

In vivo でのクロマチン解析に用いるケミカルマッピング法の改良

口 開 弥 優¹ 渡 邊 隼 太¹ 高 附 宏 暢² 柳 田 顕 郎³

清 水 光 弘⁴

An improved chemical mapping method for *in vivo* chromatin analysis

Miyu KOKAI¹, Hayata WATANABE¹, Hironobu TAKATSUKI², Akio YANAGIDA³,
Mitsuhiro SHIMIZU⁴

Our previously reported method for isolating nuclei from budding yeast cells, followed by a series of steps ranging from labeling to chemical cleavage, was labor intensive and required about 10-14 hours. To make this method more user-friendly, we reexamined our experimental workflow and experimental conditions to lower the nonspecific chemical cleavage background. As a result, we have now established a more convenient experimental protocol that will hopefully be a useful tool for researchers investigating chromatin dynamics and the behaviors of specific DNA-binding proteins in the genome.

キーワード：クロマチン，ヌクレオソーム，ヒストン，DNA 結合タンパク質，部位特異的化学切断

Keywords：chromatin, nucleosome, histone, DNA binding protein, site-directed chemical cleavage

1. 緒言

真核生物のゲノム DNA はクロマチンとして細胞核内に収納されており，細胞分裂期には染色体として観察される。クロマチン・染色体の基本単位は，ヒストン 8 量体に 145–147 bp の DNA が 1.7 回転巻き付いたヌクレオソームである⁽¹⁾。ゲノム DNA におけるヌクレオソームの配置は DNA の複製，転写，組換え，修復において重要な役割を果たしており，さまざまな方法を用いてヌクレオソームの位置が決定されてきた。ヌクレオソーム間のリンカー DNA 部位を優先的に切断する micrococcal nuclease (MNase) は最も繁用された方法である。しかし，MNase による切断には塩基配列特異性があり，また，5'-exonuclease 活性も有することから，MNase によるヌクレオソームのマッピング結果はしばしば議論を引き起こすことがあった⁽²⁾。

2012 年，Widom のグループはヒストン H4 の 47 位のセリン残基をシステインに変異させた株 (H-S47C 株) を構築し，部位特異的的化学切断により出芽酵母ゲノムにおけるヌクレオソーム地図を発表した⁽³⁾。この方法はケミカルマッピングと呼ばれ，ヌクレオソームの位置決定に有力な方法であることが示された。この方法を基にして，我々は，細胞核を基質とする部位特異的的化学切断法を確立し，MNase によるマッピングとともに，同じ試料に対して MNase 消化または化

学切断を適用し，ヌクレオソームの位置をパラレルにマッピングする方法を発表した⁽⁴⁾。我々の方法では，出芽酵母の細胞から核を単離し，ラベル化反応から化学切断までの作業を連続して行うため，10-14 時間を要するハードな実験であった。

我々が確立した方法をより広い分野の多くの研究者が活用しやすくするために，本論文では，実験の作業工程を見直すとともに，非特異的な化学切断のバックグラウンドをより低くする実験条件について検討した。本研究の結果，より利便性の高い，改良した実験プロトコルを確立できた。

2. 実験材料と方法

2.1 出芽酵母株

本研究においてヒストン H4-S47C 株として使用した *Saccharomyces cerevisiae* MHS3006 株 [*MAT α* *ura3-52 trp1 Δ* 63 *leu2 Δ* 1 *hhf1::S47C hhf2::KanMX*] の構築は過去に報告した⁽⁴⁻⁶⁾。出芽酵母の培地の調製と培養条件は，標準的なレシピとプロトコルに従った。

2.2 部位特異的的化学切断法

出芽酵母細胞から単離した核を基質とするヒストン H4-S47C 部位特異的的化学切断の実験手順，用いる試薬等は過去の報告⁽⁴⁻⁶⁾と同じであるが，ラベル化反応時間と CuCl_2 濃度について本論文で検討した。間接末端標識による切断部位

1 明星大学大学院理工学研究科化学専攻 博士前期課程 専門分野 分子生物学，生化学

2 明星大学大学院理工学研究科化学専攻 博士前期課程修了 専門分野 分子生物学，生化学

3 東京薬科大学薬学部 教授 専門分野 生体分析化学

4 明星大学理工学部総合理工学科/理工学研究科化学専攻 教授 専門分野 分子生物学，生化学，分子遺伝学

の解析, Typhoon FLA7000 生体分子イメージャー (GE Healthcare UK Ltd., England) による切断部位の可視化は, 既に報告した論文^(4,6)に記載したように行った。

