

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02374

研究課題名(和文) 真の1細胞情報に基づく、クロマチンダイナミクスの正確な解明

研究課題名(英文) a novel strategy toward chromatin dynamics based on precise single-cell information

研究代表者

永野 隆 (Nagano, Takashi)

大阪大学・蛋白質研究所・招へい教授

研究者番号：70272854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のエピゲノム情報を調べる場合、従来は同種細胞を多く集めてその平均値を得ることが一般的であったが、近年の技術進歩により1細胞ごとの解析も可能になってきた。その結果、これまで均一と思われていた細胞集団が実は均一ではなく、マイナーな小集団が内在していたり動的変化が見出されたり、新知見が得られている。そのような1細胞エピゲノムデータを更に有効活用するには、単独のデータではなく同じ1細胞から複数のデータを同時取得して比較するのが望ましいが、その技術的ハードルは高かった。本研究ではクロマチン高次構造と細胞形質との関係を真の1細胞解像度で調べるため、両データを同じ1細胞から取得する新技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピゲノム情報は細胞形質制御を通じ、多細胞生物個体内で細胞の多様性を支えている。複数の階層からなるクロマチン高次構造もエピゲノム情報の1種であり、やはり細胞形質の決定に関わるが、細胞形質が不変でもクロマチン高次構造は細胞周期進行と共に変化する。そのため、個体発生や腫瘍など増殖と形質変化が共存する場合、クロマチン高次構造が果たす役割はこれまで不明確であった。本研究で開発した新技術によって細胞周期進行の影響を排除しながらクロマチン高次構造の変化を1細胞ごとに調べることが可能となり、クロマチン高次構造を通じた細胞形質制御の全体像を、高次構造階層の枠を超えて明らかにできると期待される。

研究成果の概要(英文)：To analyze epigenomic information of the cell, it has been a normal practice to acquire an average information across millions of cell population that are regarded as homogeneous. However, recent technical progress has enabled to detect epigenomic information from single cells. These single-cell approaches have revealed heterogeneity within a "homogeneous" cell population, for example minor cell groups with distinct epigenomic characteristics and dynamic reorganization of the epigenomic information. To make the most of such unprecedented findings, it is ideal to acquire multiple epigenomic information from the same single cells and correlate them with each other within each single cell, which is still technically challenging. In this study, we have developed a new method to get information on three-dimensional chromatin structure and cellular phenotype simultaneously from the same single cells.

研究分野：エピゲノミクス

キーワード：クロマチン高次構造 エピジェネティクス 1細胞解析 Hi-C RNA-seq

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物一個体の持つ千差万別の体細胞どうしの間でゲノムの配列情報はほぼ同じだが、そこに独自のエピゲノム情報(ここではDNAやクロマチン蛋白質の修飾だけでなく、それらと密に関連するクロマチン構築やその高次構造も含める)が加わることで各細胞種に特有の遺伝子発現パターンなどの形質が安定して生み出される。これらエピゲノム情報や遺伝子発現など細胞形質の情報は、従来は既知の知識に基づき準備した「均一な細胞集団」から「平均的な情報」として得るのが通例であった。しかし近年の技術の進歩により、1細胞ごとにエピゲノムや遺伝子発現の情報を得ることが次第に可能になりつつある。そして1細胞レベルでの解析の結果、それまで均一と見なされていた細胞集団内にサブグループが見出されたり、個々の細胞間の多様性が動的変化の一環だと判明したりするなど、従来の「細胞集団の平均」に基づく常識を書き換える新発見がもたらされている。例えば細胞分裂間期のクロマチン高次構造に関して、細胞集団の解析では細胞周期進行に伴う変化は知られていなかった。それに対し本研究代表者は数千個の細胞のクロマチン高次構造を1細胞ごとに捉えて横断的に比較することで、細胞周期がG1期・S期・G2期と進行するに伴いクロマチン高次構造に大規模で連続的な再構成が起きていることを見出した。

クロマチン高次構造を含めたエピゲノム情報がそれぞれ独立したものではなく互いに影響を与え合い、その結果として細胞形質が決まる、という概念は細胞集団を用いた研究で確立されている。しかし1細胞レベルでは、上述した通り増殖細胞のクロマチン高次構造には細胞周期変化に伴う大規模な再構成が絶えず進行していることが判明した。ならば他のエピゲノム情報や細胞形質にも、実際は各細胞ごとにクロマチン高次構造と連動した変化が隠れている可能性がある。特に発生過程や疾患などで細胞形質が変化する過程で細胞形質とクロマチン高次構造のリアルタイムに近い関係を見出すことができれば、クロマチン高次構造の意義を理解する上で大きな意義がある。

### 2. 研究の目的

クロマチン高次構造と他のエピゲノム情報や細胞形質の関係を各1細胞ごとに捉えて比較するため、本研究ではクロマチン高次構造に関する情報と他のエピゲノム情報や遺伝子発現情報を同じ1細胞から得る方法を新たに開発する。これにより、特定細胞の特定ゲノム領域における実際の(平均ではない)エピゲノム情報を、同じ細胞・同じ領域の実際のクロマチン高次構造と1細胞解像度でリンクさせることが可能になる。この1細胞データどうしのリンクを細胞横断的に集積し、それらが変化する様子やその仕組みを動的かつより正確に理解する基盤を作ることを目指す。

