

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05556

研究課題名(和文)ヌクレオソーム動的制御における内部塩基配列の役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of internal DNA sequences in dynamic nucleosome regulation

研究代表者

加藤 太陽 (Kato, Hiroaki)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：40548418

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)：ヌクレオソームDNAの内部塩基配列がどのようにしてヌクレオソーム動的制御に関わるかを理解するためには、ヌクレオソーム配置を予測する信頼性の高いツールが必要です。このため我々は、nuCposというR/Bioconductorパッケージを開発し、様々な側面からこのツールを検証しました。MNase-seqに基づくツールに比べて、nuCposは高い精度でヌクレオソーム配置を予測します。詳細な調査は、ヌクレオソームのケミカルマップの高解像度がDNAのヒストンと接する面の認識に寄与することを示しました。このツールを使えば、自然配列および人工配列のヌクレオソーム形成への親和性を予測することができます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含む真核生物の染色体DNAは、ヒストンタンパク質にDNAが巻きついたヌクレオソームを基本単位として核の中に収納されています。ヌクレオソームの配置はエピジェネティクス制御に重要ですが、一見無秩序に並んでいるように見えるDNAの塩基配列が、ヌクレオソームの配置にどう寄与するのかわかっていません。本研究ではDNA配列からヌクレオソーム配置を予測するソフトウェアを開発しました。これは、DNA配列とヌクレオソーム配置の関係や、遺伝的多様性とエピジェネティクスの関係を、さらに詳細に理解するための手がかりになると期待されます。

研究成果の概要(英文)：In order to understand how nucleosomal DNA subsequences affect dynamic nucleosome regulation, we need to have a reliable tool for prediction of nucleosome positioning. In this study, we developed an R/Bioconductor package nuCpos for this purpose and studied the potential of this tool in various aspects. Compared to an MNase-seq-based tool, nuCpos predicts nucleosome positioning with high accuracy. Detailed analyses revealed that the high-resolution of chemical nucleosome maps accounts for appropriate recognition of histone-contact sides of DNA strings. With this tool, users can predict affinity of natural and artificial DNA sequences for nucleosome formation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：ヌクレオソーム エピジェネティクス DNA ヒストン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体 DNA は、ヒストン 8 量体に DNA が巻きついたヌクレオソームコア粒子と、コア粒子間をつなぐリンカーからなるヌクレオソームを基本単位として核の中に収められている。分裂酵母の転写ユニットの詳細な解析によると、転写開始点から下流方向に A (アデニン)、T (チミン)、G (グアニン)、C (シトシン) の 4 塩基の構成は周期性を示し、ヌクレオソーム配置を整える要因であることが示唆されていた。さらに、タンパク質をコードしない 5' 非翻訳領域に注目すると、センス鎖に特に T が多く明瞭な周期性を示していた。このことから、コドンの制限を受けない非コード領域においては特に塩基が最適化される傾向があると予想され、それを明らかにすることが、真核生物エピゲノム制御の本質的理解に繋がると予想された。

2. 研究の目的

一見無秩序に並んでいる DNA の塩基配列が、動的制御にどの程度寄与するのか、全く不明であった。本研究は、塩基構成の観点から細胞内におけるヌクレオソームの動的制御機構を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

DNA 配列の寄与を明らかにすることを目的として、隠れマルコフモデルに基づくヌクレオソーム配置予測ソフトウェアを構築した (nuCpos)。以前から、MNase-seq のデータを予測に適用する NuPoP というソフトウェアが存在していた。しかし、MNase-seq の解像度の低さが予測を妨げることが容易に想像されるにも関わらず、それ以上の改善がなされないままであった。本研究では、塩基対解像度で同定されたヌクレオソームマップ (ケミカルマップ) のデータを予測に適用し、NuPoP と比較しながら、nuCpos の予測精度の検証を行った。