3. 結果

部位特異的切断法の原理と本研究で用いたヒストン H4 の S47C 残基の位置を図 1 に示す。本法の原理は, Cys 残基に N-(1,10-phenanthroline-5-yl) iodoacetamide を連結し, Cu^+ をキレートした後, H_2O_2 の添加によるフェントン反応で OH ラジカルを発生させて, DNA を局所的に切断するというものである。ヒストン H4 の S47C 残基が N-(1,10-phenanthroline-5-yl) iodoacetamide でラベル化されると, ヌクレオソーム中央の DNA 部位が切断されることが報告された⁽⁹⁾。本研究で確立したケミカルマッピング (部位特異的的化学切断法) の実験手順スキームを図 2 に示す。今回, 改良した手順をその中に下線で示した。以下に, 検討したポイントについて述べた。

3.1 ラベル化反応時間の検討

2017 年, 当研究室から報告⁽⁴⁾した実験手順では, 細胞核の懸濁液に N-(1,10-phenanthroline-5-yl) iodoacetamide を加え, 4°C で 1 時間反応させることによって, この試薬を Cys 残基に連結し, それに引き続き DNA の化学切断を行った。その実験プロトコルでは 1 日の実験時間が 10-14 時間を要することは大きな制約であった。そこで今回, ラベル化反応を 4°C で一晩行い, 実験工程を二日間に分けることを試みた。この変更に関して, spheroplast lysate に対してラベル化反応を一晩行うという, Brogaard らの報告⁽³⁾を参考にした。

コントロールの野生株 FY24 と H4-S47C 株におけるゲノム DNA の切断について, ラベル化反応時間が従来の 1 時間と一晩との間で比較した結果を図 3A に示す。いずれの条件においても, H4-S47C 株ではヌクレオソームの並び (nucleosome arrays) に由来する DNA 断片が検出され (図 3A, レーン 1-3, 10-12), 反応時間とともにヌクレオソームが特異的に切断されることが示された。加えて, 部位特異的的化学切断で調製したゲノム DNA を制限酵素 *HindIII* と *ClaI* により二重消化した後, 1.2% アガロースゲルで電気泳動した。アガロースゲルをサザンブロットした後, HybondTM-N (GE) メンブレンに DNA を転写した。間接末端標識により *RPS5* 遺伝子座における切断部位を解析した。DNA の断片化の程度はラベル化反応を一晩 (約 18 時間) 行った試料の方がやや高いが, 重要なこととして, 切断部位の位置には両者の間で差異はなかった。(図 3B)。一方, コントロールの FY24 株 (図 3A, レーン 4-9) では, ラベル化反応を 1 時間から一晩 (~18 時間) への延長が切断に及ぼす影響は極めて少ないと判断された。以上の結果から, ラベル化反応を一晩行うこととした。

3.2 部位特異的的化学切断に及ぼす CuCl_2 の影響

本研究に着手した当初, 大過剰の CuCl_2 を添加すると,

H_2O_2 によって細胞核内のゲノム DNA がほぼ完全に消化されるという結果に遭遇した。すなわち, 過剰の遊離 Cu^+ は DNA の非特異的切断を引き起こす要因となる。それを踏ま

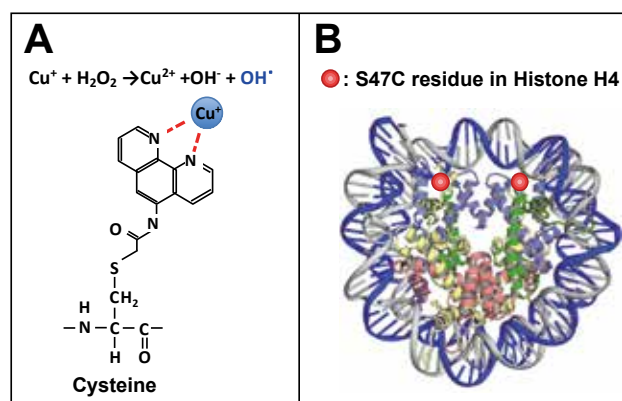
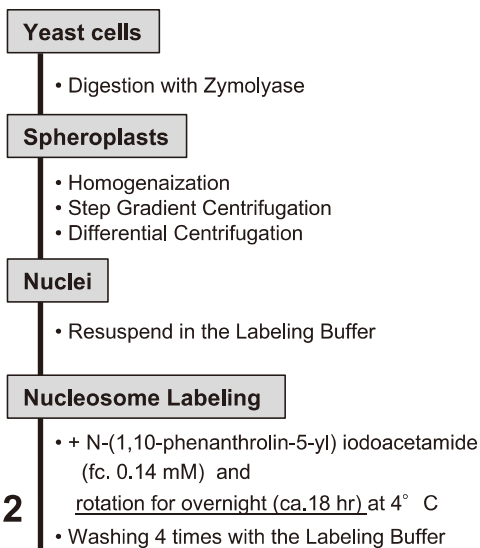


