

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06679

研究課題名(和文)ゲノム編集が遺伝情報へ及ぼす影響の動的モニタリングを可能とするための基盤研究

研究課題名(英文)Basic research to enable monitoring genome editing effects on dynamics of genetic information

研究代表者

中村 公亮(Nakamura, Kosuke)

国立医薬品食品衛生研究所・食品部・室長

研究者番号：60570926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質と結合していないDNAを分解する非特異的エンドヌクレアーゼと、ゲノムDNA結合タンパク質に特異的なIgG抗体と結合するプロテインAとを架橋したユニバーサルプローブを創製し、このプローブを用いて、遺伝子の欠失、置換、及び、挿入変異がゲノムDNA結合タンパク質の有する遺伝情報へ及ぼす影響を単一細胞レベルで追跡するscChIC-Seq法を開発した。活性型H3K4me3と抑制型H3K27me3ヒストン修飾を検出するプローブを創製し、方法の特異性と感度の高さを実証した。本法を用いて、ゲノム編集細胞のゲノムDNA結合タンパク質の位置と量の変化を経時的・網羅的に解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術が応用されたバイオテクノロジーは、目覚ましい発展を遂げている。今後、国内外でゲノム編集食品の開発と流通が進むと予想されている。本研究では、我々が開発したscChIC-Seq法を用いて単一細胞単位でゲノム編集食品のゲノムに起こる変化を網羅的に検出可能であることを実証した。本法は、ゲノムの特定のタンパク質の性質の変化を高感度かつ特異的に検出可能な新しい技術であることから、ゲノム編集食品の安全性を確認する新たな方法の1つになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a universal probe in which non-specific endonuclease, MNase, that degrades genomic DNAs that proteins were not bound and protein A that binds to IgG antibodies specific to a genomic DNA-binding protein were covalently-crosslinked. Developed method using this universal probe (scChIC-Seq method) enabled tracking the genetic information regarding to the genomic DNA-binding proteins signals at the single-cell level (Nature Methods, 16, 323-325, 2019). We created probes that detect active histone-modified H3K4me3 and inhibitory histone-modified H3K27me3 signals, and demonstrated specificity and sensitivity of the developed probes to analyze epigenetic modification. In this study, the position and amount of genomic DNA-binding proteins motifs in genome-edited cells were comprehensively analyzed using this method.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：バイオテクノロジー ゲノム編集 単一細胞 DNA結合タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノム編集ツールを用いてゲノム編集生物が開発され、食品のみならず医療用などへの応用が期待されているところである。このような技術の実用化に向けた安全性を裏付ける評価法は、未だ発展途上にある。特に、細胞の運命を司るゲノム DNA 結合タンパク質の微細な変化をとらえる手法については、特異性、感度、再現性を向上させ改良が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、汎用性と高い再現性を実現し、これまでに不可能とされてきた単一細胞単位のゲノムタンパク質を解析可能な特異的な方法 (scChIC-Seq 法) を開発し、本法を用いて、様々な細胞を解析し、ゲノム編集技術のさらなる進化・発展に繋がる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 新型プローブの創成: ゲノムタンパク質に特異的な IgG 抗体と Nuclease micrococcal from *S. aureus* (MNase) またはプロテイン A と MNase を共有結合させたプローブを作成した。本研究の供試 IgG 抗体の標的抗原は、プロモドメインタンパク質 BRD4、活性型ヒストン修飾 H3K4me3 と H3K27ac、抑制型ヒストン修飾 H3K27me3 等のゲノム DNA 結合タンパク質とした。

2) scChIC-Seq 法の最適化: 供試細胞には、ホルムアルデヒドで固定したマウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞及びマウス T 細胞リンパ腫 EL4 を用いた。創成したプローブを用いて、断片化させたゲノム DNA は、End-It-DNA End-Repair Kit を使用して、平滑末端にし、Klenow Exo-で A-hang させた。次に、Illumina Adaptor Oligo Mix を TA ライゲーションし、Indexing Primer と Common PCR Primer 1.0 を使用して、PCR 後、得られた増幅産物をシークエンスした。シークエンサーには、HiSeq2500、又は、MiSeq を使い、Fastq データファイルを得た。データファイル中の DNA1 本毎の塩基配列 (リード) は、Bowtie2 を用いて、マウスゲノム (mm9) へ 張付け (マッピング) することで、ゲノム中の「場所」を特定した。リード配列の密集領域 (「量」) は、SICER を用いて同定した。同一細胞種や異種細胞種間の比較には、EdgeR を用いた。また、あわせて WEB 公開されている ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) の ChIP-Seq データと比較することで、scChIC-Seq データの特異性について考察した。

