

令和 3年 4月 29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 2019年度

受付番号 201960115

氏名 小林 航

(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: ウィーン (国名: オーストリア)
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。  
転写因子依存的なクロマチン再編成による分化全能性獲得機構の解析
3. 派遣期間: 平成 31年 4月 1日 ~ 令和 3年 3月 31日
4. 受入機関名及び部局名  
受入機関名: Austrian Academy of Sciences  
部局名: Institute of Molecular Biotechnology
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。

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の個体発生は、減数分裂を経て終末分化した精子と卵が融合した受精卵から開始される。受精卵はその後、卵割を繰り返すことで胚発生を進行させていく。その過程において、マウスの1細胞期および2細胞期までの胚は、一個体の形成が可能な分化全能性を有する。受精卵の発生は、卵に存在する mRNA やタンパク質などの母性因子によって制御され、その後母性因子の分解に伴い胚性ゲノムから転写された因子によって制御される。この受精後初めに引き起こされる遺伝子発現は胚性ゲノムの活性化(Zygotic genome activation)と呼ばれ、受精卵のその後発生に必須であることから、細胞の分化全能性の獲得に重要な現象であることが考えられている。これまでに、胚性ゲノムの活性化の過程において、父方と母方のエピゲノム状態のリプログラミング及び大規模なクロマチンの再編成が行われることが報告されている。しかし、受精卵がどのように胚性ゲノムを活性化し、分化全能性獲得するのか、その機構は明らかになっていない。

分化全能性の獲得機構に重要な候補因子として、パイオニア転写因子が挙げられる。パイオニア転写はヌクレオソーム上の標的 DNA 配列を認識し、閉じたクロマチンを開くことで転写を促進することが知られている。その過程において、パイオニア転写因子はヒストン修飾酵素やクロマチンリモデリング因子、その他の転写因子をリクルートすることで転写活性化を制御することが考えられている。実際に、パイオニア転写因子である *Zelda* は標的 DNA 配列を含むヌクレオソームに直接結合し、ハエにおける胚性ゲノムの活性化に引き起こすことが報告されている(Liang *et al.*, *Nature*, 2008)。一方で、ゼブラフィッシュでは分化多能性に関わる *Nanog* や *Sox* といった転写因子が胚性ゲノムの活性化において重要な役割を果たす(Leichsenring *et al.*, *Science*, 2013; Lee *et al.*, *Nature*, 2013)。したがって、パイオニア転写因子依存的な胚性ゲノムの活性化は種間を超えて保存されていることが想定されるが、哺乳類における胚性ゲノム活性化のトリガー因子は未だ同定されていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、転写因子依存的な着床前初期胚の分化全能性機構の解明を目的とする。そこで本研究は、マウスの胚性ゲノムの活性化に関わる因子をスクリーニングし、その分子機構の解明を目指す。具体的には、スクリーニングによって得られた候補因子をリコンビナントタンパク質として精製し、生化学的手法によりパイオニア転写因子としての機能を検証する。また、候補因子による胚性ゲノム活性化機構を明らかにするために、微量ゲノム解析手法を駆使し、候補因子の結合領域をゲノムワイドに同定する。さらに、候補因子によって誘起されるエピゲノム変化及びクロマチン再編成機構について、エピゲノム解析と Single-nucleus Hi-C 法を用いて明らかにする。

## 3. 研究・調査実施状況

### (1) 候補因子の生化学的解析

派遣先である Tachibana 研究室では、トランスクリプトームおよびプロテオーム解析の結果から胚性ゲノムの活性化を制御する候補因子を選定し、独自に開発したスクリーニングを行っている。そこで本研究では、これまでのスクリーニングにより得られた胚性ゲノムの活性化に関わる因子の一つをリコンビナントタンパク質として精製し、パイオニア転写因子として機能を検証するために生化学的解析を行うことを目的とする。

まず、パイオニア転写因子のコントロールとして、ハエ由来の *Zelda* タンパク質の DNA 結合ドメインの精製を試みた。構築した発現ベクターを大腸菌内に導入した後、*Zelda* の DNA 結合

ドメインを細胞内で過剰発現させた。発現させたタンパク質をアフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製した後、最終精製物とした。精製したタンパク質の DNA 結合特異性を確認するために、その標的塩基配列を含む DNA を調製し、ゲルシフトアッセイ法による解析を行った。解析の結果、Zelda の DNA 結合ドメインは標的塩基配列を含む DNA に対して特異的に結合することがわかった。

