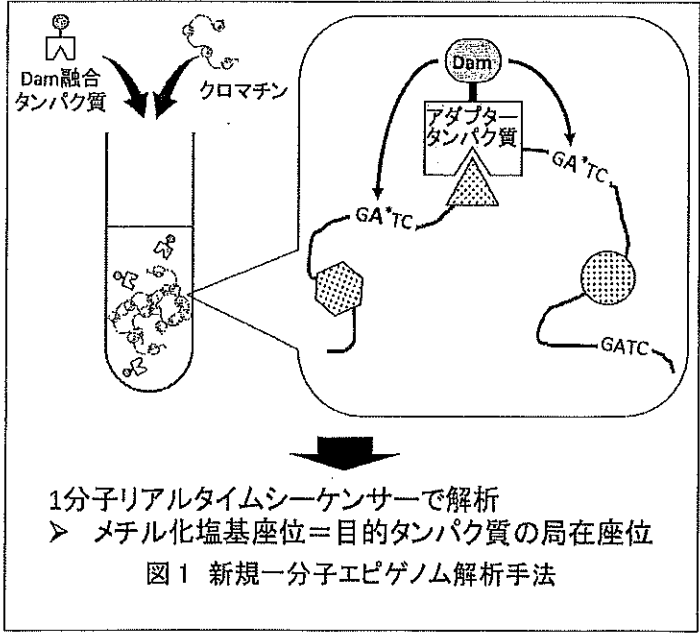


京都府公立大学法人若手研究者・地域未来づくり支援事業研究成果報告書

	(所 属)	(職名・学年)	(氏 名)
研究者 (研究代表者)	京都府立大・生命環境 科学研究科	博士後期3年生	畑 貴之
研究の名称	ChIP法の弱点を克服する新規エピゲノム解析手法の開発		
研究の キーワード	1分子エピゲノム、DNA修飾、クロマチン、1分子シーケンサー		
研究の概要	<p>真核生物のDNAは、クロマチンとして細胞核内に存在する。クロマチン分子上での個々のDNA結合タンパク質の分布(=エピゲノム状態)は、真核生物の遺伝子発現制御に重要な役割を持ち、細胞ごとにそれぞれ固有の状態をとると考えられている。しかし、従来のエピゲノム解析手法(=ChIP法)では、多数の細胞を含むサンプルの平均的な様相しか知ることができない。そこで本研究では、「特定のDNA結合タンパク質が、DNA上のどこに結合しているかを、クロマチン1分子ごとに解析する」まったく新しい実験手法(図1)の開発を目的とした。</p>  <p>1分子リアルタイムシーケンサーで解析 > メチル化塩基座位=目的タンパク質の局在座位 図1 新規一分子エピゲノム解析手法</p>		

研究の背景	<p>近年の核酸解析技術の発展は、細胞で合成される核酸分子を1分子ごとに、そして一挙に読み解くことを可能にした。このような高感度・高解像度での解析から、同じゲノム配列を持つ同一クローンの細胞であっても、細胞ごとに遺伝子発現プロファイルにバラツキがあることが明らかとなっている。このことは、DNA配列 (=cis因子) とは別に、種々のDNA結合タンパク質の結合・局在を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御 (=エピゲノム状態) が、細胞ごとに多様性をもつことを示唆している。しかし、現在ひろく用いられているエピゲノム解析手法 (=ChIP法) では、試料中に含まれる分子集団の平均的な状態しか知ることができず、想起されるエピゲノムの多様性については未解明のままであった。</p>
研究手法	<p>本研究では、1分子エピゲノム解析のための新技術開発を目的とする。本手法ではまず、DNA上の局在を明らかにしたい目的タンパク質について、それと特異的に結合・相互作用するタンパク質 (=アダプタータンパク質) と、DNA adenine methyltransferase (Dam) を連結した Dam 融合タンパク質を調製する。次に、単離したクロマチンと調製した融合タンパク質を試験管内で反応させ、目的タンパク質のクロマチン上の局在位置を、周辺 Dam 標的配列のメチル化によって DNA 分子上に記録する。このメチル化塩基を DNA 分子ごとに1分子ロングリードシーケンサーによって検出・同定することで、目的タンパク質の局在位置を明らかにできる。</p> <p>本研究では、実験系のモデルとして、シロイヌナズナを実験材料に、目的タンパク質にヒストンバリエーション H2A.Z、そして H2A.Z 特異的なクロマチンリモデラー PIE1 をアダプタータンパク質とし、実験系の開発・検討をおこなった。</p>
研究の成果	<p>(1) Dam::PIE1 融合タンパク質を用いて、単離クロマチンのメチル化に成功</p> <p>作製した Dam::PIE1 融合タンパク質を用い、シロイヌナズナから単離したクロマチンへのメチル化標識が可能であることを確認した。</p> <p>(2) Dam::PIE1 融合タンパク質が、単離クロマチン中の H2A.Z と選択的に結合することを確認</p> <p>アダプタータンパク質として Dam に連結した PIE1 が、実際に H2A.Z と選択的に結合するかの確認を行った。そのために、融合タンパク質と単離クロマチンとを試験管内で混合したのち、融合タンパク質とそれに結合したクロマチン分子を回収した。条件検討の結果、Dam メチラーゼに対し競合阻害的に働く DNA 断片を加えることで、非特異的結合を抑制した上で</p>

	H2A.Z 選択的なクロマチンの回収が可能であることを確認した。
今後の期待	<p>本研究では、クロマチン上の特定のDNA結合タンパク質に選択的に結合し、かつ、クロマチンへのメチル化標識が可能なDam::アダプタータンパク質の作製に成功した。今後、さらに実験条件を至適化し、それを1分子ロングリードシーケンサーによる検出と組み合わせることで、1分子エピゲノム解析の確立が期待される。</p> <p>本手法の応用・発展性は高く、例えば、種々のDNA修飾酵素を組み合わせることで、1分子のクロマチン上での多様なDNA結合タンパク質の分布解析へと発展させることも期待される。</p> <p>また本手法は、これまで全く未知であった「リピート構造」のエピゲノム状態をも明らかにできる可能性がある。リピート構造とは、同一の塩基配列が繰り返して現れるゲノム上の領域で、真核生物のゲノムには大量に存在する。これらリピート構造は、遺伝子発現制御やゲノムの進化にも大きく関与してきたことが知られているが、そのエピゲノム状態の詳細については、技術的な困難さから不明のままであった。紙面の都合上詳細は割愛するが、長鎖1分子シーケンサーを利用する本手法は、この問題の一解決案となりうる。本研究で提案した1分子エピゲノム解析手法が現実となれば、「1分子エピジェネティクス」や、「リピートエピジェノミクス」といった、新しい研究分野の開拓・構築につながる。</p>
研究発表 (注3)	<p>2019年度 修士論文 「DNA結合タンパク質の局在位置をDNA鎖に記入する～1分子エピゲノム解析への新しいアプローチ～」 京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 応用生命科学専攻 植物ゲノム情報学研究室 修士2年 早川 千明</p>