図 1. A. 化学切断法の原理, B. ヌクレオソームにおけるヒストン H4-S47C 残基の部位。

Fig. 1 A. Principal of chemical cleavage, B. The S47C residue of histone H4 in the nucleosome.

Day 1



Day 2

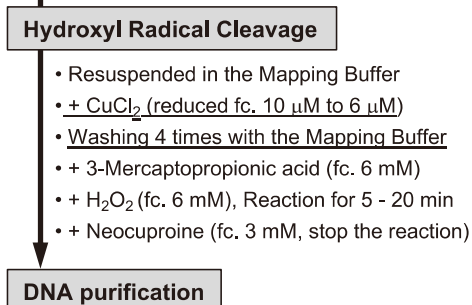


図 2. ケミカルマッピング (部位特異的的化学切断法) の実験手順の概要。

Fig. 2 An overview of the experimental procedure for chemical mapping (site-specific chemical cleavage).

えて、2017 年に報告した実験手順では、N-(1,10-phenanthroline-5-yl) iodoacetamide によるラベル化反応の後、添加する CuCl_2 の濃度の検討を行い、その最終濃度を $10 \mu\text{M}$ と決定した。しかし、その後、ゲノムにおけるさまざまな遺伝子座を解析したところ、遺伝子座によっては、非特異的な

切断部位が検出されることがあった。例えば、図 4 に示すように、出芽酵母の第 3 番染色体のセントロメア近傍を解析（1.2% アガロースゲルで電気泳動し、サザンブロットで Hybond™-N メンブレンに DNA を転写し、間接末端標識法で検出）したところ、セントロメアの上流と下流に非特異的切断が検出された（図 4B, レーン 1）。

このようなバックグラウンドとなる非特異的切断をさらに減じ、特異的切断部位のマッピング解析の精度を高めるために、添加する CuCl_2 を最終濃度 $6 \mu\text{M}$ に下げた条件で実

