

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 31 年度

受付番号 201960592

氏 名 牛木 亜季

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： サンフランシスコ （国名： 米国 ）
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。
コウモリ翼形成から探る四肢形態の進化に関わるエンハンサーの同定と機能的意義の検証
3. 派遣期間： 平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 年 8 月 31 日（884 日間）

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名： University of California, San Francisco部局名： Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences

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)**

【記載事項】

- ・ 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
- ・ 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、国内採用開始・採用期間延長・翌年度渡航のいずれかの適用を受けた場合は、当該措置の適用による影響等

(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。

研究背景

ヒトゲノムの 98%は、タンパク質、すなわち遺伝子をコードしていない非コード領域によって構成されている。エンハンサーは、遺伝子の時空間的な活性を制御しており、標的遺伝子から 1Mb 遠位に存在する場合も知られている。エンハンサーを介した遺伝子発現制御の変化・破綻は、生物の進化や疾患の原因となり得る。派遣期間中において、私はエンハンサーを介した四肢の進化、および、ヒトの先天性無手足症に関する研究を行った。

1. コウモリ四肢形成に関わるエンハンサーの探索と機能の解析

派遣先研究室では、コウモリ (*M. natalensis*) の De novo 全ゲノムアセンブリを行い、さらに形態の差異が生じる発生段階 (Carnegie Stage; CS) 15-17 における前肢と後肢を用いた RNA-seq、ATAC-seq 及び ChIP-seq (活性型ヒストンマーク H3K27ac、不活性型マーク H3K27me3) を行うことで、コウモリ四肢形成過程における強固なエピゲノムデータセットを得た (Eckalbar *et al. Nature Genet.* (2016))。本研究では、これらのデータをもとに、コウモリ翼特異的なエンハンサー候補配列を選出し、マウスを用いた機能解析を行った。

【LacZ トランスジェニックエンハンサーアッセイ】

ゲノミクスデータの *In silico* 解析、翼手目特異的なゲノム配列変化、過去の発表文献から、10 種類の候補配列を選定した。これらの配列について、コウモリゲノム DNA を鋳型とし、PCR によって、LacZ レポーターへとクローニングした。これらレポータープラスミドをマウス受精卵へ顕微注入し、マウス胚

におけるエンハンサー活性を調べた。その結果、7 種類の候補配列について、コウモリ配列特異的な活性の変化を確認することができた。

【リプレースメントマウスの作成および、解析】

7 種の候補配列について、マウス内在配列とコウモリ相同配列の置換を行った。置換の方法としては、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を利用した。ドナーDNAとして、一本鎖 DNA とプラスミド DNA の両方に関してマウス ES 細胞で検討を行った。合成上の都合、および過去の報告から、一本鎖 DNA には、150 から 250 base の相同配列を配した。プラスミドドナーに関しては、1 kilo base の相同配列、および相同組換えカセットの両側に guide RNA (gRNA) ターゲット配列を配した。ES 細胞に、Cas9/gRNA 発現プラスミドとド

ナーDNA をトランスフェクションし、内在配列の置換をPCRにより検出した(図 1)。その結果、プラスミドドナーの場合において、より効率

的な置換が認められた。そこで、プラスミド組換えドナー、Cas9 タンパク質、gRNA をマウス受精卵に顕微注入し、リプレースメントマウスを作成した。標的遺伝子座に関して、サンガーシーケンス、サザンブロット法により目的の置換が起こったことを確認した。コウモリ・エンハンサー置換遺伝子座に関して、ホモ化し、その表現型を、骨格構造、遺伝子発現の観点から、解析した。いくつかのマウス系統の四肢形態に関して、野生型との差異が認められた。現在さらなる追加解析を行っている。

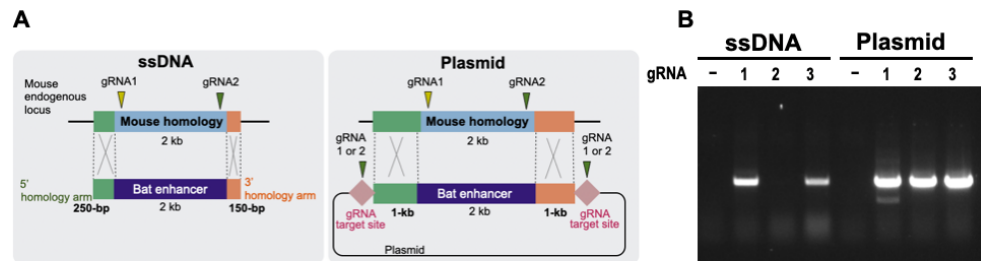


図1: マウス内在配列とコウモリ外来 DNA の置換方法の検討

2. 無手足症 (Acheiropodia) の解析 Ushiki et al. Nature communications. 12, 2282 (2021).

