

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22392

研究課題名(和文) 娘細胞に継承されるエピジェネティック修飾の非対称性を親細胞内で捉える新技術の開発

研究課題名(英文) development of a new technology to detect epigenetic asymmetry between sister chromatids prior to cell division

研究代表者

永野 隆 (Nagano, Takashi)

大阪大学・蛋白質研究所・招へい教授

研究者番号：70272854

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)：多細胞生物の個体を構成する多種多様な細胞はどれもほぼ同じゲノム情報を持つが、各細胞種に特異的なエピゲノム情報の働きでゲノム情報の使い方を細胞種ごとに換え、細胞の多様性を実現している。しかし細胞が増殖して新たな種類の細胞を生み出す際、新たな細胞種に応じたエピゲノム情報が細胞分裂前から準備されるのか、新たなエピゲノム情報は細胞分裂後に用意されるのかは、調べる方法がないため分かっていなかった。本研究はそのための方法を開発するために行われた。技術の完成には未だ至っていないが、これまで技術開発が難しかった要因である、DNA配列が同じ一対の姉妹染色分体を分裂前細胞内で鑑別標識する手法を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1個の受精卵からスタートした私達の細胞はエピゲノム情報を頼りに人体を作り上げ、疾患や老化などにおいてもエピゲノム情報の異常が関わっていることが分かっている。従って、細胞が増える際にエピゲノム情報が適切に継承されるメカニズムを知ることは大きな意義がある。特に新たな種類の細胞が生まれる際にはそれに対応する新たなエピゲノム情報が必要なので、それがどのように作られるのかはとりわけ重要である。本研究の成果は、そのメカニズムを調べるための新たな技術に必要な知識であり、今後の研究の礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：Diverse types of cells in multicellular organism share almost identical genome, but the epigenomic information specific to each cell type plays crucial roles for the cellular diversity. It is an important question whether a new epigenome information is set before or after the cell division in which the corresponding new cell type is born. However, the question has been unanswered because there has been no appropriate method to find the answer. More specifically, there has been no way to discriminate a pair of sister chromatids carrying epigenetic information because they have exactly the same DNA sequence, and the purpose of this research is to develop a new method to discriminate between sister chromatids. Although we have not completed the technology development, we have found an efficient way to label sister chromatids differently and discriminate between them.

研究分野：エピゲノミクス

キーワード：非対称細胞分裂 染色分体 エピジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の細胞分裂には、親細胞が同じ娘細胞2つに分かれる分裂様式(対称細胞分裂)以外に、生み出される2つの娘細胞が互いに異なる非対称細胞分裂と呼ばれる様式が存在する。この非対称細胞分裂は多細胞生物の発生過程のみならず、成体や癌組織においても幹細胞が自らの集団を維持しつつ分化細胞を生み出す普遍的な細胞分裂様式として重要であり、娘細胞間に違いを生み出す非対称性の形成機構は重要な研究ターゲットである。娘細胞の運命が同じでないということは、同一のゲノムDNA配列を持つ娘細胞間でそのエピジェネティック修飾などDNA配列以外の状態が異なることを意味する。細胞分裂後に娘細胞に引き継がれる染色分体(複製後の単一コピーDNAを含むクロマチン)のエピジェネティック修飾の複製は、一般的にDNA複製後すぐ(細胞分裂を待たずS期からG2期に)開始されることから、非対称細胞分裂に先立つ本質的な決定因子として、染色分体間のエピジェネティック修飾の非対称性が親細胞内で形成されている可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

現在の非対称細胞分裂研究は、親細胞内でのDNAやエピジェネティック情報の複製との関連にまで手が及んでいない。そしてその背景には、親細胞内でDNA配列が全く同一の(1塩基多型なども存在しない)1対の姉妹染色分体を鑑別してエピジェネティック修飾を解析する方法が存在しない現実がある。本研究の目的は新手法を開発してそこに新たな道を拓くことにあり、非対称細胞分裂研究の対象を親細胞内におけるエピジェネティック制御の分野にまで拡大する契機となることを目指す。

### 3. 研究の方法

この研究で新たに開発しようとした方法は、ChIL法(Harada et al., Nat Cell Biol. 2019)を基本とし、それに独自のアイデアを加えて姉妹染色分体を鑑別する、というものであった。

ChIL法とは、クロマチン上で任意の抗体により認識される領域のDNAに、抗体に結合させたトランスポゼースの働きで挿入配列(原法ではT7RNAポリメラーゼのプロモーター)を導入し、それを利用して挿入部分に隣接するDNA配列を増幅し次世代シーケンスにより同定する手法である。最初に用いた抗体の認識部位近傍にあるゲノム配列を知ることができ、従来のクロマチン免疫沈降法(ChIP法)と同種のデータをChIP法よりも高感度で得ることができることが特徴である。この研究で目指した方法は、抗体の認識部位近傍にあるゲノム配列を増幅するという点ではChIL原法と同じだが、ゲノム配列の由来(姉妹染色分体のどちらか)を鑑別できるようにするため、以下に述べる改変を加えて進める計画であった。