3) ゲノム編集細胞を用いた検証: 供試細胞には、上述した HEK293、3T3-L1、EL4、マウス ES 細胞を用いた。CRISPR-Cas9 を用いて、いわゆるセーフハーバー AAVS1、CCR5、ROSA26 領域を中心に、欠失 (<300 bp)、置換 (<30 bp) 並びに、トランスジーン発現カセット (<3,000 bp) を配列、長さ、組み合わせを変えて変異導入し、解析に供した

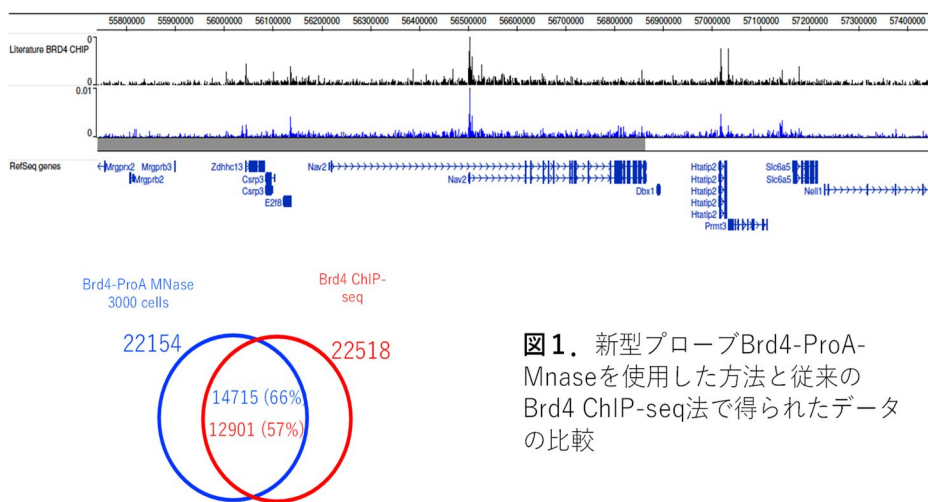


図1. 新型プローブBrd4-ProA-Mnaseを使用した方法と従来のBrd4 ChIP-seq法で得られたデータの比較

4. 研究成果

1) 従来の免疫沈降 (ChIP) 後、次世代シークエンサーで解析する方法を用いてプロモドメインタンパク質 BRD4 のゲノム上の位置を網羅的に解析した。そのデータと我々が開発した scChIC-Seq 法を用いて 3000 個の細胞あたりの情報と比較解析を試みた。その結果、Brd4 の位置情報は、66% の一致率を示すことが示唆された (図1)。

2) scChIC-Seq 法には、使用する抗体の化学修飾の最適化、様々な細胞由来ゲノムの脱凝縮反応の最適化、使用する緩衝液の最適化等を検討する必要があったため、様々な細胞種を同方法に供して単一細胞単位で解析可能な方法を検討した。その結果、細胞の固定化後、新型プローブを細胞と混合する前に、界面活性剤 (RIPA) を 1% (v/v) 含有させた溶液で処理し、同プローブの細胞膜の浸透を増加させることにより、感度が向上することが示唆された (図 2)。

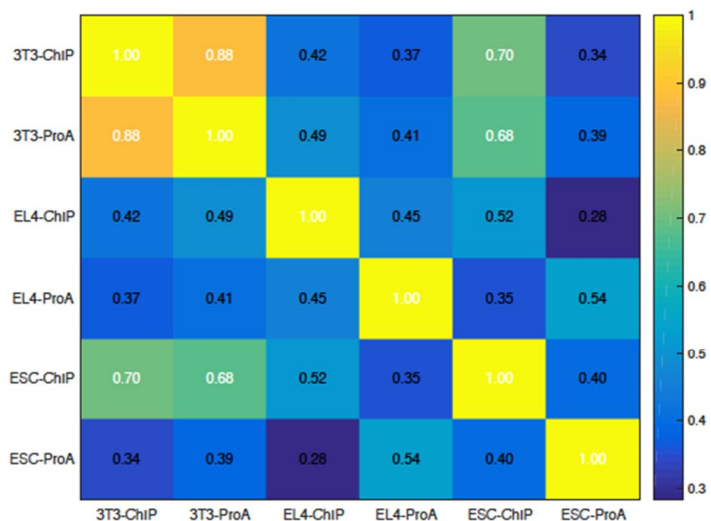


図 2. 新型プローブを用いてH3K4me3-ProA-Mnaseを使用した方法と従来のH3K4me3 ChIP-seq法で得られたデータ間の比較。3000個の3T3-L1、EL4、マウスES細胞の情報をそれぞれ比較した結果を示す。

