

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05512

研究課題名（和文）細胞老化過程におけるゲノム構造変化のヌクレオソームレベルでの理解

研究課題名（英文）Revealing aging-associated chromatin structural change at the nucleosome level

研究代表者

大野 雅恵（Ohno, Masae）

京都大学・高等研究院・特定講師

研究者番号：10581738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：ゲノムの高次構造をとらえることは、転写をはじめとしたゲノムの機能を理解する上で重要である。本研究では、これまでに開発した高分解能ゲノム構造解析 Hi-CO法を用いて、老化前後の出芽酵母に適応し、老化に伴うゲノム構造変化をヌクレオソームレベルで明らかにした。老化前の細胞として対数増殖期の酵母、および老化細胞として長期培養し増殖静止期に入った酵母を用いた。その結果、プロモーター部分のヌクレオソーム高次構造が老化前後で大きく変化していることを明らかにした。このゲノム構造変化は、遺伝子発現量と相関しており、老化に伴う遺伝子発現変化にゲノム構造が関与していることをヌクレオソームレベルで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化の分子メカニズムの解明は、古くから行われている重要な研究テーマである。しかし、老化過程に伴うゲノム構造変化、特に、ヌクレオソームや遺伝子レベルでのゲノム構造変化の解明はあまり進んでいない。この問題を解決するため、本研究では申請者が開発したHi-CO法を用いて、老化に伴う前後のゲノム構造をヌクレオソームレベルで明らかにすることを目指した。その結果、本研究により、老化に伴うゲノム構造変化、特に、プロモーター領域のヌクレオソーム高次構造変化をとらえることに成功した。本研究により、老化に伴う遺伝子発現変化とゲノム構造の関係の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Revealing chromatin structure is a key for understanding genomic function including transcription. In this study, we attempt to capture chromatin structural changes associated with yeast aging by using our developed chromatin structural analysis, Hi-CO. We here used yeast cells in exponential growth phase as pre-senescent cells and yeast cells in stationary-phase as senescent cells. Our Hi-CO can reveal nucleosome folding in these cells by detecting spatial proximity among nucleosomes. We showed that nucleosome interactions in promoter regions were significantly changed before and after senescence. We also found that these structural changes are associated with gene expression. These results suggest that local nucleosome folding at promoter regions is involved in the changes in gene expression associated with aging.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヌクレオソーム ゲノム構造 染色体立体配座捕捉法

1. 研究開始当初の背景

ゲノムは、塩基配列の情報として機能することに加え、「構造」としても機能することで、転写をはじめとした多様な生命現象を担っている。細胞内のゲノム構造をとらえる手法の一つに Hi-C 法があり、この Hi-C 法によって、ゲノム構造と機能との関連性が明らかにされつつある。

これまでに申請者は、Hi-C 法の解像度を向上させることで、ヌクレオソーム分解能を持つ新規のゲノム構造解析手法: Hi-CO (Hi-C with nucleosome orientation) 法の開発に成功した。ヌクレオソームは、約 150 塩基対の DNA とヒストンタンパク質で構成されるゲノム最小構造である。Hi-CO 法は、このヌクレオソームを単位としてゲノム構造を決定する技術であるため、従来の Hi-C 法では検出できなかった詳細なゲノム構造を特定できる。特に、それぞれの遺伝子の中のヌクレオソームの空間的な配置や向きまで決定できる。これまでに申請者は、この Hi-CO 法を用いて、出芽酵母のゲノム構造決定を行い、遺伝子から染色体に至るまでの全ゲノム内のヌクレオソーム高次構造を明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者の開発した高分解能ゲノム構造解析 Hi-CO 法を用いて、細胞老化に伴うゲノム構造変化をとらえることで、老化過程においてゲノム構造が果たす役割を明らかにする。真核微生物や哺乳類細胞の老化過程では、ダイナミックなゲノム構造変化が報告されており、マクロなゲノム構造 (数メガから数十キロ塩基対) は同定されている一方で、マイクロな構造はまだ不明のままである。そこで、Hi-CO 法を用いることで、ゲノムの最小構造であるヌクレオソーム (数百塩基対) の分解能でゲノム構造を決定することを目指した。老化研究のモデル生物として有用な出芽酵母に Hi-CO 法を適応し、老化に伴うゲノム構造変化をマイクロからマクロスケールで、つまり、ヌクレオソームや遺伝子から染色体にいたるまでのゲノム構造を明らかにすることを目指した。さらに、得られた構造変化と遺伝子発現変化やエピゲノム変化と比較することで、細胞老化におけるゲノム制御機構の基盤として機能するヌクレオソーム高次構造を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