ソフトウェアの構築にあたり、出芽酵母、分裂酵母、マウス ES 細胞で得られたケミカルマップについて、そのデータの性質を細かく検討した。その上で、ヌクレオソーム DNA の中心 (dyad) が 107 bp 以上離れた代表的ヌクレオソームからヌクレオソーム確率モデルを構築し、代表的ヌクレオソームでカバーされない領域からリンカーモデルを構築した。隠れマルコフモデルによるヌクレオソーム配置予測には NuPoP のアルゴリズムを借用した。ヌクレオソーム DNA の長さについて 147 bp を中心に様々な長さでの予測結果を検討した。

ゲノム座標上の解像度の低い MNase-seq で教育された NuPoP と、高解像度のケミカルマップで教育された nuCpos は、ヌクレオソーム配置の回転設定の予測力に大きな差を持つと予想された。予測ヌクレオソームと直近の細胞内ヌクレオソームの距離を計測し、それぞれのソフトウェアがどの程度確かに DNA の面を識別できるかを検討した。

A/T 嗜好性を持つ MNase-seq に基づく予測と、塩基嗜好性を持たないとされるケミカルマッピングに基づく予測を比べた場合、前者の予測は対象配列の A/T 含量に強く影響されると予想された。これを確かめるため、147 bp の配列のヒストンとの相性の指標である HBA に着目し、HBA スコアと A/T 含量の相関を調査した。

NuPoP では 147 bp を評価対象とする HBA のみがヌクレオソーム配置予測に利用されていたが、この 147 bp を互いに重複する 20-21 bp の断片に分け、それぞれの局所的な HBA (local HBA) を求めるアルゴリズムを構築した。部分配列のヒストンとの相性をスコアリングし、優れたヌクレオソーム形成能を持つ Widom 601 配列を対象に、スコアと文献的知見との照らし合わせを行った。

染色体 DNA の部分改変は、酵母細胞内でのヌクレオソーム配置に影響することがある。これらの変化が計算によって再現できるかどうかを検討した。また、DNA 変異によるヌクレオソーム配置変化と local HBA の関係を調査した。

4. 研究成果

新規に構築したヌクレオソーム配置予測ソフトウェア nuCpos を、R/Bioconductor パッケージとして公開した (<https://bioconductor.org/packages/nuCpos/>)。また、ソフトウェアの評価結果等を論文にまとめ、*BMC Bioinformatics* 誌に発表した。

ケミカルマップデータの調査の結果、出芽酵母と分裂酵母はゲノムサイズが比較的小さく、十分なシグナルノイズ比でヌクレオソームが検出されており、その頻度は 30 bp に 1 つ程度であった。一方、マウスは、シグナルノイズ比に基づく選抜を行うにはリード数が不十分で、わずか 3bp に 1 つの頻度でヌクレオソームが検出されてしまっていた。酵母とマウスのデータの質的な差は、それらを用いたヌクレオソーム配置予測に大きく影響した。予測に適したヌクレ

オソーム DNA の長さは 147 bp であり、5 bp 単位で延長や縮小すると、ヌクレオソーム配置の予測精度が低下した。

回転設定の予測力については、nuCpos の場合、予測ヌクレオソームから ± 1 bp に直近の細胞内ヌクレオソームが見つかり、それ以上離れても見つかるヌクレオソームの数がほとんど増加しなかった

(図 1)。この結果は、nuCpos が DNA とヒストンの接する面を正しく捉えることを示している。NuPoP の場合、予測ヌクレオソームからの距離の増加に応じて細胞内ヌクレオソームが増加する傾向が見られた。ゲノム座標上の解像度の低い MNase-seq では正しく dyad を同定することができず、そのヌクレオソームマップに基づいているために回転設定の予測が困難であると考えられる。この結果は、確率モデルによるヌクレオソーム配置予測のためには、用いるヌクレオソームマップのゲノム座標上の解像度が決め手になることを示している。

