

令和 5 年 4 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03243

研究課題名（和文）シングルセル多重エピゲノム解析

研究課題名（英文）Single cell multi-epigenome analysis

研究代表者

三浦 史仁（Miura, Fumihito）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：50447348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：DNAメチル化フットプリンティングを用いたエピゲノムの多重検出を目的とした研究を進めた。まず、多重化検出達成のため、複数のメチル基転移酵素（MTase）を開発した。また、SpyTag-SpyCatcherシステムを採用し、エピゲノムに結合するタンパク質とMTaseを容易に共有結合で連結する技術確立した。また、メチル化導入操作を実現する上で必要不可欠なホルマリン固定に対応し、固定された組織から高品質なDNAを高効率に回収する技術の開発を行った。さらには、標的エピゲノムを抗原に免疫した動物からB細胞を回収し、これからナチュラルペアのまま重鎖鎖を連結したまま回収する技術の開発も進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピゲノムによるゲノムの発現制御にはさまざまな層の分子が関与しており、それぞれの連関が重要であると認識されている。しかし、一つのクロマチン分子上の複数層のエピゲノムがどのように配置されているのかをゲノム規模に分析するため手法は現時点では確立されていない。本研究ではDNAメチル化フットプリンティングを基盤として、認識配列の重ならない複数のメチル基転移酵素を用いて、同時に複数のエピゲノムを計測するためのユニークな技術開発を行ってきた。この技術が完成すれば、複数層のエピゲノムを関連付けてより深くゲノムの発現制御を理解することが可能になるだろうと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To establish a technique for detecting multiple epigenomes using DNA methylation footprinting, we first established multiple methyltransferases (MTases) of different recognition sequences. Then, by adapting the SpyTag-SpyCatcher system, we established a technology for connecting an antibody with an MTase. In addition, we have developed a technique for efficiently recovering high-quality DNA from formalin-fixed tissues. Furthermore, we have also developed a technique for recovering naturally paired heavy and light chains of IgGs from B cells derived from pre-immuned animals with the target epigenome as an antigen.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：DNAメチル化 エピジェネティクス ヒストン翻訳後修飾 次世代シーケンサー マルチオミクス解析
メチル基転移酵素

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

様々な階層の分子間の相互作用を理解するためには、複数の分子層の同時プロファイリングが必要不可欠である。従来、このようなマルチオミクス解析は細胞の集団をプロファイルするバルクアッセイに限定されていたが、単一細胞技術の急速な進歩により複数の分子層間でその関連性を調べることが可能になってきた。既にゲノムとトランスクリプトーム (Macaulay 等、2015 年) メチロームとトランスクリプトーム (Angermueller 等、2016 年) に関してはそれぞれを同一の細胞でプロファイリングすることができるプロトコルが確立されている。しかし多種多様な分子層が存在するエピゲノムにおいて、同一細胞内での同時計測が実現されているのはメチロームとクロマチンアクセシビリティのみであり (Pott, 2017 年) 最も代表的なエピゲノムマークであるヒストンの翻訳後修飾は単一細胞内で他のエピゲノムと同時に計測された例が無い。エピゲノム修飾同士の相関をより直接的な証拠を基に理解するためには、細胞集団の平均値の測定から得られた確率モデルに加えて、それぞれのエピゲノム修飾を同一細胞・同一分子上で直接検出した単一細胞多重エピゲノム計測のデータを議論する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、同一細胞から複数のエピゲノム情報を同時に取得する技術の開発を行った。そのための原理として DNA メチル化フットプリンティングに注目した。認識配列が重ならない複数の DNA メチル基転移酵素 (MTase) をチャンネルとして利用し、互いに独立したシグナルとして複数のエピゲノムを検出する系の確立を試みた。そのために以下の二つの項目を本研究の目的に設定した。

