

令和元年6月26日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19356

研究課題名(和文)トランスオミクス情報を一度に獲得する手法の開発

研究課題名(英文)Development of a method to acquire transome at once

研究代表者

大川 恭行(Ohkawa, Yasuyuki)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80448430

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):細胞の遺伝情報はゲノムに存在する遺伝子にコードされている。一方で、人体を形成する細胞は全て同一の遺伝情報を持つ。そのため、細胞が固有の機能を獲得し組織形成し個体形成に至るには、選択的な遺伝子発現が不可欠である。この選択的な遺伝子発現を理解するには、(1)転写制御系の解明、転写因子の結合、ヒストン修飾やクロマチン構造変換、RNAポリメラーゼIIの遺伝子座への結合に至る一連のダイナミクスの同時測定、(2)RNA量の測定に至る多角的な測定を、同一サンプルを用いて行うことが必要である。本研究では、各階層を横断的に測定するトランスオミクスデータ同時取得法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾病等の根拠的治療のためには、疾病の原因あるいは標的となる細胞を単一細胞レベルで解析する精度の高い理解が必要である。現在までに取得可能な情報はトランスクリプトームや一部の情報に限られていた。本研究は、その手法を拡張し、生体内のゲノムからタンパク質までの解析を可能にする技術的基盤の構築を行った。本研究の成果により早期に包括的な単一細胞解析の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文):The genetic information in cells is encoded by genes on the genome DNA. Cell in the human body have the same genetic information, and selective gene expression is essential for cells to acquire their individual functions, to form specific tissues. To understand this selective gene expression, it is essential to elucidate a set of events of transcription on chromatin, such as binding of transcription factor, histone modification and chromatin remodeling, binding to RNA polymerase II locus. To analyze this dynamic events in transcription, it is critical to develop new technology to multi-layered analysis including a measurement of RNA amount and epigenome state using the same sample. In this study, we approached to develop a new transomics methods that could measure across layers.

研究分野：クロマチン

キーワード：マルチオミクス トランスクリプトミクス クロマチン 次世代シーケンサー 定量生物学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在最もダイナミックレンジが広く再現性が高い計測機器は大規模シーケンサー（次世代シーケンサー:NGS）である。我々はこれまで数々のエピゲノム解析やトランスクリプトーム解析を行ってきた。大規模シーケンサーは、ゲノムや転写産物の配列を断片化された DNA 配列として決定する。その解析能力は、人工的なオリゴであっても正確に 1 分子単位で定量することが可能でありそのダイナミックレンジは一桁から  $10 \times 8$  レベルまでと現在の分析器の中でも圧倒的である。そこで本研究では、細胞内のトランスオミクス情報を一度すべて人工的に設計された RNA 情報に変換し、シーケンサーにより定量することでエピゲノミクス（全ゲノム上での転写因子の結合やヒストン修飾等のエピゲノム情報の解析）、トランスクリプトミクス（転写産物の解析）、プロテオミクス（全タンパク質の解析）のトランスオミクス情報を一度に獲得することを目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では、特定のゲノム領域に存在する転写因子、ヒストン修飾、クロマチン制御因子等の結合情報、そして転写産物に焦点を当て、これらのエピゲノム、トランスクリプトミクス等の同時解析を試みた。基本的には RNA 以外の分子を全て人工的な RNA に変換し、細胞のすべての情報を RNA として回収後、大規模シーケンサーで解析することで、分子種、分子数の定量を試みる。固定した細胞を持ちいた用いたエピゲノム情報の RNA 化（ChIL 法）の未固定細胞への応用を免疫希釈法の樹立により進め、トランスクリプトームデータとの同時取得を進める。更に、未固定細胞における抗原抗体反応の条件検討を進めることでプロテオーム情報の RNA 情報への変換を試みた。

