

# エピゲノム研究のデザインと応用例

## ～ATAC-seq解析を中心に～

株式会社レリクサ 研究開発部

シニアマネージャー 小田真由美

## 本日のテーマ

1. エピゲノム研究のデザイン
2. ATAC-seq: オープンクロマチン解析の原理と歴史
3. エピゲノム研究の応用



知りたいことはなんですか？

たとえば…

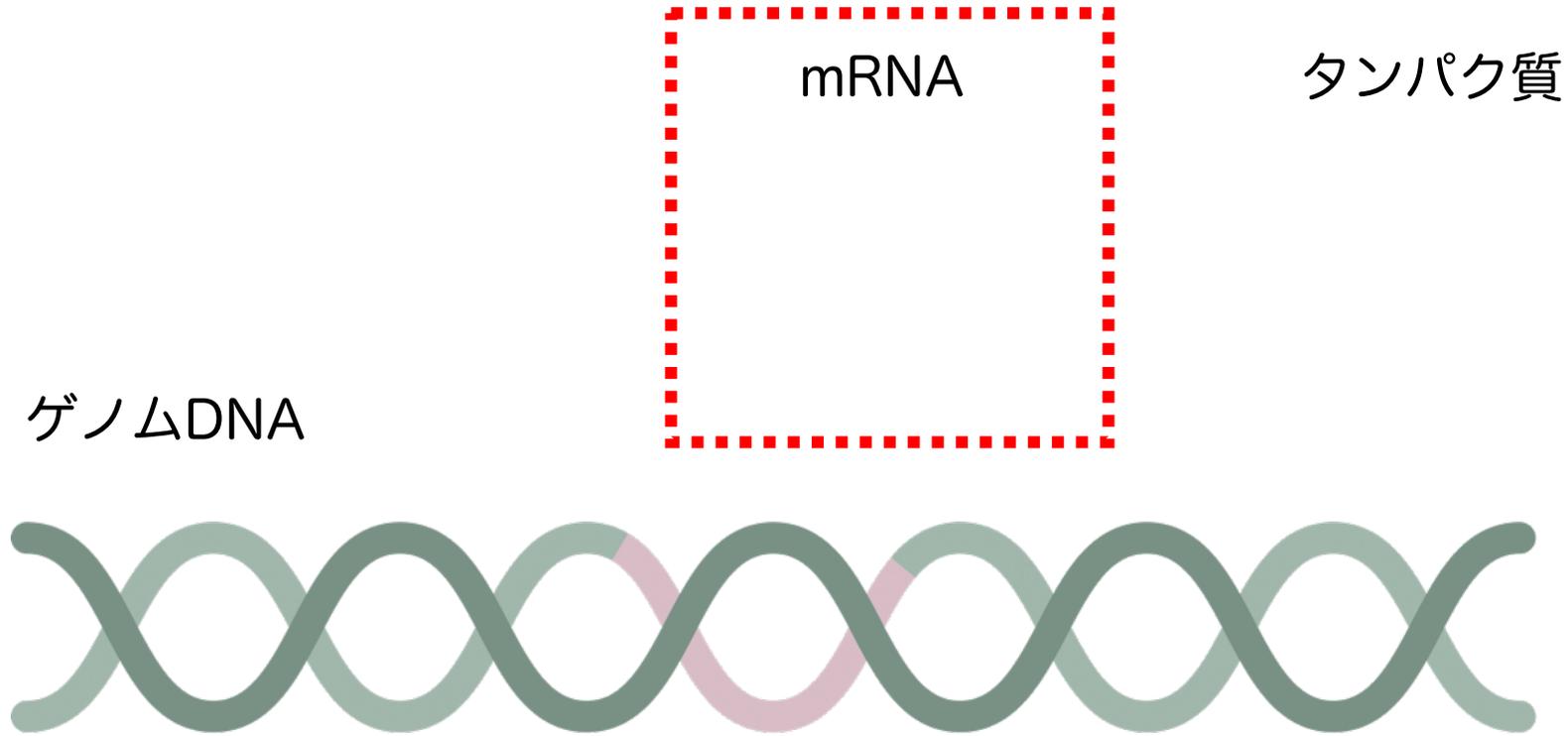
病気の原因を探りたい

治療の方法を開発したい

病気の早期発見をしたい

薬の効くメカニズムを知りたい