7つのヌクレオソームをもつ環状ミニ染色体を対象とした調査では、nuCpos は、DNA 複製起点以外に7つのヌクレオソームを予測した(図2)。複製因子の変異では複製起点がヌクレオソームで占有されることが知られているので、およそ予想の通りである。一方、NuPoP は期待される位置にヌクレオソームを予測しないばかりか、ヒストンと DNA の相性の指標である HBA が A/T 含量とミラーイメージになっており、MNase がもつ A/T 嗜好性から予想された通り、A/T 含量の影響を強く受けることが判明した。これに比べて nuCpos では予測結果と A/T 含量との明瞭な関係は認められなかった。この結果は、nuCpos がよりバイアスの少ない予測結果を提供することを示している。

147 bp のヌクレオソーム DNA を互いに重複する 13 のセグメントに分けて求めた local HBA は、Widom 601 の左側半分において、回転設定に応じて値が大きく変化した(図3)。DNA とヒストンの強い相互作用が認められる R3 エlement 付近でスコアが最大になった。一方、右側半分は、回転設定が変化しても local HBA の値が大きく変化せず、回転設定を決める要素に乏しいことが判明した。これらの知見は、これまでに試験管内の研究で示された報告と一致する。

nuCpos によるヌクレオソーム配置予測は、NuPoP によるものと比べて、酵母ゲノム全体にわたって高い精度が認められた。確率モデルはヒストン H4-S47C で同定されたケミカルマップから構築したが、H3-Q85C で同定されたヌクレオソームの配置もうまく予測した。これは、ヌクレオソーム配置における DNA 配列の寄与の大きさを物語っている。だとすれば、DNA 変異によってヌクレオソーム配置が狂うこともあり、さらにそれを予測することも可能ではないか。実際に酵母の細胞内では、DNA 配列の変化によってヌクレオソーム配置が変化する例が知られている。BAR1 遺伝子のプロモーターに配置されるヌクレオソームは、BAR1 の転写抑制に働く。この抑制的ヌクレオソームの中心に DNA を挿入した場合、配列によってはヌクレオソーム

