

研究終了報告書

「組織特異的ゲノム構造の再構築技術の開発」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：原田 哲仁

1. 研究のねらい

人体を構成する細胞は200種類以上存在し、それぞれ異なる遺伝子発現様式によって固有の細胞機能を発揮し組織形成する。このような、多彩な細胞それぞれが固有の細胞機能を獲得するために、同一のゲノムから必要な遺伝情報を得る機序が存在する(エピジェネティクス)。解析技術の発達により、組織単位で固有に発現する遺伝子の制御機構が明らかとなり iPS 細胞へのリプログラミングや異種細胞へのダイレクトプログラミングが可能となった。その基盤となったのが、細胞あるいは組織特異的な転写因子の同定である。一方で、これらの転換過程においてエラー(がん化、分化不全)が発生しており、我々は未だ“ゲノムがどのように使われているのか?”という、その操作方法を見いだせていない。転写因子によるダイレクトプログラミングの不正確性は、機能するゲノム構造が未だ不明な点にある。このゲノム構造を明らかにするためには、ゲノム上で形成されるヒストン修飾や転写因子などの結合状態(クロマチン構造)の変化を正確に解析する必要がある。そのためには、ゲノム上で形成されるクロマチン構造を単一細胞でスナップショットとして捉え、これを包括的に解析する技術の開発とその取得が必要である。これにより、ゲノム機能に必要なクロマチン構造の同定が期待される。また、ゲノム合成に向けて単一細胞解析によりそれらの因子のゲノム上での結合状態をスナップショットで抽出することが出来れば、これらの因子によってゲノム合成を達成するための転写因子等の制御因子群から形成される複合体の形成順の解明も期待できる。本研究提案では、転写因子が機能し、細胞機能をエラーなく発現させることが可能な組織特異性を形作るゲノム構造の解明から、制御因子の同定を、単一細胞エピゲノム解析の導入による解析から、組織特異的遺伝子発現を操作する技術基盤の構築を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では組織特異的転写因子の同定と、その機能に必要なゲノム高次構造を包括的に同定し、再構築までをシームレスに行う新たなゲノム高次構造制御技術の開発を試みた。転写因子によるダイレクトプログラミングの不正確性は、機能するゲノム構造が未だ不明な点にある。このゲノム構造を明らかにするためには、幹細胞等の生体内で不均一な状態で存在する少数細胞を単一細胞レベルで包括的に解析する技術を開発する必要がある。そこで研究代表者らが開発した少数細胞エピゲノム解析技術 ChIL-seq を数千細胞単位で単一細胞解析できる scChIL-seq の開発を進め、開発した方法について特許申請を行った(特願 2020-17027)。また、同一サンプル内の2種類以上のエピゲノム情報を同時に取得する multi-target ChIL-seq (mtChIL-seq)の開発を進め、ChIL-seq の詳細なプロトコルと共に論文発表を行った(Handa et al, Nat Protoc, 2020)。この際、派生技術として、ChIL 法を用いて特異的な領域に対するターゲットタンパク質の局在を評価する ChIL qPCR 法を構築した(Sakamoto et al, Nat Commun.

2020)。次に、mtChIL-seq をもとにした単一細胞解析 single cell mtChIL-seq (scmtChIL-seq) による骨格筋分化における組織特異性を規定するゲノム構造の獲得を進めることとした。各細胞の転写活性化状態を RNA Polymerase II によって可視化し、ゲノム構造情報としてヒストン修飾およびヒストンバリエーションのエピゲノム情報を取得した。転写活性化状態を指標に骨格筋分化方向に並べ替えた疑似時間をもとに、骨格筋分化における遺伝子へのヒストン修飾およびヒストンバリエーションの結合パターンを抽出した。次に、抽出した遺伝子上での異なるゲノム構造を規定する制御因子の同定を試みた。はじめに、骨格筋分化におけるマスター転写因子として知られる MyoD に着目した。MyoD の scmtChIL-seq 解析から、MyoD のゲノムへの結合位置は分化過程で時期特異的に変化することが明らかとなった。その他の制御因子の scmtChIL-seq 解析も順次進めている。また、組織特異的なゲノム構造の再構築に向けて、エピゲノム阻害剤による骨格筋分化を制御する因子の探索を進めた。これまでに複数種類の候補因子をスクリーニングしており、scmtChIL-seq 解析の結果とともに、今後、組織特異的なクロマチン構造の形成を誘導する技術開発を進める。

(2) 詳細

(i) 組織特異性を規定するゲノム構造の獲得

数千細胞から単一細胞のエピゲノム情報を取得するために、combinatorial indexing 法を用いた ChIL-seq のハイスループット化 (scChIL-seq) を進めた。scChIL-seq の combinatorial indexing 法では、プレート上でホルマリン固定された数千細胞程度が含まれるウェル内で、細胞バーコードが付加された ChIL probe を用いて