研究目的 1 : エピゲノムの多重メチル化エンコーディング技術の確立

これまでヒストンの翻訳後修飾をはじめとする多くのエピゲノムの検出には主に ChIP-Seq に類する実験プロトコルが利用されてきた。しかし、これらの ChIP-Seq に類する技術には、複数のエピゲノム状態を同時に計測しようとする場合に生じる原理的な制約がある。つまり、これらの技術は目的エピゲノムの DNA 上の局在を示すために DNA の切断を利用するが、このことが単一細胞から複数のエピゲノム情報を同時に取得するという目的の障害となりうるのである。複数のエピゲノム情報を同一 DNA 分子上から取得することを考えるとゲノム DNA はなるべく無傷で温存する必要があると考えられた。

DNA を切断する代わりに DNA メチル基転移酵素 (MTase) による DNA へのメチル基の導入をフットプリントとして利用したエピゲノム検出技術が開発されている。代表的な技術としては DNA メチル化とクロマチンアクセシビリティを同時計測する NOMe-Seq があるが、この技術では哺乳類の内在性 MTase の認識配列 CpG とクロマチンアクセシビリティを明瞭に区別するために、GC ジヌクレオチドを認識する MTase を利用する。この様に認識配列が異なる複数の MTase を別々の“チャンネル”として使い、同一 DNA 分子上の複数のエピゲノム計測に利用するという考え方は拡張性が高く、これを応用するとそれぞれのエピゲノムの局在を DNA メチル化状態の計測を通じて知る多重エピゲノム解析が実現できると考えられた。

エピゲノム状態をゲノム DNA 上にメチル化修飾として記録する分子を仮に MTase エンコーダと呼ぶ。多重エピゲノム解析を実現するためにはエンコーダのレパートリーを増やす必要がある。MTase については 4 塩基以下の認識配列で比較的高い解像度を有するものがいくつか知られているため、これらを利用した MTase エンコーダの構築をまずは考える。エピゲノムを認識する分子については、特異性や汎用性を考慮すると市販の抗体が適していると考えられる。ZZ ドメイン (プロテイン A の抗体結合ドメイン) と MTase を融合した分子を構築し、目的エピゲノムに対して特異的に結合するモノクローナル抗体と組み合わせると MTase エンコーダを構成することも考えられるが、この場合抗体とプロテイン A の特異性からチャンネル数を 2 つ以上に拡張することが出来ない。そこで本研究では、HaloTag リガンド、SNAP-Tag リガンド、CLIP-Tag リガンドで標識された抗体に対して HaloTag、SNAP-Tag、CLIP-Tag との融合タンパク質として調製された MTase を作用させることにより、抗体と MTase が共有結合で連結され、その組み合わせが決して混じることのない分子を構築することを目指した。

以上の開発に加え、MTase エンコーダを用いて目的エピゲノムをクロマチン DNA 上に記録する操作の確立を試みた。

研究目的 2 : より網羅的な単一細胞メチローム解析技術の実現

メチロームの単一細胞解析はエピゲノム解析の中では早期に実現されたが (Smallwood 等、2014 年) そのゲノム網羅率は高々 20% 程度であり、その後も抜本的な技術改善は見られていない

い。この低いゲノム網羅率は多重エピゲノム解析を実現するためのプラットフォームとしては決して十分であるとはいえない。そこで本研究は、単一細胞メチローム解析のためのライブラリー調製法を徹底的に見直し、これまでに開発してきた技術と最近登場した新技術を組み合わせることによって単一細胞メチローム解析におけるゲノム網羅率を大きく改善することを目指した。

3. 研究の方法

1) メチル化フットプリンティングに利用可能な MTase の開発

まずは、データベースに登録されている MTase を人工合成し、これを大腸菌内で発現させることを試みた。この大腸菌のゲノムは MTase の作用によってメチル化されるため、そのメチル化状態を全ゲノムバイサルファイトシークエンシング (WGBS) によって計測することでそれぞれの MTase の認識配列とメチル化活性の強度を検証することが可能になる。次いで MTase を精製し、*in vitro* で作用させることが可能な酵素標品を開発することにした。

2) エピゲノム認識抗体と MTase の連結法の確立

目的のエピゲノムを認識する抗体に対して、化学的に SNAP/CLIP リガンドを連結し、これに対して SNAP/CLIP-Tag の融合タンパク質として開発した MTase を混合する方式を考えた。SNAP/CLIP-Tag はそれぞれ SNAP/CLIP リガンドと自律的に共有結合で連結されるため、混合するだけで抗体と MTase が連結された分子を構築することが出来るだろうと考えられた。