(1)解析に用いるのは、DNA複製の完了後細胞分裂期に至る前のG2期の細胞だが、直近のDNA複製で作られる新生鎖をBrdUで予め標識しておく。DNAは半保存的に複製されるので、これにより2つの姉妹染色分体のうちの1つはマイナス鎖が、もう1つの染色分体はプラス鎖がBrdUで標識されることになる。

(2)ChIL法で用いる挿入配列を全面的に変更し、イルミナ社次世代シーケンスプラットフォームのP5(Read1側のアダプター)配列が挿入部位からゲノム上で双方向(セントロメア方向・テロメア方向の両方)に向かって挿入されるようにする。つまりいずれの染色分体上に挿入配列が入った場合でも、プラス鎖とマイナス鎖の両方のゲノムDNAがP5配列下流に来ることになる。

(3)上記(1)の標識を施した細胞にChIL法と同様に抗体を反応させ、(2)の改変を施した挿入配列を抗体認識部位近傍のゲノムDNAに挿入した後、DNAを抽出して紫外線を照射することで、BrdU標識鎖だけにニックを導入することができる。(1)に記した通り、2つの姉妹染色分体のうちの1つはマイナス鎖がBrdUで標識され、もう1つの染色分体はプラス鎖がBrdUで標識されている。これによりP5アダプターからシーケンスを行なうと、2つの姉妹染色分体のうちの1つに挿入配列が入った場合にはプラス鎖だけが、もう1つの染色分体に挿入配列が入った場合にはマイナス鎖だけがシーケンスされることになる。すなわちシーケンスリードがプラス鎖にマップされるかマイナス鎖にマップされるかにより、抗体認識部位のみならずそれが2つの姉妹染色分体のどちらに由来するかを鑑別するかたちで同定できる。

### 4. 研究成果

この研究で開発しようとする新技術には、解析しようとするゲノムDNAが細胞周期のS期に効率良く、かつ2本鎖DNAの両方ではなく新製鎖のみが、BrdUで標識できていることが前提であり重要である。しかし研究開始後にこれを実現することが予想外に困難であることが判明し、

結果的にこの点の条件検討に重点的に時間をかけて行なう必要に迫られた。解析対象とする細胞はできるだけ自然な状態のものが望ましいとの考えから、2019年度の検討では BrdU 標識を一定時間行なった後に DNA 染色とセルソーターによって G2 期細胞を選別して用いたが BrdU 標識効率は不十分であり、nocodazole による細胞同調を行なうことで標識効率が高められることが判明した。2020年度は前年度の検討結果を踏まえ、細胞同調と標識条件を至適化することでゲノム DNA の標識効率の更なる改善が可能であるかを検討した。その結果、完全に偏りのない均一な標識を得るには至らなかったものの、多くの条件を比較した中で最善の(広範囲に渡り可及的に高効率を得られる)標識効率を得る方法を見出すことができた。

また BrdU 標識の条件検討と並行して、ヒストン修飾に対する抗体の認識部位近傍のゲノム DNA にトランスポゼースの作用で挿入配列を組み込む過程の条件検討も行なった。この過程の技術的な出発点である ChIL 法は、本来プレートなど固相に付着した細胞サンプルを対象に開発された技術である。それに対し本研究で対象とした懸濁液中の細胞に対しては、トランスポゼースの作用を安定的に得ることが困難であった。それに対する改善策を模索したが、結果的には当初計画した方法を研究期間内に実現することは叶わなかった。しかし現在では、新製鎖をパルス標識した懸濁細胞サンプルを免疫沈降法と組み合わせることで、ヒストン修飾を姉妹染色分体鑑別的に検出することに成功した SCAR-seq という新たな方法が発表されている(Petryk et al., Science, 2018)。SCAR-seq で用いられるパルス標識に代えてこの研究で見出した条件で細胞標識を行ない、その細胞懸濁液を SCAR-seq と同様に免疫沈降法と組み合わせることで、この研究の当初の目的を実現できる可能性が高く、その意味で将来に向け有意義な成果が得られたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Samuel Collombet, Noemie Ranisavljevic, Takashi Nagano, Csilla Varnai, Tarak Shisode, Wing Leung, Tristan Piolot, Rafael Galupa, Maud Borensztein, Nicolas Servant, Peter Fraser, Katia Ancelin and Edith Heard	4. 巻 580
2. 論文標題 Parental-to-embryo switch of chromosome organization in early embryogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 142 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2125-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 該当する

1. 著者名 Wing Leung and Takashi Nagano	4. 巻 -
2. 論文標題 High-throughput preparation of improved single-cell Hi-C libraries using an automated liquid handling system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular 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) なし	査読の有無 無
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 永野 隆
2. 発表標題 クロマチンの高次構造ダイナミクスと複製周期
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 永野 隆（分担執筆）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 270
3. 書名 クロマチン解析実践プロトコール	

〔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			
英国	Babraham Institute	University of Birmingham		
フランス	Institut Curie			
ドイツ	EMBL			
米国	Florida State University			