標的タンパク質のゲノム結合領域に ChIL DNA を挿入する。この細胞を一度プレート上から遊離後にプールし、再び細胞を分割し、各ウェルに入れる。次に、*in situ* transcription 後、PCR により 2 つ目のバーコードを付与する。これを 96well plate を用いて実行するために、固有の細胞バーコードを持つ 96 種類の ChIL probe を作製した。この際、オリジナルの ChIL probe の DNA 長は 70bp であるのに対し、scChIL-seq 用の ChIL probe の DNA 長は 80bp と 10bp ほど長い。そこで、scChIL-seq 用の ChIL probe とオリジナルの ChIL probe を用いた場合で ChIL-seq の検出感度に差が無いか 1,000 細胞を用いた ChIL-seq を行い Max Jaccard (NCB, 2019) の指標をもとに評価した。その結果、scChIL-seq 用の ChIL probe での ChIL-seq はオリジナルの ChIL probe を用いた場合と同等であった。次に、ChIL DNA を挿入した細胞をプレート上から遊離しやすくするために、化合物処理した細胞をプレートに結合させ、ChIL 反応を行った後、遊離させ、再び細胞を分割し RNA 精製およびライブラリを作製するプロトコルを開発した。パイロット実験として、マウス SP2ミエローマ細胞を用いて scChIL-seq を行った。96ウェルプレートに化学処理した細胞を 5,000–10,000 細胞ずつウェルに添加し ChIL 反応を行った。1 次抗体反応後、各ウェルに 96 種類の異なるバーコード配列を持つ ChIL probe を用いて ChIL 反応を行い、遊離させた細胞を集め 25 細胞ずつ 96 ウェルプレートに分注し RNA 増幅およびライブラリ

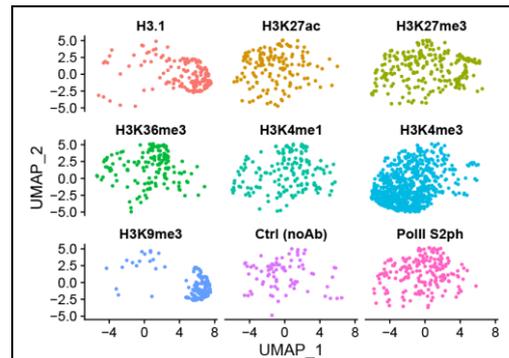


図 1. ヒストン修飾抗体を用いたハイスループット ChIL の解析例。

作製を行った。これを次世代シーケンスにより解析することで、1回の解析で2,400細胞の単一細胞エピゲノム解析が期待できる。ヒストン修飾抗体やリン酸化RNAポリメラーゼIIを用いたハイスループットChIL-seqデータを次元削減手法によるクラスタリングした結果を図1に示す。この結果から、用いた抗体に依存して得られたゲノム領域が細胞ごとに異なることがわかった。特に転写活性な遺伝子の転写開始点に存在するH3K4me3と転写不活性な領域に存在するH3K9me3では、細胞の分布が排他的になっており、これまで知られているゲノムの分布と一致していた。本手法により2,400細胞の単一細胞エピゲノム解析を1セットとした解析系を構築し、特許として出願した(特願2020-17027)。

また、同一サンプル内の2種類以上のエピゲノム情報を同時に取得するmulti-target ChIL-seq (mtChIL-seq)の開発も進めた。本手法では、2種類の一次抗体に特異的に結合するChIL probeのDNA配列内の異なるバーコードをシーケンス解析時に識別することで、2種類のターゲットタンパク質のゲノム上の局在を同定する。本手法はChIL-seqの詳細なプロトコルと共に論文発表を行った(Handa et al, Nat Protoc, 2020)。さらに、ChIL法を用いて特異的な領域に対するターゲットタンパク質の局在を評価するChIL qPCR法を構築した(Sakamoto et al, Nat Commun. 2020)。

