

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14420

研究課題名(和文)サブシングルセル解析による二倍体メチロームの解明

研究課題名(英文)Towards sub-single-cell analysis of diploid methylome

研究代表者

伊藤 隆司 (ITO, TAKASHI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：90201326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNAのメチル化は、それぞれの細胞が発揮できる潜在能力を規定するエピジェネティクスを担う重要な仕組みのひとつです。ゲノム全体のDNAメチル化状態をメチロームと呼びます。メチロームは、細胞の種類によっても状態によっても変わりますし、父親由来のゲノムと母親由来のゲノムでも異なります。したがって、究極のメチローム解析は、単一の細胞から双方のゲノムについてメチル化パターンを完全に明らかにすることです。私達は独自の技術で単一細胞メチローム解析への途を拓いてきましたが、本研究では究極のメチローム解析に向けてその技術を更に高度化しました。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation represents a major mechanism for epigenetics, which determines the potential of individual cells. Genome-wide pattern of DNA methylation is termed as the methylome. The methylome differs from one another, depending not only on the type and status of the cell but also between the paternal and maternal genomes. Hence the ultimate methylome analysis is to decipher the complete methylation patterns of the two genomes in the same single cell. While we developed a unique method that has opened the door to the single-cell methylome analysis, here we further improved the method towards the ultimate methylome analysis.

研究分野：エピゲノミクス

キーワード：DNAメチル化 PBAT 単一細胞

1. 研究開始当初の背景

メチローム解析の進歩

DNA メチル化はヒストン修飾と並ぶ代表的なエピジェネティック修飾であり、高等動物の発生分化に不可欠の役割を果たし、様々な疾患や病態にも密接に関わることから、大きな注目を集めてきた。

次世代シーケンサーの登場によって DNA メチル化を一塩基解像度で全ゲノムに亘って明らかにする Whole-Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) が実現した。しかし、当初の解析法では、哺乳類の場合だと約 10^6 個の細胞と多数回の PCR 増幅を必要とした。DNA メチル化は細胞の種類によって異なるため、正確な解析には純化した細胞を用いる必要がある。したがって、この方法では受精卵や初期胚などの興味深いサンプルの解析は不可能であった。

従来法による WGBS ライブラリの作成効率の低さは、バイサルファイト処理によってアダプタを付加されたライブラリ分子が切断されることに起因する。この問題を回避するために我々が独自に開発したのが、バイサルファイト処理後にアダプタを付加する戦略 Post-Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) 法である。PBAT の開発によって、1000 個レベルの哺乳類細胞からでも PCR なしに ~30X のカバレッジを得ることが可能になり、卵子をはじめ様々な微量試料の解析が実現した。

更に、PBAT は単一細胞解析への応用も報告された。しかしながら、そのカバレッジやクオリティは不十分であり、これらを克服できる新しい PBAT の開発が望まれていた。

メチローム解析に残された課題

PBAT によって、データ品質に問題はあっても単一細胞メチローム解析への途は拓かれた。しかし、メチローム解析の場合には、その先にも課題が残されている。それは、アレルの識別、つまり二倍体メチロームの解明である。哺乳類では X 染色体の不活化やゲノムインプリンティングに代表されるように、アレル特異的メチル化 (ASM) が起こる。更に、一塩基多型と連動するような ASM も報告されており、それらが近傍遺伝子の発現に影響を与えて多因子疾患の発症に関わる可能性も注目を集めている。また、細胞ごとにランダムに起こる ASM の可能性も示唆されている。しかしながら、アレル毎のメチル化を長いゲノム領域に渡って明らかにするエピハプロタイピングの方法論は確立されていない。

究極のメチローム解析である単一細胞二倍体メチロームの解明には、単一細胞解析とエピハプロタイピングの両立への挑戦が必要不可欠である。

2. 研究の目的

真核生物ゲノムの重要なエピジェネティック制御機構である DNA のメチル化は、領域

によっては同一細胞種でも個々の細胞によって異なるし、同一細胞内であってもアレル間で異なることもある。したがって、究極のメチロームデータとは、一塩基解像度で単一細胞から二本の染色体を識別できる形で取得されたものということになる。我々が開発した PBAT によって一塩基解像度の単一細胞メチローム解析も実現されつつある現在、次に挑戦すべき課題は二倍体メチロームの解明である。

本研究では、同一遺伝子座位の 2 つのアレルが共存しないように十分に希釈・分割したゲノム DNA に対して、PBAT を反復適用するサブシングルセル解析に挑戦する。そのための基盤として、現行 PBAT の弱点克服に取り組む。

