

令和元年5月24日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15040

研究課題名(和文)クロマチン構造解析による心筋分化の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Identification of chromatin regulatory mechanism in heart development.

研究代表者

中村 正裕(Nakamura, Masahiro)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任研究員

研究者番号：40634449

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、ヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化各段階におけるクロマチン構造解析(オープンクロマチン領域の同定)及びシングルセル発現解析を行い、心筋分化を促進させる新規転写因子を同定し、また、新規転写因子が心筋細胞のクロマチン構造をどう変化させるのかを、少数細胞を用いたChIP-seq解析およびシングルセル発現解析を用いることによって明らかにすることを目的とした。申請者は、改良版ATAC-seqを用いて、ヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化各段階における、オープンクロマチン領域を同定した。各サンプル間の比較、差分を行い、各時期に特異的なオープンクロマチン領域を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロマチン構造は染色体上の様々な位置で開閉することにより転写因子と協調し、遺伝子発現を調節し、発生・分化段階における細胞の状態を制御しているが、ヒト心筋分化過程において各々のクロマチン構造がどのような順番で変化していくかは知られていなかった。申請者は、改良版ATAC-seqを用いて、ヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化各段階における、オープンクロマチン領域を1塩基レベルで同定したことにより、オープンクロマチン領域の経時的変化が明らかとなった。分化特異的オープンクロマチン解析では新規転写因子の同定に成功した。今後これら転写因子の心筋分化における役割の解明を目指す。

研究成果の概要(英文): In this study, we performed chromatin structural analysis (identification of open chromatin region) and single cell expression analysis at each stage of differentiation from human pluripotent stem cells to cardiomyocytes, and identified novel transcription factors that promote cardiac muscle differentiation. We aimed to clarify how novel transcription factors can change the chromatin structure of cardiomyocytes by using ChIP-seq analysis and single cell expression analysis using minority cells. The applicant has identified open chromatin regions at each stage of human pluripotent stem cell differentiation into cardiomyocytes using the modified ATAC-seq. Comparisons and differences between each sample were made to identify open chromatin regions specific to each period.

研究分野：エピゲノム生物学

キーワード：心筋 クロマチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

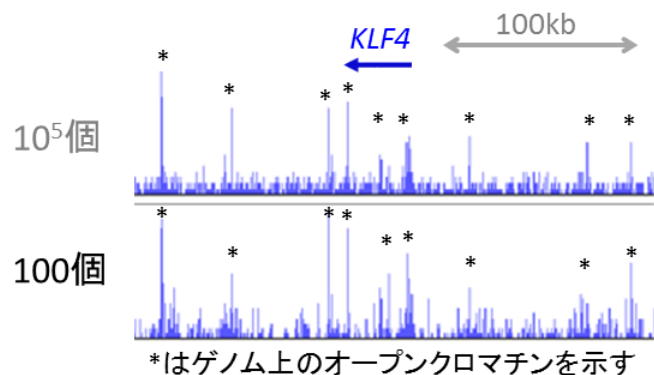
## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム上のクロマチン構造は、DNA に対する転写因子の接近しやすさを決めており、遺伝子発現制御の中心機構と考えられている。クロマチンリモデリング因子 (Brg1 や Baf60c, Wstf など) は、ノックアウトマウス解析から心筋の発達・分化に重要であることが報告され (Ho, L & Crabtree, G.R. et al, Nature(2010))、心筋分化におけるクロマチン構造は綿密に制御されていることが予想された。しかし実験的な細胞分化では細胞数が少なく、分化途中段階におけるクロマチン構造の理解は限られていた。クロマチン構造解析には DNase-seq、FAIRE-seq、ATAC-seq という手法があり、ゲノム上のオープンクロマチン領域を網羅的に同定可能である (図 1)。DNase-seq は DNase I の切断端をシーケンスするが実験工程が複雑で、再現が難しいとされる。FAIRE-seq はホルムアルデヒドによる架橋と超音波切断を行い、オープンクロマチン領域を含む DNA を抽出、シーケンスする。申請者らは、マウス細胞株の脂肪分化過程を題材として FAIRE-seq 解析を施行し、脂肪分化特異的オープンクロマチン領域を同定、同領域における転写因子結合モチーフ解析から、脂肪分化に関わる新規マスター転写因子 Nfia を発見した (Waki.T and Nakamura.M et al. PLoS Genetics 7(10): e1002311, 2011)。

## 図1. 網羅的クロマチン解析手法



100個からでも  
10<sup>5</sup>個と同等の  
クロマチン構造解析  
を実現した。



一方 ATAC-seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing) 法は、トランスポザーゼによる DNA 切断を行い、トランスポザーゼの結合部位によってオープンクロマチン領域を同定する手法である。DNase-seq や FAIRE-seq では 10<sup>6</sup> 以上の細胞数を必要とするのに対し、本手法は 10<sup>4</sup> 程度の細胞数で実験可能である。申請者は精製のプロセスと試薬を見直すことで ATAC-seq を改良し、100 細胞未満の細胞からの高品質なクロマチン構造解析系の立ち上げに成功した。