### 3. 研究の方法

細胞数を 10,000 個程度として、本法の条件設定と安定作動条件の調整を行った。そのため、最も技術的に困難な未固定細胞を用いたエピゲノムデータの RNA 化に焦点を当てた。当初は、使用抗体を、ヒストン修飾 H3K4me3 あるいは H3K27me3 のそれぞれ活性化クロマチン領域、抑制型クロマチン領域に絞り、の検出を試みた。検討を進めたプロトコールを以下に示す。（クロマチンに結合する抗体プローブの作製）1) PEG リンカーを挟んでランダム配列、T7RNA プロモーター配列、6 塩基の index 配列（抗体を識別させる）と 8 塩基の分子バーコードとを加えた DNA を合成し抗体に架橋を行う。（クロマチン上での抗原抗体反応）2) DNA を結合させた抗体を用いて通常の免疫染色同様に細胞（今回は NIH3T3 細胞を用いる）に抗体を反応させる。（クロマチン領域の分割）3) RIPA バッファー（1%SDS とデオキシコール酸を含む強変性バッファー）を用いて可溶化させ、閉鎖系にて微量で超音波破碎とによるクロマチン断片化を同時に行う。尚、我々の用いる抗体は通常のエピゲノム解析において超音波破碎 RIPA バッファーでも反応しているため抗体の反応性に問題はない(Harada et al Nucleic Acids Res. 2015)。（分割したクロマチンの分画と識別化）次に、破碎液をそれぞれに異なる標識配列を含む 96 ウェルプレートや droplet 等に分画した。96 ウェルでの反応系を検証し、反応が確認されたため既に導入している droplet システムにより、10 万ウェル以上に相当する希釈と、分画されたゲノムと対応抗体に付加した DNA を共通の標識配列のついた RNA として転写した。この標識配列の付加には GEM と呼ばれる多様なアダプターをそれぞれゲル化したものを用いた(Hashimshory et al Genome Biol 2016.)。以上の工程により、H3K4me3 が反応したゲノム断片と H3K4me3 抗体に付加されたオリゴの index 配列が同時に存在していたことを確認した結果、同じ分画つまり同じ識別配列からであることが検出されたと判断した。

### 4. 研究成果

1 回の試行で得られるゲノム領域は、希釈したウェルで割ったものに対応する約 400 塩基の領域程度の空間解像度であった。これは通常の ChIPseq とほぼ同程度の解像度に相当し遺伝子レベルでの解析に相当する。また、この工程を繰り返し収集することで、細胞に普遍的に存在するシグナルについては、エラー率（近接しない DNA の誤検出率）1%以下の高精度な解像度のデータを得られることが将来的には可能と考えられ、原理的には 1 細胞レベルでの解析が見込まれた。一方で現在もまだ開発は継続しており、複数の細胞について工程を繰り返すことで解像度と信頼性を高めていく予定である。本工程における技術的な課題点は、極微量の DNA 断片を増幅させる方法であるが、T7RNA Polymerase と template switch 法を併用した手法で ChIP 断片の増幅をルーチンに行っており問題なかった。サンプル数の爆発的な増大については、dropletを用いることで半自動化し外部 DNA による汚染の問題を解決し効率よくライブラリー作成を行うことで解決を図った。これら手法で得られたライブラリーは HiSeq1500 で 10 億リード程度データを取得した。まず、得られたリード情報をすべてゲノム上にマップさせることで、ゲノム上で情報が獲得される領域を評価決定したけっか、実効リードは 5 - 10%と決して効率は高くないが解析には十分であった。実際に標識配列ごとに得られたゲノム領域の頻度を計算し最終的にシグナルが集積された領域の数と集積しないゲノム領域の数が十分な解像度に達したか評価を行い、十分と判断した。これら手法を複数のバッファー条件および超音波破碎条件にて検討を行い、最もシグナルが濃縮される実験情報の確定を行った。得られたデータはすでに取得している H3K4me3 及び H3K27me3 のデータ(Harada et al. Nucleic Acids Res. , 2015)と比較を行いデータ再現性の確認を行い、現在論文投稿準備中である。ターゲットとする標的分子の多様化をエピゲノム、トランスクリプトミクスに加えてプロテオミクスの追加も図った。独自に多くの標準データを所持する骨格筋芽細胞 C2C12、加えてを NIH3T3 細胞

に加えて解析を行った。エピゲノム及び、プロテオームデータの取得には独自に作出しているため、量的に無限無制限に得ることが採取可能である以下のモノクローナル抗体を用いた。

