

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域: 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
2. 研究開発課題名: エピゲノム解析の国際標準化に向けた新技術の創出
3. 研究開発代表者: 白髭 克彦 (当該年度 3 月 31 日時点の所属)
4. 研究開発の成果

ChIP-seq の微量化については、木村らと共同の元、H3K4me1 の抗体 9 種、H3K27ac の抗体 5 種について ChIP-seq を行い、1 万細胞での ChIP-seq 条件を検討した。また、少スケール化について特にルーチンに少スケール ChIP-seq を実施可能なプロトコルを確立した。今年度は新たにグループ内で得られた 11 細胞種、36 実験、200 配列について情報解析を実施し、光山の協力の下 DDBJ に登録した。また、グループ内で得られた 11 細胞種、36 実験、200 配列を、TrackHub によって IHEC Data Portal にも提供した。

和田らとの協力の下、血管内皮細胞のエピゲノム解析を行い、血管内皮特異性を決定するエピゲノムマークを探索した。複数ドナーから得た血管内皮細胞の解析においては、個人差やサンプル取得環境に由来するデータのばらつきが大きくなる。これらの問題点を克服するため、効果的にばらつきをキャンセルする手法を確立した。サンプルのリード数のばらつき、対象領域から個人差や技術的な要因に起因するノイズなどの影響を除去するため、各サンプルからそれぞれ同数の上位ピークを選び、かつ上位ピークのうち 7 細胞種各々について、replicate 間で共通するもののみを抽出し、更にそれらのサイトを 7 細胞種で統合し、プロモーター (8,683 サイト) とエンハンサー (16,976 サイト) の reference sites を得た (図 1)。プロモーター領域は約半数が全内皮で共通しており、細胞特異的なものは 1 割に満たないのに対し、エンハンサーは 3 割以上が単一の内皮細胞特異的に表れていた。更にクロマチンの立体相互作用データを利用し、標的遺伝子から遠位(10 kbp~)に位置するエンハンサーについて、対応関係にあるプロモーターを特定した。これらにはエンハンサー同士を結ぶ立体相互作用も含まれており、複数のエンハンサーによって単一遺伝子の発現が制御されているスーパーエンハンサーのような事例も示された。

7 種の内皮細胞の近縁度を知るため、20 の血管内皮細胞に対し、エンハンサー領域における H3K27ac のピーク強度に基づくクラスタリングを行った。従来のリード数に基づくリード正規化手法はサンプル間の S/N 比の違いを考慮しないため、細胞ごとにうまくクラスタ化されないが、S/N 比を考慮した正規化手法を構築したところ、各サンプルのピーク強度の中央値に基づく正規化を事前に行うことで、良好なクラスタリング結果を得た。より環境依存的である遺伝子発現に基づくクラスタリングとは異なり、エンハンサーに基づくクラスタリング結果はより組織の解剖学的距離を強く反映した。細胞間の差を特徴づけるエンハンサーとして多群間で統計的有意に変動しているエンハンサーを抽出した(265 サイト, FDR < 0.05)。その結果、内皮間で発現が異なる遺伝子を得ることができ、これらの中には HOX gene cluster が多く抽出された (図 2)。これは HOX 領域が内皮間の差を表す重要なマーカーとなる可能性を示している。さらに、各細胞種特異的に存在するサイトを対象にモチーフ解析を行い、これらのサイトに有意に存在するモチーフ配列が存在すること、そのいくつかは各細胞での遺伝子発現量と正の相関を持つことを明らかにした。これらの成果は各血管内皮特異的に発現している遺伝子群及び、それらに作用する転写制御因子が存在する可能性も示唆している。これらの成果は論文としてまとめ、現在投稿中である。