次に、mtChIL-seqによる単一細胞解析(scmtChIL-seq)を進めることとした。対象とする細胞はNIH3T3にMyoDを導入し骨格筋分化を誘導するtrans-differentiationの系を用いた。本モデル系は低血清培地交換による分化誘導により骨格筋遺伝子を誘導するものの、分化後期の細胞融合は起こらない。したがって、trans-differentiationにおける時間依存的なクロマチン構造の解析を細胞の形態変化に影響を受けず解析することが可能である。ここで、確度の高い分化状態に依存したゲノム構造情報を取得するために、分化度に対応して細胞を並べ替えて解析することを考えた。細胞の転写状態の情報はRNA Polymerase IIの結合により評価することとした。ChIL-seqによりRNA Polymerase IIが転写状態を反映しているか評価するために、骨格筋再生のモデル系を用いて検証した。骨格筋再生では筋損傷刺激により免疫細胞の浸潤に続いて骨格筋幹細胞の分化が起こる。組織切片を用いたChIL-seq解析から、RNA Polymerase IIの結合状態は細胞内の転写産物を解析するRNA-seq解析と同様に遺伝子の活性化状態を反映することを確かめた(Maehara et al, Mol Syst Biol, 2021)。また、RNA Polymerase IIの遺伝子中の移動度を解析することで細胞集団の大きさに依存せず、組織中の細胞の転写活性化状態の評価が可能となった。scmtChIL-seq解析ではRNA Polymerase IIと組織特異的なゲノム構造としてヒストン修飾(H3K4me3, H3K27me3, H3K27ac)やヒストンバリエーション(H3.3)のゲノム位置情報を取得することとした。ドキシサイクリン誘導によりMyoDを発現するNIH3T3細胞を用いて、MyoD誘導前(Dox-)、MyoD誘導24時間後(Dox+)、分化誘導24時間後(D24)、分化誘導後72時間(D72)の4状態の細胞を準備した。各抗体の組み合わせとタイムコースに対して、それぞれ2,400細胞のデータの取得を想定しシーケンスを行った。このうち、各条件で理論的に正しいindexの組み合わせを持つ細胞は1,500-2,000細胞で、そのrecovery rateは60-80%であった。これらの細胞のうちRNA Polymerase IIのリードが1,000以下の細胞を、H3K4me3、H3K27me3、H3K27acのリードが3,000以下の細胞を、H3.3のリードが500以下の細胞を除外し解析を進めた。はじめに、RNA Polymerase IIとH3K4me3の組み合わせを例に、trans-differentiationの間に転写活性化状態とエピゲノム状態の変化が捉えられているか解析した。この結果、MyoDの誘導前Dox(-)からD72の細胞状態の変化を捉

えられていることを確認した。この結果は、H3K27me3、H3K27ac、H3.3 でも確認された。次に、遺伝子への RNA Polymerase II の結合量を指標とした疑似時間解析により、分化度に応じて細胞を並びかえた。最終的に、H3K4me3、H3K27me3、H3K27ac、H3.3 の疑似時間における遺伝子への局在のタイミングによりグループ分けを行った。

(ii) 組織特異的なゲノム構造を規定する制御因子の同定

(i) で得られる特徴的なゲノム構造を制御する因子を網羅的に同定するスクリーニング法の検討を進めた。はじめに、候補制御因子に対する sgRNA ライブラリを作製し CRISPR-Cas9 ランダムノックインタグ法による検討を行った。CRISPR-Cas9 ノックインタグ法の一つである VIKING 法(Sawatsubashi et al, Scientific Reports, 2018)を用いて転写因子等のタンパク質へのノックインタグ導入の系の構築を試みたが、VIKING 法ではノックインタグの導入細胞が得られなかった。また、VIKING 法から PITCh 法(Sakuma et al, Nat Protoc, 2016)に変更し、アームを付加させた系での検証も行ったが、標的内在性タンパク質の C 末端に目的のタグが挿入されたタンパク質の発現が確認できなかった。また、解析には ChIL 法を用いた網羅的な内在性タンパク質のエピゲノム解析とどの遺伝子にノックインされているか評価するための RNA-seq 解析を組み合わせた ChIL-2.0 を立案しプロトコルを開発しシーケンス解析を行ったが、RNA 側のリード数が高深度解析に耐えられず、*in situ* RNA-seq 解析に限界があったため、scmtChIL-seq でのデータの取得を進めた。

制御因子として、まず MyoD と RNA Polymerase II の scmtChIL-seq 解析を行った。次に、抽出した遺伝子上での異なるゲノム構造を規定する制御因子の同定を試みた。はじめに、骨格筋分化におけるマスター転写因子である MyoD に着目した。MyoD の scmtChIL-seq 解析から、MyoD のゲノムへの結合位置は分化過程で時期特異的に変化することが明らかとなった。また、その他にも特徴的なクロマチン構造を可視化することが出来た。今後これらの特徴づけをさらに進めていく必要がある。

(iii) 組織特異的なゲノム構造の再構築

組織特異的なゲノム構造の再構築に向けて、エピゲノム阻害剤による骨格筋分化を制御する因子の探索を進めた。マウス骨格筋芽細胞は骨格筋の分化能を有しながら増殖し、分化刺激により骨格筋細胞へと分化する。したがって、すでに骨格筋分化における組織特異的なゲノム構造を有していると考えられる。スクリーニングは、増殖中のマウス骨格筋芽細胞に小分子化合物を添加し、24 時間後の分化刺激により分化状態の変化を評価した。この際、細胞増殖に影響する化合物は除外した。その結果、101 の小分子化合物のうち、17 種類が分化を促進し、25 種類が分化を抑制した。scmtChIL-seq 解析の結果とともに、今後、組織特異的なクロマチン構造の形成を誘導する技術開発を進める。