無手足症 (Acheiropodia) は先天的な四肢の欠損を示す常染色体潜性遺伝病である。ブラジルにおける同疾患の家系が、2001 年に報告され (Ianakiev et al. AJHG (2001)), *Limb development membrane protein 1 (LMBR1)* 遺伝子における欠損がおおまかに同定された。四肢の発生には、*Sonic hedgehog (SHH)* 遺伝子の適切な発現制御が必須であり、同遺伝子のエンハンサー、ZRS により制御される。ZRS は、*LMBR1* 遺伝子イントロン 5 に位置しており、発見された欠失が ZRS エンハンサーまたは、*SHH* 遺伝子の発現制御に関与していることが予想された。しかしながら、その発症メカニズムや、正確な欠失領域については、不明であった。

【次世代シーケンサーによる欠失領域の同定】

Acheiropodia 発端者および両親の細胞を入手し、DNA を抽出後、whole-genome sequencing に供した。その結果、発端者は *LMBR1* 遺伝子エキソン 4 を含む 12-kb の欠失を、ホモに持つことが明らかとなった (chr7:156,816,030-156,828,070; hg38 with CA insertion)。両親に関しては、同欠失をヘテロに持つことがわかった。一方で、*SHH* 遺伝子の四肢エンハンサーとして知られる ZRS に関しては、無傷で保存されていることを確認した。

【LacZ トランスジェニックエンハンサーアッセイ】

12-kb の欠失領域に関して、ヒト大腸菌人工染色体 (RP11-155D20) を鋳型とし、PCR によって、LacZ レポーターへとクローニングした。これらレポータープラスミドをマウス受精卵へ顕微注入し、マウス胚 (11.5 日齢胚) におけるエンハンサー活性を調べた (図 2)。その結果、多くの胚で活性が見られない、もしくは、トランスジーンランダム挿入による、ランダムな活性が確認された。また、四肢における活性は確認できなかった。

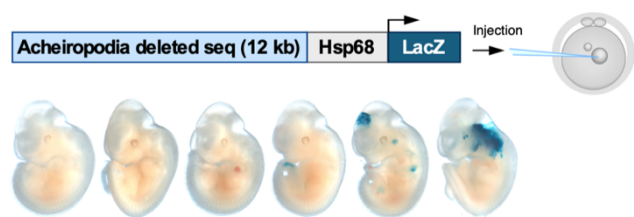


図2: Acheiropodia 12-kb 領域のエンハンサー活性の検証

【CTCF/RAD21 ChIP-seq】

一般に公開されている細胞株を用いた、CCCTC-binding factor (CTCF) ChIP-seq データから、12-kb の欠失領域に CTCF が結合していることを確認した。CTCF は、ゲノムの高次構造形成に重要であり、エンハンサー・プロモーターの相互作用形成にも関与している。そこで、不死化した発端者由来の細胞と、健常者由来の細胞に関して、CTCF および、Cohesin 複合体の一部である RAD21 の抗体を用いて、全ゲノムク

ロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を行った (図 3)。その結果、3 箇所の CTCF および RAD21 の結合を 12-kb 領域に確認した。発端者細胞においては、12-kb の欠失により、これら 3 箇所の結合が消失し、ZRS よりも上流側に異所的な結合、LSC2 が確認された。

