

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03210

研究課題名（和文）静止期Bリンパ球の迅速的活性化の基盤となるエンハンサーアイランド形成機序の解明

研究課題名（英文）Elucidating the process of enhancer island formation during B cell activation

研究代表者

二村 圭祐（Nimura, Keisuke）

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00462713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現は非常に多くのタンパク質やRNAによって制御される。この多因子間で形成される複雑な相互作用を定量的に計測することは現在の技術では困難である。そこで、この多因子に渡る相互作用を定量的に測るための次世代シーケンシングを用いた新規な多因子間相互作用解析法を確立することを目指し研究を進めた。転写を制御する複数因子に対する抗体にDNAバーコードを付加し、ポリマー中でPCR反応を行った。このデータの解析から、多因子間にわたる相互作用を検出できることがわかった。このことから本法は新規な多因子間相互作用解析法として確立できることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果からDNAバーコードを付加した抗体とポリマーを用いて細胞を封入し、PCR反応を行うことで、多因子間の相互作用を次世代シーケンシングによって解析できる方法を開発するための基盤を構築することができた。本法を用いることで、微量なヒト組織検体などにおいてタンパク質間の相互作用が検出できるようになり、新たな組織検体の評価法になり得る。

研究成果の概要（英文）：A vast number of proteins and RNAs regulate gene expression. It is difficult with current technology to quantitatively measure the complex interactions formed among these multifactorial proteins and RNAs. Therefore, we aimed to establish a novel method for analyzing multifactorial interactions using next-generation sequencing to measure these multifactorial interactions quantitatively. PCR reactions ligated between DNA barcodes conjugated to antibodies against multiple factors that regulate transcription in polymers. Analysis of the data showed that this method could detect multifactorial interactions. This data suggests that this method can detect multifactor interactions.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：転写ユニティー 遺伝子発現 DNAバーコード

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティックな遺伝子発現制御は、正常な発生過程に極めて重要である。例えば、幹細胞を三胚葉に分化させることで未分化維持に必要な遺伝子の発現が抑制される。このような分化過程と比較して、B細胞がプラズマ細胞に最終分化する過程は独特であり、遺伝子発現の増減だけでなく、静止期細胞が細胞周期に入る時に全体の遺伝子発現を増加させる。このメカニズムは長らく不明であったが、最近我々はゲノム解析、超高解像度顕微鏡、1分子イメージングと in situ Hi-C を用いて静止期から増殖期へのB細胞のクロマチン構造変換機構を解明した。

この研究から、静止期B細胞の活性化過程において、クロマチンは3つの段階をへて脱凝集することを見出した。1、静止期B細胞においてクロマチンは核膜付近に存在するが、クロマチンのアセチル化に伴い核の内部へと移動する。2、Myc および ATP の増加によりヌクレオソームが脱凝集する。3、クロマチン間の結合が長距離から短距離へと移行する。このクロマチン構造変化によって、プロモーターとエンハンサー間の結合が促進される。これらの結果から、クロマチン構造の脱凝集が転写に与える影響、および、核のトポロジー構築における Myc の新規な機能を明らかにした (Molecular Cell 67, 566-578, 2017)。

クロマチン構造が脱凝集することで、全体的な遺伝子発現の増加を誘導することが明らかになったが、急速なクロマチン構造変換が可能なクロマチン構造を静止期B細胞がどのように形成しているのか、その機構は全く不明である。急速な活性化に対応できるクロマチン構造を静止期B細胞が形成できなければ、抗原に対し速やかに応答できない。このクロマチン構造は、複数のタンパク質が複雑に相互作用することで制御される。このような複雑なタンパク質間相互作用を解析する方法を開発することで、静止期B細胞が急速な活性化に対応できるクロマチン構造を形成するメカニズムを明らかにすることを目的に研究を開始した。

2. 研究の目的

これまで我々は、静止期から増殖期へのダイナミックなクロマチン構造転換を促進する詳細な分子メカニズムを明らかにしてきた。しかし、静止期B細胞の急速な活性化に対応するための特殊なクロマチン構造は不明である。