老化前の細胞として対数増殖期の酵母、および老化細胞として長期間培養し増殖静止期に入った酵母を用意し Hi-CO 解析を行った。はじめに、Hi-CO 法を行うための予備検討を行った。Hi-CO 法では、化学固定した酵母を Micrococcal nuclease (MNase) で処理し、ゲノムをヌクレオソームサイズに切断した後に、DNA アダプターをヌクレオソーム上のゲノム DNA に結合させ、このアダプター同士を結合させることで空間的に近い位置にあるヌクレオソーム同士を連結する。増殖期と静止期の酵母では、細胞壁の厚さやクロマチンのアクセシビリティが異なる。そのため、細胞壁破碎や MNase 処理条件などの Hi-CO 法における各ステップを、増殖期と静止期のそれぞれの酵母において最適化する必要があった。また、最終産物である連結したヌクレオソームの収量が低いことが問題としてあったため、この点を改善するために、使用する酵素の変更や、アダプター-DNA の配列の変更を試ることで、Hi-CO 法の各ステップの改良を行いヌクレオソームの連結効率を上げる検討を行った。これらの改良を行った後に、増殖期と静止期の酵母を用いて Hi-CO 解析を実施した。

4. 研究成果

はじめに、これまで使用していた対数増殖期の酵母と同じ条件で増殖静止期の酵母のゲノムを切断した。酵母を化学固定、細胞壁破碎、MNase で処理し、DNA を精製した後にゲル電気泳動で確認した。しかし、MNase により過剰にゲノムが切断され、ヌクレオソームサイズの DNA が確認できなかった。そのため、MNase のユニット数を減らして処理時間を検討した。さらに、ジルコニアビーズによる細胞破碎条件も検討した結果、破碎の条件を弱くした方がヌクレオソームの収量が上がることも確認した。同じ細胞数の増殖期と増殖静止期の酵母を用意して比較すると、増殖静止期の方が得られるヌクレオソームが少ないが、単一ヌクレオソームを得るゲノム切断の条件は見つけることができた (図 1)。このゲノム切断条件を用いて、次の Hi-CO のステップであるヌクレオソームを pull-down する検討を進めた。ヌクレオソームを切断した後に、酵母の細胞溶解液を調製し、ヒストン抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) し、DNA を精製しゲル電気泳動を行った。その結果、対数増殖期と同様に増殖静止期でもヌクレオソームは得られたが、ヌクレオソームの収量は少なかった (図 2)。

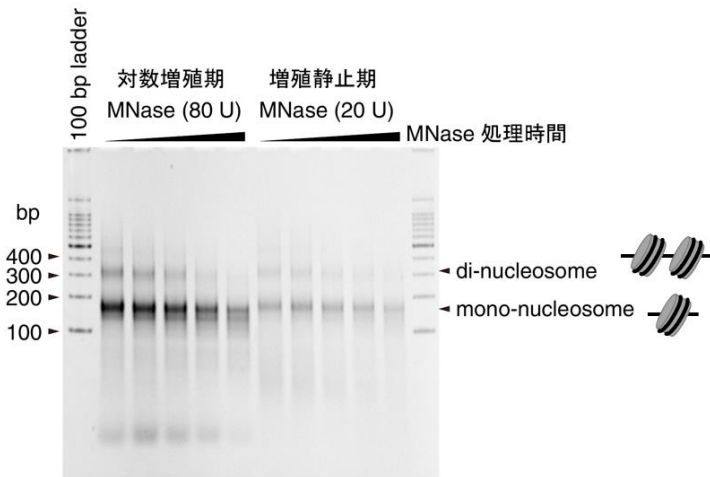


図1. MNaseによるゲノム切断条件の検討結果

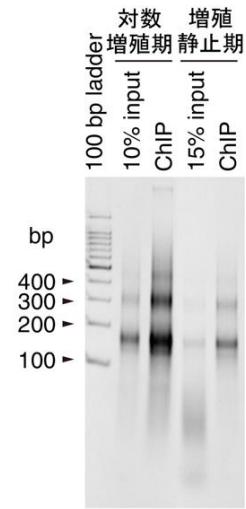


図2. ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) の検討結果

次に、増殖期と静止期の細胞を用意して Hi-CO 実験を行った。この際に、増殖期と静止期で同じ細胞数を用意し、ヌクレオソームの収量は異なる条件で、Hi-CO の実験を進めた。