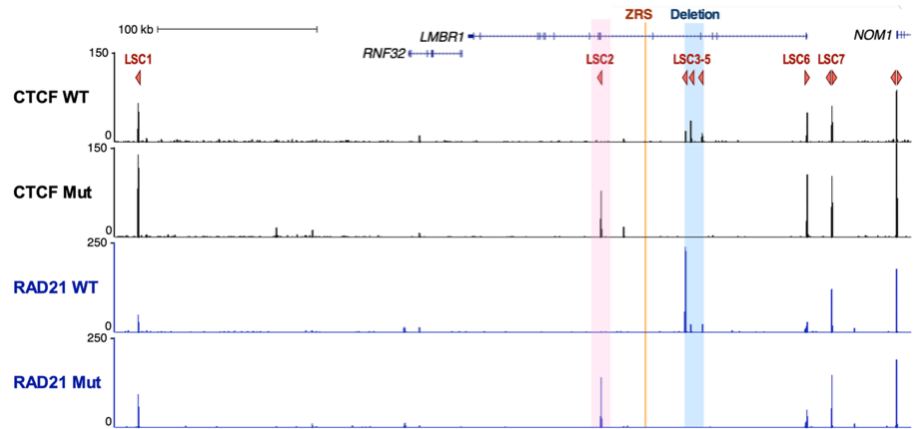


図3: *LMBR1* 遺伝子座における CTCF および RAD21 の結合

健常者細胞 (WT) および、発端者細胞 (Mut) を用いて、ChIP-seq を行った。赤の矢頭は、CTCF 結合配列の方向性を示す (*LMBR1*-*SHH* CTCF site: LSC)。ZRS および、*Acheiropodia* 欠失部位は、それぞれ橙と青色で示されている。発端者細胞特異的な新規結合部位は、桃色で示されている (LSC2)。

【4C-seq】

3 箇所の CTCF 結合部位の欠失、および異所的な CTCF/RAD21 の結合から、発端者細胞において、*SHH* 遺伝子プロモーターおよび、ZRS エンハンサーの相互作用が損なわれていることが予想された。4C-seq は、ある特定のゲノム部位と相互作用する領域を網羅的に解析する手法である。*SHH* 遺伝子プロモーターと相互作用する領域を 4C-seq により解析した (図 4a)。その結果、健常者細胞において、ZRS エンハンサーそれ自体よりも、3 箇所の CTCF サイトが *SHH* プロモーターと強く相互作用していることが明らかとなった (図 4b)。発端者細胞においては、ZRS および、12-kb 領域周辺との相互作用は確認されず、LSC1 より上流側との相互作用が増加していた (図 4a)。異所的な結合サイトである LSC2 との強い相互作用は確認されていなかった。一方で、LSC1 との相互作用がより強くなっていた (図 4b)。この変化により、ZRS エンハンサーが DNA ループの外側に隔離されたと考えられる。

【DNA FISH】

DNA fluorescence *in situ* hybridization (DNA FISH) によって、DNA 領域間の距離を計測した。*SHH*、LSC1、LSC2、LSC3-5 の領域プローブを設計した (図 5a)。*SHH* プローブと、各 LSC 部位の距離を計測した (図 5bc)。4C-seq の結果と同様に、欠失型の遺伝子座では、LSC1 との距離が近く、LSC3-5 (欠失部位) との距離は遠くなっていた。一方で、LSC2 との距離に変化は見られなかった。

【*Acheiropodia* 12-kb マウス相同領域のノックアウト】

最後に、ヒト *Acheiropodia* 12-kb と相同なマウス領域を CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により、ノックアウトした (図 6a)。*Shh* 遺伝子発現について、qPCR および、Whole-mount *in situ* hybridization により解析した。その結果、遺伝子発現に差は見られず (図 6bc)、18.5 日齢胚における四肢骨格構造にも差は見られなかった (図 6d)。これは、ヒトとマウスで、12-kb 領域中における CTCF の数が異なっていること、同領域外の CTCF の分布の違いにより、マウスでは、エンハンサー・プロモーター相互作用が補償されているためだと考えられる。