パイオニア転写因子の特徴の一つとして、ヌクレオソーム上の標的塩基配列を認識し、結合することが挙げられる。この仮説を検証するために、候補因子によるヌクレオソーム結合解析を行った。まず、マウス由来のコアヒストン H2A、H2B、H3.3 および H4 をリコンビナントタンパク質として精製した。精製したヒストンタンパク質を用いてヒストン 8 量体を再構成し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって精製した。さらに、精製したヒストン 8 量体と DNA を混合し、塩透析法によってヌクレオソームを試験管内で再構成した。再構成したヌクレオソームは、分取用電気泳動装置 Prepcell により精製した。精製したヌクレオソームを用いてゲルシフトアッセイを行った結果、Zelda の DNA 結合ドメインはその標的配列を含むヌクレオソームに結合することがわかった。

## (2) 超微量 CUT&Tag の確立

候補因子による胚性ゲノムの活性化制御機構を明らかにするためには、ゲノム上におけるその結合領域とエピゲノム状態の変化を解析することが必須である。ヒストン修飾や転写因子等の DNA 結合タンパク質の結合領域をゲノムワイドに解析する方法として、クロマチン免疫沈降法(ChIP)と次世代シーケンサーを組み合わせた ChIP-seq 法が広く用いられている。しかし、ChIP-seq 法を用いた解析では多くの細胞数を必要とするため、着床前初期胚などの微量サンプルではその解析が困難である。既に少数細胞を用いた ChIP-seq 法が開発されているものの、数百細胞程度を要し、多くのリソースを必要とするため、本研究を遂行する上でのボトルネックとなっている。近年開発された Cleavage Under Targets and Tagmentation (CUT&Tag) は、*in situ* で標的タンパク質が結合した DNA 領域上に Tn5 トランスポゼースによるアダプター-DNA の挿入を行い、その DNA 断片を次世代シーケンサーによって決定する手法である (Kaya-Okur *et al.*, *Nat. Commun.*, 2019.)。本手法は、一細胞~数十細胞程度の微量サンプルからヒストン修飾や転写因子結合領域をゲノムワイドに解析することが可能である。そこで、本研究では超微量 CUT&Tag の確立に着手した。

CUT&Tag では、標的タンパク質を認識した抗体に対してプロテイン A と Tn5 トランスポゼースの融合体(pA-Tn5)が結合した後、その近傍のクロマチン上にアダプター-DNA が挿入される。そこで、大腸菌を用いて pA-Tn5 をリコンビナントタンパク質として精製した。Tn5 トランスポゼースはマグネシウムイオン存在下で二本鎖 DNA を切断し、自身に結合していた DNA をその部位に挿入する。試験管内にて、精製した pA-Tn5 と DNA をマグネシウムイオン存在下または非存在下において反応させたところ、pA-Tn5 はマグネシウムイオン依存的に DNA 切断活性を示すことを確認した。精製した pA-Tn5 を用いて、以下のコントロール実験を行った。

### ① 卵丘細胞を用いた CUT&Tag の確立

精製した pA-Tn5 を用いて、まず先行研究に示された手法に従い、CUT&Tag の確立を試みた。そこで、体細胞を用いたコントロール実験として、卵丘細胞を用いた H3K4me3 の検出を行った。遺伝子発現に重要なヒストン修飾の一つである H3K4me3 は、体細胞において主に転写開始点近傍に局在する。

過排卵させた C57BL/6 系統の雌マウスから 20,000-30,000 細胞の卵丘細胞を採取し、それらをコンカナバリン A ビーズ上に固定させた。その後、ジギトニン存在下で抗体反応を行い、マグネシウムイオン存在下において pA-Tn5 によるアダプター-DNA の挿入を行った。次世代シーケンサーによる解析の結果、H3K4me3 の集積が転写開始点近傍に認められた(図 1)。また、ネガティブコントロールである IgG 存在下ではランダムな局在が見られた。以上の結果より、体細