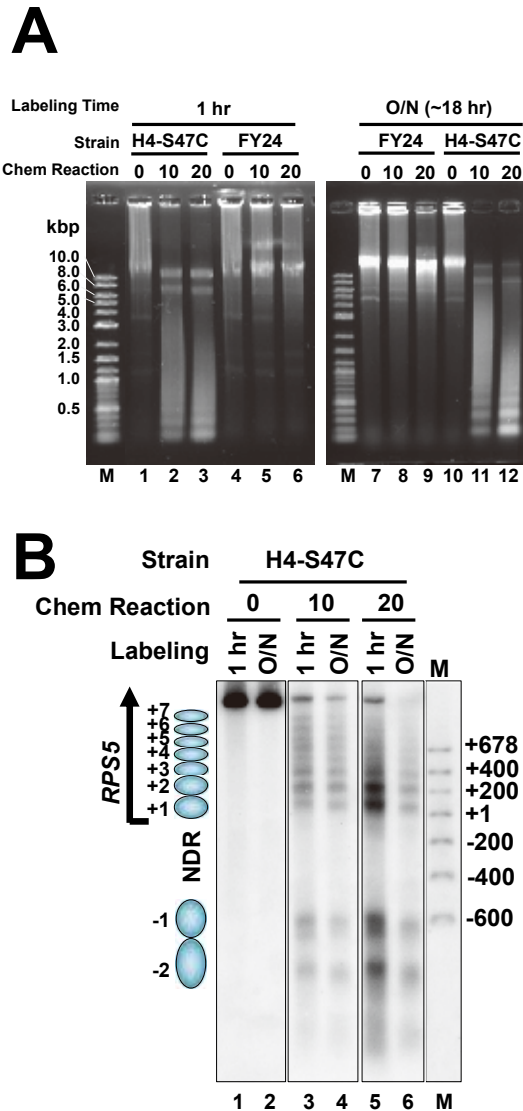


図3. A. ケミカルマッピングにおけるH4-S47Cを介した切断の度合いに及ぼすラベル化反応時間の影響。

B. 間接末端標識によるRPS5遺伝子座におけるH4-S47CによるDNA切断部位のケミカルマッピング。NDR, スクレオソーム欠失領域 (nucleosome depleted region); M, DNAサイズマーカー。

Fig. 3 A. Effect of labeling reaction time on the degree of cleavage through H4-S47C in chemical mapping.

B. Chemical mapping of DNA cleavage sites mediated by H4-S47C at the RPS5 locus by indirect end labeling. NDR, nucleosome depleted region; M, DNA size marker.

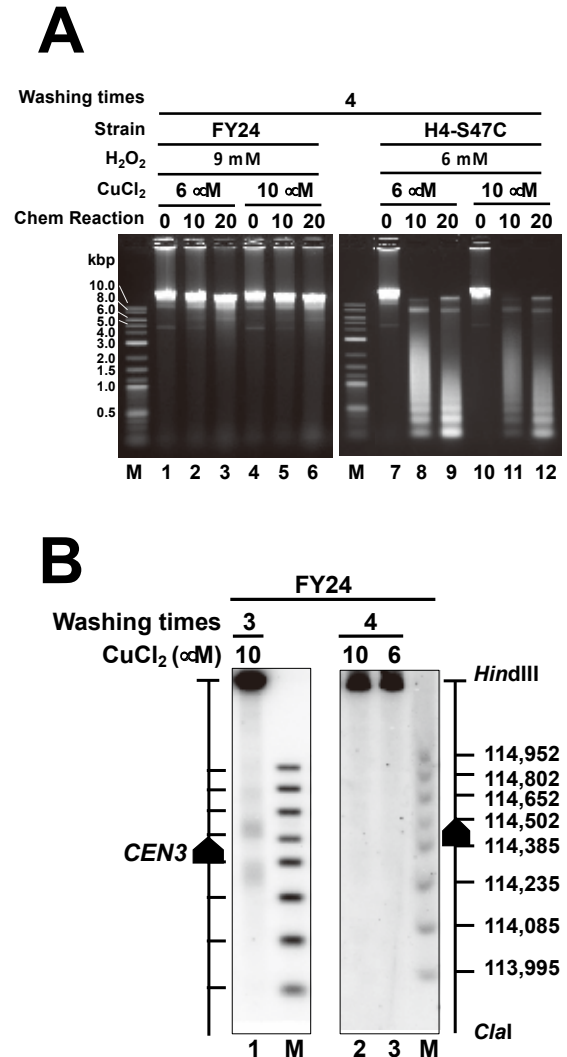


図4. A. ケミカルマッピング（部位特異的化學切断法）における CuCl_2 濃度の検討。

B. 間接末端標識によるFY24株（野生株）におけるCEN3近傍のケミカルマッピングのバックグラウンドの検出。M, DNAサイズマーカー。

Fig. 4 A. Examination of CuCl_2 concentration in chemical mapping (site-specific chemical cleavage method).

B. Chemical mapping of background cleavages near the CEN3 locus in FY24 strain (wild-type strain) detected by indirect end-labelling. M, DNA size marker.

験を行った。加えて、CuCl₂を添加してキレートした後の遊離 Cu⁺をさらに除去するために、細胞核の洗浄回数を従来の3回から4回に増やした(図2, 下線部参照)。

図4にCuCl₂濃度の10 μMと6 μMの比較および洗浄回数を4回にして調製した試料のアガロースゲル電気泳動の結果を示す。CuCl₂の濃度を減じても、ゲノムDNAの全体的な消化の程度はほとんど変わらなかった(図4A, レーン7-12)。部位特異的の化学切断で調製したゲノムDNAを制限酵素HindIIIとClaIにより二重消化した後、1.2%アガロースゲルで電気泳動し、サザンブロットでHybond™-N (GE) メンブレンにDNAを転写した。第3番染色体のセントロメア近傍における切断を間接末端標識法により検出した。図4Bのレーン2と3に見られるように、セントロメア近傍の非特異的切断強度が減少した。CuCl₂濃度10 μMと6 μMの差異がほとんどなかったことは、洗浄回数を増やして遊離のCu⁺を減らしたことの効果が大きいと考えられる。

