

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18469

研究課題名(和文) PAR化修飾によるクロマチン高次構造制御・遺伝子転写調節機構の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analyses of controlling mechanism for higher-order structure of chromatin and gene transcription regulation mediated by Poly-ADP-ribosylation

研究代表者

藤木 克則 (Fujiki, Katsunori)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：10646730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞核内で起きるタンパク質のポリADPリボシル化(PAR化)修飾はその電気的性質から周囲のクロマチン環境を大きく変化させ、遺伝子の転写制御や修復に関わることが知られている。本研究ではこの修飾によるクロマチン高次構造の変化を観測するための新たな研究手法の開発を行った。クロマチン複合体を微小液滴に封入しラベリングを行うことからChIA-dropと名付けたこの手法は、Hi-CやChIA-PETといった既存のクロマチン高次構造の解析手法が2点間のDNAの相互作用情報を大量に取得し蓄積することで高次構造を再構成するのに対し、多点間での相互作用を、1分子の解像度で検出できるようにした初めての方法である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したChIA-drop法を用いることで、PAR化修飾によるクロマチン高次構造制御機構の理解がさらに深まることが期待できる。またこのChIA-drop法はPAR化のみを標的とした解析手法にとどまらず、インプットとして用いるサンプルを変えることで、様々な標的タンパク質を介したクロマチン高次構造の解析に用いることが可能である。ChIA-drop法の多点間のクロマチン相互作用を1分子の解像度で解析できるという特徴は、既存の方法では実現できなかった利点であり、この手法を用いることで広くクロマチン高次構造の研究が進展すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Protein Poly-ADP-ribosylation in cell nuclear drastically changes surrounding chromatin environment by its electric property, and regulates many biological process including gene transcription and DNA repair. In this project, I developed a new research method to detect the change of higher-order chromatin structure by this modification. ChIA-drop, the new method which was named on its use of DNA labeling technology in micro droplet, is the first research method that enables detection of "multi-contact" chromatin interaction in "single-molecule" resolution, and provides advantages over the existing techniques including Hi-C and ChIA-PET that base on accumulation of pairwise-contact information of many molecules.

研究分野：分子生物学

キーワード：PAR化 次世代シーケンサー 1細胞解析 ChIA-drop

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のポリ ADP リボシル化(PAR 化)は、NAD を基質としてポリ ADP リボースポリメラーゼ(PARP)タンパク質により標的タンパク質上に形成されるタンパク質修飾の一種である(図1)。PAR 化は DNA の複製や損傷に反応して生じることが良く知られており、アデニン・リボース・リン酸からなるこの特殊なポリヌクレオチド鎖が損傷部位周辺で形成されることで、DNA 修復関連酵素群の損傷部位へのリクルートや周辺部位のクロマチン構造の変化に関与しているとされている。その他にも最近では、特定の遺伝子の転写制御やテロメア伸長に PAR 化が関わる等の報告も散見される。また申請者はさらに、遺伝子発現の活性化を引き起こす DNA の脱メチル化が、クロマチンの局所的 PAR 化を目印としたヒドロキシメチル化の誘導によることを新たに発見し報告している。

しかしタンパク質の PAR 化が様々な生理的役割を持つことが示唆される一方で、これらの研究報告はどれも散発的かつ現象論的で、意外にも、PAR が具体的にどのような仕組みでこれらの多様な機能を担っているのかという PAR 化の普遍的な役割となると未だ不明な点が多岐にわたる。それには PAR 化の持つ特殊性に原因のひとつがある。PAR 化は、メチル化・アセチル化といった他のタンパク質修飾と異なり『不規則な枝分かれをもつポリマーを形成し分子量・形状が一定しない』『細胞処理の過程で DNA に損傷が生じると様々なタンパク質で過剰に修飾が起きてしまう』『代謝回転が非常に早く分解しやすい』『標的アミノ酸が知られるだけで6種類以上ある』などといった性質を有している。そのため解析に技術的な制約が多く、PAR の発見から 50 年が経とうとしている現在でもその機能には不明な点が多い。

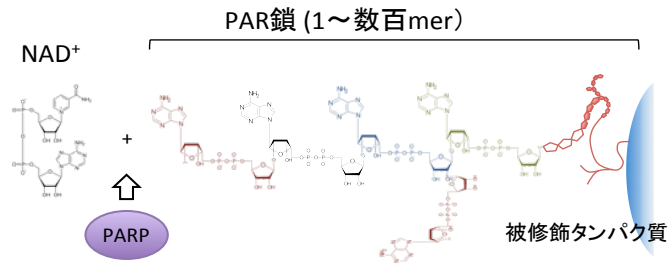


図1 タンパク質の PAR 化は PARP によって触媒されるタンパク質修飾で、NAD を基質としてアデニン・リン酸・リボースからなる不規則な枝分かれを含んだ~数百 mer 程度の特殊なポリヌクレオチドを形成する

