

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 ゲノム配列と核内構造動態の解析による多様な転写制御機構の解明
(Elucidation of diverse transcriptional regulatory mechanisms
by analysis of genome sequences and intra-nuclear structural dynamics)

広島大学大学院統合生命科学研究科

数理生命科学プログラム

学生番号 D211108

氏 名 小本 哲史

生命の活動を司る遺伝子の転写制御には、遺伝子領域及びその周辺の制御領域を内包する塩基配列に依存した DNA の一次構造、種々の分子の結合や修飾により DNA が三次元的に折り畳まれた局所クロマチン構造、および局所クロマチン構造の生成・消滅により変化する高次染色体構造などの各階層の構造が、重要な役割を果たしている。本学位論文では、雌マウス胚性幹細胞における分化開始に伴う核内構造動態と、バフンウニにおける転写制御を担う特徴的な配列に着目し、多様な転写制御機構について生物種横断的に考察した。

第Ⅱ章では、雌マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) が分化誘導された際、それに伴って一過的に起こる X 染色体の対合機構を考察した。

雌マウス ES 細胞からの細胞分化では、分化過程初期に X 染色体不活性化中心 (X chromosome inactivation center, Xic) とよばれる領域間の対合が起こる。近年この対合の形成が、X 染色体不活性化を制御する遺伝子や、核内構造、代謝、概日時計を制御する遺伝子の発現を制御している可能性が示された (Pollex and Heard 2019)。しかしこのような Xic 対合の胚発生中における生理的重要性が明らかになる一方で、染色体で混み合った核内において、Xic および X 染色体同士がどのように互いを認識し接近するのか、その機構は不明であった。

最近マウス ES 細胞の分化過程の観察より、ヒストン修飾の分布や X 染色体におけるクロマチンドメイン境界の位置などのエピゲノム状態が、分化開始後 2 日で大きく変化することが見出された (Pollex and Heard 2019)。また近年の核内染色体構造動態の理論的研究は、染色体サイズや局所的ゲノム領域のエピゲノム状態が、核内染色体や染色体内クロマチンドメインの位置関係に影響を与える可能性を示唆している。実際、エピゲノム状態に依存してクロマチンの物理的特性が局所的に異なるとした、不均一な高分子鎖で染色体をモデル化しシミュレーションを行うことで、実験で観察された核内染色体配置が再現された例も報告されている (Ganai et al. 2014; Fujishiro et al, 2021)。よってマウス ES 細胞の分化過程における Xic 対合の促進も、X 染色体のエピゲノム状態変化に起因する物理的要因より説明される可能性がある。

そこで本研究では、マウス ES 細胞 (ES-cell model) 及び Xic 対合が実際に観察される分化後 2 日目の細胞 (2-day cell model) の核内染色体の粗視化分子動力学モデルを構築し、分化に伴う核内構造の変化を解析した。各染色体は high-throughput chromosome conformation capture (Hi-C) 法で得られたデータ (Miura et al. 2019) に基づいた、物理的性質の不均一性をもつ粒子鎖で記述した。ES-cell model と 2-day cell model のシミュレーションから、分化した状態のモデルの方が、2 本の X 染色体が互いに接近する頻度が高くなり、従来報告されている実験結果が定性的に再現された。さらに、Hi-C データの解析から、未分化の ES 細胞では全ての染色体の表面に非 Open クロマチン領域が広く分布する一方、分化開始後 2 日目の細胞では、X 染色体表面のみで Open クロマチン領域が広く分布することが見出された。Open クロマチン領域ではクロマチン繊維や結合タンパク質の体積分率が非

Open クロマチン領域よりも小さいため、Open クロマチン領域は柔らかい領域であると考えられる。よって分化後 2 日目では X 染色体が常染色体と比べ顕著に柔らかくなっていると推定された。この推定に基づくと、X 染色体間の排除体積効果は他の染色体間のものよりも弱いため、X 染色体同士が隣接するとその対はコンパクトな形状になり得、その結果他の染色体に大きな空間が核内に提供されることで、系全体のエントロピーが高くなる可能性がある。そこでより単純化したモデルで系のエントロピーを与える状態数を見積もると、系の全状態数に対する 2 本の X 染色体が隣接している場合の状態数の比が、X 染色体のみが柔らかい分化後 2 日目の状況で大きくなった。つまり分化に伴うエピゲノム状態変化に起因する X 染色体の物理的柔軟性の変化が、X 染色体の相互接近を駆動し得ることが見出された。

