

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21384

研究課題名(和文)多領域間クロマチン相互作用を1分子の解像度で網羅的に解析できる新たな手法の開発

研究課題名(英文)Development of New methodology for Genome-wide Detection of Multi-contact Interaction between Chromatin Regions in Single Molecular Resolution

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：多領域間クロマチン相互作用を1分子の解像度で網羅的に解析できる新たな手法、標的型(targeted)Pore-C法の開発をおこなった。従来型Pore-Cは2点間クロマチン相互作用検出法Hi-C法の改良版で、ライブラリを断片化することなくロングリードシーケンサーを用いて解読することで、多点間の相互作用を簡単に検出することができる。このPore-Cを改良し、特定の標的分子の周辺ゲノムに化学修飾を付加し濃縮することで、標的が介在する相互作用に絞った解析を可能にした。手法の開発には一定の成功を収めたが、修飾効率の向上が必要であるなど実用化への課題も残されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロマチン領域の相互の物理的位置関係はゲノム情報の発現に非常に重要な役割を果たしている。これらを解析する手法として現在はHi-CやHiChIPなどの方法が用いられてきたが、これら既存法は原理的にクロマチン高次構造を2領域間の点と点の相互作用の積算としてしか検出できない。今回Pore-C法をもとに開発したtargeted Pore-Cは、標的分子周辺に形成された多点間の相互作用を1分子の解像度で検出することを可能にし、近接領域を点と点ではなく塊で捉え、また細胞間のバリエーションを損なうことなく、既存技術では観察し得なかった核内のクロマチン高次構造を記述できる。

研究成果の概要(英文)：Through this project, I developed a new method, "targeted Pore-C," which enables the multi-contact analysis in genome-wide with a single molecular resolution. The original Pore-C method is a derivative version of the genome-wide contact detection method "Hi-C." It can detect multi-contact using a long-read sequencer and unfragmented library. I improved this Pore-C to focus on multi-contacts mediated by a specific factor of interest, which was achieved by introducing a chemical modification to DNA nearby the factor. Development of the new method in this project gained a sure success and remaining some challenges for practical use, such as improvement of modification efficiency.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ゲノム クロマチン高次構造 次世代シーケンサー ロングリードシーケンサー Hi-C Pore-C 多点間相互作用

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

ゲノムが持つ遺伝子情報は、ヌクレオソーム、ヒストン修飾、プロモーター・エンハンサーなどの機能ユニットやこれらに結合するタンパク質など、様々な次元で制御されている。これらに加え、クロマチン領域の相互の物理的位置関係、すなわち「ゲノムがどのように核内で折り畳まれ配置されているか」もその機能の発揮に非常に重要な要素であることに注目が集まっている。このようなクロマチン高次構造を解析する手法として現在は Hi-C や HiChIP などの方法が広く用いられており(図1)ゲノムが TAD や compartment、chromosome territory などの機能的階層に分かれて存在し、それぞれに転写活性や凝集状態を制御されていることが明らか

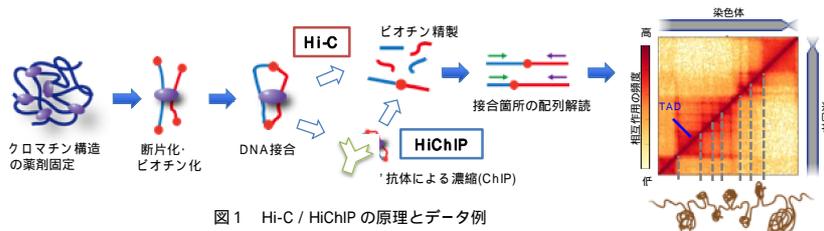


図1 Hi-C / HiChIP の原理とデータ例

にされている⁽¹⁾。さらに最近では、自己集合能を持ったタンパク質と DNA が結合し緩やかな”場”を形成して機能的に働く「相分離 (phase-separation)」と言った現象がクロマチンの高次構造に影響を与えていることも示唆されてきている(図2)⁽²⁾。

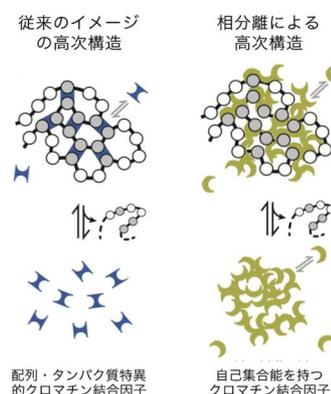


図2 相分離によるゲノム高次構造形成

しかしながら、上にあげた従来の方法は、核内で隣接する2つの DNA 領域を酵素的に接合し、次世代シーケンサーを用いて接合部分の DNA 配列を読み取ることで近接領域の位置情報を得るため、基本的に2領域間の点と点のクロマチン相互作用しか検出できず、また、得られた情報を数億~数十億配列分積分算してゲノム全体の高次構造データを作成するため、得られた

