

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19432

研究課題名（和文）単一細胞超高解像度解析を可能にするゲノム3次元構造解析技術の開発

研究課題名（英文）Capture of three-dimensional structure by ultra-high resolution on single cell

研究代表者

原田 哲仁（Harada, Akihito）

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：60596823

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：我々は骨格筋分化における遺伝子の空間的配置は「増殖段階における遺伝子発現抑制」と「分化過程における転写誘導」を担う遺伝子発現制御機構であることを報告している。また、近年の報告で、癌形成過程で遺伝子の空間配置が変化していることから、heterogeneityを持つ細胞群における1細胞空間配置解析が必要であるが現段階で実用レベルの技術が存在していない。本研究では、ハイスループットな1細胞空間配置解析手法である3DChILTの開発を試みた。その結果、Tn5によるin situでのDNA挿入法と2段階のバーコード識別法の開発に成功し3D-ChILT法に利用できる目途が立った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の空間配置解析法では臨床分野での応用に限られる。これは、現在の空間配置解析プロトコルでは、技術的な煩雑さとコスト高により普及していないことが一因ある。本研究は、制限酵素によるバイアスを受けない点、かつ少数細胞でハイスループットな空間配置情報を解析する点でこれまでの空間配置情報解析方法とは異なる。3D-ChILTは、多数細胞の解析では発見が困難であった「細胞間での3次元構造の均一性、不均一性」や「揺らぎ」も明らかに出来ると期待される。得られる知見は、申請者の研究対象である骨格筋分化の分野のみならず、生体内でのあらゆる細胞分化・発生現象の研究分野にも大きなインパクトを与えられよう。

研究成果の概要（英文）：We have previously reported that the spatial arrangement of skeletal muscle genes plays a crucial role in the gene expression regulation mechanism in the forms of the suppression of gene expression in the growth state and the induction of transcription at the differentiation stage. In recent years, it has been shown that the spatial arrangement of genes alters during the course of oncogenesis and the need for the spatial analysis of genes within cells at the tissue level has arisen. However, there still lacks a reliable technology for collecting high-precision single cell-level data in heterogenous cell populations. In this study, we attempted to develop such a high-throughput single-cell spatial arrangement analysis method, 3DChILT. As a result, we succeed to develop in situ DNA insertion methods with Tn5 transposase and 2-step barcode indexing method. Accordingly, we have accomplished a certain thing usable of 3D-ChILT method.

研究分野：エピゲノム

キーワード：ゲノム生物 エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、骨格筋分化における遺伝子の空間的な配置は、増殖段階における発現抑制と分化時の転写誘導の2役を担う遺伝子発現制御機構であることを示した(Harada *et al*, *NAR*, 2015)。近年、癌化は秩序だった遺伝子発現制御機構の破綻(空間配置の乱れ)により起こることが明らかとなった(Mifsud *et al*, *Nature Genetics*, 2015)。次世代シーケンサーによるこれまでの空間配置情報の取得では、近接した DNA 群を取得する際に、近接 DNA 情報が一つの組み合わせしか取り出せないため、組み合わせ数の問題から多くの細胞とリード数を必要としていた。最近、現行法のペア情報の取得という考え方を捨て、近接 DNA 情報を同時に識別可能な GAM 法が報告された。しかしながら、方法は煩雑であるため限られた研究グループでしか解析出来ない。我々は、研究者らが安定的に精度の高い空間配置情報を得られる手法の確立を目指し、3D-ChILT 法の着想に至った。

3D-ChILT 法は、我々が最近開発した少数細胞でのクロマチン免疫沈降解析法 ChILT を基本としている。また、所属研究室でルーチンに行っている Droplet 法を用いた単一細胞トランスクリプトーム解析を応用することで、ハイスループット化が期待できる。本法の開発により、空間配置解析プロトコルの平易化につながることから、波及効果は高いと考えている。さらに、ChILT 法に含まれる”細胞の識別法”と”微量 DNA の増幅法”は、空間配置解析法だけでなく、様々な既存の解析法に応用できる微量解析法のアイデアを提供できると考えており。本法の確立は、最初のモデルケースになると期待される。