# 遺伝子発現の仕組み



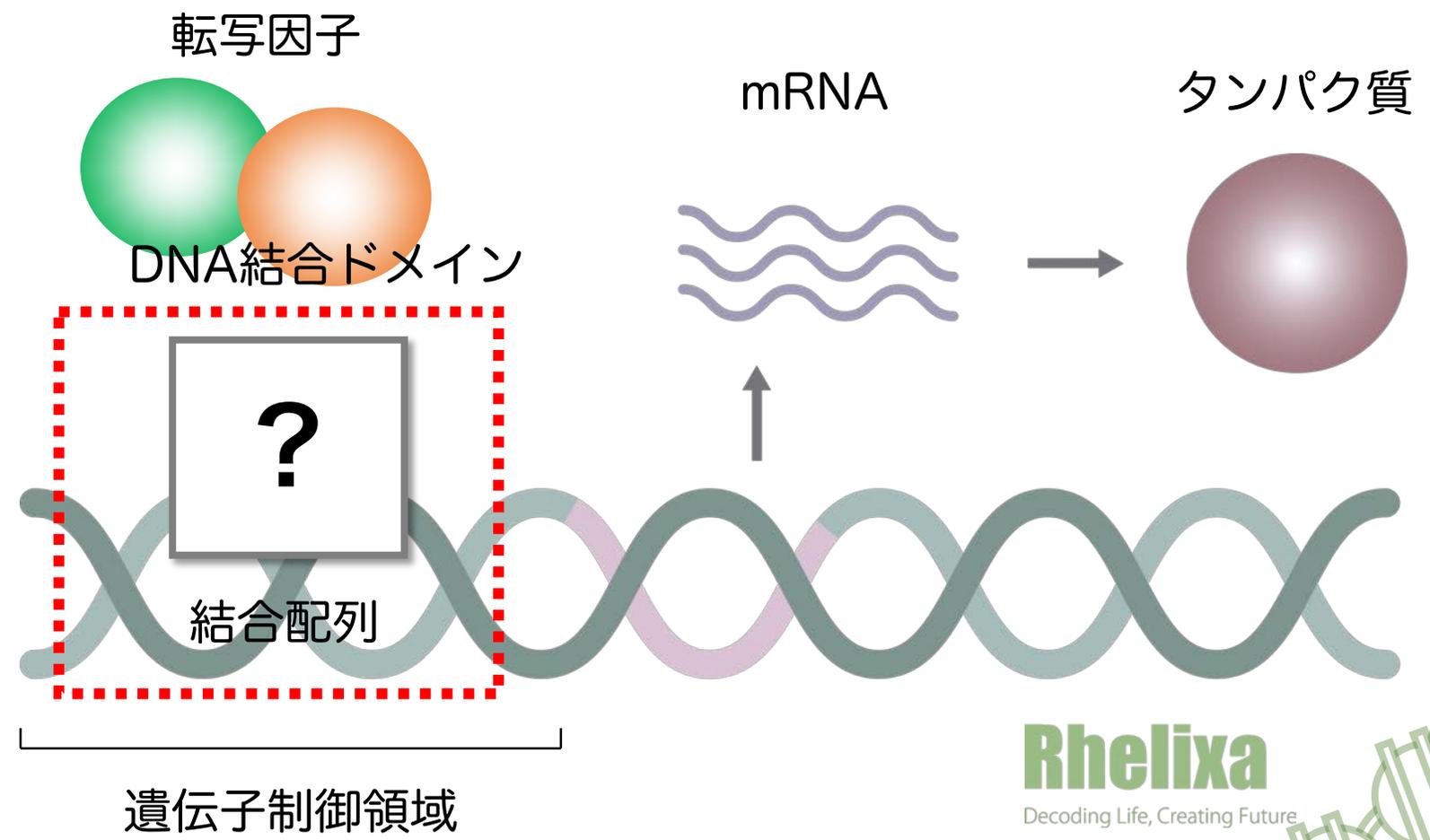
ゲノムDNA

mRNA

タンパク質

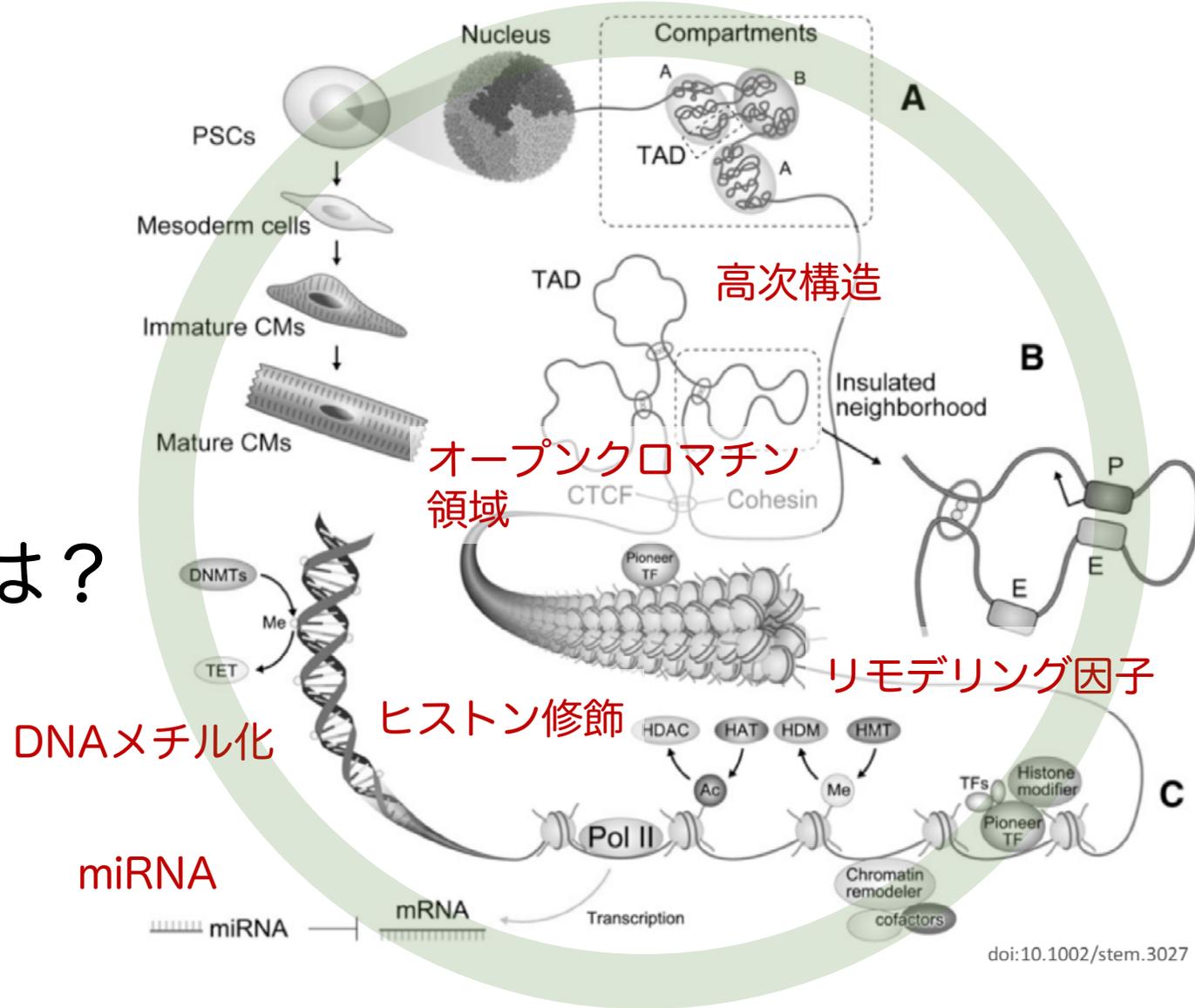
# エピジェネティック 分子制御機構

細胞分裂を超えて維持される  
遺伝子発現制御機構の総称



# エピゲノムとは？

複数の分子機構  
による核・ゲノムの  
体系的な制御



## クロマチン・アクセシビリティ：

DNA-ヒストン複合体=ヌクレオソームの位置や高次構造により、DNA配列への分子アクセス性が変化する。