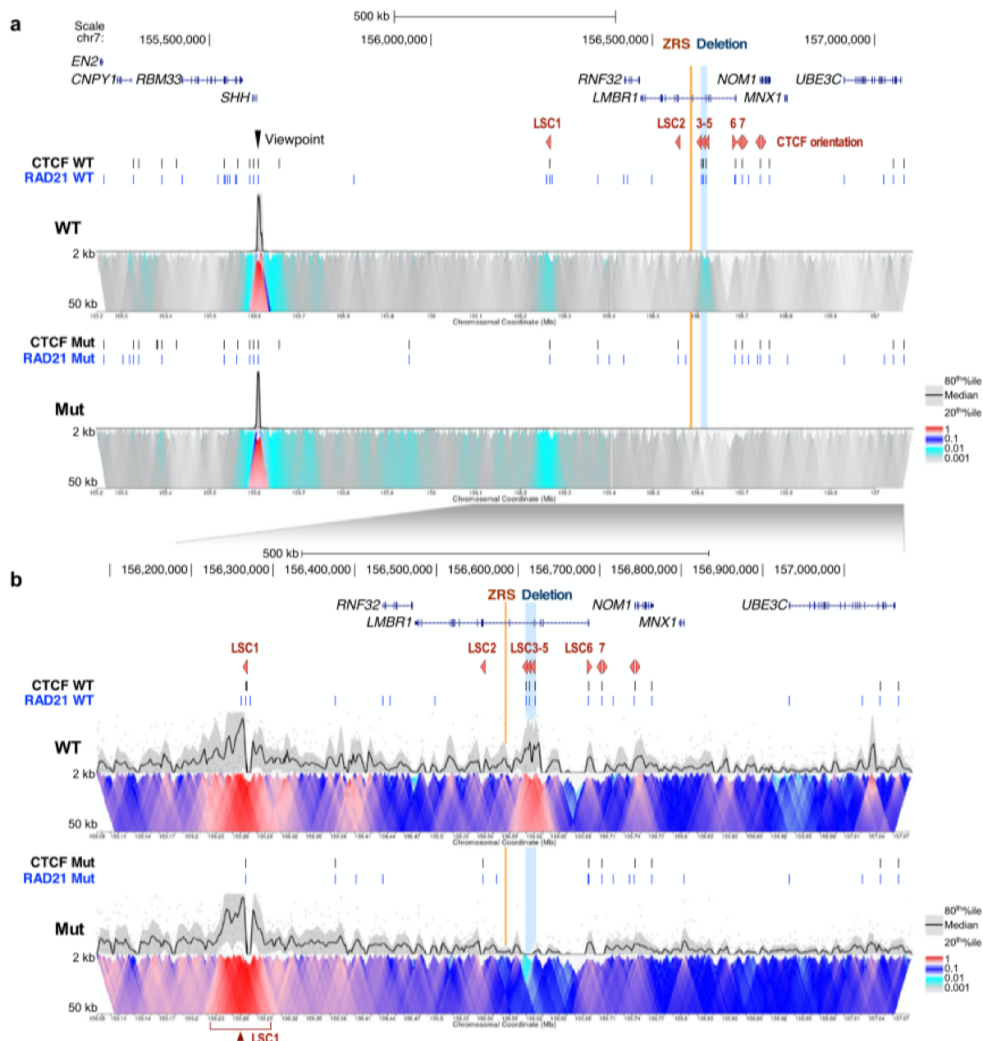


図4: SHH プロモーターと相互作用する領域の網羅的解析

健康者細胞 (WT) および、発端者細胞 (Mut) を用いて、SHH プロモーターと相互作用する領域を 4C-seq によって網羅的に解析した。ZRS および、Acheiropodia 欠失部位は、それぞれ橙と青色で示されている。黒と青の縦線は ChIP-seq で CTCF、または RAD21 と結合した箇所を示す。SHH プロモーターとの相互作用の強い順に、赤、青、水色、灰色のカラーマトリックスで相互作用レベルが示されている。図中上から、SHH-LMBR1 遺伝子座全体の領域 (a)、ZRS 周辺を拡大した領域 (b) を示している。