そうして得られたデータから、アレル別のメチル化を明らかにすることによってエピハプロタイプを再構成し、究極のメチローム解析への途を拓くことを目指す。

3. 研究の方法

1) 現行 PBAT による挑戦

単一細胞由来 DNA に対して、ランダムプライミングを用いる PBAT で鋳型に成り難い高 AT 含量の合成ポリマーをキャリアー DNA として加えた上で、96 ないし 384 ウェルに分割することで希釈を行う。次に、各ウェルにおいて、異なるインデックス配列を持つアダプタープライマーを用いて、PBAT 反応を反復する iterative PBAT でライブラリを作成する。最後に、ライブラリをプールしてシーケンスを行い、解析を行う。

2) PBAT の改良

ランダムプライミングを用いない方法として、バイサルファイト変換反応後の 1 本鎖 DNA にアダプタオリゴヌクレオチドを連結する方法を検討する。具体的には、RNA リガーゼを用いる方法と化学的に連結する方法を検討する。

4. 研究成果

当初計画では、ランダムプライミングを用いる現行 PBAT では AT リッチ領域のカバレッジが低いという弱点を逆に利用して、AT リッチな合成ポリマーをキャリアー DNA として利用する予定であった。しかしながら、研究の過程で PBAT の改良の方で大きな進展が見られ、こちらのアプローチの方が当初計画よりも有効であることが期待されたので、研究をそちらに集中することとした。

1) 現行 PBAT の弱点

ランダムプライミングを用いる PBAT 法には、2 つの弱点が存在する。

第一の弱点は、AT リッチな領域ではカバレッジが低くなることである。バイサルファイト変換は、哺乳類の場合、大半の C を U に変換してしまうため、大まかに言って GC 含量

が本来の 50%に低下してしまう。その結果、AT リッチな領域では極端の GC 含量が下がって、ランダムプライミングに用いる N_4 配列との間のハイブリダイゼーションが起こりにくくなってしまう。この弱点を克服するために、修飾核酸などの使用も検討したが、所期の成果は得られなかった。

第二の弱点は、現行 PBAT では極微量解析になればなる程、マッピングできるリードの比率が低下する。ターゲットとなるゲノム DNA が少なくなればなる程、アダプタ同士のプライミングによる人工産物の比率が増加するのが、その原因と考えられる。

つまりどちらの弱点もランダムプライミングに起因している。この点を改善すれば、より効率的なライブラリ作成が実現して、2 倍体メチローム解読に必要な両アレルのカバレッジが可能になる筈である。

2) 一本鎖 DNA 連結法の検討

ランダムプライミングに代わるアダプタ付加法としては、RNA リガーゼによる 1 本鎖 DNA とアダプタの連結が考えられる。1 本鎖 DNA 同士の連結を触媒できる酵素は、DNA リガーゼではなく、RNA リガーゼである。しかしながら、1 本鎖 DNA 同士の連結反応の効率は、1 本鎖 RNA 同士の連結反応の効率に比較すると低いことが知られていた。実際に、市販の各種 RNA リガーゼとその変異体のみならず我々自身で発現精製した RNA リガーゼにも検討を加えたが、それらの効率はいずれも満足のゆくものではなかった。

3) 化学的 1 本鎖 DNA 連結法

酵素による連結法の開発が行き詰ったため、発想を転換して化学的な連結の検討に取り組んだ。そこでクリックケミストリーに着目し、銅触媒を用いるアジドとアルキンとの環化付加反応 (CuAAC: Cu-catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition) の利用を検討することにした。何故ならば、CuAAC 反応の結果、ヌクレオチド間はホスホジエステル結合ではなくてトリアゾールで連結されることになるが、DNA ポリメラーゼによってはこの連結を乗り越えることが報告されていたからである。

CuAAC 反応を行うには、生体由来の DNA にアジドかアルキンを導入する必要がある。そこで我々は抗ウイルス剤として開発された各種の 3'-azido-ddNTP に着目して、これをターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) によって、DNA の 3' 末端に取り込ませることを検討した。

モデルオリゴヌクレオチドを用いた実験で各種の条件を検討した結果、取り込むヌクレオチドとしては 3'-azido-ddGTP が最も効率がよいことが判明した。また、DNA 側の 3' 末端の塩基によって取り込み効率に差が生じることが判明したが、反応系に十分量の TdT と 3'-azido-ddGTP を用いることで、ほぼ