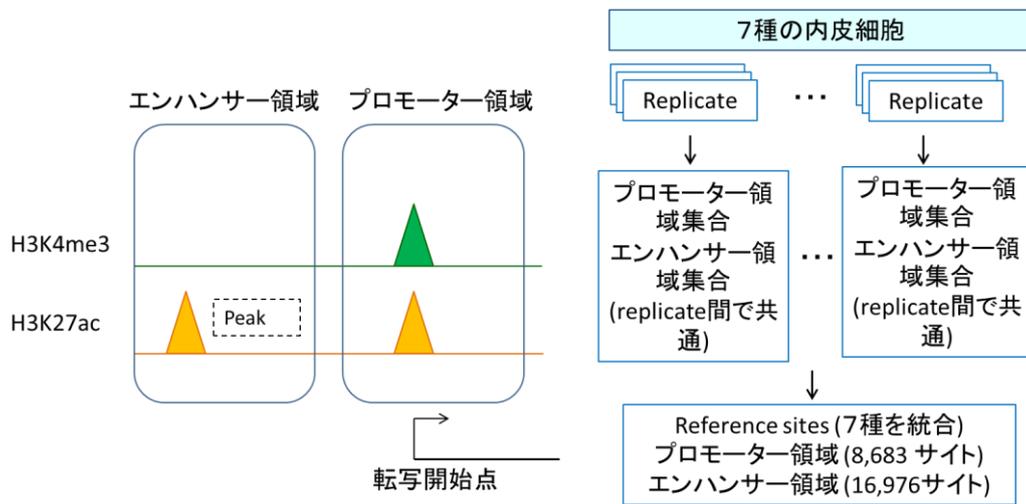


図1 7種の血管内皮からのエンハンサー・プロモーターの reference sites の取得

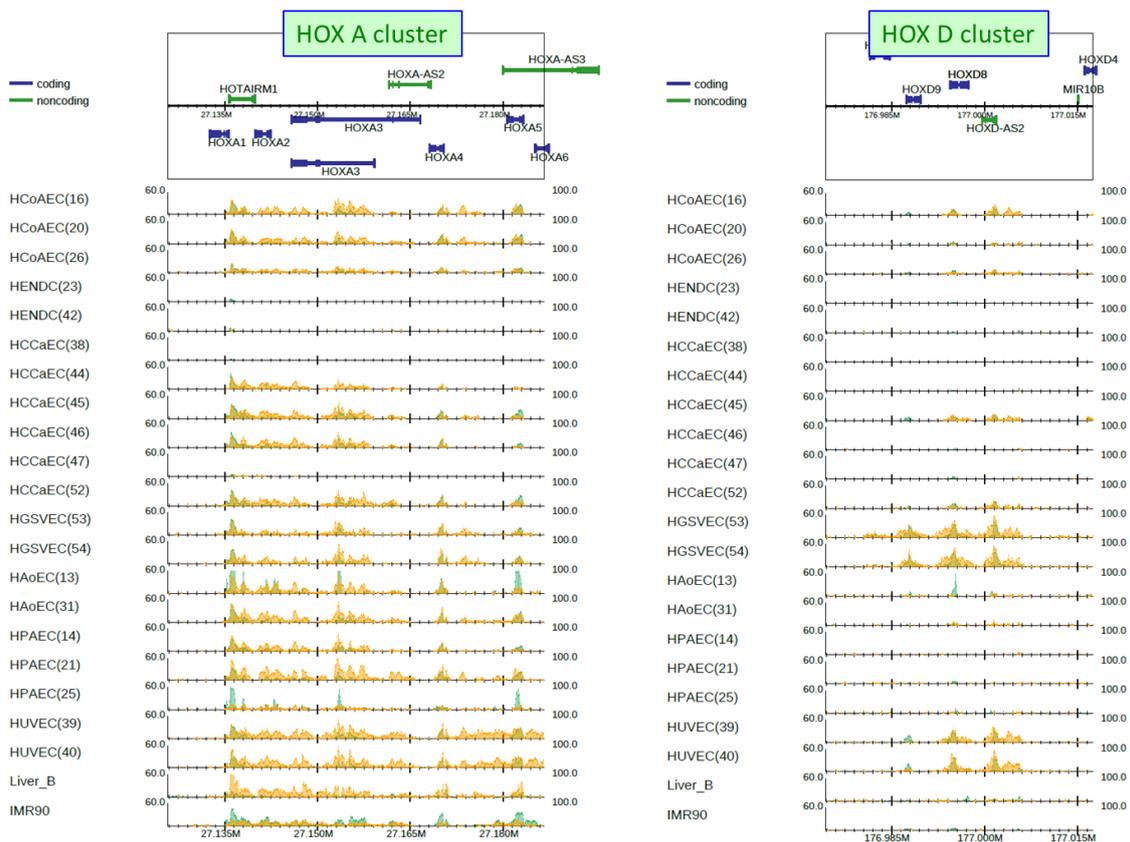


図2 開発した DROMPA による H3K4me3 と H3K27ac の可視化。