

クロマチン高次構造を制御する因子の同定
岡崎統合バイオサイエンスセンター 核内ゲノム動態研究部門

1. 目的

クロマチン高次構造は、転写や複製などの様々なゲノム機能に密接に関与しているものの、その制御機構は多くが謎に包まれている。プロモーターやエンハンサーなどの転写制御領域は、ヌクレオソームによって占有されていない「オープンクロマチン構造」をとる。オープンクロマチン構造の形成は、遺伝子の転写活性化に必須なイベントであり、細胞特異的な遺伝子発現に直結する。しかしながら、クロマチン高次構造を解析する技術に限られていたために、その制御機構は明らかになっていない。申請者は、貴財団の研究助成によってサポートされたプロジェクトにより、オープンクロマチン構造を「可視化」する革新的な技術(in situ ATAC法)を開発した。

本研究では、2つの革新的技術; ①「in situ ATAC法」と、②「CRISPR/Cas9システムによるゲノムワイド遺伝子スクリーニング」を組み合わせることによって、「オープンクロマチン構造」の形成を制御する因子の同定に挑む。

2. 方法

in situ ATACの蛍光シグナルを指標としたCRISPR/Cas9によるゲノムワイド遺伝子ノックアウトスクリーニングをおこなう。CRISPR/Cas9システムでは、ヌクレアーゼであるCas9と、標的配列と相補的なsgRNAを用いることによって、目的の遺伝子を効率よく破壊することができる。近年、ヒトの全遺伝子に対するsgRNAをコードしたレンチウイルスライブラリーを用いた、様々なゲノムワイドスクリーニングが報告されている(Feng Zhang et al., Science., 2014など)。本研究では、ヒト一倍体細胞株eHAP1にsgRNAレンチウイルスライブラリーを感染させ、ゲノムワイドに遺伝子破壊を誘導する。その後、感染eHAP細胞のオープンクロマチン構造をin situ ATAC法により染色し、その蛍光強度をFACSを用いて解析する。蛍光強度に変化が見られた細胞(=遺伝子破壊によりクロマチン高次構造に異常をきたした細胞)をソーティングする。回収された細胞内のsgRNA配列を次世代シーケンサーを用いて解析することで、オープンクロマチン構造の構築に関与する遺伝子群を網羅的に同定する。

3. 結果

CRISPRスクリーニングの結果、既知のクロマチン制御遺伝子群および新規制御遺伝子を複数個同定することに成功した。その遺伝子リストは、様々な機能を有する遺伝子群を含んでおり、EP400, CREBBP, TFDP1, HNRNPUなどが含まれていた。なかでもTFDP1は転写因子の一つであり、これまでにクロマチン高次構造に関連する報告は全くされていない、新規クロマチン制御因子であった。

4. 考察

スクリーニングをスタートする前は、既知の制御因子のみがヒットしてくるのではと思われたが、スクリーニング結果はその予想を大きく裏切り、複数の新規遺伝子群を同定することができた。本研究期間では、新規クロマチン制御因子のリストアップにとどまっているが、今後は同定された遺伝子群がどのようにクロマチン高次構造を制御するのか、その分子メカニズムに迫る予定である。

5. 参考文献

最後に、アステラス病態代謝研究会からのご支援のおかげで、CRISPRスクリーニングを行うことができました。助成していただいた時期が、研究室の立ち上げ時期であったこともあり、大変有り難く使っていただきました。この場をお借りして、御礼申し上げます。