100%の効率で取り込みを行う条件を確立できた (図 1)。

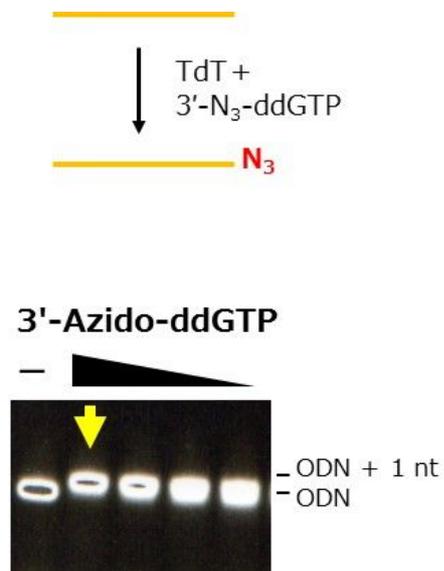


図 1 : TdT による 3'-アジド化標識反応

続いて 5'末端をエチニル化したアダプタオリゴヌクレオチドを東北大学・磯部研究室に合成して頂き、これを用いた CuAAC 反応による連結の最適化を行った (図 2)。その際に、前の反応からの 3'-azido-ddGTP の除去が問題となったが、SPRI ビーズによる精製の反復によってそれを克服する方法を開発した。

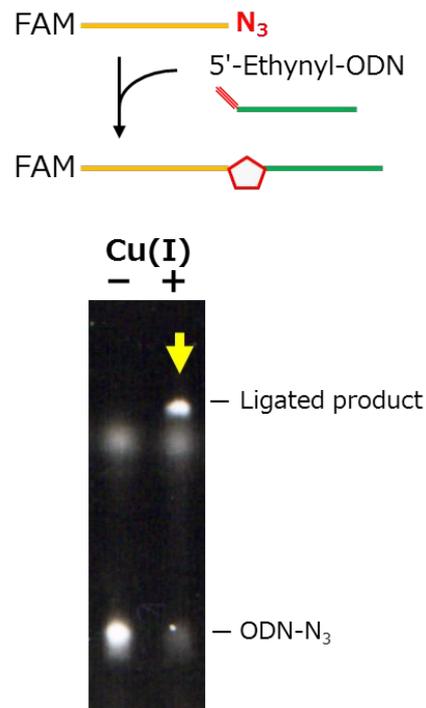


図 2 : CuAAC によるアダプタ連結反応

最後にトリアゾール連結を乗り越える伸長反応を行った (図 3)。更に、DNA ポリメラーゼのスクリーニングを行い、Klenow 断片と

Klenow exo-minus が最も効率がよいことを明らかにした。

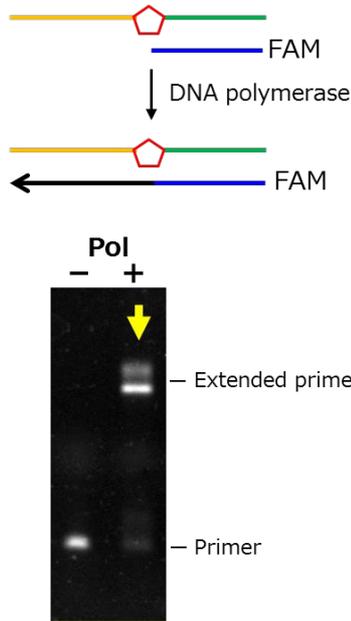


図3：プライマー伸長反応

こうして図2に示すような、1本鎖DNAの3'末端に1本鎖アダプタオリゴヌクレオチドを連結する新しい方法が開発された。現在、論文投稿の準備を進めている。

1本鎖ゲノムDNA (acceptor DNA) 1本鎖アダプタ (acceptor DNA)

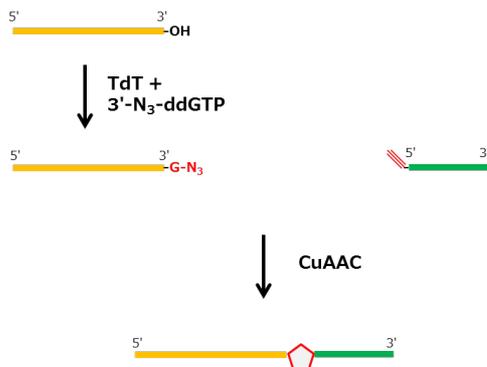


図4：TdTとクリックケミストリーによる1本鎖DNA連結法

4) 酵素的1本鎖DNA連結法

上記の化学的連結法の開発と平行して、酵素による連結法の開発も継続して進めた。その過程で我々は、RNAリガーゼが、3'-OHがRNAから提供されていれば、DNAから提供された5'-Pとの間をRNA同士の間と遜色ない効率で連結できるという報告に着目した。何故ならば、ゲノムDNAの末端をリボヌクレオチドで標識できれば、それがRNAリガーゼのよい基質となる可能性が示唆されたからである。

ここで我々が注目したのが、TdTである。

TdTの基質は、言うまでもなくdNTPであるが、以前よりNTPも限定的に基質として利用できることが知られていた。この場合TdTの反応はNMPを2~4残基取り込んだところで反応を停止する。つまりTdTとNTPを用いれば、限定的なリボ・テーリングが可能になる。実際にこの性質はcDNAの解析等に利用された実績があった。