この問いに答えるために、我々が超高解像度顕微鏡を用いて見出した静止期状態B細胞特異的なエンハンサーアイランドの形成メカニズムを解明する。超高解像度顕微鏡は少数の蛍光物質を励起させることで、それぞれの蛍光物質の位置を光学顕微鏡の10倍の分解能で観察できる。この顕微鏡を用いた実験の結果、静止期B細胞は非常に凝集したヌクレオソーム構造をもち、核膜付近にクロマチンが凝集した構造を持つことがわかった。一方、増殖期B細胞は弛緩したヌクレオソーム構造で全体的にクロマチンが広がっていた。エンハンサーのマーカの1つである、ヒストンH3の27番目のリジン(H3K27)のアセチル化を認識する抗体を用いてB細胞核を超高解像度顕微鏡で観察したところ、静止期B細胞はH3K27アセチル化が凝集した塊を形成していることを見出した。一方、活性化に伴ってH3K27アセチル化シグナルは核全体に分散した。

H3K27アセチル化のChIPseqを行ったところ、静止期状態のクロマチンで元々H3K27アセチル化されている領域が活性化に伴ってH3K27アセチル化量が増加していた。また、ヒストン脱アセチル化阻害剤を静止期B細胞の投与により、ヒストンのアセチル化を亢進させても、エンハンサーアイランドの構造は維持されていた。

H3K27アセチル化活性を持つp300のChIPseqを行ったところ、ゲノムワイドな結合領域は、静止期と増殖期で変化しなかった。このことから、活性化時に必要となるエンハンサー領域がすでに静止期クロマチンにおいても低レベルでH3K27アセチル化されており、そのエンハンサー領域が転写を活性化しないようにエンハンサー領域を核内で凝集させたエンハンサーアイランドを形成しているという仮説が考えられた。

3. 研究の方法

我々のこれまでの研究から、静止期B細胞は核内に島状に局在するH3K27アセチル化でマークされるエンハンサーアイランドを形成し、B細胞の活性化に伴って消失するという予備的な結果を得た。さらに、エンハンサーアイランドはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によりヒストン全体のアセチル化を亢進させることで、クロマチンを分散させても、エンハンサーアイランドは維持されたことから、エンハンサーアイランドを能動的に形成している分子メカニズムの存在が示唆された。

このようなクロマチン構造は多数のタンパク質が複雑に相互作用することで制御される。これまでに次世代シーケンシングを用いたクロマチン高次構造解析法やChIPseq法、ATACseq法など様々な方法が開発され、クロマチン構造を制御するメカニズムの解明が進められてきた。しかし、既存の方法では、クロマチンに複雑に相互作用するタンパク質が形成するネットワークを同定することはできない。そこで、本研究において、複数のタンパク質が核内で多因子間に渡る相互作用を解析する方法の開発を行う。そのために、独自に設計したDNAバーコードを付加した抗体を作成し、スライドガラス上に播種した細胞に作用させる。DNAバーコード抗体で標識した細胞

胞をポリマー中に埋め込み、スライドガラスのまま PCR を行う。この方法を開発することで、複数のタンパク質によるクロマチン構造制御のメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

複数のタンパク質が形成する相互作用ネットワークを解析する方法の開発を行った。最近、細胞内での RNA の位置を PCR によって検出し、顕微鏡で撮像したようなデータを作成できることが報告された (Weinstein et al. Cell 2019)。この系を応用することで、タンパク質間の相互作用ネットワークを検出できるのではないかと考えた。まず、DNA バーコードの設計を行った。抗体分子を識別するバーコード Unique Molecular Index (UMI) を NNNNNNNWWSNNNNNNNNNS として設計した。この UMI は 340 億以上のバリエーションを持つことができる。さらに、それぞれの抗体を識別するための Antibody index を 4-6 塩基のバーコードとして配置した。3' 側にはポリマーに連結した DNA オリゴと相同的な配列を配置した。この抗体バーコードを 2 種類作成した。次にポリマーに連結させる DNA オリゴの設計を行った。このポリマー連結オリゴによって、空間的に PCR 反応を区別する。そのためにポリマー連結オリゴにバーコード配列 Unique Event Index (UEI) を付加した。UEI の配列は NNNNNATNNNNN とした。このポリマー連結オリゴを Target1 の抗体結合オリゴ、または Target2 の抗体結合オリゴと結合するように 2 種類合成した。ポリマーは 2 種類のを混合し形成させる。その一方に SH 基を持ったものを用いた。オリゴの 5' 末端をアクリタイド修飾することで、SH 基と共有結合させ、ポリマーに固定することが可能になる。