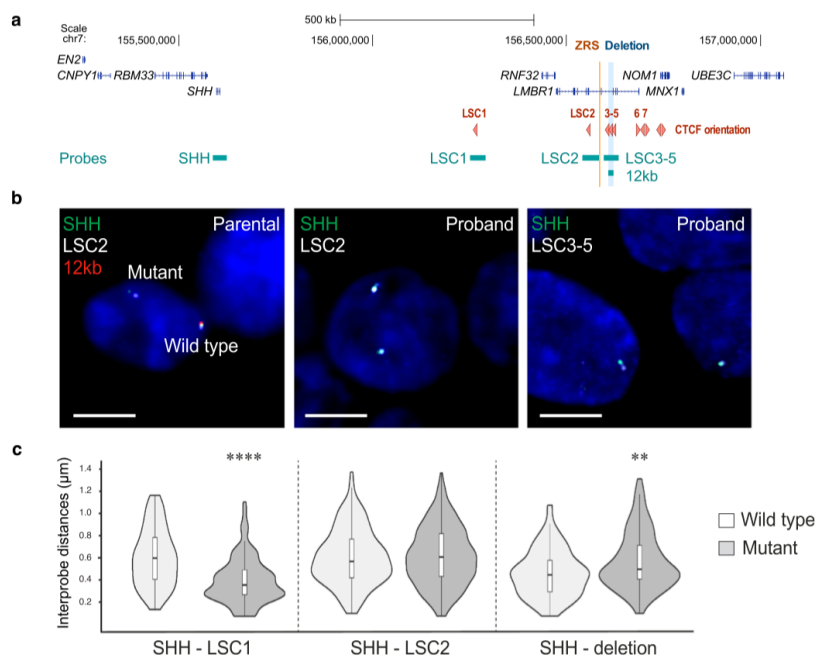


図5: DNA FISH による SHH プロモーターと各 LSC サイトの距離

各プローブの位置 (a)、DNA FISH 解析の様子 (b)、各プローブ間の距離 (c)。Mann-Whitney U-test, ** = 0.004537, **** = 2.083×10^{-11} ($n = 75-150$ alleles).