2. 研究の目的

我々は、骨格筋分化における遺伝子の空間的配置は「増殖段階における遺伝子発現抑制」と「分化過程における転写誘導」の2役を担う遺伝子発現制御機構として必須であることを報告した(Harada *et al*, *NAR*, 2015)。近年、癌形成過程で遺伝子の空間配置が変化することが明らかとなり、組織レベルでの一細胞内遺伝子空間配置情報の解明が喫緊の課題となっている。一方で、heterogeneity を持つ細胞群では、1細胞レベルでの解析が必要であるが現段階で実用レベルの技術が存在していない。そこで我々は、精度の高い空間配置情報を安定的に得るために、ハイスループットな1細胞空間配置解析手法である3D-ChILTの開発を目指す。

3. 研究の方法

3D-ChILT の基本技術開発

3D-ChILT では、限界希釈と IVT 法による線形増幅により、ドメインが分配された1細胞レベルの微量 DNA を検出し、精度の高い染色体高次情報の取得を目指す。また、癌細胞を含む様々な細胞の空間配置情報を同時に得るため、Droplet 法を用いてハイスループット化を試みる。これにより、低コスト化と時間短縮が期待される。Droplet 法は、数万個のナノリットルサイズのエマルジョン化した Droplet 内に細胞や DNA を分画し、解析する手法である。DNA ドメインを、Droplet を用いて区画化(分配)することで、より多くの細胞種を同時に解析できる。また、本法の特徴の一つである DNA ドメイン識別配列を Droplet 内で付加することで、どの細胞に由来するのか識別可能である。Droplet を作製する機器は、研究代表者が所属する研究室に整備済みである。具体的には、以下の工程による(図 1)。

1. 固定化した細胞群を単一細胞として分離し、ゲノム DNA を Tn5 トランスポゼースにより断片化する(図 1-)。Tn5 トランスポゼースには予め ChILT 法に準ずる T7 RNA polymerase のプロモーター配列と細胞識別配列が組み込まれており、これらをゲノム DNA に挿入する(図 1-)。これにより DNA ドメインの分離とそれらが由来する細胞の識別化(cell

barcoding)を行う。

2. cell barcoding が付いた DNA ドメインを 1,000 細胞単位で集め、Droplet 法により 1 つの Droplet 内に 1 つの DNA ドメインを区画化する(図 1- ,)。この際、DNA ドメイン識別配列を含む逆転写用プライマーを結合したビーズと T7 RNA polymerase を同時に加える。Droplet 内で T7

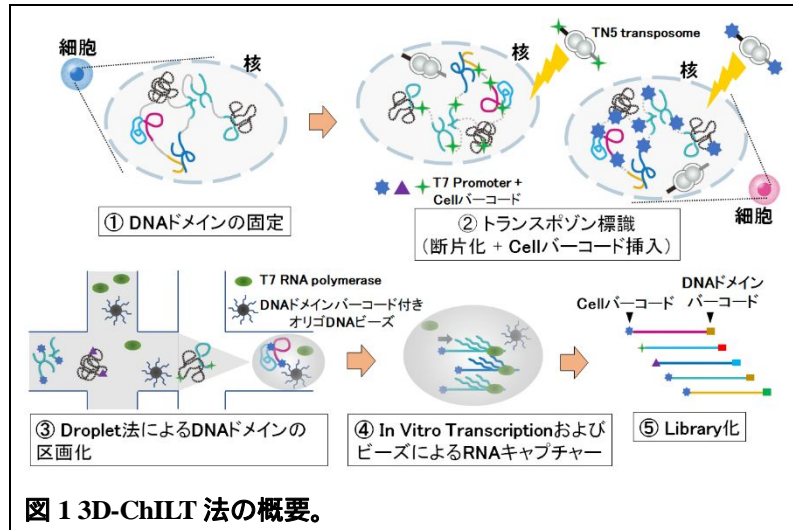


図 1 3D-ChILT 法の概要。

RNA polymerase により DNA ドメインを形成する各 DNA 配列を RNA として増幅(*In Vitro* Transcription: IVT)する。増幅された RNA をビーズに結合された逆転写プライマーを用いて cDNA 化する。この際、Droplet 内に存在する 1 つの DNA ドメイン由来の増幅された RNA は、すべて同じ DNA ドメイン識別配列が付加される。

