

平成30年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14642

研究課題名(和文)新しい原理に基づくヌクレオソーム中心と転写因子結合部位の網羅的統合解析

研究課題名(英文) A novel principle for integrative analysis of nucleosome centers and transcription factor-binding sites

研究代表者

伊藤 隆司 (Ito, Takashi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：90201326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：私達の細胞は、ゲノム中の遺伝子を取捨選択して使うことによって、個性を発揮したり環境変化に適応したりしています。この取捨選択はDNAに結合する転写因子やヌクレオソームというタンパク質が行いますので、ゲノムの働き方を理解するにはゲノムDNA上のタンパク質結合部位を網羅的に知る必要があります。私達は、細胞膜を通過してDNAを修飾するジメチル硫酸と次世代シーケンサーを用いる新技術DMS-seqを開発し、細胞核の単離や遺伝子操作なしに転写因子結合部位とヌクレオソームの中心位置をゲノムワイドに同定することに初めて成功しました。DMS-seqはゲノム機能の理解を支える技術になると期待されます。

研究成果の概要(英文)：The cells in our body select distinct subsets of genes in the genome, thereby generating a variety of unique cell types and responding appropriately to changes in the environment. Since the selection is done by the transcription factors and nucleosomes bound to the genomic DNA, it is critical to comprehensively reveal their binding sites for an in-depth understanding of genome functions. We have developed a novel method termed DMS-seq using dimethylsulfate, a cell-permeable DNA-modification reagent, and next-generation sequencer. DMS-seq has, for the first time, enabled comprehensive identification of transcription factor-binding sites and the center positions of nucleosomes without nuclear isolation and genetic manipulations. We expect that DMS-seq provides a unique method to accelerate our understanding of genomic regulation.

研究分野：ゲノム科学

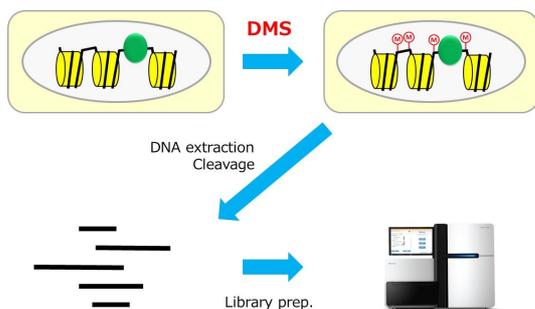
キーワード：ゲノム ヌクレオソーム クロマチン 転写因子 次世代シーケンサー DMS

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノムがその多彩な機能を発揮する際の分子基盤には、タンパク質と DNA の相互作用がある。ゲノム DNA の収納、染色体・核内高次構造の構築、DNA 複製・修復・組換、転写、染色体分配等々、いずれの過程においてもゲノム DNA とタンパク質の相互作用が重要な役割を果たしていることは改めて強調するまでもあるまい。したがって、in vivo におけるタンパク質-DNA 相互作用の全体像解明は、ゲノム生物学の最重要課題のひとつと言える。

タンパク質-DNA 相互作用の網羅的解析には、クロマチン免疫沈降(ChIP)に基づく ChIP-seq が用いられてきた。しかし、ChIP-seq は目的とするタンパク質ごとに実験が必要な個別的解析手法であり、その成否は用いる抗体の質に依存する。よって、あらゆる DNA 結合性因子について ChIP-seq を行うことは現実的には不可能である。そこで求められるのが、ゲノム DNA 上のあらゆるタンパク質結合部位を一気に同定できる方法である。その代表格が、単離核の DNase I 消化に基づく DNase-seq である。タンパク質結合部分は、DNase I による切断を免れたフットプリントとして検出される。この方法は画期的であるが、技術的難易度が高い。また、核の単離が必須であるため、細胞や組織によっては困難が伴う上に、厳密には in vivo 解析法ではない。

そこで我々は、古くから DNase I と同様にフットプリント法に利用され、その細胞膜透過性から in vivo フットプリント法にも応用可能なジメチル硫酸(DMS)に着目し、核の単離を必要としない真の in vivo ゲノムワイドフットプリント法 DMS-seq の開発に取り組んできた。その結果、転写因子結合部位(TFBS)の同定における有効性を確認できた。



DMS-seq のピークは TFBS のみならず遺伝子体部にも出現する。それらは転写開始点から離れるにつれて減衰する周期性を示すことから、マイクロコッカルヌクレアーゼ(MNase)-seq と同様にヌクレオソーム配置を反映すると思われた。ところが、DMS-seq と MNase-seq では振動の位相が逆という予想外の事実が判明した。この結果は、MNase がヌクレオソームのリンカーを切断するのに対して、DMS がヌクレオソームの中心を優先的に

に切断することを示唆している。

ヌクレオソームの位置はその中心の座標で定義される。中心は、MNase-seq が示唆するリンカー部位からの間接的推定ではなく、直接検出で決定するのが精度の上からは理想的である。それが可能な唯一の方法は、ヒストン H4 遺伝子の改変を必要とするため、そのコピー数が例外的に少ない酵母にしか適用できない。しかし、上記の現象を活用すれば、全真核生物に適用可能な普遍性と中心検出に基づく高精度の双方を兼ね備え、核の単離さえ不要なヌクレオソームマッピングを実現できる。更に同一手法で TFBS との統合解析も可能になると考えて申請に及んだ。

