

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05505

研究課題名(和文) 並進配置補正によるヌクレオソームマップ高解像度化手法の開発

研究課題名(英文) Development of a translational correction method for resolutional improvement of nucleosome maps

研究代表者

加藤 太陽 (Kato, Hiroaki)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：40548418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：MNaseの嗜好性の調査により高い位置精度のヌクレオソームを抽出できた。これらのヌクレオソームはケミカルマッピング法と同様のWW/SSパターンを示した。2つの手法によって同定されるヌクレオソームの比較から、ケミカルマップも変異特異的な切断バイアスをもつことが判明した。ハイブリッドモデルによる遺伝子の調査は+1ヌクレオソームDNAがプロモーター側の半分でヒストンと高い親和性を持つことを示唆した。転写開始点は+1ヌクレオソームの内部に存在していた。酵母は2つのタイプのTSSをもっていた。1つはヌクレオチド位置-8にアデニンをもち、もう1つは+1ヌクレオソームの回転設定と関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日、様々な生体分子の振る舞いは構造生物学によって高解像度に明らかにされつつある。ただし、その多くは人工的に再構成された複合体を対象としており、自然条件における実際の分子の振る舞いまで網羅することが難しい。例えばヌクレオソームの関わる再構成系では特別なDNA配列が使用される傾向があり、自然配列を網羅的に評価できないので、タンパク質複合体と自然DNA配列との関係性については謎に包まれている。塩基対解像度でヌクレオソーム配置に関わるDNA配列の特徴を明らかにしようとする本研究は、自然配列を対象とする点で特徴的であり、構造生物学の不足を補う視点を提供できる。このため、今後の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：By analyzing the digestion preference of micrococcal nuclease (MNase), we successfully extracted nucleosome positions of high accuracy from MNase-seq data sets. These nucleosomes exhibited a fine pattern of WW/SS dinucleotides, which is comparable to those determined by chemical mapping methods. Comparison of MNase-seq-based and chemical mapping-based nucleosomes revealed that even chemical mapping methods have histone mutant-specific cleavage biases. Analysis of genes with a hybrid chemical model suggested that +1 nucleosome DNA has a high affinity to histones especially in the promoter-proximal half. Transcription start sites determined by CAGE-seq were located in the promoter-proximal side of +1 nucleosome. Analysis of promoter sequences identified two types of TSS in yeast: one has adenine at -8 nucleotide position, and the other one that are related to the rotational setting of +1 nucleosomes.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ヌクレオソーム ヒストン 転写 エビジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体 DNA は、145~147 塩基対 (bp) ほどの DNA がヒストンタンパク質 8 量体に巻きついたヌクレオソームコア粒子とリンカー DNA からなるヌクレオソーム単位を繰り返して、核の中にコンパクトに収まっている。ヌクレオソーム粒子はゲノム座標上でただ無秩序に並んでいるのではなく、遺伝子発現などの生理機能と関連して、その配置が整えられる。

細胞内でのヌクレオソームの配置は、マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) による消化を免れた DNA 断片を次世代シーケンシング (NGS) で解析する手法 (MNase-seq) によって、これまで多様な生物で調査されてきた。しかし、MNase 特有の基質特異性が DNA 切断効率に配列依存的な偏りを生むため、必ずしも正しい配置を予測できるとは限らないと捉えられてきた。

MNase-seq に代わるヌクレオソーム配置の調査手法として、ヌクレオソームのケミカルマッピングが開発された。この手法では、ヒストンに Cys 変異を導入し、フェナンスロリンを介して Cu⁺ をヌクレオソーム局所に配置し、フェントン反応によって H₂O₂ から OH ラジカルを発生させ、ヌクレオソーム内部の DNA を局所で切断し、切断産物を NGS で解析する。ケミカルマッピングによって同定されるヌクレオソームは、MNase-seq によるものに比べて配置が厳密であり、より正しく塩基対解像度でヌクレオソーム DNA の中心に位置する塩基 (dyad) を同定できる。

ケミカルマッピングで同定されるヌクレオソームに比べると、MNase-seq によるそれは明らかに解像度が低い。その理由は MNase が T/A を好むためであると説明されるが、より具体的などのような要因がヌクレオソーム同定に影響を与えるのか、よく分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、MNase による DNA 切断パターンを詳細に解析し、どのような規則でヌクレオソームの同定位置がずれてしまうのかを明らかにし、さらに、ケミカルマッピングのデータに基づいたモデルによってヌクレオソームの並進位置の補正できる系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