2. 研究の目的

PAR は DNA 鎖よりも強く負に帯電した非常に巨大な (~数百 mer) ポリヌクレオチド分子であり、クロマチンの PAR 化はその周囲の静電的環境に作用しクロマチン構造に大きな影響を与えることは容易に想像できる。一方で遺伝子の転写調節には、エピジェネティックな制御やエンハンサー・プロモーター間のループ形成などによる、染色体の高次構造のマクロな変化が深く関わっていることが知られている。そこで、PAR 化がこのような染色体の巨視的な構造とどのように相互関連し遺伝子の転写を調節しているのかを、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな PAR 化を解析するための新たな手法を開発することで明らかにする。

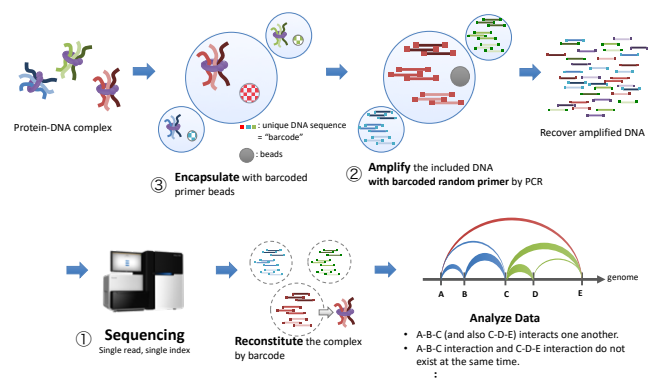
3. 研究の方法

クロマチンの高次構造をゲノムワイドに明らかにする方法としては Hi-C 法や ChIA-PET が用いられるが、これらの方法は多くの DNA 断片のデータを取得しその平均としての高次構造を明らかにする方法である。一方で PAR 化はその修飾の形状が 1 分子ごとに異なっており、各細胞、各ゲノムごとに異なった高次構造をとることが予想された。またこれらの方法は 2 点間のゲノム相互作用の積算により高次構造を推定するが、PAR 化に限らずゲノムの相互作用は 3 点間以上にもわたる可能性が十分考えられる。特に PAR 化については、phase-separation と呼ばれる電気的に相分離した領域を形成していることが近年示唆されている。そこで本研究では、多点間の相互作用を 1 分子ごとの解像度で検出できる手法を開発することで、PAR 化によるゲノム高次構造を解析する。

4. 研究成果

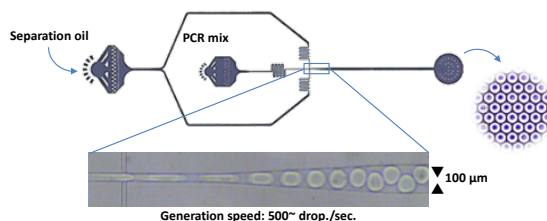
この新技術では、対象の細胞からクロマチン免疫沈降 (ChIP) により濃縮した PAR-タンパク質-DNA 複合体を①マイクロ流体回路を用いて 1 分子ずつ液滴に封入し、②同時に封入したバーコード DNA 配列を付加したランダムプライマーによって液滴中において DNA を増幅し、③増幅した DNA を次世代シーケンサーで配列決定し、バーコード配列によってソートしてそれぞれの PAR-タンパク質-DNA 複合体に含まれていた DNA 領域を決定する、という方法がとられた。

①のマイクロ流体回路の開発においては早稲田大学理工学術院竹山春子研究

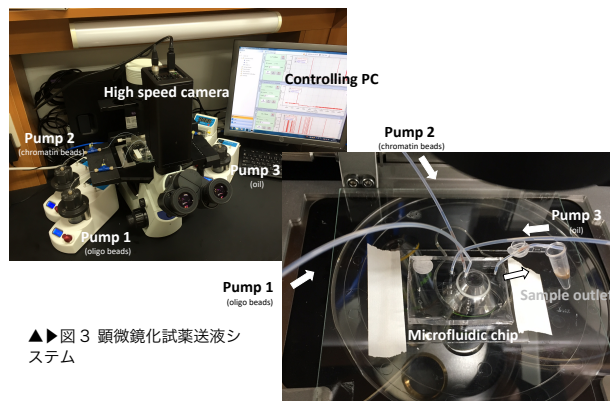


▲ 図2 ChIA-drop 実験の概念図

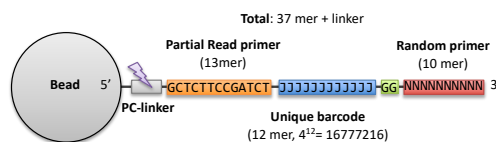
室の細川正人助教の協力のもと行った。フォトリソグラフィにより作製したレジストから2 input-1 outputのPDMS製マイクロ流体チップを作製し(図3上)、スーパースローカメラを取り付けた光学顕微鏡下で、直径~50 μmの液滴中に1分子の複合体と1分子のプライマービーズを数百droplet/secのスピードで封入できる条件を決定した(図3下)。