## オープン・クロマチン領域：

様々なエピジェネティック制御の結果、ヌクレオソーム密度などが低下し、DNAへのアクセス性が高い領域。

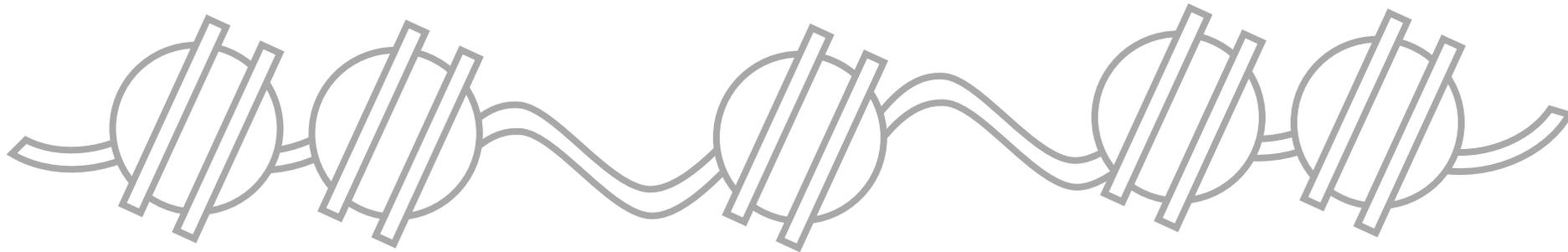
## 本日のテーマ

1. エピゲノム研究のデザイン
2. ATAC-seq: オープンクロマチン解析の原理と歴史
3. エピゲノム研究の応用



## オープンクロマチン領域：

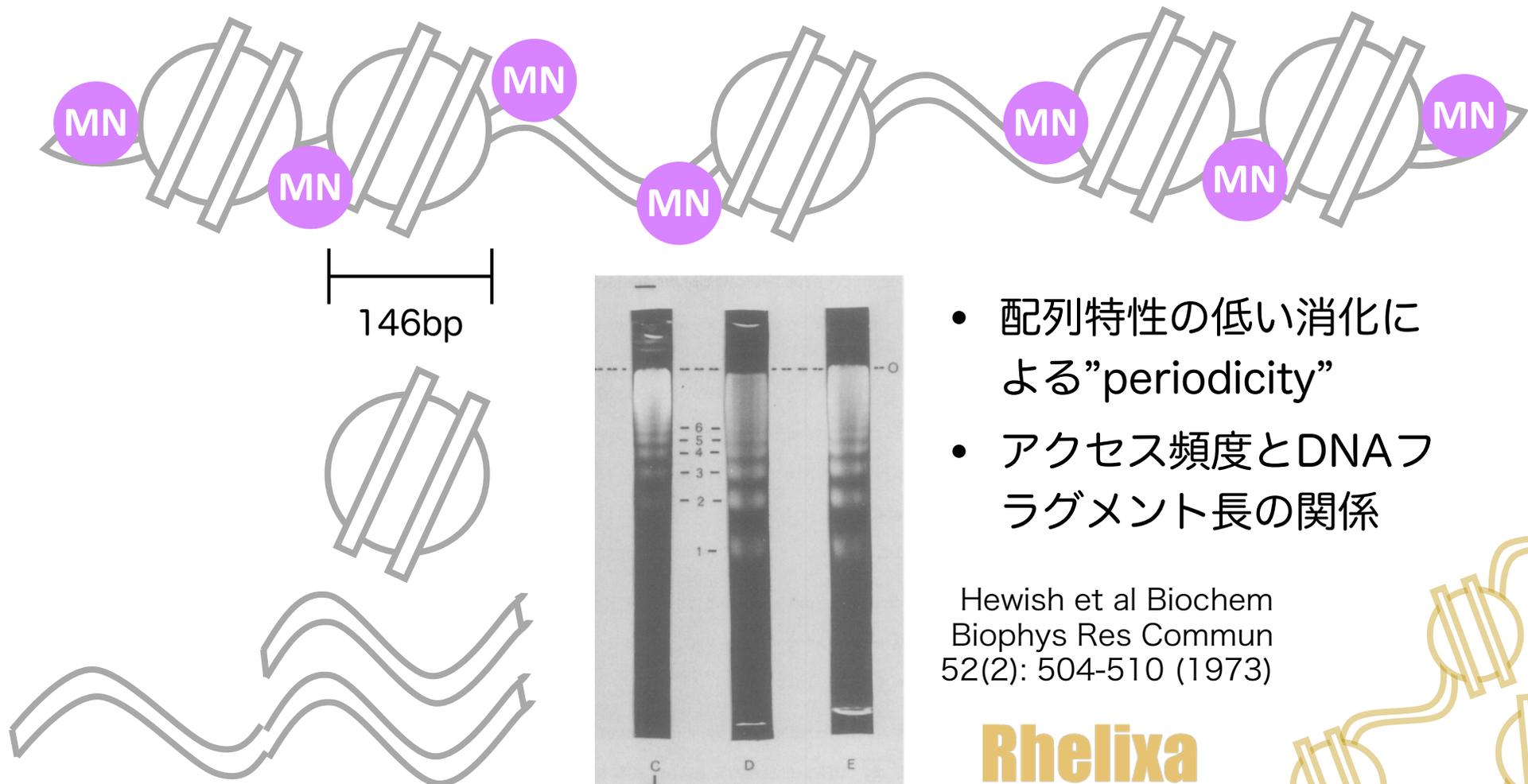
ノンコーディングRNA、DNAメチル化、ヒストン修飾、ヘテロクロマチン形成が関与



- 転写開始領域のヌクレオソームfree領域
- 転写因子の結合
- ヌクレオソームの安定性

→ 遺伝子の活性化状態を反映

## Mnase assayによるヌクレオソーム関連DNAの観察



- 配列特性の低い消化による”periodicity”
- アクセス頻度とDNAフラグメント長の関係

Hewish et al Biochem  
Biophys Res Commun  
52(2): 504-510 (1973)