出芽酵母をモデル生物として用いた。MNase-seq で得た NGS リードの 5' 端のヌクレオチドをゲノム座標上で同定し、その周囲の DNA 塩基配列をゲノム配列から抽出し、切断パターンを詳細に検討した。モノヌクレオチドだけでなく、ダイヌクレオチドなどの連続配列のレベルで評価した。また、ケミカルマッピングで同定されたヌクレオソームの dyad からの相対距離の観点で、MNase が好んで切断する場所を調査した。さらに、MNase-seq の両側のリードから推定される断片の長さに着目し、どのような条件が重なった場合にヌクレオソーム配置の同定が不明瞭になり、あるいは厳密になるのかを調べた。得られた情報をもとに、ヌクレオソーム検出が困難と予想される遺伝子座を探し、そこでどのようにヌクレオソームが同定されるのかを調査した。

MNase-seq で高解像度に検出されるヌクレオソームに注目し、その DNA 配列を、ケミカルマッピングで検出されるヌクレオソームのものと比較した。Dyad を中心に 1 塩基対の解像度で比較を行い、手法によってパターンが異なる場所を探した。ヒストンの Cys 変異 H4-S47C と H3-Q85C のそれぞれを用いるケミカルマッピング法で同定されるヌクレオソームと比べた。

解像度が高いとされてきたケミカルマッピングに注目し、H4-S47C と H3-Q85C のそれぞれの手法が独自にもつ化学切断バイアスを調査した。その結果を受けて、H4-S47C と H3-Q85C で同定されるヌクレオソーム DNA のうち、信頼度の高い DNA 領域を組み合わせ、ハイブリッド確率モデルを構築した。このモデルによるヌクレオソーム配置の予測精度について Widom 601 配列で評価した上で、遺伝子の領域についてヌクレオソーム配置予測を行なった。さらに、プロモーター側とターミネーター側に分けて予測できるモデルを構築し、遺伝子領域における DNA 配列とヌクレオソーム形成能の関係を調査した。

遺伝子領域に予測されるヌクレオソーム形成配列の特徴を評価するために CAGE-seq を行なった。CAGE-seq は Mat-a と の両方の細胞型で、YPD と SC の 2 つの培地で行なった。CAGE による発現レベルの分布を評価するため、細胞型が異なる際に変化する遺伝子と転写開始点 (TSS) のパターンを明らかにした。次に、ケミカルマッピングで塩基対解像度で同定される +1 ヌクレオソームの dyad と CAGE-seq で同定される TSS のゲノム座標上での位置関係を調査した。さらに、出芽酵母に特徴的な TSS の -8 位のアデニンを含むケースと含まないケースで、TSS と dyad の位置関係を調査した。

4. 研究成果

MNase は TA (5' -TA-3') のつなぎ目を主な切断対象とすることを確認した。TT と AT も切断するが、AA が切断されることはほとんどなかった。このことから、MNase は単に T/A に富む配列を好むのではなく、具体的には特定のダイヌクレオチド (TA, TT, AT) を好み、AA は好まないことが判明した。また、切断箇所の前後に C と G の特徴的な配置も観察された。ゲノム上の切断

箇所によっては、両鎖の5'末端の1塩基に相当するヌクレオチド座標を共有するパターンから、5'末端が互いに3塩基離れたパターンまで、多様な切断パターンを持つことを確認した。この情報をもとに151±0 bpの断片を生むヌクレオソームに注目し、WW/SSなどのダイヌクレオチドのパターンを評価したところ、配列の条件が合えば、MNase-seqでもケミカルマッピングと同程度の高解像度でヌクレオソーム配置を同定できることが分かった。

MNaseが好む配列がリンカーにあれば配列に応じた断片が生じる。その裏付けとしてARS107遺伝子座に注目した。ARS107は、左腕側と右腕側の両方にヌクレオソームアレイを持つことが複数のケミカルマッピング手法で確認できる。しかし、MNase-seqでは左腕にのみヌクレオソームを検出することができ、右腕側ではうまく検出できない。調査の結果、右腕側のヌクレオソームのリンカー領域はMNaseが好む配列を持たないと特徴づけられた。これらの結果は、局所の配列によってはヌクレオソームの同定が困難であるが、同定さえできればMNase切断配列の特性を考慮した並進配列補正が可能であることを示唆した。

MNaseによる切断パターンの詳細な検討をさらにに行い、適切にヌクレオソームを選抜すればケミカルマッピングに匹敵する解像度でヌクレオソームDNAを調査できることを確かめた。ただし、この手法はMNase切断バイアスと相性の良いヌクレオソームしか対象とすることができず、並進配置補正の必要性が高いことが裏付けられた。また、MNaseを用いたマッピングから高解像度に得たヌクレオソームDNAの情報とケミカルマッピングで得た情報との比較の結果、ケミカルマッピングが持つ技術的なバイアスが、これまでより明確に浮かび上がった。すなわち、切断箇所近くの短いDNA配列に対してケミカルマッピングは強い嗜好性をもっていた。この事実は、単にケミカルマップを用いて並進補正を行なったとしても、それはケミカルマッピング特有のバイアスを受けた補正になってしまうことを意味していた。これを受けて、ケミカルマッピングによる技術的バイアスを詳細に検討した。