3. Droplet を破壊したのち、1,000 細胞分の DNA ドメイン配列情報からなる DNA を、次世代シーケンスプライマーを用いた PCR によりライブラリー化する(図 2-)。その後、次世代シーケンス解析を行い、DNA ドメイン識別配列と細胞識別配列を基に 1 細胞レベルで染色体配置を再構成する。この情報解析において、連携研究者である九州大学 大川恭行博士、前原一満博士らによって構築されたパイプラインを用いて行い、解析の多くは両者の協力を仰ぎ行う。さらに、これまでの申請者らの解析で明らかとなっている骨格筋芽細胞 C2C12 における *Acta1* と *Ckm* の遺伝子集積を指標とし、本法の検証を行う。

3D-ChILT を用いた rhabdomyosarcoma 細胞株における空間配置情報解析

3D-ChILT 法を実用化し、筋の癌化における核内空間配置とその制御に関わる因子を明らかにする。癌モデルである rhabdomyosarcoma(RMS)細胞株 4 種(CCA、RD、RH4、CT-TC)を用いて、空間配置情報を取得し、遺伝子空間配置の破綻をプロファイリングする。具体的には、空間配置の指標の一つである染色体のドメイン形成位置に違いがあるか検証する。通常、CTCF タンパク質がドメイン境界を形成するタンパク質であるが、違いが明らかとなった場合は、CTCF 以外のタンパク質によりドメイン形成に乱れが起こった可能性を検証する。方法としては、ChIP-seq data との比較解析により行う。申請者の所属するグループで確立された ChIP-seq data の比較解析による co-localization model 法では、比較対象の 2 つのタンパク質の結合位置の一致度を評価することで協調的に働く因子であるか推定する (Maehara *et al*, *NAR*, 2012)。この推定に基づき、申請者らが取得したデータや国際データベースで登録されているヒストン修飾やクロマチン修飾因子の ChIP-seq データと網羅的に比較解析することで、遺伝子集積における遺伝子発現調節機構に関わる因子の同定とその機能解明を行う。

以上を計画していた。

4. 研究成果

本研究では、3D-ChILT 法における 2 つの基礎技術の開発を行った。本研究の 3D-ChILT の開発において根幹となるゲノム DNA への Tn5 トランスポゼースを用いた標識法の開発では、

in situ で抗体に結合した DNA と Tn5 の複合体形成を行い、Mg イオン依存的に、抗体が結合した近傍のゲノム領域に DNA を挿入することに成功した。また、挿入領域を挿入 DNA 配列に含まれる T7 RNA polymerase promoter 配列から T7 RNA polymerase により RNA として増幅する技術も開発した。さらに、それら RNA を用いた次世代シーケンス解析の結果、ヒストン修飾において ChIP-Seq と同等のシグナルを得ることに成功した。これら一連の技術 ChIL 法を用いたシーケンス技術 ChIL-Seq の開発では、100,000 細胞から単一細胞までのエピゲノムシーケンス解析が可能なプロトコルを論文化し発表した(Harada et al, NCB, 2019)。また、Tn5 の特性を in vitro による生化学解析により明らかにした(Sato et al, Open Biol, 2020)。上記成果のうち特に単一細胞解析用に Tn5 トランスポゼースの反応量の適正化は、3D-ChILT にそのプロトコルを直接転用することができ、3D-ChILT のプロトコル開発の促進につながった。次に、各 DNA ドメインの標識化について検討した。本実験では、Tn5 によるゲノム挿入の際に 8bp の barcode 配列を挿入し 1 次識別とし、2 次識別として PCR によるライブラリーインデックシングを用いた。本法では次世代シーケンス解析において同一配列をシーケンスすることになるが、同一配列のシーケンスは解析の妨げになる。しかしその点についてはスパイクインライブラリーを 10% 添加することでクリアした。実際に、培養細胞を用いて 96 種類のバーコード配列を用いた ChIL-Seq では、すべてのバーコード配列を検出できた。今後、これら 2 つの手法を取り入れることで 3D-ChILT 法の更なる改良が期待される。