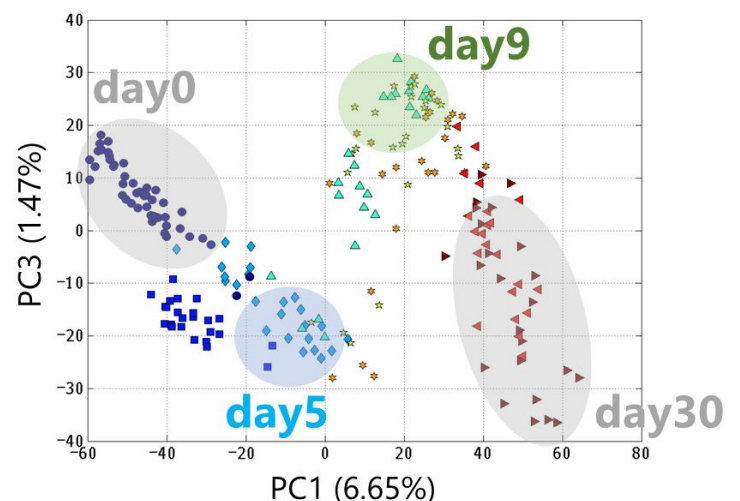
申請者は、ヒト多能性幹細胞から心筋細胞へと分化させる実験系におけるクロマチン構造の変化に興味を持った。クロマチン構造の変化が大きく起こる時期では、遺伝子発現の変化も大きいと考えられたため、まず心筋分化段階におけるシングルセル発現解析を行った。1 細胞ごとの発現状態にはばらつきがあり、分化細胞中における heterogeneity の存在が示唆された。細胞の並び替えを行うと、分化初期から中期 (Day5 Day9) に心筋特異的遺伝子の発現の上昇がみられ、主成分分析においても大きな軌跡の変化を認めた(図 2)。

そこで本研究では、今までは細胞数が少なく解析が困難であった、ヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化各段階、特に分化初期から中期におけるクロマチン構造解析を行い、各時期に特異的なオープンクロマチン領域を同定する。そこから転写因子結合モチーフ解析を用い、心筋分化を促進させる新規候補転写因子を同定していく。また、新規転写因子が心筋細胞のクロマチン構造やヒストン状態をどのように変化させるのかを、少数細胞を用いた ChIP-seq 解析およびシングルセル発現解析を用いることによって明らかにする。

## 2. 研究の目的

クロマチン構造は染色体上の様々な位置で開閉することにより転写因子と協調し、遺伝子発現を調節し、発生・分化段階における細胞の状態を制御しているが、ヒト心筋分化過程において各々のクロマチン構造がどのような順番で変化していくかは知られていない。申請者は、ヒト心筋分化過程におけるクロマチン構造の変化に興味を持ち、100 細胞程度の微量細胞

図2. 心筋分化におけるシングルセル発現解析  
(主成分分析。1つの点が1細胞を表す。)



数を用いたクロマチン構造解析法（改良版 ATAC-seq）を開発している。本研究では、今までは細胞数が少なく解析が困難であった、ヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化各段階におけるクロマチン構造解析（オープンクロマチン領域の同定）及びシングルセル発現解析を行い、心筋分化を促進させる新規転写因子を同定し、また、新規転写因子が心筋細胞のクロマチン構造をどう変化させうるのかを、少数細胞を用いた ChIP-seq 解析 およびシングルセル発現解析を用いることによって明らかにすることを目的とした。

### 3．研究の方法

#### (a)心筋分化におけるオープンクロマチン領域の同定（クロマチン構造解析）

ヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化各段階における、オープンクロマチン領域を改良版 ATAC-seq を用いて同定する。タイムポイントとして、シングルセル発現解析にて用いた分化前 (Day0)、分化初期 (Day5)、分化中期 (Day9)、分化後期 (Day30) を選択し、各時期に特異的なオープンクロマチン領域を同定する。

#### (b)心筋分化を促進させる新規転写因子の同定

(a)で同定したオープンクロマチン領域は、転写因子が結合しやすい領域であり、転写因子結合モチーフを多く含んでいる。そこで、申請者が脂肪分化細胞解析の際に用いた EM アルゴリズム (expectation-maximization algorithm) を利用し、新規転写因子モチーフを同定する。

#### (c)新規転写因子の心筋分化における役割の解明

(b)で同定した新規転写因子や、シングルセル解析で得られた候補転写因子について、心筋各分化段階における ChIP-seq を行い、新規転写因子がいつゲノム上のどの位置に結合するか同定し、オープンクロマチン領域とのオーバーラップを検証する。

また siRNA / 発現プラスミドを用い転写因子の発現を調節し、シングルセル発現解析を行い、分化度を比較する。

### 4．研究成果

申請者は、改良版 ATAC-seq を用いて、ヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化各段階における、オープンクロマチン領域を 1 塩基レベルで同定した。タイムポイントとしては、シングルセル発現解析にて用いた分化前(Day0)、分化初期 (Day5)、分化中期(Day9)、分化後期(Day30) を選択し、各サンプル間の比較、差分を行い、各時期に特異的なオープンクロマチン領域を同定することができた。また、シングルセル遺伝子発現解析を用いて、分化初期から中期 (Day5 Day9)に心筋特異的遺伝子の発現の上昇がみられ、主成分分析においても大きな軌跡の変化を認めることを示した。分化特異的オープンクロマチン解析では新規転写因子の同定に成功した。今後これら転写因子の心筋分化における役割の解明を目指す。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)(うち招待講演 0 件/うち国際学会 1 件)

Heterogeneity and its hierarchy of Prrx1-positive cells during limb development.

Cell Symposium: Single Cells: Technology to Biology (2019 年、国際学会)

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。