並進配置補正精度を高めるため、ヒストンH4-S47CとH3-Q85Cを用いて同定されたヌクレオソームDNAから、両方の手法がバイアスをもつ領域を避ける形でキメラ配列を作成し、ハイブリッド確率モデルを構築した。これまでの予測法との比較に加え、生体内でのヌクレオソーム配置の予測精度の調査を行い、これまでより高い精度でヌクレオソーム配置を予測できるようになった。

ケミカルマッピングによる技術的バイアスを詳細に検討し、ハイブリッド確率モデルによる予測結果について検証した。これまでに、出芽酵母の遺伝子ではDNAの配列がヌクレオソーム配置に最適かされるようデザインされていることを見てきたが、1番目のヌクレオソーム(+1ヌクレオソーム)のプロモーター側でヒストンとDNAの相性が相対的に高いことについて、その意味がわからなかった。手がかりを得るためmRNAの5'末端を定量的かつゲノムワイドに調査した。その結果、性特異的な遺伝子を含めて、多くの遺伝子のTSSを塩基対解像度で定量的に同定することができた。また、+1ヌクレオソームのDNAのヒストンに巻きついた部分から転写が始まることを見出した。ヌクレオソーム内部に見つかるTSSについて既報と比較すると、実はより内部にTSSが存在していた。出芽酵母のTSSの8塩基上流にはアデニンが頻出することが知られているが、このアデニンを持たないプロモーターに注目すると、TSSは+1ヌクレオソームの回転設定と関係することが明らかになった。この傾向はマウスの研究でも示唆されているが、まだ深く追求されていない。酵母の場合、少なくとも2通りのTSS決定要因があるらしく、その1つは8塩基手前のアデニン、もう1つはヌクレオソームとの空間的關係と言える。今後は、変異体を用いた解析や、多種生物を対象とした研究を進め、転写開始要因についてさらに検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sugiura Tomoko, Sugiura Hiroaki, Kato Hiroaki, Nariyai Yuko, Mizumoto Yuuki, Hanada Kozue, Takahashi Rieko, Hinotubo Yukari, Tanaka Naoko, Sasaki Mutsumi, Eguchi Haruki, Kamino Hiroki, Urano Takeshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Kinetics of Anti-SARS-CoV-2 Antibody Response Following Two Doses of the BNT162b2 mRNA Vaccine: A Japanese Single-Center Primary Care Clinic Report Involving Volunteers and Patients with Autoimmune Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infectious Disease Reports	6. 最初と最後の頁 24 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/idr15010003	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 -
1. 著者名 Kato Hiroaki, Shimizu Mitsuhiro, Urano Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Chemical map-based prediction of nucleosome positioning using the Bioconductor package nuCpos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12859-021-04240-2	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 -
1. 著者名 Katsumata Koji, Ichikawa Yuichi, Fuse Tomohiro, Kurumizaka Hitoshi, Yanagida Akio, Urano Takeshi, Kato Hiroaki, Shimizu Mitsuhiro	4. 巻 556
2. 論文標題 Sequence-dependent nucleosome formation in trinucleotide repeats evaluated by in?vivo chemical mapping	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.155	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 Kawakami Kei, Maeda Shin-ichi, Tanimoto Yoshiko, Shimizu Mitsuhiro, Kato Hiroaki	4. 巻 99
2. 論文標題 A budding yeast CAGE dataset comprising two cell types	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.24-00020	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 -

1. 著者名 Kato Hiroaki, Shimizu Mitsuhiro, Urano Takeshi	4. 巻 2023.04.16.537090
2. 論文標題 Asymmetric patterns of nucleosome positioning sequences in protein-coding regions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2023.04.16.537090	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加藤太陽
2. 発表標題 自分でデータを解析したい
3. 学会等名 第94回日本遺伝学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kato H, Shimizu M, Urano T
2. 発表標題 A chimeric chemical model revealed asymmetric DNA pattern in transcribed nucleosomes
3. 学会等名 The 30th Hot Spring Harbor International Symposium
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤太陽、清水光弘、浦野健
2. 発表標題 ケミカルハイブリッドモデルによるヌクレオソーム配置予測
3. 学会等名 第93回日本遺伝学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

島根大学医学部病態生化学
<http://www.shimane-med.ac.jp/biochem2/index.html>
Researchmap
https://researchmap.jp/hrk_kato/

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