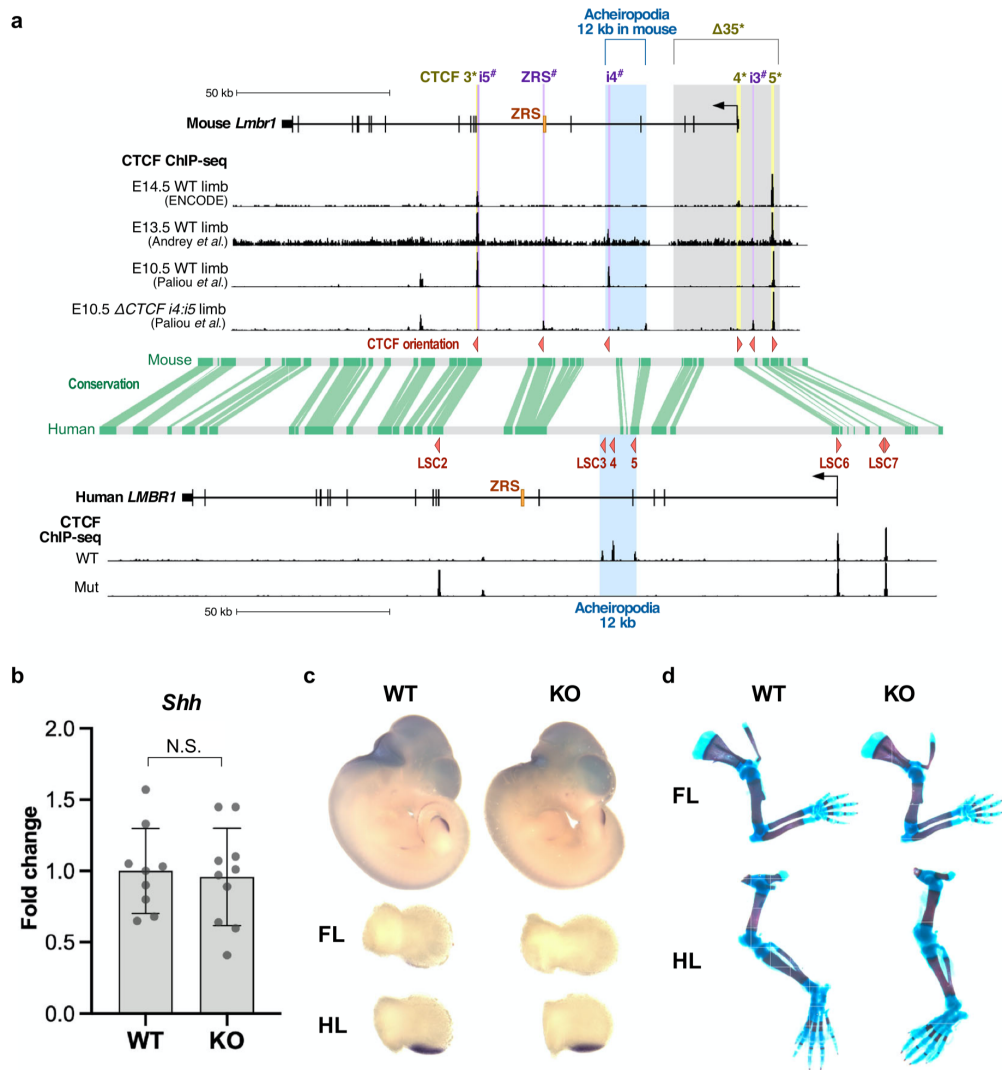


図6: Acheiropodia 12-kb マウス相同領域ノックアウトマウスの作成と解析

マウス および、ヒト *SHH* 遺伝子座の配列保存性の比較と CTCF ChIP-seq データ (a)。11.5日齢胚 野生型 (WT) とノックアウトマウス (KO) における *SHH* 遺伝子発現レベルを qPCR (b) および Whole-mount *in situ* hybridization (c) により検討した。アルシアンブルー・アリザリンレッド硬骨軟骨染色により 18.5日齢胚の四肢骨格構造を検討した (d)。Forelimbs (FL)、Hindlimbs (HL)。

【Acheiropodia 発症モデル】

以上の結果から、*SHH* 遺伝子プロモーターは、LSC3-5 を足場として、そこに結合する CTCF を介して、ZRS エンハンサーと相互作用していると考えられる。Acheiropodia 発端者においては、LSC3-5 が欠失したことで、ZRS 上流に位置する、LSC1 と強く相互作用することで、ZRS がゲノムループ構造から外に隔離され、胎児期に正常な *SHH* 遺伝子発現が起こらず、四肢発生に異常を生じたと考えられる(図 7)。

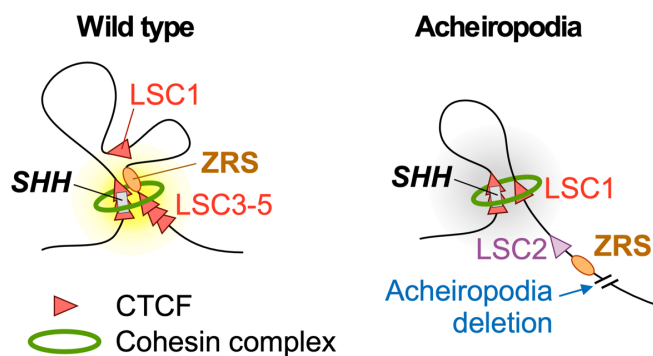


図7: Acheiropodia 12-kb の欠失によるゲノム構造の変化

発表論文 (2019 年–2021 年)

1. **Ushiki A**, Zhang Y, Xiong C, Zhao J, Georgakopoulos-Soares I, Kane L, Jamieson K, Bamshad MJ, Nickerson DA, University of Washington Center for Mendelian Genomics, Shen Y, Lettice LA, Silveira-Lucas EL, Petit F, Ahituv N. Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia. **Nat Commun.** 2021 Apr 16; 12(1):2282. [PMID: 33863876](#).
2. Makki N, Zhao J, Liu Z, Eckalbar WL, **Ushiki A**, Khanshour AM, Wu J, Rios J, Gray RS, Wise CA, Ahituv N. Genomic characterization of the adolescent idiopathic scoliosis-associated transcriptome and regulome. **Hum Mol Genet.** 2021 01 21; 29(22):3606-3615. [PMID: 33179741](#).
3. Wise CA, Sepich D, **Ushiki A**, Khanshour AM, Kidane YH, Makki N, Gurnett CA, Gray RS, Rios JJ, Ahituv N, Solnica-Krezel L. The cartilage matrisome in adolescent idiopathic scoliosis. **Bone Res.** 2020 Mar 09; 8(1):13. [PMID: 33686053](#).
4. Matsuzaki H, Kuramochi D, Okamura E, Hirakawa K, **Ushiki A**, Tanimoto K. Recapitulation of gametic DNA methylation and its post-fertilization maintenance with reassembled DNA elements at the mouse *Igf2/H19* locus. **Epigenetics Chromatin.** 2020 01 14; 13(1):2. [PMID: 31937365](#).