上記の効果は枯渇力とよばれる力(Asakura, et al. 1954)や、剛性の異なるポリマーの相分離を引き起こす力(Adhikari et al. 2002; Egorov et al. 2021)と同様のものである。本研究により、これらの力が各染色体内でのエピゲノム状態の変化を通じて調節されることで、核内構造が制御されている可能性が見出された。この知見は、細胞種や細胞周期に依存した動的な核内構造形成の機序を明らかにする、新たな考察基盤を提供する。

第Ⅲ章では、広島で採集されたバフンウニ(*Hemicentrotus pulcherrimus*)から単離したゲノム DNA を用い、バフンウニドラフトゲノムの更新を行った。

近年の脊椎動物や昆虫、植物に対する Hi-C 法等による細胞核内構造の解析は、各遺伝子の発現がエンハンサー・プロモーターループ、Topologically associated domain、A/B コンパートメントなど、様々なシスエレメントや高次構造に制御されることを明らかにしてきた(Erez Lieberman-Aiden et al. 2009)。しかしこのような構造の影響の詳細な解析には、連続性の高いゲノム配列が必要である。一方従来の short-read 解析を用いたゲノムアセンブリでは、ゲノム中に散在する繰り返し配列などの存在により、多くの生物種で遺伝子領域とそのシス制御領域を含む連続性の高いドラフトゲノムを得ることは困難であった。例えば古くからの初期発生モデル生物であり、核内染色体ダイナミクス、左右非相称体軸の確立、中枢神経系の形成(Matsushita et al. 2017; Takemoto et al., 2016; Yaguchi et al. 2003)など様々な研究がなされているバフンウニのドラフトゲノム(HpulGenome_v1)でさえ、アリルスルファターゼ(*HpArs*)遺伝子の転写開始点から上流 2kb に位置する *Ars* インスレーターコア配列(ArsInsC)(Takagi et al., 2012)などのシスエレメントや、初期型ヒストンをコードする遺伝子が数十から数百のタンデムリピートを形成するゲノム領域が含まれていないなど、多くの課題が残されていた(Kinjo et al. 2018)。

そこで本研究では、バフンウニ精子由来 DNA の Oxford Nanopore sequencer による long-read 解析を行い、その long-read データと HpulGenome_v1 構築に用いられた short-read データの両方を用いたハイブリッドアセンブリにより、バフンウニドラフトゲノム配列を更新した。その結果、HpulGenome_v1 と比べ今回得られた配列では Scaffold 数が 16,251 から 2,164 へと、N50 が 143 kb から 516 kb、ゲノムとしての完全性(BUSCO score)が 86.1 から 96.5 へと、トランスクリプトームモデルのマッピング率が 55% から 76% へと、アノテーションされたモデル遺伝子数が 24,860 から 36,055 へと大幅に改善され、高いゲノム連続性と精度が実現された。また一方 10,000 以上の非アノテーション遺伝子領域も得られ、これらはノンコーディング RNA 由来遺伝子やバフンウニ特異的な遺伝子である可能性が考えられた。更にこのドラフトゲノムには、ArsInsC と 100 以上の ArsInsC 相同配列、及び初期型ヒストン遺伝子の長いタンデムリピートを内包する 2 つのゲノム領域が含まれていた。

本研究ではこのように、より多くの遺伝子モデルとその制御領域、及び高い配列の連続性を有するバフンウニドラフトゲノムが得られた。ここで初期型ヒストン遺伝子のタンデムリピートを含む領域が 2 箇所見出されたことは、先行研究でなされたバフンウニの核内蛍光イメージングの結果(Matsushita et al. 2017)より妥当であり、発生段階依存的な Histone locus body 動態の研究を進展させると考えられる。また ArsInsC と相同な配列が 100 以上見出されたことから、脊椎動物ではほぼ CTCF 結合配列に担われていたインスレーター機能が、ウニでは多くのゲノム領域で ArsInsC やその相同配列に担われている可能性を示している。さらに今回得られた新規ゲノム配列は、バフンウニにおける遺伝子発現を制御する新規シスエレメントの発見とその機序解明に貢献する可能性も有し、それは広く様々

な生物に存在する、多様なシス制御因子の研究を進展させると期待される。