

ヌクレオソーム分解能でのゲノム構造解析

京都大学高等研究院物質—細胞統合システム研究拠点

大野雅恵

【発表論文】

Published: May 18, 2021

Masae Ohno, Tadashi Ando, David G. Priest & Yuichi Taniguchi

Hi-CO: 3D genome structure analysis with nucleosome resolution

Nature Protocols volume 16, pages 3439–3469 (2021)

Published: Oct 8, 2021

Mehrdad Oveisi, Manu Shukla, Nogayhan Seymen, Masae Ohno, Yuichi Taniguchi, Sunil Nahata, Remco Loos, Ghulam J Mufti, Robin C Allshire, Stefan Dimitrov, Mohammad M Karimi

iNucs: Inter-Nucleosome Interactions

Bioinformatics (2021)

【申請書の概要】

真核生物のゲノムDNAは、ヒストンタンパク質に巻き付いてヌクレオソームと呼ばれる基本構造をとって核内に収納されている。ゲノム構造は、遺伝子発現やエピジェネティクスに応じて変化するが、最小単位であるヌクレオソームのレベルでの構造変化についてはまだ不明な点が多い。申請者は、このヌクレオソーム分解能でゲノム構造を解くHi-CO法を開発し、出芽酵母のゲノム内の3次元ヌクレオソーム配置を決定している (Ohno et al., Cell, 2019)。しかし、出芽酵母は単細胞生物であるため、ヒトを含む多細胞生物が持つ細胞分化の生命現象を解析できない。本研究では、ヒト細胞にHi-CO法を拡張し、未分化・分化細胞内のヌクレオソームの3次元配置を明らかにする。ヌクレオソーム配置が、ヒストン修飾酵素のゲノムへの結合を制御する場合や、またその逆の制御の場合など、ヌクレオソームの配置変化とエピジェネティクス変化は相互に関連していることが考えられる。そこで本研究により、ヌクレオソームの配置とエピジェネティクスとの関連性を調べることで、細胞分化のメカニズムを明らかにする。

【研究計画と進捗】

まず、出芽酵母で開発したHi-CO法をヒト細胞にも拡張する必要がある。Hi-CO法は、空間的に近いヌクレオソーム同士を結合させて、そのゲノムを配列解読することで、細胞内のヌクレオソームの配置を決める手法である。具体的には、まずゲノムとタンパク質を架橋させ、ゲノムをヌクレオソームごとに切断した後に、ヌクレオソーム同士を結合させ、ゲノムDNAを精製し次世代シーケンサーを用いてゲノム配列を解読する。次に、この配列情報から、どのヌクレオソーム同士が結合したかを明らかにする。さらに、ヌクレオソームの結合頻度を距離の逆数に変え、コンピューターを用いてシミュレーションすることで、ヌクレオソームの3次元配置を決定する (図1)。このHi-CO法を出芽酵母からヒト細胞へ拡張する際に一番問題になるのが、ゲノムの違いである。特に、ヒトゲノムは、出芽酵母ゲノムに比べて、約250倍の長さを持ち、また繰り返し配列を多く含む。そこで、最終産物である連結したヌクレオソームの収量を増やすためのプロトコルの開発を行った。さらに、拡張したヒト細胞のHi-CO法により、未分化・分化細胞でのヌクレオソーム配置を決定する計画であったが、研究期間内には達成できなかった。

ヒト細胞Hi-CO法のプロトコルの開発の結果

・ 株化培養細胞の検討

培養の容易な株化培養細胞でプロトコルの確立を目指した。数種類の株化培養細胞を用いて、細胞固定条件やゲノムをヌクレオソームサイズに切断するMNaseの条件検討を行った。ゲノムを比較的効率よく単一ヌクレオソームにすることができた肺がん細胞A549細胞を用いて以降の検討を行った。

・ ヌクレオソームの免疫沈降の検討

ヌクレオソームを高効率で免疫沈降させるヒストン抗体の検討を行った。数種類のヒストン抗体の購入に加え、ヒストン抗体の作製を試みた。また、細胞膜や核膜を壊し、ヌクレオソームを高収量で得るため、界面活性剤の種類や濃度を検討した。

・ ヌクレオソームの免疫沈降ステップを省略する検討

ヌクレオソームの免疫沈降効率は、10%程度と低かったため、免疫沈降ステップを省略してゲノムを高効率・高収量で得る他の方法を検討する必要があると考えた。これまでは、細胞を溶解してヌク

レオソームを得ていたが、細胞を溶解せず、ヌクレオソームが核内に存在した状態でヌクレオソーム同士を連結させる方法の検討を始めた。また、Hi-CO法では、ヌクレオソーム同士の連結は、ゲノムをMNaseで切断しヌクレオソームサイズにした後に、ヌクレオソーム上のDNAの末端形状を平滑にして、この平滑末端にアデニン塩基を付加してからDNAアダプターを結合させ、このアダプターを介してヌクレオソームを連結している（図1）。そこではじめに、アダプターを高効率で結合させる方法の探索を行った。これまで使用してきたDNA結合酵素（T4 DNA ligase）から、化学的に結合するクリックケミストリー法や、Tn5 transposase酵素を使用する検討、RNA-seqのSMART法で用いられているtemplate switchingを利用してアダプターを結合させることを試みた。しかしながら、あまり効率は上がらなかった。次に、次世代シーケンシングのアダプター結合のためのキットを用いてアダプター結合を試みた結果、一番効率が高かった。