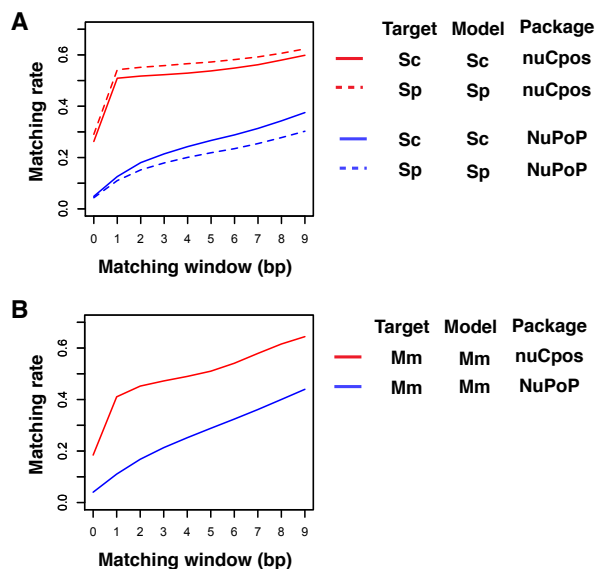


図 1 回転設定の予測力

酵母(A)とマウス(B)の結果を示す。標的ゲノム(Target)を対象に、それぞれの生物種のヌクレオソームマップに基づくモデル(Model)で予測を行った。

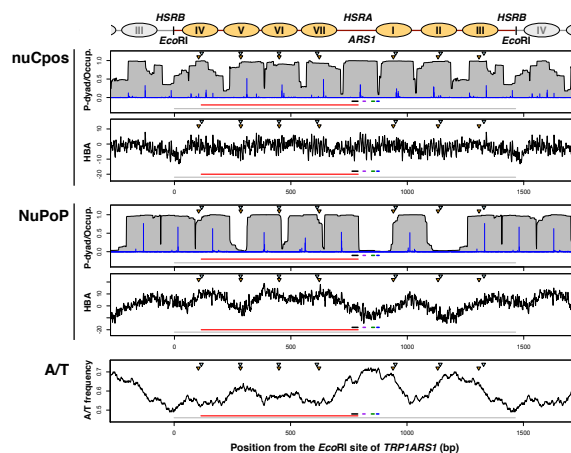


図 2 ヌクレオソーム配置予測結果とA/T含量の関係

TRP1ARS1環状ミニ染色体を対象とした予測結果。NuPoPで求めたHBAはA/T含量のミラーイメージになっている。

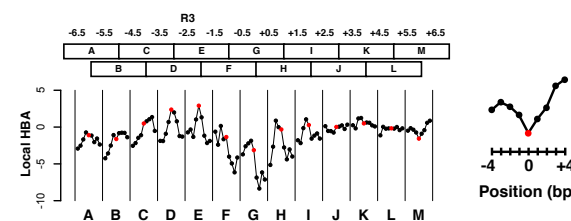


図 3 ヌクレオソーム部分配列を評価するための新指標

Widom 601を対象とした local HBA の算出。特に R3 エlement 付近において、試験管内での配置がスコアを最大化する。

ム配置が変化せず転写も誘導されない。しかし配列によっては、ヌクレオソーム形成が困難となり転写が誘導される。この変化を nuCpos で再現できるかどうか調査したところ、細胞内での知見をうまく説明する結果が得られた (図4)。

以上の結果を含めた様々な検討結果は、ケミカルマップに基づく確率モデルがヌクレオソーム配置予測に力を発揮することを示している (Kato et al. *BMC Bioinformatics* 2021)。本研究によって、DNA 配列とヒストンの相性を評価することができるようになり、塩基配列の観点から真核生物エピゲノム制御の本質に迫るためのツールを得ることができた。ただし、本研究の過程でケミカルマップが必ずしも完璧なものではなく、系特異的なバイアスを持つことが明らかとなってきた。得られた知見を改善に適用し、さらに予測力を高める必要があるだろう。