1) 転写因子群: MyoD, SRF, Myf5、2) クロマチンリモデリング因子群: Brg1, Brm, Chd1, Chd2 (Harada et al., EMBO J., 2012)、3) ヒストン修飾: H3K4me3 及び H3K27me3 (これらのみ購入) 4) RNA ポリメラーゼ II。これら 4 群の解析 (計 7 種) について異なる index (識別配列) をつけた抗体を作出した。現在解析を進めている。以上、当初提案をほぼ達成し、論文発表順を進めている。本研究で得られた知見、技術については早期に公開して技術供与を進めていきたい。

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 36 件)

1. Locomotor Training Increases Synaptic Structure With High NGL-2 Expression After Spinal Cord Hemisection. Kobayakawa K, DePetro KA, Zhong H, Pham B, Hara M, Harada A, Nogami J, Ohkawa Y, Edgerton VR. *Neurorehabil Neural Repair*. 2019 Mar;33(3):225-231.
2. Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: HeyL requires Hes1 to bind diverse DNA sites. Noguchi YT, Nakamura M, Hino N, Nogami J, Tsuji S, Sato T, Zhang L, Tsujikawa K, Tanaka T, Izawa K, Okada Y, Doi T, Kokubo H, Harada A, Uezumi A, Gessler M, Ohkawa Y, Fukada SI. *Development*. 2019 Feb 20;146(4). pii: dev163618.
3. Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury. Yokota K, Kubota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Maeda T, Katoh H, Ohkawa Y, Nakashima Y, Okada S. *Mol Brain*. 2019 Jan 9;12(1):4.
4. A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input. Harada A, Maehara K, Handa T, Arimura Y, Nogami J, Hayashi-Takanaka Y, Shirahige K, Kurumizaka H, Kimura H, Ohkawa Y. *Nat Cell Biol*. 2019 Feb;21(2):287-296.
5. Fetal Leydig cells dedifferentiate and serve as adult Leydig stem cells. Shima Y, Miyabayashi K, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Doi M, Okamura H, Suzuki K. *Development*. 2018 Dec 5;145(23). pii: dev169136.
6. Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids. Baba T, Otake H, Inoue M, Sato T, Ishihara Y, Moon JY, Tsuchiya M, Miyabayashi K, Ogawa H, Shima Y, Wang L, Sato R, Yamazaki T, Suyama M, Nomura M, Choi MH, Ohkawa Y, Morohashi KI. *Commun Biol*. 2018 Mar 22;1:18.
7. Cancer-associated mutations of histones H2B, H3.1 and H2A.Z.1 affect the structure and stability of the nucleosome. Arimura Y, Ikura M, Fujita R, Noda M, Kobayashi W, Horikoshi N, Sun J, Shi L, Kusakabe M, Harata M, Ohkawa Y, Tashiro S, Kimura H, Ikura T, Kurumizaka H. *Nucleic Acids Res*. 2018 Nov 2;46(19):10007-10018.
8. MNase, as a probe to study the sequence-dependent site exposures in the +1 nucleosomes of yeast. Luo D, Kato D, Nogami J, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Kono H. *Nucleic Acids Res*. 2018 Aug 21;46(14):7124-7137.
9. The Autism-Related Protein CHD8 Cooperates with C/EBP  $\beta$  to Regulate Adipogenesis. Kita Y, Katayama Y, Shiraishi T, Oka T, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Miyata K, Oike Y, Shirane M, Nishiyama M, Nakayama KI. *Cell Rep*. 2018 May 15;23(7):1988-2000.
10. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. Harada A, Maehara K, Ono Y, Taguchi H, Yoshioka K, Kitajima Y, Xie Y, Sato Y, Iwasaki T, Nogami J, Okada S, Komatsu T, Semba Y, Takemoto T, Kimura H, Kurumizaka H, Ohkawa Y. *Nat Commun*. 2018 Apr 11;9(1):1400.
11. Cryo-EM structure of the nucleosome containing the ALB1 enhancer DNA sequence. Takizawa Y, Tanaka H, Machida S, Koyama M, Maehara K, Ohkawa Y, Wade PA, Wolf M, Kurumizaka H. *Open Biol*. 2018 Mar;8(3). pii: 170255.
12. Direct Reprogramming of Spiral Ganglion Non-neuronal Cells into Neurons: Toward Ameliorating Sensorineural Hearing Loss by Gene Therapy. Noda T, Meas SJ, Nogami J, Amemiya Y, Uchi R, Ohkawa Y, Nishimura K, Dabdoub A. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Feb 14;6:16.
13. Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images. Kondo Y, Higa S, Iwasaki T, Matsumoto T, Maehara K, Harada A, Baba Y, Fujita M, Ohkawa Y. *PLoS One*. 2018 Jan 19;13(1):e0191532.
14. Identification of miR-305, a microRNA that promotes aging, and its target mRNAs in *Drosophila*. Ueda M, Sato T, Ohkawa Y, Inoue YH. *Genes Cells*. 2018 Feb;23(2):80-93.
15. Ser7 of RNAPII-CTD facilitates heterochromatin formation by linking ncRNA to RNAi. Kajitani T, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Kimura H, Ohkawa Y, Obuse C, Hermans D, Murakami Y. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Dec 26;114(52):E11208-E11217.