3) エピゲノム特異的抗体の生産法の開発

エピゲノム認識抗体の遺伝子情報が得られれば、融合タンパク質の創出などにより技術開発の自由度が高まると同時に、エピゲノム検出のチャンネル拡張の面で有効な手段が得られると考えた。そこで、抗原であらかじめ免疫を行った動物の B 細胞からナチュラルペアのまま重軽鎖を融合した DNA 断片を得て、これをファージディスプレイによって選択することでエピゲノム特異的抗体の scFv を得ることにした。

4) ホルマリン固定組織からの DNA 回収技術の開発

抗体を用いる操作には抗体の結合に加えて未反応抗体の洗浄・除去の操作が必要である。非固定の組織・細胞はこの操作に耐えられないため、ホルマリンによる固定が必要不可欠である。しかしホルマリンによる固定は DNA の回収を困難にする。そこで、ホルマリン固定が平衡反応であることに注目し、遊離ホルマリン濃度を低下させることを主眼においた反応液組成の開発と温度条件の検討により、ホルマリン固定組織から高効率に DNA を回収する技術を開発することにした。

5) シングルセルメチローム解析技術の開発

これまでに開発してきた PBAT 法のプロトコルを再度見直し、それぞれの効率を最適化することにより、よりゲノム網羅性の高い WGBS のライブラリー調製プロトコルを確立することにした。

4. 研究成果

1) 認識配列の短い新規 MTase の開発

REBASE に登録されているシトシンを基質とする MTase の中から、哺乳類細胞の内在性 MTase が認識する CpG 配列と明瞭に区別可能で解像度面で許容できる 4 塩基以下の認識配列を有する 6 種類の MTase (M.CviPI, M.CviQIX, M.AluI, M.FatI, M.Gel16401IV, M2.HpyAVI) を選択し、人工遺伝子合成の後、大腸菌内で発現を試みた。しかし、登録情報と異なる挙動を示す (M.Gel16401IV) 大腸菌内で活性が得られない (M.CviQIX, M.FatI) 精製が困難 (M.AluI, M2.HpyAVI) など、M.CviPI (GC を認識) 以外の MTase の開発は困難を極めたことから開発方針を変更することにした。

ゲノムデータベースから M.CviPI に対する相関性が高いながらも十分なアミノ酸配列の違いがある遺伝子群を 63 個選択し、その人工合成を行い、大腸菌内で発現を試みた。WGBS により認識配列を決定した結果、既存の認識配列 (GC, CG) に加え、新規認識配列 (CC, TCG, CNG, RGCA, RNCG, GCY) を有する MTase を同定するに至った。この中でも CC ジヌクレオチドを認識する MTase (CCMT) は CpG 配列と決して認識配列が重ならない有望な酵素であったことから、CCMT のエピゲノムフットプリンティング用酵素としての開発を進めた。出芽酵母とヒト培養細胞を対象にメチロームとクロマチンアクセシビリティを同時検出する NOMe-Seq を CCMT を用いて実現した。この成果は知財化するとともに論文発表を行った。

2) エピゲノム認識抗体と MTase の連結法の確立

市販抗体を SNAP/CLIP リガンドで化学的に標識する試みは、抗体の変性が生ずることが判明し、実用性が無かった。そこで、2 次抗体にリンカーを介して SNAP/CLIP タグを連結する方策を検討したものの、これも収量や標識 2 次抗体の生産の安定性の問題から頓挫した。さまざまな検

討を試みた結果、1次抗体に結合することが知られている特異的なノボディを SpyCatcher と、MTase を SpyTag とのそれぞれを融合タンパク質として開発し、これらを混合することにより抗体と MTase が連結された分子を構成する方策を採用することにした。この方法を採用することにより、出芽酵母をモデルとした実験で H3K4me3 を標的としたメチル化フットプリンティングを得ることに成功している。ただし、上記 SpyCatcher および SpyTag 融合タンパク質の保存安定性が低く、実験の再現性確保の問題が解決できていない。