## DNase I assay: ショートリードによるDHSの網羅的な解析

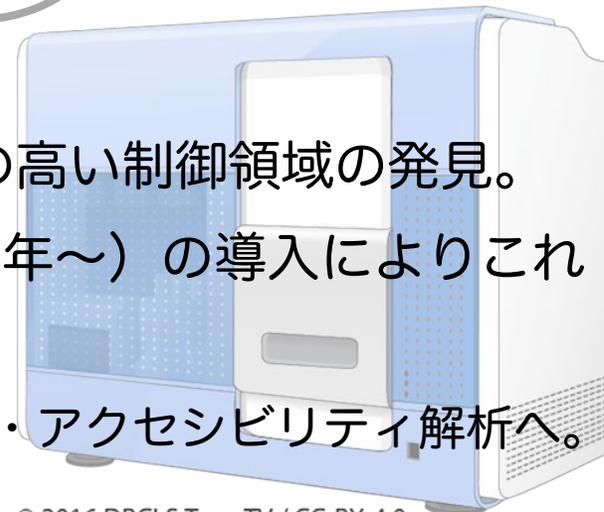


DNase hypersensitive site (DHS)=保存性の高い制御領域の発見。  
PCR (1985年～)、マイクロアレイ (2006年～) の導入によりこれらの遠位制御領域の定量的解析が可能に。

Dnase I-seq: Solexaによる網羅的なクロマチン・アクセシビリティ解析へ。

Boyle et al Cell 132, 311–322 (2008)

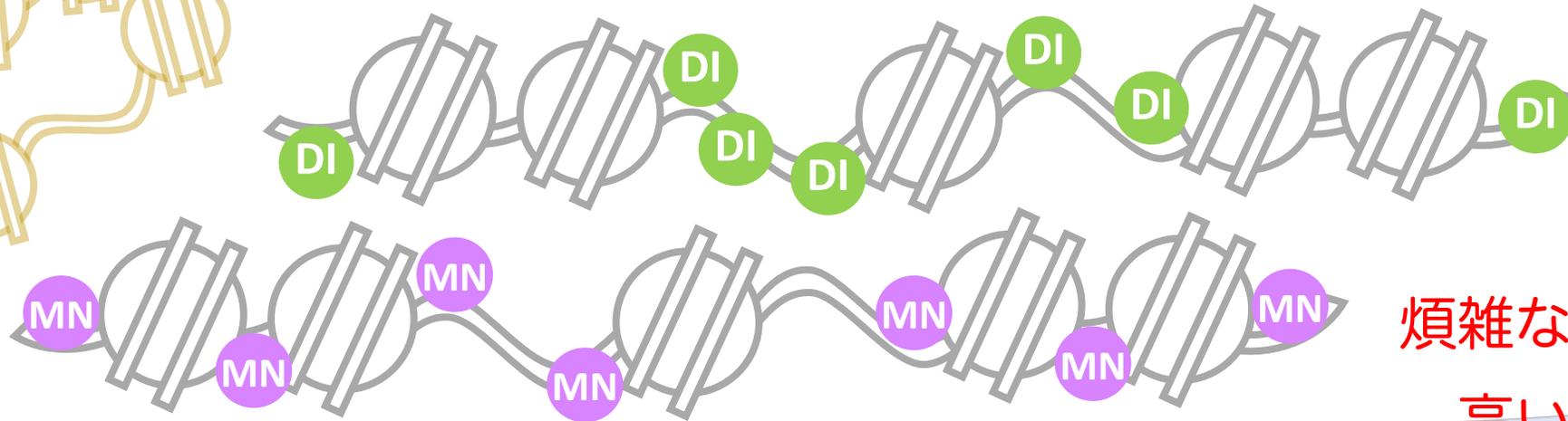
- シングルカット (タイプII制限酵素を使う)
- ダブルカット (フラグメントのサイズ選択)



© 2016 DBCLS TogoTV / CC-BY-4.0

**Rhelixa**  
Decoding Life, Creating Future

## ショートリードシーケンスによる網羅的解析



大量の細胞サンプル  
煩雑なライブラリ作成手順  
高いシーケンスコスト  
...

**Mnase-seq:** ショートリードシーケンスによる網羅的ヌクレオソーム配置解析 (25bpショートリード)

- ・ 遺伝子発現活性化によるヌクレオソーム再編成 (位置の変化)
- ・ ヒストンバリエント (H2A.Z) や活性ヒストン修飾マーク (H3K4me3) によるヌクレオソーム除去。