データは多くの細胞=多くのゲノム分子の平均のデータとなってしまう。これでは、多数の領域の相互作用からなり、細胞間でもその構成にバリエーションがあると予想される相分離のような現象を捉えるには限界がある。実際にクロマチンが核内でどのような高次構造を持って配置されているのかをより正確に、柔軟に理解するには、近接領域を点と点ではなく塊で捉え、細胞間のバリエーションを損なうことなく網羅的に記述できる新たな方法の開発が必要であった。

そこで我々は本研究に先立ち、ゲノム生物学における次世代の研究手法として、1分子解像度の多領域間相互作用検出技術 ChIA-drop 法を開発してきた。前述のように、この方法を用いてこれまでには観察することが不可能だった図3のようなクロマチンの局所高次構造

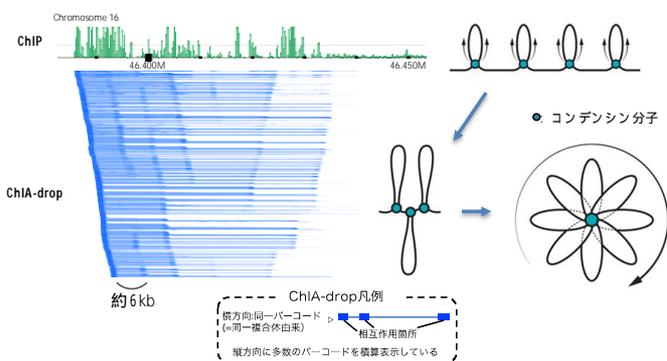


図3 コンデンシンの ChIA-drop 実験結果と想像図

を示唆するようなデータが得られた。しかしながら本研究の開始時の方法では技術的制約から検出能力に限界があり、先の例ではコンデンシンの結合が集中するセントロメア近傍でしか十分なシグナルが得られていない。そこで本研究によりより詳細で正確なゲノム高次構造情報の取得を可能とする、新たな技術の開発を

指した。

- (1) MJ Rowley & VG Corces, Organizational principles of 3D genome architecture. **Nature Reviews Genetics** vol. 19, pp789 (2018)
- (2) RHG.Wright *et al.* ATP, Mg²⁺, Nuclear Phase Separation, and Genome Accessibility. **Trends Biochem. Sci.**, Vol. 44, 7, pp565 (2019)