3. 今後の展開

本研究成果より、組織特異的な遺伝子発現に寄与するゲノム構造を取得し分類する解析基盤の構築に成功した。実際に細胞に因子を導入し組織特異的なゲノム構造を誘導するためには、細胞への因子の導入ストレスを抑制するために、最小限の因子に絞ることと、導入方法の検討が必要となる。前者は、取得したデータをもとに必要十分な因子の選定を進めることで達

成できると考えている。例えば、阻害剤やゲノム編集による *perturbation* の系を用いて因子を絞ることが挙げられる。後者については、本ゲノム合成領域で開発される細胞への導入法を利用することで達成できると考えている。また、本技術はモデルとした骨格筋分化系以外にも、様々な分化系で利用できることが強みであると考えており、本技術の普及にも尽力していきたい。

4. 自己評価

本研究提案では、組織特異的遺伝子発現を操作する技術基盤の構築のために、組織特異的な遺伝子発現を可視化するための単一細胞解析技術の開発とそれを用いたデータの取得を目的とした。そのために(1)組織特異性を規定するゲノム構造の獲得、(2)組織特異的なゲノム構造を規定する制御因子の同定、(3)組織特異的なゲノム構造の再構築の3つの課題に対してアプローチした。単一細胞解析技術の開発についてはChIL-seqの単一細胞解析のハイスループット化を進め、最終的に2種類のエピゲノム情報を単一細胞解析するscmtChIL-seqを開発した。これをもとに(1)組織特異性を規定するゲノム構造の獲得、(2)組織特異的なゲノム構造を規定する制御因子の同定にアプローチ出来たと考えている。(2)に関しては、当初予定のノックインタグ導入による網羅的な制御因子の開発を予定していたが系の構築に難航した。また、本解析にトランスクリプトームとエピゲノムを同時に単一細胞で取得する技術を立案していたが、取得データの深度が本研究目的に足りなかった。しかしながら、この難航により当初予定していなかった、RNA Polymerase IIによる転写活性化状態の可視化と疑似時間解析を用いたエピゲノムダイナミクスの解析手法の考案につながった。このような解析は世界的にも例がなく、時間軸を伴う単一細胞エピゲノム解析技術の標準的な手法となることが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 12件

†: co-first authors

1. †Tetsuya Handa, †Akihito Harada, †Kazumitsu Maehara, Shoko Sato, Masaru Nakao, Naoki Goto, Hitoshi Kurumizaka, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura.

Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input.

Nat Protoc. 2020 Oct;15(10):3334-3360.

従来のChIL-seqでは1度の解析で単一のヒストン修飾あるいは転写因子の結合情報のみしか解析できなかったが、本論文では、様々なエピゲノム情報を同時に取得可能な発展型技術mtChIL (multi-target ChIL)の開発に成功した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1件(特許公開前のものも含む)

1	発 明 者	大川恭行、原田哲仁
	発 明 の 名 称	対象核酸の塩基配列を1細胞レベルで並列に検出する方法
	出 願 人	国立大学法人九州大学
	出 願 日	2020/02/04

出願番号	特願 2020-17027
概要	細胞を高効率に識別するための ChIL probe に対するバーコード配列の組み合わせ法を工夫した ChIL-seq により、数千細胞の単一細胞エピゲノム解析法を開発した。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 原田 哲仁, 前原 一満, 半田 哲也, 木村 宏 , 大川恭行
ChIL 法による単一細胞エピゲノムプロファイリング
第 43 回日本分子生物学会 オンライン発表 2020 年 12 月 4 日
2. 原田 哲仁, 藤井 健, 前原 一満, 田中 かおり, 木村 宏, 大川 恭行
ChIL 法による単一細胞マルチオミクスプロファイリング
第 44 回日本分子生物学会 オンライン発表 2021 年 12 月 1 日
3. 原田哲仁
単一細胞エピゲノム解析によるゲノム動作原理の理解
第 15 回日本エピジェネティクス研究会年会 九州大学医学部百年講堂 2022 年 6 月 9 日
4. 原田哲仁, 藤井健, 前原一満, 木村宏, 大川恭行
単一細胞エピゲノム解析を用いたクロマチンマッピングによるゲノム機能の解明
第 45 回分子生物学会 幕張メッセ 2022 年 11 月 30 日
5. 大川 恭行, 原田 哲仁, 前原 一満
1 細胞エピゲノム解析技術開発の最前線
医歯薬出版株式会社 週刊医学のあゆみ 2021 年 Vol276No.10:912-917
2021 年 3 月 6 日刊行