### 2. 研究の目的

DMS-seq の手法を確立すること。更に、DMS がヌクレオソームの中心を優先的に切断する可能性を従来法によるヌクレオソーム中心位置との比較によって検証すること。

### 3. 研究の方法

1) 出芽酵母をモデルに DMS-seq の実験手法を確立し、データ解析パイプラインを確立する。

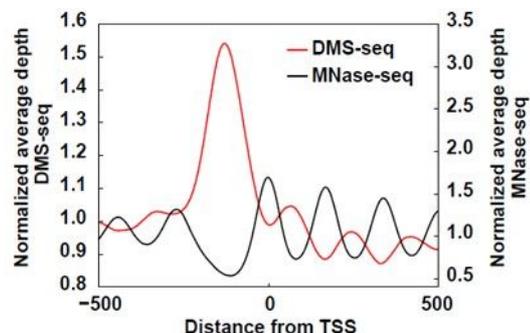
2) 1) の系を用いて得た結果を、ヒストン H4 S47C 変異株を用いる化学切断法で決定されたヌクレオソーム中心位置と比較する。

3) ヌクレオソーム配置様式が異なる分裂酵母を用いて DMS-seq を行い、化学切断法によるヌクレオソーム中心位置との比較を行う。

4) ヒト培養細胞の DMS-seq を行い、ヒトにおけるヌクレオソーム中心検出の可能性を検討する。

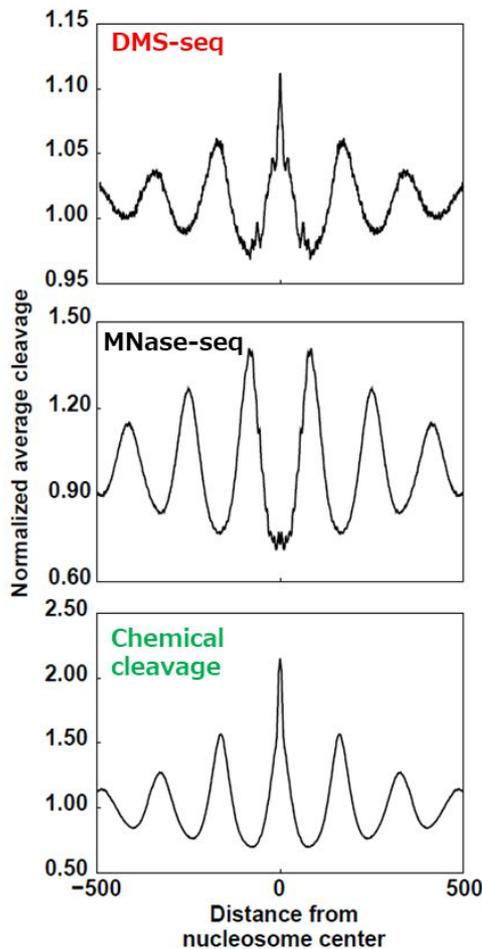
### 4. 研究成果

1) DMS-seq のプロトコルを確立して、出芽酵母における TFBS 検出における有効性を実証した。十分量のデータを取得して、主に遺伝子体部において MNase-seq とピークが逆相関することを確認した(下図)

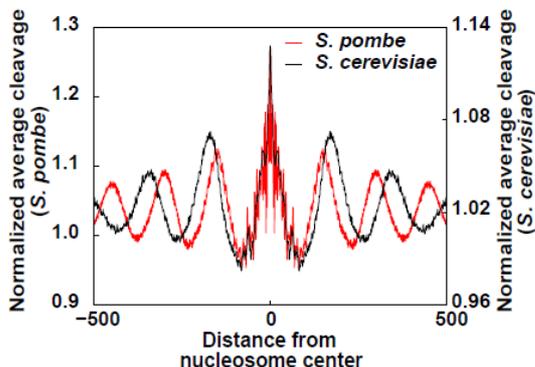


2) Brogaard らが 2012 年に発表したヒストン H4 S47C 変異株を用いた化学切断法が、出芽酵母の最も正確なヌクレオソーム中心位置のデータである(1)。そこでこのデータによるヌクレオソーム中心位置と DMS-seq における切断点の比較を行なった。その結果、字図に示す様に両者は驚くべき一致を示すこ