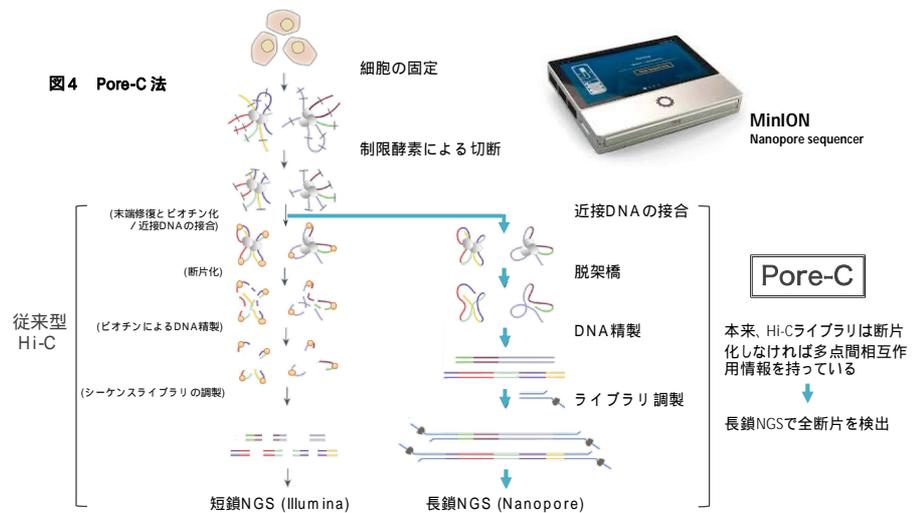
2. 研究の目的

本研究の目的は『**核内におけるゲノムの高次構造を理解するための、多領域間クロマチン相互作用を1分子の解像度で網羅的に解析できる新たな手法の開発**』である。

前述の通り、ゲノム上の遺伝子情報が正しく機能するためにはクロマチンが核内で適切な立体的配置をとっていることが必要であり、この高次構造を正確に記述することは生命現象の理解に大変重要である。しかし、最もスタンダードな方法である Hi-C/HiChIP 法を用いた解析では多くの重要な情報(多領域間相互作用、細胞・分子間の多様性、等)が損なわれている。そこで我々は、これらに対応する次世代のクロマチン高次構造解析法として、ChIA-drop (Chromatin Interaction Analysis using droplets)の開発を行ってきた(図3)。研究開始当初の目的としてこの ChIA-drop をベースに検出効率を改善し、より詳細なデータを得られる手法の開発を目指した。しかし研究を進める途上で、同じ多領域間相互作用検出法である Pore-C 法がより簡便で汎用性があり、本研究の目的達成のためには Pore-C をベースとする新たな手法の開発がより近道であると判断し、以後こちらを研究の主軸とした。

Pore-C 法は2点間相互作用検出法 Hi-C の改良版で、クロマチンを固定・断片化し DNA の接合(proximity ligation)を行うまでは通常の *in situ* Hi-C と同様である(図4)。このときクロマチン断片の両端は近傍 DNA とそれぞれ接合し、多くの断片が連続した非常に長い DNA となってい

る。この DNA を Hi-C のように断片化することなくロングリードシーケンサー (Nanopore シーケンサー)を用いて解読することで、多点間の相互作用を検出することができる。この



方法のプロトコルは Hi-C をさらに簡略化したものであり、マイクロ流体回路を用いた ChIA-drop よりも実験手法としてより簡単で確実性が高い。一方で1回の Nanopore シーケンシングで得られるデータ量は Hi-C 等で用いられるイルミナシーケンサーに比べ少なく、Hi-C に匹敵するほどの全ゲノムデータを得るためにはコストが嵩みすぎるという欠点がある。そこでこの点の改善を標的として新たな多領域間クロマチン相互作用の開発を行った。

3. 研究の方法

上述の通り、Nanopore シーケンサーにより得られる実験1回あたりのデータ量はイルミナシーケンサーに比べ少ない。しかし多領域間相互作用の解析においてはむしろ特定タンパク質を介した相互作用に注目することがより有意義であると考え、標的タンパク質に絞

った相互作用のみの抽出を可能にし、且つそれに伴い必要なデータ量をすなわちコストを最小限にすることが可能な、標的型(targeted)Pore-C 法の開発を行った。標的タンパク質の結合領域を濃縮する方法として、標的周辺のゲノムに修飾を導入挿入する方法を探索した。ひとつ目の方法は、ビオチン化されたオリゴを標的周辺に挿入する方法、もうひとつはアデニンメチラーゼを用いて標的周辺のアデニンをメチル化する方法である。これと並行し、tPore-C データの解析プログラムを新たに開発する。このプログラムは既存の Pore-C 解析プログラムを拡張し、tPore-C で用いられるタグ配列の処理を可能とし、データの視覚的な理解を補助するデータの可視化機能を付加したものである。