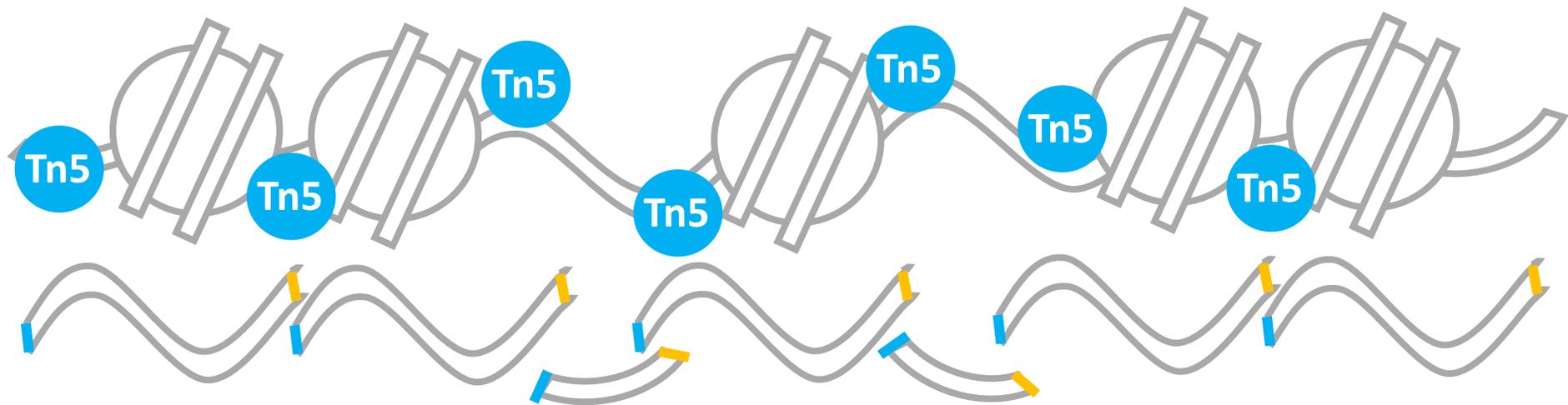
Schones et al. Cell  
132(5):887-898 (2008).



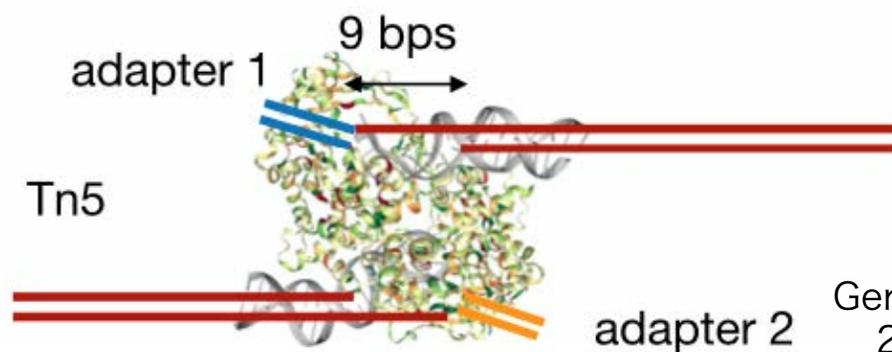
© 2016 DBCLS TogoTV / CC-BY-4.0

**Rhelixa**  
Decoding Life, Creating Future

## ATAC-seq: assay for transposase-accessible chromatin using sequencing



迅速かつ高感度・少ない未固定生細胞（500細胞～）に適応可能なオープンクロマチン解析法。



トランスポゼース (Tn5) がDNAタグの付加によりDNAを分断。

Buenrostro et al.  
Nat Methods

10(12):1213-1218 (2013)