また②では、8~12塩基のランダム配列の上流に12塩基のビーズ分子特異的なバーコード配列を持ち、さらに上流にシーケンスライブラリを構成するDNA配列を持ったプライマーを設計した(図4)。これらのプライマーは封入後に紫外線照射によって遊離し、適切なプライマー濃度の溶液となるような密度で photocleavable linkerによってビーズ分子に結合された。またビーズ特異的バーコード配列は、split-and-pool法によって合成した。このビーズを用いて、駅的中でDNAを増幅するための最適条件(酵素溶液組成・反応温度・シーケンスライブラリ作製手順等)を検討した。



▲図3 顕微鏡化試薬送液システム

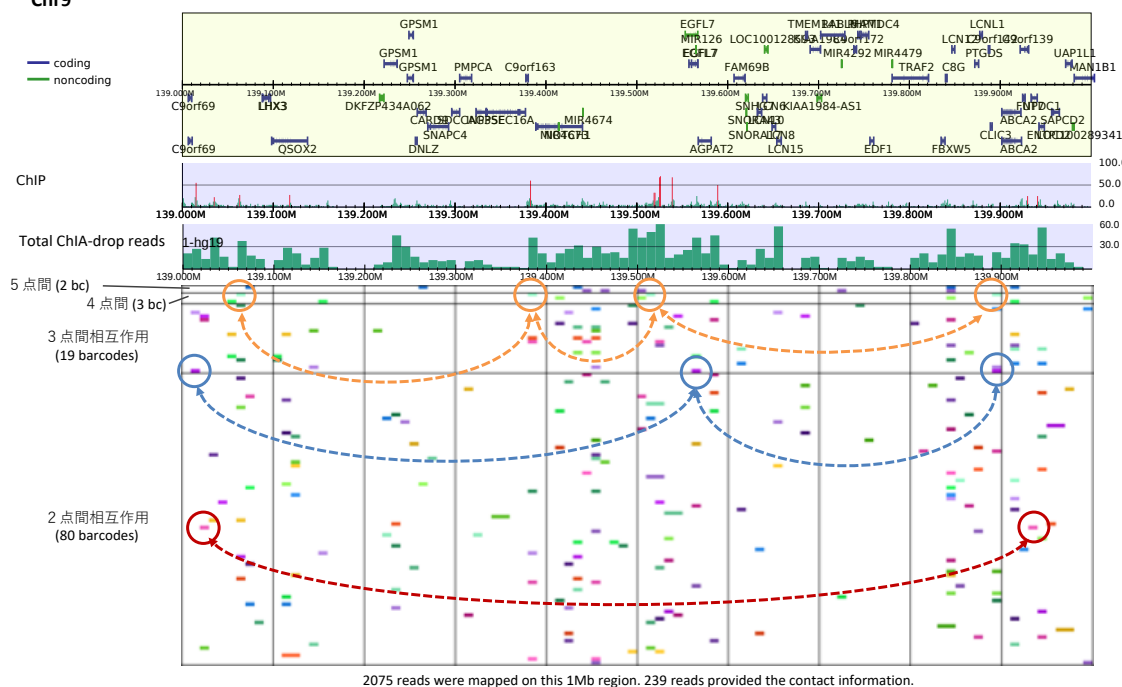


▲図4 プライマーのデザイン

さらに③では、出力された大量のデータを解析しクロマチン高次構造を明らかにするための情報学的解析プログラムを新たに開発した。解読されたデータからバーコード情報を取り出し、この情報を元に下流のPAR相互作用配列を分類して各PAR-タンパク質-DNA複合体を再構成し、ゲノム上のどの点がPARを介して相互作用しているのかを検出した。

これらの一連の技術を用いて、実際の細胞内における相互作用を検出することに成功した。ChIA-dropと名付けたこの手法は、ChIA-PETが可能にした”着目したタンパク質が介在するクロマチン高次構造の解析”を、1分子の解像度で、多点間の相互作用を検出できるようにした初めての方法となった。さらにChIA-dropの検出感度と実験の利便性を改善するために反応系の改良を進めるとともに、PAR化修飾によるクロマチン高次構造の解析を行った。(図5)

Chr9



▲ 図5 ChIA-dropによるクロマチンの相互作用の解析例。(上段)このクロマチン領域における遺伝子分布 (中段) ChIP結果とChIA-dropの積算データの比較 (下段) ChIA-dropの各分子データ。横方向同色の点が入った液滴から検出された=同時に相互作用していたDNA領域。このクロマチン領域では最大5点間の相互作用が検出されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

藤木克則, 細川正人, 竹山春子, 白髭克彦, Development of a New Research Method for Multi-contact Genomic Interaction Analysis. ポスター, 第41回日本分子生物学会年会, 2018.11.29

〔図書〕(計 1件)

藤木克則, 白髭克彦, 羊土社, 『実験医学別冊 最強のステップUPシリーズ・シングルセル解析プロトコール』「クロマチン免疫沈降法 ChIP-seq」、2017、pp241-247

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。