4 . 研究成果

標的タンパク質の周辺への標識の導入に、まず Tn5 トランスポザラーゼを用いる方法を試みた。Tn5 は Protein A と融合した Protein A :: Tn5 として、抗原に結合した抗体の周辺へ濃縮することができる。この Protein A :: Tn5 へあらかじめビオチン化した 100bp 程度のオリゴをロードしておくことで標的周辺へビオチンを挿入するのだが、実際の反応効率は期待ほど得られなかった。原因としてこの Protein A :: Tn5 - ビオチン化オリゴ複合体の形成時に、タンパク質がランダムに結合した非反応性の凝集体を形成してしまうことが観察された。様々な条件検討をおこなって凝集体の解消を試みたが改善には至らなかった。続いて 2 次抗体と直接コンジュゲートしたビオチン化オリゴタグを抗原周辺へ挿入することを試みた。はじめに、標的周辺に抗体によりリクルートされたタグを、のちに添加する Tn5 トランスポザラーゼによって挿入することを試みたが、期待したほどの効率を得ることは難しかった。そこで、Pore-C プロトコル中の制限酵素によるゲノムの断片化後に標的にタグ付加抗体を結合させ、制限酵素断片の proximity ligation の合間にこのビオチン化オリゴタグを差し込むことを試みた。しかしこれも、タグの挿入頻度が制限酵素サイトの頻度に依存するため十分な効率が得られなかった。そこで 2 次抗体を大腸菌由来の非特異的アデニンメチル化酵素 EcoGII と融合し、標的周辺のアデニンにメチル基を導入することでメチルアデニン抗体を用いて標的領域の濃縮を行うことを試みた。この方法も一定の効率でライブラリの作成を行うことができるが、ビオチン-ストレプトアビジンの強力な結合を用いた前述の方法に比べて効率の改善には限界があった。最終的に標的領域の濃縮効率が最も高かった方法は、Pore-C プロトコルの proximity ligation ののちに界面活性剤処理や sonication によって核構造を緩やかに壊したのち、標的タンパク質の結合した Pore-C ライブラリを抗体によって濃縮するものであった。この方法によって得られたライブラリは、並行して開発した tPore-C 解析プログラム (tPore-C snakemake、未公開) を用いてゲノムへのマッピングをおこなった結果、ChIP-seq 等から予想される各タンパク質のゲノム上での分布と最も一致した。一方で、核構造を破壊する際にライブラリが一部断片化してしまい、相互作用情報が一定程度損なわれてしまうこともわかっており、今後のさらなる効率化と実用化へ課題を残した。今後これらの課題を解決し成果を論文として発表する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Takeuchi S, Tsuchiya A, Iwasawa T, Nojiri S, Watanabe T, Ogawa M, Yoshida T, Fujiki K, Kouji Y, Kido T, Yoshioka Y, Fujita M, Kikuta J, Itoh T, Takamura M, Shirahige K, Ishii M, Ochiya T, Miyajima A, Terai S	4. 巻 6
2. 論文標題 Small extracellular vesicles derived from interferon- pre-conditioned mesenchymal stromal cells effectively treat liver fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Regenerative Medicine	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) 10.1038/s41536-021-00132-4	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 -
1. 著者名 Yamada Ryuichi, Oguri Akira, Fujiki Katsunori, Shirahige Katsuhiko, Takezoe Hirotsuka, Takahashi Naoki, Kanai Yoshiakira	4. 巻 543
2. 論文標題 Single-cell transcriptional analysis reveals developmental stage-dependent changes in retinal progenitors in the murine early optic vesicle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 80 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.043	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 -
1. 著者名 Watada Eriko, Li Sihan, Hori Yutaro, Fujiki Katsunori, Shirahige Katsuhiko, Inada Toshifumi, Kobayashi Takehiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Age-Dependent Ribosomal DNA Variations in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular 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) 10.1128/MCB.00368-20	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 -
1. 著者名 Tanaka S, Ise W, Inoue T, Ito A, Ono C, Shima Y, Sakakibara S, Nakayama M, Fujii K, Miura I, Sharif J, Koseki H, Koni PA, Raman I, Li QZ, Kubo M, Fujiki K, Nakato R, Shirahige K, Araki H, Miura F, Ito T, Kawakami E, Baba Y, Kurosaki T	4. 巻 21
2. 論文標題 Tet2 and Tet3 in B cells are required to repress CD86 and prevent autoimmunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 950 ~ 961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-020-0700-y	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 -

1. 著者名 Hada Masashi, Miura Hisashi, Tanigawa Akie, Matoba Shogo, Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Hirose Michiko, Watanabe Naomi, Nakato Ryuichiro, Fujiki Katsunori, Hasegawa Ayumi, Sakashita Akihiko, Okae Hiroaki, Miura Kento, Shikata Daiki, Arima Takahiro, Shirahige Katsuhiko, Hiratani Ichiro, Ogura Atsuo	4. 巻 36
2. 論文標題 Highly rigid H3.1/H3.2-H3K9me3 domains set a barrier for cell fate reprogramming in trophoblast stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 84 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.348782.121	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 -

1. 著者名 Yamada Ryuichi, Oguri Akira, Fujiki Katsunori, Shirahige Katsuhiko, Hirate Yoshikazu, Kanai-Azuma Masami, Takezoe Hiroataka, Akimoto Yoshihiro, Takahashi Naoki, Kanai Yoshiakira	4. 巻 14
2. 論文標題 MAB21L1 modulates gene expression and DNA metabolic processes in the lens placode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	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) 10.1242/dmm.049251	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 -

1. 著者名 Nakajima Natsu, Hayashi Tomoatsu, Fujiki Katsunori, Shirahige Katsuhiko, Akiyama Tetsu, Akutsu Tatsuya, Nakato Ryuichiro	4. 巻 49
2. 論文標題 Codependency and mutual exclusivity for gene community detection from sparse single-cell transcriptome data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	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) 10.1101/2021.03.15.435370	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤木克則、白髭克彦
2. 発表標題 多点間クロマチン相互作用検出技術によるゲノム高次構造の解析
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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