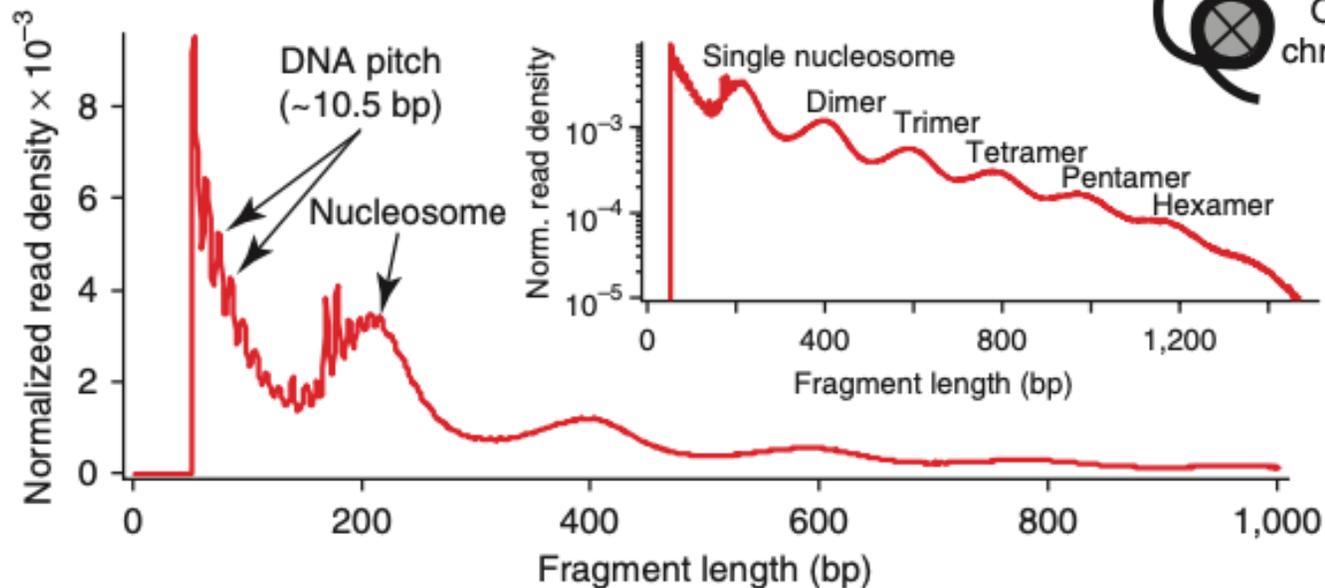
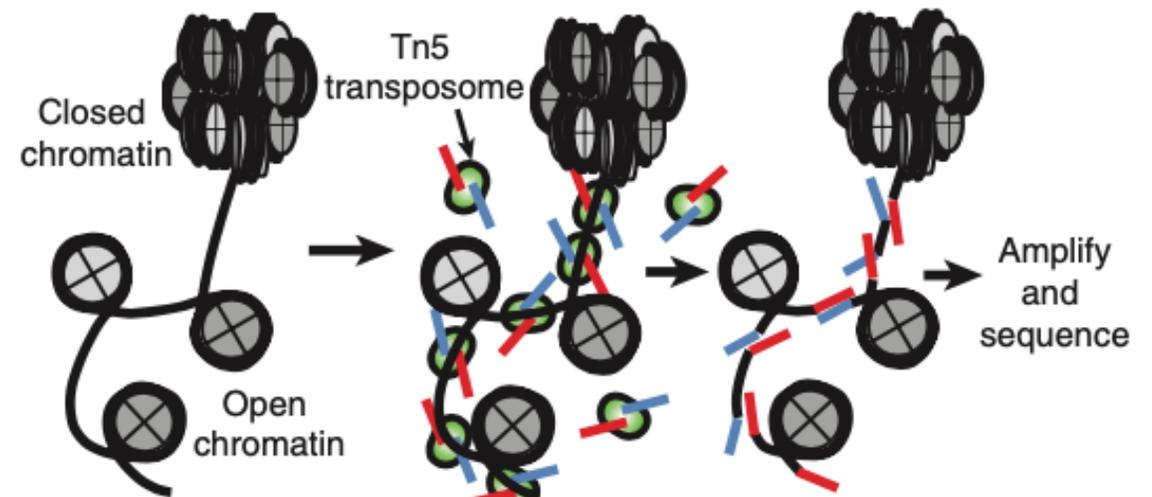
Li et al.  
Genome Biology  
20:45 (2019)

