構造が転写を抑制できる事が分かった。さらに、詳細な結果は割愛するが、その他のヘテロクロマチン因子の解析や場所特異的な機能についても研究を行い、新たな知見を得た。以上より、一連のシステムが想定した通りに働く事を確認し、最終研究目標である新しいエピゲノム因子解析手法の確立に成功したと考えている。本研究で確立した手法の概略図を以下に示す。



＜成果の発表・関係学会への参加状況＞

派遣期間内に論文発表をすることはできなかったが、研究自体は概ね完遂した。現在論文投稿の準備中であり、遅くとも年内には投稿する予定である。また研究の各段階において関係学会に参加し、国際学会で二度ポスター発表を、日本国内の学会で二度口頭発表を行った。それぞれ自身の研究内容について周知できただけでなく、国内外の研究者の方々と交流でき、有意義であった。