16. Biochemical and immunological characterization of a novel monoclonal antibody against mouse leukotriene B4 receptor 1. Sasaki F, Koga T, Saeki K, Okuno T, Kazuno S, Fujimura T, Ohkawa Y, Yokomizo T. PLoS One. 2017 Sep 18;12(9):e0185133.
17. The requirement of Mettl3-promoted MyoD mRNA maintenance in proliferative myoblasts for skeletal muscle differentiation. Kudou K, Komatsu T, Nogami J, Maehara K, Harada A, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Ohkawa Y. Open Biol. 2017 Sep;7(9). pii: 170119.
18. The novel heme-dependent inducible protein, SRRD regulates heme biosynthesis and circadian rhythms. Adachi Y, Umeda M, Kawazoe A, Sato T, Ohkawa Y, Kitajima S, Izawa S, Sagami I, Taketani S. Arch Biochem Biophys. 2017 Oct 1;631:19-29.
19. Persistent detection of alternatively spliced BCR-ABL variant results in a failure to achieve deep molecular response. Yuda J, Miyamoto T, Odawara J, Ohkawa Y, Semba Y, Hayashi M, Miyamura K, Tanimoto M, Yamamoto K, Taniwaki M, Akashi K. Cancer Sci. 2017 Nov;108(11):2204-2212.
20. Evolution of the sperm methylome of primates is associated with retrotransposon insertions and genome instability. Fukuda K, Inoguchi Y, Ichiyangi K, Ichiyangi T, Go Y, Nagano M, Yanagawa Y, Takaesu N, Ohkawa Y, Imai H, Sasaki H. Hum Mol Genet. 2017 Sep 15;26(18):3508-3519.
21. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, Kumamaru H, Yokota K, Saito T, Kijima K, Yoshizaki S, Harimaya K, Nakashima Y, Okada S. Nat Med. 2017 Jul;23(7):818-828.
22. Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. Semba Y, Harada A, Maehara K, Oki S, Meno C, Ueda J, Yamagata K, Suzuki A, Onimaru M, Nogami J, Okada S, Akashi K, Ohkawa Y. Nucleic Acids Res. 2017 Sep 6;45(15):8758-8772.
23. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. Kato D, Osakabe A, Arimura Y, Mizukami Y, Horikoshi N, Saikusa K, Akashi S, Nishimura Y, Park SY, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Matsumoto A, Kono H, Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H. Science. 2017 Apr 14;356(6334):205-208.
24. Crystal Structure and Characterization of Novel Human Histone H3 Variants, H3.6, H3.7, and H3.8. Taguchi H, Xie Y, Horikoshi N, Maehara K, Harada A, Nogami J, Sato K, Arimura Y, Osakabe A, Kujirai T, Iwasaki T, Semba Y, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Biochemistry. 2017 Apr 25;56(16):2184-2196.
25. Thymine DNA glycosylase modulates DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and independent mechanisms. Nakamura T, Murakami K, Tada H, Uehara Y, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Saitoh H, Nishitani H, Ono T, Nishi R, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Genes Cells. 2017 Apr;22(4):392-405.
26. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. Kujirai T, Horikoshi N, Sato K, Maehara K, Machida S, Osakabe A, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Nucleic Acids Res. 2017 Apr 7;45(6):3612.

〔学会発表〕 関連する発表なし

〔図書〕 なし

〔産業財産権〕

出願準備中

〔その他〕 該当なし

ホームページ等

<http://tx.bioreg.kyushu-u.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

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。