### 3. 研究の方法

1細胞からエピゲノム情報を取得する1細胞エピゲノミクスの手法は、2021年現在では以前に比べ普及してきたが、同じ1細胞から2つ以上のエピゲノム情報を同時に取得することは技術的にまだハードルが高く、特にクロマチン高次構造情報との組み合わせは世界的に見てもほとんど例がない。クロマチン高次構造情報の取得には細胞を架橋固定する必要があるが、エピゲノミクスの手法には架橋固定をしないものも多いので、それに由来する問題を回避するため、本研究開始当初は、クロマチン高次構造情報の取得にはHi-C法を、エピゲノム情報の取得にはサンプルの架橋固定を行なうChIL法を用いて、同じ1細胞から2種類のエピゲノム情報を同時取得できる手法の確立を目指した。ChIL法とは、クロマチン上で任意の抗体により認識される領域のDNAに、抗体に結合させたトランスポゼースの働きで挿入配列を導入し、それを利用して挿入部分に隣接するDNA配列を増幅し次世代シーケンスにより同定する手法である。ChIL法では最初に用いた抗体の認識部位近傍にあるゲノム配列を知ることができ、従来のクロマチン免疫沈降法(ChIP法)と同様のデータをChIP法よりも高感度で得ることができる。

しかし実際にHi-C法とChIL法を組み合わせると、Hi-C法が前提とする懸濁液中の細胞に対し、トランスポゼースの作用を安定的に得ることが困難であった(ChIL法は本来、プレートなど固相に付着した細胞サンプルを対象に開発された技術である)。それに対する改善策を模索したが、これまでのところHi-C法とChIL法を組み合わせると当初計画した新規1細胞ゲノミクスの手法を実現するには至っていない。

そこで方針を転換し、Hi-C法とRNA-seqを組み合わせ、同じ1細胞からクロマチン高次構造情報と共にエピゲノム情報を鋭敏かつ総合的に反映する遺伝子発現データを同時取得する手法の確立を目指した。暫定的なプロトコルを確立し、これに基づいて実際に次世代シーケンス解析を繰り返し行なって検討と改良を重ね、下記の通り実用的な手法の確立に至ることができた。

### 4. 研究成果

1細胞Hi-C法と1細胞RNA-seqを組み合わせ、2種類のデータを同時取得するための暫定的

プロトコルを確立し、これに基づいて実際に次世代シーケンス解析を行なったところ、データの再現性については安定していることが確認できた。しかし通常の1細胞 Hi-C データと比較すると、当初は暫定的プロトコルで得られる1細胞 Hi-C データの情報量が乏しく、また Hi-C データと RNA-seq データの品質は互いに相反する傾向が認められた。そこで得られる2種類のデータ品質を両立しつつ高め、更には時間的・経済的に効率良く多くの細胞からデータが得られるよう暫定的プロトコル各部の改善に取り組んだ。その結果、データ品質に関しては RNA-seq データ品質を損なうことなく Hi-C データの情報量を通常の1細胞 Hi-C データと同等レベルまで引き上げることができた。実験効率に関しては、liquid handling 自動化システムに適應させることで、96 ウェルプレートにソートした1細胞から最速3日間で Hi-C ライブラリと RNA-seq ライブラリが作成できるようになった。また1細胞あたりの実験コストも、当初と比べて Hi-C ではおおよそ半分に、RNA-seq では1/4 にまで減らすことが可能になった。

ここまでの検討の結果確立された手法を用い、増殖中の株化培養細胞 (HCT116) 数百個の1つ1つから同時取得したデータの間関係を調べたところ、Hi-C データと RNA-seq データは矛盾なく合致しており、新開発した手法により当初の狙い通りのデータが得られることが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Samuel Collombet, Noemie Ranisavljevic, Takashi Nagano, Csilla Varnai, Tarak Shisode, Wing Leung, Tristan Piolot, Rafael Galupa, Maud Borensztein, Nicolas Servant, Peter Fraser, Katia Ancelin and Edith Heard	4. 巻 580
2. 論文標題 Parental-to-embryo switch of chromosome organization in early embryogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 142-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-2125-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Koohy H, Bolland DJ, Matheson LS, Schoenfelder S, Stellato C, Dimond A, Varnai C, Chovanec P, Chessa T, Denizot J, Manzano Garcia R, Wingett SW, Freire-Pritchett P, Nagano T, Hawkins P, Stephens L, Elderkin S, Spivakov M, Fraser P, Corcoran AE, Varga-Weisz PD.	4. 巻 19
2. 論文標題 Genome organization and chromatin analysis identify transcriptional downregulation of insulin-like growth factor signaling as a hallmark of aging in developing B cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13059-018-1489-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Wing Leung and Takashi Nagano	4. 巻 -
2. 論文標題 High-throughput preparation of improved single-cell Hi-C libraries using an automated liquid handling system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永野 隆	
2. 発表標題 クロマチンの高次構造ダイナミクスと複製周期	
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回年会（招待講演）	
4. 発表年 2019年	

1. 発表者名 永野 隆
2. 発表標題 1 細胞レベルで見直した分裂間期マウスES細胞のクロマチン高次構造
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 永野 隆（分担執筆）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 270
3. 書名 クロマチン解析実践プロトコール	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	大川 恭行  (Ohkawa Yasuyuki)  (80448430)	九州大学・生態防御医学研究所・教授   (17102)	
連携研究者	木村 宏  (Kimura Hiroshi)  (30241392)	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授   (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

フランス	Institut Curie			
米国	Florida State University			
英国	Babraham Institute	University of Birmingham		
イスラエル	Weizmann Institute			
ドイツ	EMBL			