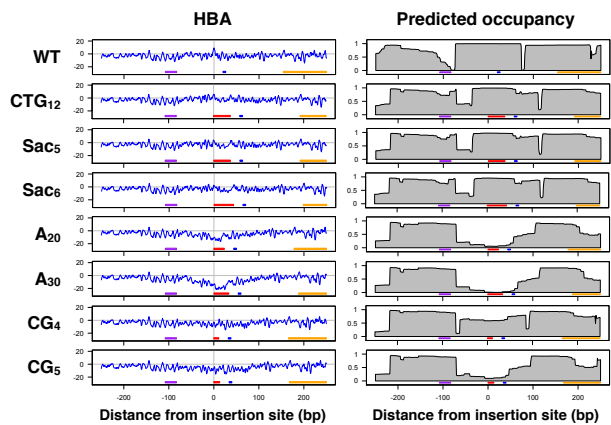


図4 DNA変異によるヌクレオソーム配置変化の予測
nuCposによる予測は、変異による細胞内配置変化を再現した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Chikashige Yuji, Kato Hiroaki, Thornton Mackenzie, Pepper Whitney, Hilgers Madelyn, Cecil Ariana, Asano Izumi, Yamada Haana, Mori Chie, Brunkow Cheyenne, Moravek Carter, Urano Takeshi, Singh Chingakham Ranjit, Asano Katsura	4. 巻 48
2. 論文標題 Gcn2 eIF2 kinase mediates combinatorial translational regulation through nucleotide motifs and uORFs in target mRNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8977 ~ 8992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa608	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
1. 著者名 Katsumata Koji, Ichikawa Yuichi, Fuse Tomohiro, Kurumizaka Hitoshi, Yanagida Akio, Urano Takeshi, Kato Hiroaki, Shimizu Mitsuhiro	4. 巻 556
2. 論文標題 Sequence-dependent nucleosome formation in trinucleotide repeats evaluated by in?vivo chemical mapping	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.155	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 清水光弘、加藤太陽	4. 巻 52(9)
2. 論文標題 ヌクレオソームポジショニングのゲノムワイド解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 503-507
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 -
1. 著者名 Kato Hiroaki, Shimizu Mitsuhiro, Urano Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Chemical map-based prediction of nucleosome positioning using the Bioconductor package nuCpos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12859-021-04240-2	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 Sorida Masato, Hirauchi Takahiro, Ishizaki Hiroaki, Kaito Wataru, Shimada Atsushi, Mori Chie, Chikashige Yuji, Hiraoka Yasushi, Suzuki Yutaka, Ohkawa Yasuyuki, Kato Hiroaki, Takahata Shinya, Murakami Yota	4. 巻 15
2. 論文標題 Regulation of ectopic heterochromatin-mediated epigenetic diversification by the JmjC family protein Epe1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008129	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 Okazaki Kosuke, Kato Hiroaki, Iida Tetsushi, Shinmyozu Kaori, Nakayama Jun-ichi, Murakami Yota, Urano Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 RNAi-dependent heterochromatin assembly in fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> requires heat-shock molecular chaperones Hsp90 and Mas5	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	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) 10.1186/s13072-018-0199-8	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 Kato Hiroaki, Okazaki Kosuke, Urano Takeshi	4. 巻 65
2. 論文標題 How does Hsp90 function in RNAi-dependent heterochromatin assembly?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 87 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-018-0866-0	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 Nariai Yuko, Kamino Hiroki, Obayashi Eiji, Kato Hiroaki, Sakashita Gyosuke, Sugiura Tomoko, Migita Kiyoshi, Koga Tomohiro, Kawakami Atsushi, Sakamoto Kazuma, Kadomatsu Kenji, Nakakido Makoto, Tsumoto Kouhei, Urano Takeshi	4. 巻 663
2. 論文標題 Generation and characterization of antagonistic anti-human interleukin (IL)-18 monoclonal antibodies with high affinity: Two types of monoclonal antibodies against full-length IL-18 and the neopeptide of inflammatory caspase-cleaved active IL-18	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 71 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2019.01.001	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 Nakayama Naomi, Sakashita Gyosuke, Nariai Yuko, Kato Hiroaki, Sinmyozu Kaori, Nakayama Jun-ichi, Kyo Satoru, Urano Takeshi, Nakayama Kentaro	4. 巻 9
2. 論文標題 Cancer-related transcription regulator protein NAC1 forms a protein complex with CARM1 for ovarian cancer progression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	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) 10.18632/oncotarget.25400	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 Masato Sorida, Takahiro Hirauchi, Hiroaki Ishizaki, Wataru Kaito, Atsushi Shimada, Chie Mori, Yuji Chikashige, Yasushi Hiraoka, Yutaka Suzuki, Yasuyuki Ohkawa, Hiroaki Kato, Shinya Takahata, Yota Murakami	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Regulation of ectopic heterochromatin-mediated epigenetic diversification by the JmjC family protein Epe1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plos Genetics	6. 最初と最後の頁 印刷中
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 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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 加藤太陽、清水光弘、浦野健
2. 発表標題 ケミカルマップに基づくヌクレオソームDNAの相性予測
3. 学会等名 第14回エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤太陽、浦野健
2. 発表標題 塩基構成から眺めるクロマチン
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶谷卓也、石井ひとみ、加藤太陽、木村宏、大川恭行、Damien Hermand、John Lis、村上洋太
2. 発表標題 RNA polymerase II高精度解析で迫る転写一時停止とヒストン修飾制御
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato H and Urano T
2. 発表標題 Training a dHMM with a chemical map improved accuracy of nucleosome positioning prediction in yeasts
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Epigenetics & Chromatin (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>島根大学医学部病態生化学ホームページ https://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/ リサーチマップ https://researchmap.jp/hrk_kato/?lang=japanese 島根大学教員情報検索システム https://www.staffsearch.shimane-u.ac.jp/kenkyu/search/e5084ae925c23e6c843da12a5eef8c35/detail?page=research 島根大学医学部病態生化学ホームページ https://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/ Researchmap https://researchmap.jp/hrk_kato/ 島根大学医学部病態生化学 http://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html</p>

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
研究分担者	浦野 健 (Urano Takeshi) (70293701)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	

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
---------	---------