3) エピゲノム特異的抗体の生産法の開発

ファージディスプレイを用いて標的エピゲノムに対する高親和性のタンパク質を同定するにあたり、B 細胞中でペアで発現している正しい組み合わせの重鎖と軽鎖が連結された scFv 断片のライブラリーを得る必要がある。従来この目的にはセルソーティングやマイクロフルイディクスなど高額な機材が必要とされたため、その導入の敷居が高かった。そこで、B 細胞から直接重鎖と軽鎖を増幅し、同一反応液中でそのまま連結して scFv 断片を得る PCR 反応条件を確立した。現在 W/O エマルジョン中でこの反応を実施するための検討を進めている。

4) ホルマリン固定組織からの DNA 回収技術の開発

ホルマリン固定組織からの DNA 抽出を効率化するに当たり、ホルマリン固定が平衡反応であることに注目した。つまり、遊離ホルマリン濃度を低下させれば脱クロスリンク反応を促進することが可能になるという考えを元に、高濃度のホルマリンスキャベンジャーの使用を検討した。その結果、ホルマリン固定された組織を 800 mM 以上のトリス緩衝液中に浸し、80 で 24 時間以上加熱することにより高効率に高品質な DNA を回収することが可能な技術を確立することができた。この方法を HiTE 法と名付け、論文発表を行った。

5) シングルセルメチローム解析技術の開発

現在のシングルセルメチローム解析は多くは Post-bisulfite adaptor tagging (PBAT) の戦略を実装したプロトコールで実現されているが、その 1 細胞当たりのゲノム網羅率は依然 10 - 30% 程度と改善の余地がある。そこで、PBAT 法の全体を見直した。特に新規に開発した 1 本鎖 DNA リガーゼを採用することによって WGBS のライブラリー調製効率を従来プロトコールの 3 倍程度に改善することに成功した点は大きな成果となった。これまでに、10 ミクロン厚のホルマリン固定パラフィン包埋切片から回収された 100 ミクロン径の部分組織 (30 個程度の細胞を含む) を対象とした WGBS のライブラリー調製に成功している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 2件）

1. 著者名 Miura Fumihito, Miura Miki, Shibata Yukiko, Furuta Yoshikazu, Miyamura Keisuke, Ino Yuki, Bayoumi Asmaa M. A., Oba Utako, Ito Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification, expression, and purification of DNA cytosine 5-methyltransferases with short recognition sequences	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biotechnology	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12896-022-00765-3	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Oba Utako, Kohashi Kenichi, Sangatsuda Yuhei, Oda Yoshinao, Sonoda Koh-Hei, Ohga Shouichi, Yoshimoto Koji, Arai Yasuhito, Yachida Shinichi, Shibata Tatsuhiro, Ito Takashi, Miura Fumihito	4. 巻 7
2. 論文標題 An efficient procedure for the recovery of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology Methods and Protocols	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） 10.1093/biomethods/bpac014	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Miura Fumihito, Ito Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Post-bisulfite Adaptor Tagging with a Highly Efficient Single-Stranded DNA Ligation Technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transcription Factor Regulatory Networks	6. 最初と最後の頁 45 ~ 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2815-7_4	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 -

1. 著者名 Miura Fumihito, Shibata Yukiko, Miura Miki, Ito Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Post-bisulfite Adaptor Tagging Based on an ssDNA Ligation Technique (tPBAT)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Epigenomics: Methods and Protocols	6. 最初と最後の頁 21 ~ 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2724-2_2	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3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Fumihito Miura
2. 発表標題 Overlaying multiple epigenomes on the methylome
3. 学会等名 1st ASHBi SignAC Workshop 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumihito Miura
2. 発表標題 Toward overlaying multiple epigenomes on the methylome
3. 学会等名 The 11th International Forum on Post-Genomic Technologies（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumihito Miura
2. 発表標題 A highly efficient scheme for library preparation from single-stranded DNA
3. 学会等名 The 12th International Forum on Post-Genomic Technologies（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 DNAメチル基転移酵素	発明者 三浦史仁	権利者 九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-087994	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

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

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
---------	---------