胞を用いた CUT&Tag の確立に成功した。

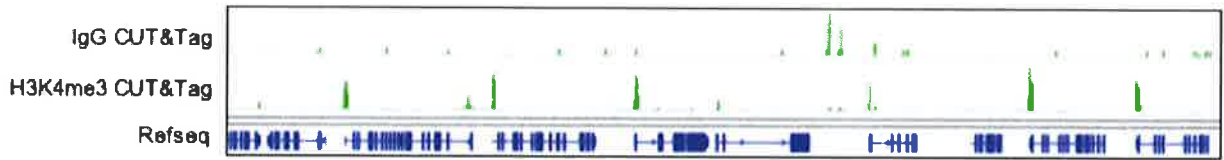


図 1: 卵丘細胞における H3K4me3 ドメインを表示したスナップショット

### ② GV 期卵を用いた超微量 CUT&Tag の確立

超微量 CUT&Tag のコントロール実験として、マウス GV 期卵における H3K4me3 ドメインの検出を試みた。マウスの卵では体細胞とは異なり、転写開始点近傍のみならず広範囲に渡ってユニークな局在を示すことが知られている(Dahl *et al.*, *Nature*, 2016; Zhang *et al.*, *Nature*, 2016)。

C57BL/6 系統の雌マウスから 50-60 細胞の GV 期卵を採取し、界面活性剤によって細胞膜・核を緩やかに破壊した。その後、パラホルムアルデヒドにより固定した後、抗体反応を行った。抗体反応後、マグネシウムイオン存在下において pA-Tn5 によるアダプター DNA の挿入を行い、次世代シーケンサーによる解析を行った。解析の結果、本実験によって得られたデータは、既に報告されている H3K4me3 の局在(Zhang *et al.*, *Nature*, 2016)と一致することがわかった (図 2)。また、ネガティブコントロールである IgG 存在下ではランダムな局在が見られた。以上の結果より、超微量 CUT&Tag の確立に成功した。

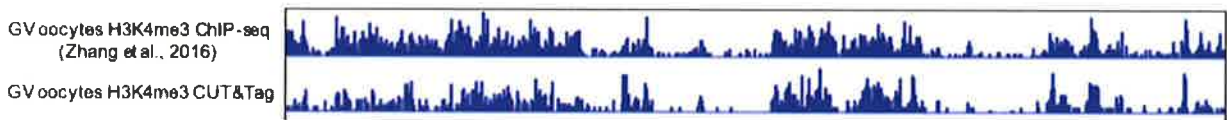


図 2: GV 期卵における H3K4me3 ドメインを表示したスナップショット

上段: 先行研究において報告されている ChIP-seq を用いた H3K4me3 の局在

下段: 本研究において確立した CUT&Tag を用いた H3K4me3 の局在

### ③ 2 細胞期における転写因子の結合領域の同定

確立した CUT&Tag 法を用いて、2 細胞期における転写因子の結合領域の同定を試みた。

B6129F1 系統の雌マウスを過排卵処理し、B6CBAF1 の雄マウスと交配させた。交配後、受精 3 4 時間後の 2 細胞期を採取し、界面活性剤によって細胞膜・核を緩やかに破壊した。その後、パラホルムアルデヒドにより固定した後、抗体反応を行った。抗体反応後、マグネシウムイオン存在下において pA-Tn5 によるアダプター DNA の挿入を行い、次世代シーケンサーによる解析を行った。解析の結果、約 200-300 の 2 細胞期胚から転写因子の結合を検出することに成功した。

## 4. 今後の研究展開

確立した実験系を用いて、候補因子による胚性ゲノムの活性化機構の詳細を明らかにする。候補因子をリコンビナントタンパク質として精製し、パイオニア転写因子としての機能を生化学的解析によって検証する。また、候補因子の結合領域を CUT&Tag 法によりゲノムワイドに同定する。以上の解析を通して、候補因子による胚性ゲノム活性化機構について考察を行う。さらに、候補因子による胚性ゲノムの活性化機構の詳細を明らかにするために、コンディショナルノックアウトマウスまたは AID ノックアウトマウスを作製する。作製したマウスを用いて、候補因子によるエピゲノム制御機構解析を行う。具体的には、候補因子によるエンハンサー領域の確立とクロマチン空間配置の変動に着目する。候補因子欠損卵を用いて微量 CUT&Tag を行い、候補因子によって引き起こされるヒストン翻訳後修飾またはオープンクロマチン領域

の分布を解析する。さらに、候補因子によって引き起こされる胚性ゲノムの活性化がクロマチンの空間配置に与える影響を Single-nucleus Hi-C 法により解析する。クロマチン間の相互作用であるループ構造、空間的に隣接したゲノム領域であるトポロジカルドメイン、オープンクロマチンとクローズドクロマチンの分布に着目し、1 細胞期胚・2 細胞期胚それぞれの過程において解析を行う。以上の解析を行い、転写因子依存的な着床前初期胚の分化全能性機構の解明を目指す。