Hi-CO 実験では、ChIP によりヌクレオソームを pull-down した後に、ヌクレオソーム上のゲノム DNA に DNA のアダプターを結合させて、DNA リガーゼを用いてそのアダプター同士を結合させ、結合した DNA をシーケンスし、その結合頻度からヌクレオソーム間の距離の情報を得る。結合頻度が高いヌクレオソーム間は、その距離が近いことを示している。このヌクレオソーム間結合確率をゲノム間距離ごとに表示した (図3)。その結果、対数増殖期 (黒) では、約 1000 bp 程度までゲノム間の結合確率が大きく低下しないのに対し、静止期 (灰色) では、ゲノム間の結合確率が低下していた。これは、静止期の方が約 1000 bp までのゲノム距離までのヌクレオソーム (ヌクレオソーム 2~6 個分) の結合率が低いことを示している。このことから、静止期のクロマチンファイバーの方が、増殖期より細いことが示された。

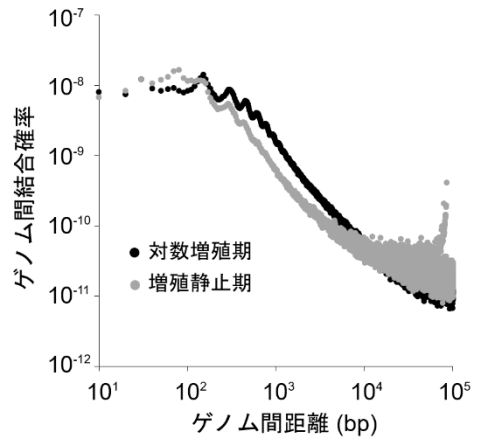


図3. ゲノム間の結合頻度

また、Hi-CO 解析により得られるヌクレオソーム間相互作用マップの一例を示した (図4)。このマップは、1つのピクセルが1つのヌクレオソーム間相互作用を示しており、結合したヌクレオソームの数を色の濃淡で表している。また、遺伝子の位置を最下部に示している。増殖期の酵母では、プロモーター部分のヌクレオソーム相互作用が少ないのに対し、遺伝子内のヌクレオソーム相互作用が多いため、遺伝子ごとのヌクレオソームの集まりが見られる。その一方で、静止期の酵母では、プロモーター部分のヌクレオソーム相互作用が増加するのに対し、遺伝子内のヌクレオソーム相互作用が低下しており、遺伝子ごとの集まりが見られなくなる傾向にあった。つまり、増殖期の酵母のプロモーター領域は、オープンな状態であるのに対し、静止期の酵母では、クローズドな状態であり、この傾向は、多くの遺伝子で起こっていた。このプロモーター部分のヌクレオソーム高次構造の変化は、mRNA 発現量と関連しており、老化に伴う遺伝子発現変化にゲノム構造が関与していることをヌクレオソームレベルで明らかにした。

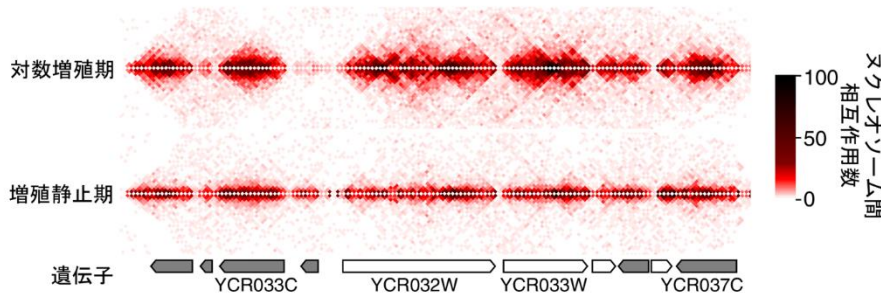


図4. 老化前 (対数増殖期) と老化後 (増殖静止期) のHi-CO法によるヌクレオソーム相互作用マップ (3番染色体の169 k~198 kbpの領域)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohno Masae, Ando Tadashi, Priest David G., Taniguchi Yuichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Hi-C0: 3D genome structure analysis with nucleosome resolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 3439 ~ 3469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-021-00543-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 -

1. 著者名 Oveisi Mehrdad, Shukla Manu, Seymen Nogayhan, Ohno Masae, Taniguchi Yuichi, Nahata Sunil, Loos Remco, Mufti Ghulam J, Allshire Robin C, Dimitrov Stefan, Karimi Mohammad M	4. 巻 37
2. 論文標題 iNucs: inter-nucleosome interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 4562 ~ 4563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bioinformatics/btab698	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

〔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 大野雅恵
2. 発表標題 クロマチン構造をヌクレオソーム単位で明らかにする
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------