さらに、連結したヌクレオソームを高収量で得られるようにDNAのアダプターを変更することを試みた。これまでは、アダプターからから25塩基対離れたゲノム領域を切り出す酵素（EcoP15I）を使用していたが、切り出さずに、ヌクレオソームのゲノムDNAの全長を解析できるように、アダプターの変更を行った（図1）。これにより、連結したヌクレオソームの収量を増やすことに成功した。

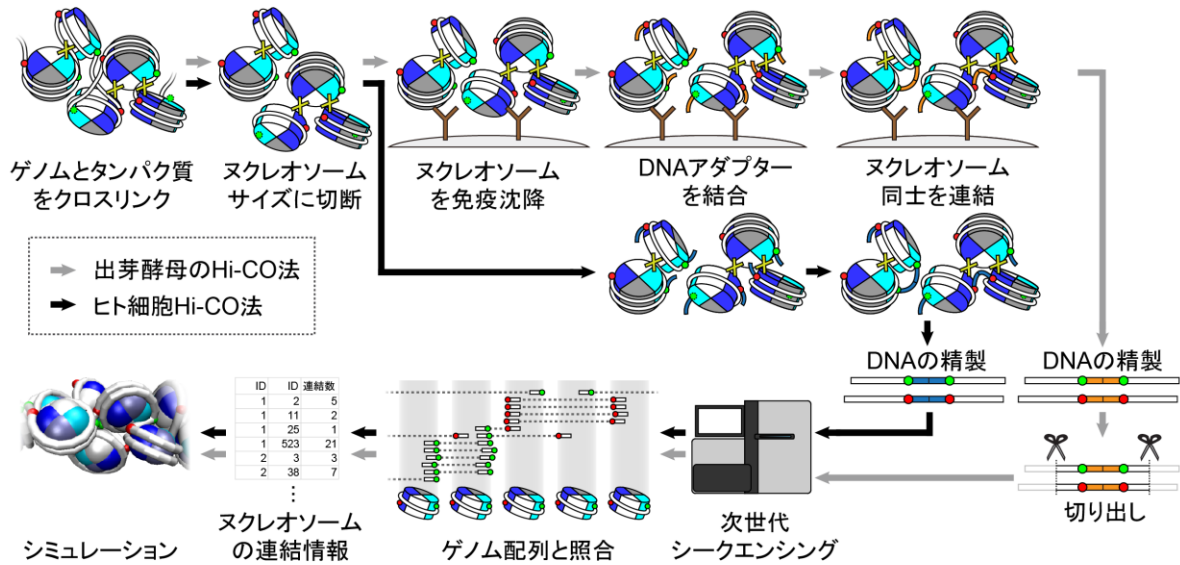


図1. 出芽酵母とヒト細胞におけるHi-CO法のプロトコルの比較

・ シーケンサーの検討

これまでと同様に、illumina社のシーケンサーで、150塩基対を両側から配列解読（paired-end解析）を行った。しかし、ヌクレオソームのDNAサイズは、130~160塩基対であり、比較的短いDNAサイズをもつヌクレオソーム同士の解析は可能であったが、長いDNAをもつヌクレオソームの場合、アダプター配列まで配列解読できなかった。そこで、MGI社のシーケンサーで、200塩基対のpaired-end解析を行った。また、MGI社に加え、Illumina社のシーケンサーで、250塩基対のpaired-end解析が可能な機種も考慮にしている。しかし、費用の点から、ゲノムの全長をシーケンシング解析するのは困難であるため、得られた連結ヌクレオソーム産物の内、目的のゲノム領域領域のみを選択し、シーケンシング解析するための検討を行っている。

【今後の展望】

本研究により、Hi-CO法のヒト細胞への拡張に成功した。ほ乳類細胞でのHi-CO法プロトコルの確立により、Hi-CO法の汎用性が向上したため、今後様々なゲノム構造研究への応用が可能になると考えている。今回の研究では、株化培養細胞しか解析できなかったが、今後は、各種組織の細胞や、iPS細胞やES細胞におけるゲノム構造解析がヌクレオソームレベルで可能になると考えている。ヌクレオソームは、全ての真核生物において共通して存在するゲノムの最小の構造単位および機能単位である。これまでは、ヌクレオソーム数百から数千個分に相当する大きなゲノム構造しか解析できなかったが、高分解能のHi-CO技術を使用することで、ヌクレオソーム1個分の解像度での構造解析が可能になる。遺伝子発現をはじめとしたゲノム上の反応は、ヌクレオソームの3次元的な高次構造に基づいて行われている。そのため、本研究によって得られる高解像度のゲノム構造は、ゲノム上で行われる多様かつ複雑な反応を解明する上で、新たな知見をもたらすことが期待できる。

この度は、伝統ある貴財団に助成金を賜りましたことを心より感謝を申し上げます。基礎的な研究が医学・薬学などの応用研究に至るまでには時間を要する中、今回のようなゲノム構造解析という基礎研究にご支援いただいたことを最大限に活かして、今後より一層研究に取り組んでいきたいと考えております。