3) 改良型 scChIC-Seq 法を用いて、17個と3000個の野生型 HEK293 細胞の H3K4me3 タンパク質の位置情報を解析した (図 3A)。その結果、17個の細胞において特定のゲノム域を検出可能であることが示唆された。次に、12個の野生型とゲノム編集細胞の多変量解析を行い、ゲノム編集後の H3K4me3 タンパク質の位置情報から細胞の性質を分類した (図 3B)。その結果、明確な分類はなされなかった。以上の結果は、ゲノム編集によってヒストンタンパク質の明確な変化が起きていないことが示唆された。今後、同方法を用いて、様々なゲノムの位置にゲノム編集を行った細胞間において、ゲノム編集後の多角的な表現型の微細な変化を継続して解析する予定である。

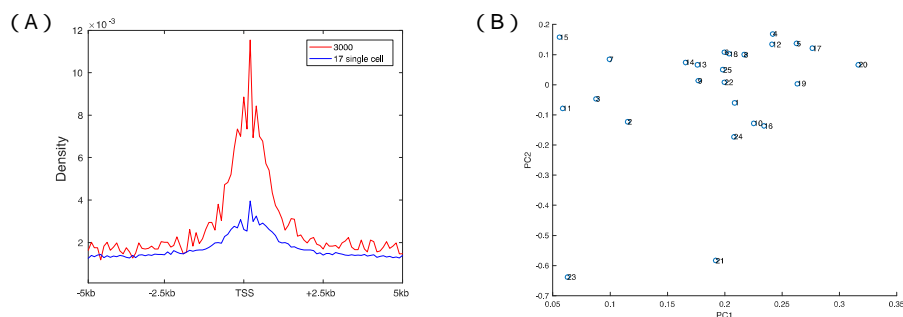


図 3. 新型プローブを用いてH3K4me3-ProA-Mnaseの位置情報を比較 (A) 17個と3000個のHEK293細胞のデータを比較 (B) 24個の野生型とゲノム編集細胞のH3K4me3位置情報を多変量解析した結果

< 引用文献 >

1. Nature Methods, 16, 323-325, 2019

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Soga, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Kimata, S., Ohmori, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Nagoya, H., Kondo, K.	4. 巻 27
2. 論文標題 Data representing applicability of developed growth hormone 1 (GH1) gene detection method for detecting Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>) at high specificity to processed salmon commodities	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 104695 ~ 104695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.104695	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 Soga, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Kimata, S., Ohmori, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Nagoya, H., Kondo, K.	4. 巻 305
2. 論文標題 Development of a novel method for specific detection of genetically modified Atlantic salmon, AquAdvantage, using real-time polymerase chain reaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 125426 ~ 125426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2019.125426	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 Narushima, J., Kimata, S., Soga, K., Sugano, Y., Kishine, M., Takabatake, R., Mano, J., Kitta, K., Kanamaru, S., Shirakawa, N., Kondo, K., Nakamura, K.	4. 巻 84
2. 論文標題 Rapid DNA template preparation directly from a rice sample without purification for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of rice genes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 670 ~ 677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1701406	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 Zhao, K., Nakamura, K., Ku, W. L., Gao, W., Cui, K., Hu, G., Tang, Q., Ni, B.	4. 巻 NA
2. 論文標題 A single-cell chromatin immunocleavage sequencing (scChIC-seq)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protocol Exchange	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/protex.2019.011	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 該当する

1. 著者名 Ku, W. L., Nakamura, K., Gao, W., Cui, K., Hu, G., Tang, Q., Ni, B., Zhao, K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Single-cell chromatin immunocleavage sequencing (scChIC-Seq) to profile histone modification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 323-325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41592-019-0361-7	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 該当する

[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 中村公亮、木俣真弥、成島純平、志波優、秋本智、曾我慶介、権藤崇裕、明石良、近藤一成
2. 発表標題 ゲノム編集生物に残留する意図せざるDNA切断の予測・検出法の評価
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成島純平、中村公亮、木俣真弥、志波優、秋本智、曾我慶介、権藤崇裕、明石良、近藤一成
2. 発表標題 2017年中に発表されたゲノム編集イネのオフターゲット効果に関する評価
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村公亮、木俣真弥、成島純平、志波優、秋本智、曾我慶介、権藤崇裕、明石良、近藤一成
2. 発表標題 ゲノム編集食品に残留する意図せざるDNA切断の予測・検出法の評価(第2報)
3. 学会等名 日本食品化学学会 第26回 総会・学術大会
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
---------	---------