学会発表 (2019 年–2021 年)

■Talk (*Presenter)

1. **Ushiki A***, Zhang Y, Xiong C, Zhao J, Georgakopoulos-Soares I, Kane L, Jamieson K, Bamshad MJ, Nickerson DA, University of Washington Center for Mendelian Genomics Shen Y, Lettice LA, Silveira-Lucas EL, Petit F, Ahituv N
'Deletion of CTCF sites in the SHH-LMBR1 locus alters enhancer-promoter interaction and leads to acheiropodia'
Invited lecture
EducaGene - Sociedade Brasileira de Genética Médica e Genômica, August (2021)
2. **Ushiki A***, Zhang Y, Xiong C, Zhao J, Georgakopoulos-Soares I, Kane L, Jamieson K, Bamshad MJ, Nickerson DA, University of Washington Center for Mendelian Genomics Shen Y, Lettice LA, Silveira-Lucas EL, Petit F, Ahituv N
'Deletion of CTCF sites in the SHH-LMBR1 locus alters enhancer-promoter interaction and leads to acheiropodia'
54th Annual Meeting of Japan Society of Developmental Biologists, June (2021)
3. **Ushiki A**, Eckalbar WL, Schlebusch SA, Mason MK, Booker B, Nevonen K, Carbone L, Pollard KS, Wall JD, Illing N, Ahituv N*
'Functional Characterization of Bat Wing Development'
The 12th International Congress of Vertebrate Morphology, Prague, Czech, July (2019)

■Poster (*Presenter)

1. **Ushiki A***, Zhang Y, Xiong C, Zhao J, Georgakopoulos-Soares I, Kane L, Jamieson K, Bamshad MJ, Nickerson DA, University of Washington Center for Mendelian Genomics, Shen Y, Lettice LA, Silveira-Lucas EL, Petit F, Ahituv N
'Deletion of CTCF sites in the SHH-LMBR1 locus alters enhancer-promoter interaction and leads to acheiropodia'
American Society of Human Genetics 2020 Virtual Meeting, October (2020)

受賞 (2019 年-2021 年)

- 2020 Reviewers' Choice (the top 10% of all poster abstracts),
American Society of Human Genetics 2020 Virtual Meeting
- 2020 Semi-Finalists of ASHG/Charles J. Epstein Trainee Awards

UCSF におけるコロナウィルスの影響、研究活動規制

2020 年 3 月、アメリカ国内でのコロナウィルス感染者の増加を受け、San Francisco 市長は、3 月 17 日より、不要不急の外出自粛を要請する“shelter in place”オーダーを発令した。これに伴い、私が所属しているカリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) においても、3 月 18 日より閉鎖となり、実験動物の維持など、必要最低限の活動以外は認められなくなった。具体的には、各ラボにおいて、液体窒素タンクのメンテナンス、実験動物の世話などの必要最低限の業務を短時間行う 3、4 人のエッセンシャルワーカーが選出され、通常実験の遂行が不可能となった。また、実験動物の世話を行う、テクニシヤンの労働時間を最小化するために、マウスの交配ケージ数を最小化することが求められた。私の研究課題には、遺伝子改変マウスを用いた実験が不可欠であり、UCSF 閉鎖の 2 ヶ月間においては、研究の進捗が著しく困難となった。

UCSF の閉鎖は、2020 年 5 月 18 日に解除されたものの、研究室における人口密度制限が課されることとなった。私が所属するラボでは、12 個の実験台が存在するが、正規ラボメンバー (大学院生・ポスドク) は、12 人を超過しており、シフト制での業務となった。その結果、実験時間が 1/2 から 1/3 程度に大きく制限されることとなった。細胞培養室・共通機器室においても、部屋が小さいため、1 人のみの入室しか認められず、円滑な研究の遂行に影響がでた。

以上の研究活動の規制から、特例措置として、2021年8月31日までの派遣期間延長を認めて頂いた。迅速・柔軟なご対応をいただき、日本学術振興会海外特別研究員事業の関係者の方々にこの場を借りて、深く御礼申し上げます。