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Oka M, Mura S, Otani M, Miyamoto Y, Nogami J, Maehara K, Harada A, Tachibana T, Yoneda Y, Ohkawa Y. Chromatin-bound CRM1 recruits SET-Nup214 and NPM1c onto HOX clusters causing aberrant HOX expression in leukemia cells. *Elife* 8. pii: e46667, 2019 doi: 10.7554/eLife.46667.
2. Fukuda S, Kaneshige A, Kaji T, Noguchi YT, Takemoto Y, Zhang L, Tsujikawa K, Kokubo H, Uezumi A, Maehara K, Harada A, Ohkawa Y, Fukada SI. Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle. *Elife* 8. pii: e48284, 2019 doi: 10.7554/eLife.48284.
3. Sato S, Arimura Y, Kujirai T, Harada A, Maehara K, Nogami J, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Biochemical analysis of nucleosome targeting by Tn5 transposase. *Open Biol.* 9(8):190116, 2019 doi: 10.1098/rsob.190116.
4. Kobayakawa K, DePetro KA, Zhong H, Pham B, Hara M, Harada A, Nogami J, Ohkawa Y, Edgerton VR. Locomotor Training Increases Synaptic Structure With High NGL-2 Expression After Spinal Cord Hemisection. *Neurorehabil Neural Repair.* 33(3):225-231, 2019 doi: 10.1177/1545968319829456.
5. 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. Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: HeyL requires Hes1 to bind diverse DNA sites. *Development* 146(4). pii: dev163618, 2019 doi: 10.1242/dev.163618.
6. Harada A, Maehara K, Handa T, Arimura Y, Nogami J, Hayashi-Takanaka Y, Shirahige K, Kurumizaka H, Kimura H, Ohkawa Y. A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input. *Nat Cell Biol.* 21(2):287-296, 2019 doi: 10.1038/s41556-018-0248-3.
7. ^{*}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. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat Commun.* 9(1):1400, 2018 doi: 10.1038/s41467-018-03845-1.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 原田 哲仁, 前原 一満, 田中 かおり, 半田 哲也, 木村 宏, 大川 恭行

- “組織切片を用いたエピゲノム解析” 日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020 年
2. 原田 哲仁, 小松 哲郎, 前原 一満, 近藤 友佳理, 田中 かおり, 桑門 温子, 佐藤 優子, 木村 宏, 林 克彦, 小野 悠介, 竹本 龍也, 胡桃坂 仁志, 大川 恭行
“ヒストン H3 バリエーションの選択的取り込みによる組織特異的な遺伝子発現制御” 第 47 回日本分子生物学会年会, 2019 年
 3. Akihito Harada “High-Throughput Single Cell Epigenomic Profiling using Chromatin Integration Labeling-Sequence” 3D Genome Gene Regulation and Disease (X6), 2019 年
 4. 原田 哲仁, 前原 一満, 小野 悠介, 林 克彦, 木村 宏, 胡桃坂 仁志, 大川 恭” ヒストン H3.3 サブバリエーション H3mm13 は骨格筋再生に必要な” 第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2018 年

[図書] (1 件)

1. 原田 哲仁, 大川 恭行 “クロマチン挿入標識法 (ChIL) による単一細胞エピゲノム解析” 羊土社 実験医学, 2019 年, 178-183

[産業財産権]

出願番号 : 特願 2020-017027
出願日 : 2020/02/04
発明の名称 : 対象核酸の塩基配列を 1 細胞レベルで並列に検出する方法
出願人 : 国立大学九州大学
代表発明者 : 大川 恭行、原田哲仁

出願番号 : PCT/JP2017/019309
出願日 : 2017/05/24
締結日 : 2019/05/23
発明の名称 : DNA 結合タンパク質の結合領域の近傍に所望の DNA 断片を挿入する方法
出願人 : 国立大学法人九州大学、東京工業大学
代表発明者 : 大川恭行、原田哲仁、胡桃坂仁志、木村宏、半田哲也、佐藤優子、林陽子

[その他]

ホームページ等

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

[研究組織]

(1) 研究代表者

原田哲仁 (Harada Akihito)

九州大学 生体防御医学研究所・助教

研究者番号 : 60596823

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Harada Akihito, Maehara Kazumitsu, Handa Tetsuya, Arimura Yasuhiro, Nogami Jumpei, Hayashi-Takanaka Yoko, Shirahige Katsuhiko, Kurumizaka Hitoshi, Kimura Hiroshi, Ohkawa Yasuyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 287 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-018-0248-3	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa
2. 発表標題 High-throughput single cell epigenomic profiling using chromatin integration labelling-sequence
3. 学会等名 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology Epigenetics and Human Disease/3D Genome: Gene Regulation and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----