そこでまずTdTによるNTPの限定的取り込み反応を、オリゴヌクレオチドをモデルに再検討して、非常に高い効率でこれが可能であることを確認した。この際にATPを用いると、次のRNAリガーゼ反応の際にそれをそのまま基質として利用できる。そこで図5に示す様なスキームの反応を考案した。

1本鎖ゲノムDNA (acceptor DNA) 1本鎖アダプタ (acceptor DNA)

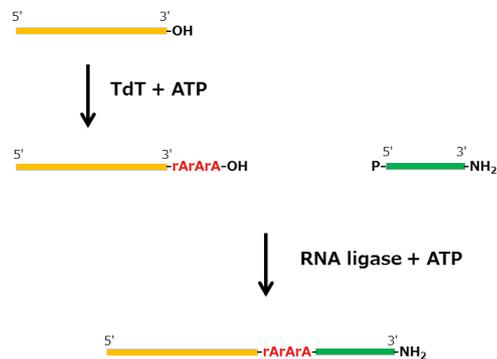


図5：TdTとRNAリガーゼによる1本鎖DNA連結法

これまでの予備的検討によれば、この反応は上記の化学的連結法よりも効率がよく、また特殊な合成オリゴヌクレオチドも必要としない。そのため、汎用性が高く、様々な局面での応用も可能であると考えられたため、特許の出願を行った。

また、このアプローチで試験的に行ったPBATによって、GC含量によるバイアスも軽減されることが確認されている。したがって、今後はその最適化を更にすすめて、シングルセルさらにはサブシングルセル解析の基盤技術とすることとした。

更に、この方法の開発によって、現行PBATでは利用が不可能であった環状DNAをキャリアーDNAと使用することも可能になった。環状DNAは末端へのアダプタ連結には全く利用されないという点で優れたキャリアーDNAになる。したがって、当初予定していたランダムプライミングとATリッチポリマーを用いるアプローチの検討は中断した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1. Toh H, Shirane K, Miura F, Kubo N, Ichiyangi K, Hayashi K, Saitou M, Suyama M, Ito T, Sasaki H. Software updates in the Illumina HiSeq platform affect whole-genome bisulfite sequencing. BMC Genomics 2017, 18, 31. 査読有
2. 三浦史仁, 伊藤隆司, 一細胞エピゲノム解析, 医学のあゆみ 2016, 258, 281-286. 査読無
3. Koike T, Wakai T, Jincho Y, Sakashita A, Kobayashi H, Mizutani E, Wakayama S, Miura F, Ito T, Kono T. DNA methylation errors in cloned mouse sperm by germ line barrier evasion. Biol. Reprod. 2016, 94, 128. 査読有
4. 三浦史仁, 伊藤隆司, 1細胞メチローム解析, 細胞工学 2015, 34, 258-263. 査読無
5. Yokoyama T, Miura F, Araki H, Okamura K, Ito T. Change point detection in base-resolution methylome data reveals a robust signature of methylated domain landscape. BMC Genomics 2015, 16, 594. 査読有
6. Colicchio JM, Miura F, Kelly JK, Ito T, Hileman LC. DNA methylation and gene expression in Mimulus guttatus. BMC Genomics 2015, 16, 507. 査読有
7. Miura F, Ito T. Highly sensitive targeted methylome sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. DNA Res. 2015, 22, 13-18. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

1. 新しい1本鎖DNAの連結反応を用いたPBAT法, ポスター 三浦史仁, 伊藤隆司, 第39回日本分子生物学会年会, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~12/2, 国内
2. An efficient method for single-stranded DNA ligation - An alternative approach for shotgun bisulfite sequencing with PBAT, poster, Miura F, Ito T, IHEC 2016, 2016/9/7-9, 国外
3. 新しい1本鎖DNAの連結反応を用いたPBAT法, ポスター 三浦史仁, 伊藤隆司, 第10回日本エピジェネティクス研究会年会, 2016/5/19-20, 国内

〔図書〕(計 2件)

1. 荒木啓充, 伊藤隆司, エピゲノムのビッグデータ解析, 実験医学増刊ビッグデータ 変革する生命科学・医療, 2016, p.58-64
2. 三浦史仁, 伊藤隆司, エピゲノム解析手技の標準化: 全ゲノムバイサルファイトシーケンシング, 実験医学増刊号 エピゲノム研究 修飾の全体像の理解が

ら先制・個別化医療へ, 2016, p.25-31

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 高効率な1本鎖DNA同士の連結方法
 発明者: 三浦史仁, 伊藤隆司
 権利者: 三浦史仁, 伊藤隆司
 種類: 特許
 番号: 特願 2016-98101号
 出願年月日: 2016年5月16日
 国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 隆司 (ITO, Takashi)
 九州大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号: 90201326

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

三浦 史仁 (MIURA, Fumihito)
 九州大学・大学院医学研究院・講師
 研究者番号: 50447348

(4) 研究協力者

()