次に、PCR を行う系の検討を行った。当初 PCR チューブ中で PCR 反応を行ったが、顕微鏡で観察しづらいことや、手作業で PCR チューブに細工をする操作が煩雑であった。そこで、スライドガラスに細胞を播種することにした。このスライドガラスにシール状の枠組みを添付して、細胞を播種し、ポリマーで細胞を封入した。しかし、このシールの枠組みの周囲に抗体液が残存し、非特異的なシグナルを生じる原因となることがわかった。そこで、次に、テフロン加工したスライドガラスを用いてみた。テフロン加工してあることで、細胞をポリマーに封入しやすくなった。そこでスライドガラスをそのまま PCR できる機械によって、PCR 反応を行うことにした。

次に PCR 反応の検討を行った。この PCR 反応は 3 段階で形成される。まず、1 段階目の PCR 反応によって、抗体結合オリゴとそれぞれに対応するポリマー結合オリゴの間で PCR 反応をして、抗体結合オリゴに位置情報を付与する。2 段階目の PCR 反応の過程において、1 つのポリマー結合オリゴを複数の抗体結合オリゴとの間で PCR 反応を行うことで、1 つのポリマー結合オリゴの周囲に存在する抗体情報が取得可能になる。3 段階目の PCR 反応によって、抗体オリゴとポリマーオリゴが連結した Target1 と Target2 のそれぞれを連結させる。これによって、抗体間での結合をネットワーク化することが可能になる。DNA をポリマーから回収し、精製した後に、シークエンシング用のアダプター配列を付加し、ライブラリーを構築した。

このライブラリーを次世代シークエンシングによって解析し、データを解析するパイプラインを構築した。初めに Trim_galore を用いて、read のクオリティーコントロールを行い、質の低い配列を削除した。次に、flash2 を用いてペアードエンドの配列を結合し、1 本の DNA 配列情報に変換した。この配列から Umi_tools を用いて必要な UMI、UEI、抗体に関するバーコード情報を抽出した。このデータを整形し、正しい抗体インデックスを持っている read を抽出した。データを整形した後に、R の igraph パッケージを用いてグラフ構造の解析を行った。

この解析を静止期 B 細胞と活性化 6 時間、24 時間、48 時間で行った。抗体には RNA ポリメラーゼ II、Myc、p300、CTCF、HDAC1 などのクロマチンを制御する因子、ヒストン H3 の 4 番目のリジンのメチル化 (H3K4me1、H3K4me3)、27 番目のリジンのアセチル化 (H3K27ac)、メチル化 (H3K27me3)、転写終結を制御する CPSF73、転写メディエーター Med26 などを用いた。

このデータを解析すると、データは UEI をノードし、それぞれの UEI 間の相互作用を主鎖とし、各 UEI に複数の抗体結合情報が付与された構造を取ることがわかった。転写の活性化状態のマーカーとして知られている H3K27ac について解析したところ、活性化に伴って、1 つの UEI に結合する H3K27ac 抗体数が徐々に増加していくことがわかった。この結果、B 細胞の活性化過程において H3K27ac が増加していくという ChIPseq やウエスタンブロット法などの解析の結果と合致する。

さらに B 細胞は活性化に伴ってほぼ全ての遺伝子の転写が 10 倍程度に増加し、タンパク質量も顕著に増加する。そこで、本データからタンパク質量が増加することに伴って、ネットワークの濃度が増加することを検出できるか検討した。ネットワーク濃度は、理論的に形成可能なノードの繋がりを母数とし、実際に検出できたノードの繋がりを子数とすることで求めた。その結果、B 細胞の活性化に伴って、ネットワーク濃度が増加していくことを検出できた。これらのことから本法は、核内での複数タンパク質によって形成される複雑な相互作用をネットワークとして検出できることが示唆された。

次に、ネットワークを図示することを試みた。この解析の過程で、UEI のバーコード集団内でバリエーションが不足し、重複が生じている可能性が示唆された。そこで、この重複をデータから排除するためにオリゴを再設計した。ランダム配列を延長した結果、PCR が設計どおりに反応しないことが示唆されたので、PCR の温度条件、酵素などを再検討した。現在、この改善したプロトコルでデータの再取得を行っている。