以上の結果から、実験プロトコールにおいて添加するCuCl₂濃度を6 μMとし、洗浄回数を4回に変更することとした。

4. 考察

本論文において、我々の研究室で確立した細胞核を基質とするケミカルマッピングの改良点として、細胞核内タンパク質のN-(1,10-phenanthroline-5-yl) iodoacetamideのラベル化反応時間と、Cys残基に連結した試薬にキレートさせるCuCl₂の添加濃度の2点を検討した。その結果、本実験プロトコールは、1日目に出芽酵母から細胞核を調製し、N-(1,10-phenanthroline-5-yl) iodoacetamideを一晩反応させ、2日目に細胞核懸液で部位特異的の化学切断反応を行う、というプロトコールとなった。この変更により、1日における実験時間を5-6時間程度にすることができ、実験者にとって、より利用しやすい方法となった。加えて、非特異的切断のバックグラウンドを低下させることができた。

部位特異的の化学切断の程度を決める因子として、加えるH₂O₂濃度とその反応時間もまた重要である。切断強度は解析対象タンパク質のCys残基とDNAとの近接度によって変化すると考えられる。したがって、この点に関しては、解析対象タンパク質に対して標準的な条件(H₂O₂最終濃度6 mM, 反応時間0, 10, 20分)で実験を行い、その結果を見た上で、3mM~9mMの間でのH₂O₂濃度と反応時間を検討することで適正な条件下で行うことができるであろう。

現在、当研究室において、出芽酵母ゲノムにおけるさまざまな遺伝子座について、アガロースゲル電気泳動/サザンブロット/間接末端標識と、プライマー伸長法/シーケンスゲルによる解析を進めている。一方で、本法で調製した試料は、次世代シーケンサー(NGS)によるゲノムワイド解析も併せて進めている。それらの結果については、別の原著論文として報告する予定である。

JacobとMonodによるオペロン説において特異的DNAタンパク質の結合が遺伝子の発現を制御することが示され、

今日まで、DNAの複製、転写、組換え・修復の過程に関与する多くのタンパク質が同定されてきた。したがって、DNA結合タンパク質がゲノムにおいて、どのように結合してその機能を発揮するかを明らかにすることは、分子生物学における重要なテーマである。本法が、多くの研究者にとって、ゲノムにおけるクロマチンの動態や特異的DNAタンパク質の挙動を調べるための有用な手段となることを期待する。

謝辞

本研究の一部は、2023年度明星大学重点支援研究費の支援を受けました。本研究の遂行において、ゲノムワイド解析の観点からご助言をいただいた島根大学医学部准教授・加藤太陽博士、また、構造生物学的見地からご助言をいただいた明星大学理工学部教授・香川亘博士に感謝申し上げます。

参考文献

- (1) Lai WKM, Pugh BF: "Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(9), pp. 548-556 (2017)
- (2) Chereji, RV, Ocampo, J, Clark, DJ: "MNase-Sensitive Complexes in Yeast: Nucleosomes and Non-histone Barriers", *Mol Cell*, 65, 565-580 (2017)
- (3) Brogaard K, Xi L, Wang JP, Widom J: "A map of nucleosome positions in yeast at base-pair resolutions", *Nature*, 486(7404), pp. 496-501 (2012)
- (4) Fuse T, Katsumata K, Morohoshi K, Mukai Y, Ichikawa Y, Kurumizaka H, Yanagida A, Urano T, Kato H, Shimizu M: "Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes *in vivo*", *PLoS One*, 12(10) e0186974 (2017)
- (5) Fuse T, Yanagida A, Shimizu M: "The yeast minichromosome system consisting of highly positioned nucleosomes *in vivo*", *Biol Pharm Bull*, 42(2), 289-294 (2019).
- (6) Katsumata K, Ichikawa Y, Fuse T, Kurumizaka H, Yanagida A, Urano T, Kato H, Shimizu M: "Sequence-dependent nucleosome formation in trinucleotide repeats evaluated by *in vivo* chemical mapping", *Biochem Biophys Res Commun*, 556, 289-294 (2021).