とが判明し、DMS がヌクレオソーム中心を優先的に切断することが明確に示された。

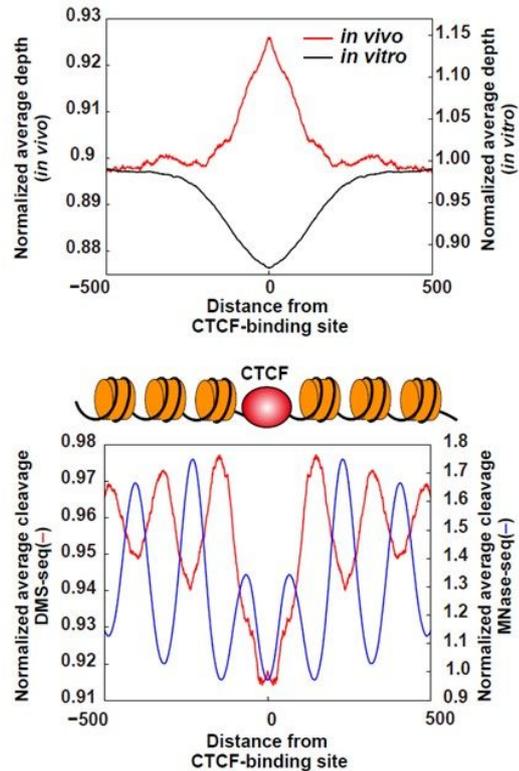


3) 出芽酵母に続いて、分裂酵母への DMS-seq の適用を行ない、分裂酵母の化学切断法の結果(2)と比較を行った。その結果、分裂酵母においても、DMS による切断点と化学切断法によるヌクレオソーム中心位置がよい一致を示すことが確認された。



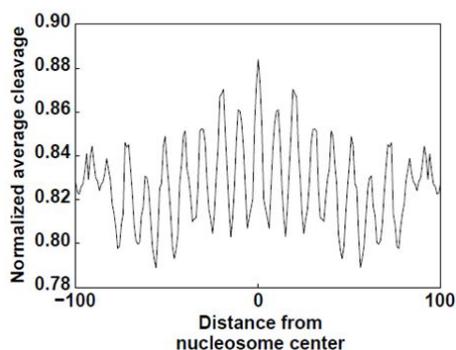
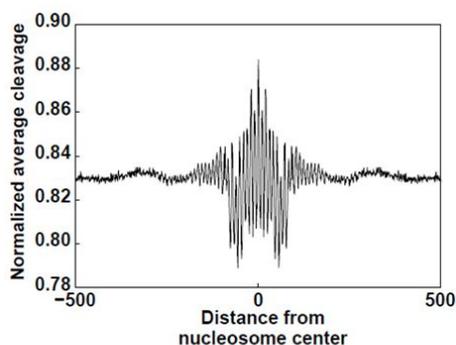
4) ヒト培養細胞 IMR90 を用いて DMS-seq を行った。まず、CTCF や RAD21 などの結合部位を DMS-seq が正しく検出できていることを確認した。これらの結合部位周辺ではヌクレオソームの配置が明確になることが知られていることから、結合部位周辺の MNase-seq デ

ータと DMS-seq データを比較したところ、両者の位相が逆になることが確認された(下図)。この結果はヒト細胞においても DMS がヌクレオソーム中心を優先的に修飾することを示唆していた。



ヒストン H4 遺伝子の変異体を用いる化学的切断方法は、ヒストン H4 遺伝子の大半を変異アレールで置換する必要があることから、同遺伝子のコピー数が例外的に少ない酵母にしか用いられておらず、ヒト細胞でのデータは存在しなかった。そこで 70 株以上のヒト不死化リンパ球から取得された DNase-seq データの統合解析からヌクレオソーム配置を予測した論文(3)に着目し、そこで決められたヌクレオソーム位置と IMR90 における DMS 切断点の比較を行ったところ、両者がほぼ一致することが判明した。酵母のデータと比較すると、中心から 10 bp 周期でずれた位置のピークが高くなる傾向が強く見られた(次頁図)。これは、ヌクレオソーム配置が DNA のらせん構造と関連することの反映であり、使用した細胞の違いも考慮すると納得のできる現象であった。

これら一連の実験の対照実験として行った精製 DNA に対する DMS-seq の詳細な解析から、ヌクレオソーム中心となる配列が内在性の DMS 高感受性を示すことが明らかになり、DNA 形状のパラメータが独特のパターンを示すことも判明した。これらの結果は、DNA 形状がヌクレオソーム配置のための隠されたコードとして働く可能性を示唆する興味深い結果と思われた。



< 引用文献 >

Brogaard et al. Nature, 486 (2012), pp. 496-501  
 Moyle-Heyrman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110 (2013), pp. 20158-20163  
 Zhong et al., Genome Res., 26 (2016), pp. 351-364

5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Taichi UMEYAMA & Takashi ITO  
 DMS-Seq for In Vivo Genome-wide Mapping of Protein-DNA Interactions and Nucleosome Centers.  
 Cell Reports、査読有、  
 21 卷、2017、289-300  
 DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.035.

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :

番号 :  
 出願年月日 :  
 国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 取得年月日 :  
 国内外の別 :

[ その他 ]  
 ホームページ等  
<http://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/185>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 隆司 ( ITO, Takashi )  
 九州大学・大学院医学研究院・教授  
 研究者番号 : 90201326

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

梅山 大地 ( UMEYAMA, Taichi )  
 九州大学・大学院医学研究院・学術研究員  
 理化学研究所・生命医科学研究センター・  
 研究員  
 研究者番号 : 30706370