本研究から、核内で生じる複雑なタンパク質の相互作用で形成されるネットワークを DNA バ

ーコード付加抗体とポリマー結合バーコード DNA を組み合わせることで、検出できることが示唆された。今後さらにこのプロトコルの開発を進めることで、本法を完成させる。この方法を用いて B 細胞の活性化過程におけるクロマチン高次構造変換を制御する分子ネットワークを明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kawamura Norihiko, Nimura Keisuke, Saga Kotaro, Ishibashi Airi, Kitamura Koji, Nagano Hiromichi, Yoshikawa Yusuke, Ishida Kyoso, Nonomura Norio, Arisawa Mitsuhiro, Luo Jun, Kaneda Yasufumi	4. 巻 79
2. 論文標題 SF3B2-Mediated RNA Splicing Drives Human Prostate Cancer Progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5204 ~ 5217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-3965	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 Saga Kotaro, Park Jinhee, Nimura Keisuke, Kawamura Norihiko, Ishibashi Airi, Nonomura Norio, Kaneda Yasufumi	4. 巻 38
2. 論文標題 NANOG helps cancer cells escape NK cell attack by downregulating ICAM1 during tumorigenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental and Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-019-1429-z	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 Yoshikawa Yusuke, Ishibashi Airi, Murai Kenichi, Kaneda Yasufumi, Nimura Keisuke, Arisawa Mitsuhiro	4. 巻 60
2. 論文標題 Design and synthesis of a phenyl C-glycoside derivative of Spliceostatin A and its biological evaluation toward prostate cancer treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 151313 ~ 151313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2019.151313	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 Yoshikawa Yusuke, Ishibashi Airi, Takehara Tsunayoshi, Suzuki Takeyuki, Murai Kenichi, Kaneda Yasufumi, Nimura Keisuke, Arisawa Mitsuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Design and Synthesis of 1,2-Deoxy-pyranose Derivatives of Spliceostatin A toward Prostate Cancer Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1310 ~ 1315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.0c00153	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 Ishibashi A, Saga K, Hisatomi Y, Li Y, Kaneda Y, Nimura K	4. 巻 10
2. 論文標題 A simple method using CRISPR-Cas9 to knock-out genes in murine cancerous cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79303-0.	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 Kitamura Koji, Nimura Keisuke, Ito Rie, Saga Kotaro, Inohara Hidenori, Kaneda Yasufumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of HPV16 E7 expression in head and neck carcinoma cell lines and clinical specimens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78345-8	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 Ito Rie, Kitamura Koji, Inohara Hidenori, Yusa Kosuke, Kaneda Yasufumi, Nimura Keisuke	4. 巻 2
2. 論文標題 Peroxisomal Membrane Protein PMP34 Is Involved in the Human Papillomavirus Infection Pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Virology	6. 最初と最後の頁 870922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fviro.2022.870922	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 Kitamura Koji, Suzuki Hidefumi, Abe Ryota, Inohara Hidenori, Kaneda Yasufumi, Takahashi Hidehisa, Nimura Keisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Dual function of SF3B2 on chromatin and RNA to regulate transcription in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell & Bioscience	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13578-022-00812-8	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 Sumitani Naoki, Ishida Kyoso, Sawada Kenjiro, Kimura Tadashi, Kaneda Yasufumi, Nimura Keisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Identification of Malignant Cell Populations Associated with Poor Prognosis in High-Grade Serous Ovarian Cancer Using Single-Cell RNA Sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3580 ~ 3580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14153580	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 Wataya-Kaneda Mari, Watanabe Yoshiyuki, Nakamura Ayumi, Yamamoto Kouji, Okada Kiyoshi, Maeda Shinichiro, Nimura Keisuke, Saga Kotaro, Katayama Ichiro	4. 巻 88
2. 論文標題 Pilot study for the treatment of cutaneous neurofibromas in neurofibromatosis type 1 patients using topical sirolimus gel	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Academy of Dermatology	6. 最初と最後の頁 877 ~ 880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaad.2022.08.066	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 Umeki Yuka, Ogawa Noriaki, Uegaki Yuko, Saga Kotaro, Kaneda Yasufumi, Nimura Keisuke	4. 巻 80
2. 論文標題 DNA barcoding and gene expression recording reveal the presence of cancer cells with unique properties during tumor progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-022-04640-4	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 Hirabayashi Satoru, Li Yue, Ohta Noriko, Ishibashi Airi, Yoshikawa Yusuke, Lin Bangzhong, Fumimoto Megumi, Takehara Tsunayoshi, Nunomura Kazuto, Suzuki Takeyuki, Haruta Junichi, Nimura Keisuke, Arisawa Mitsuhiro	4. 巻 114
2. 論文標題 Design and synthesis of ether derivatives of spliceostatin A and their biological evaluation towards prostate cancer treatment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 154288 ~ 154288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2022.154288	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 -

〔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 二村圭祐
2. 発表標題 多因子間相互作用による遺伝子発現制御機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 生体試料中の多因子間相互作用を同定する方法およびキット	発明者 二村圭祐	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-068519	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------