**Rhelixa**

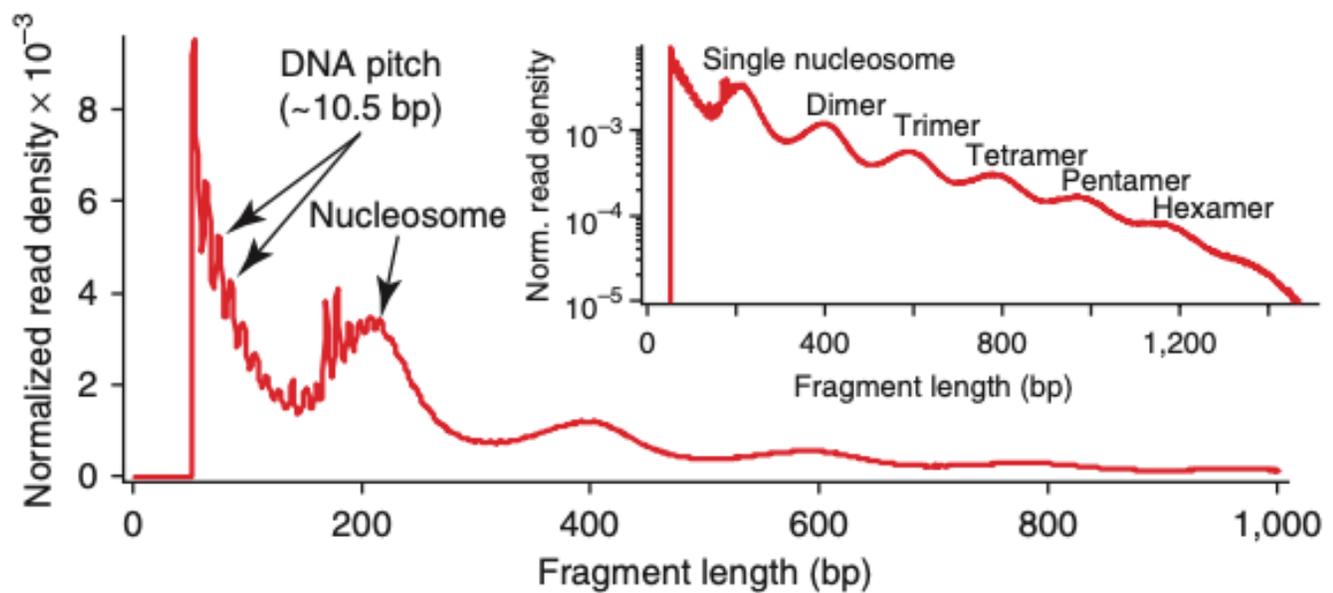
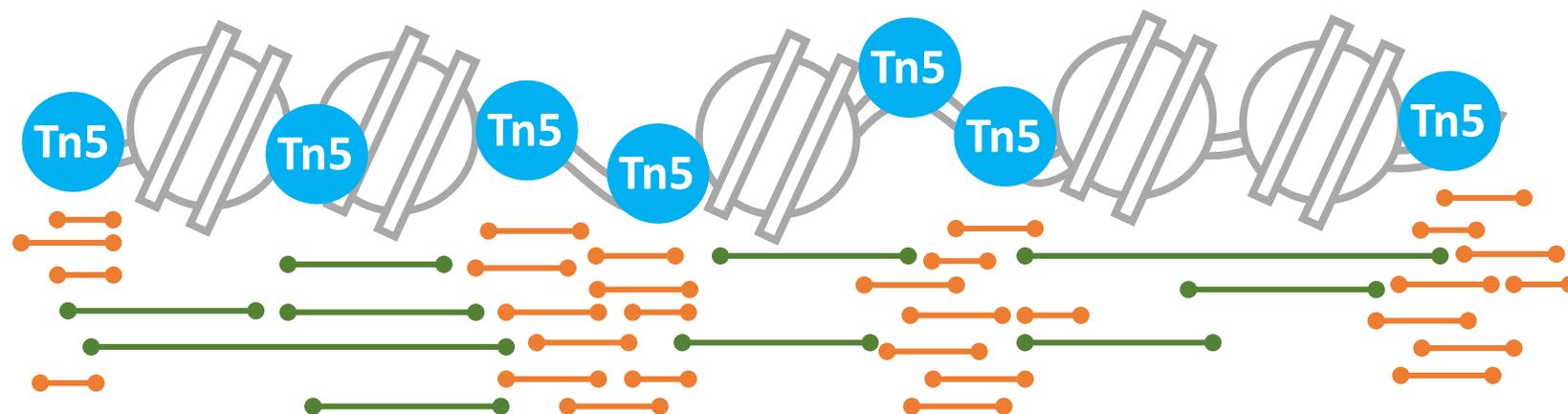
Decoding Life, Creating Future

# ATAC-seq: assay for transposase-accessible chromatin using sequencing

効率的なタグメンテーションによってクロマチン・アクセシビリティ解析の応用範囲が拡大。



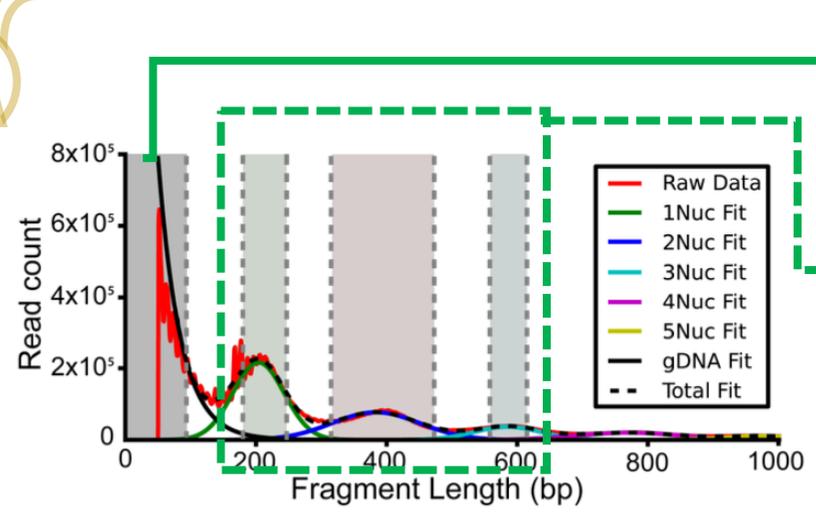
Buenrostro et al.  
Nat Methods  
10(12):1213-1218  
(2013)



Buenrostro et al.  
 Nat Methods  
 10(12):1213-1218  
 (2013)

**Rhelixa**  
 Decoding Life, Creating Future

# フラグメント長さによる区分



ATAC-seq:  
nucleosome-free reads

ATAC-seq:  
nucleosome signal

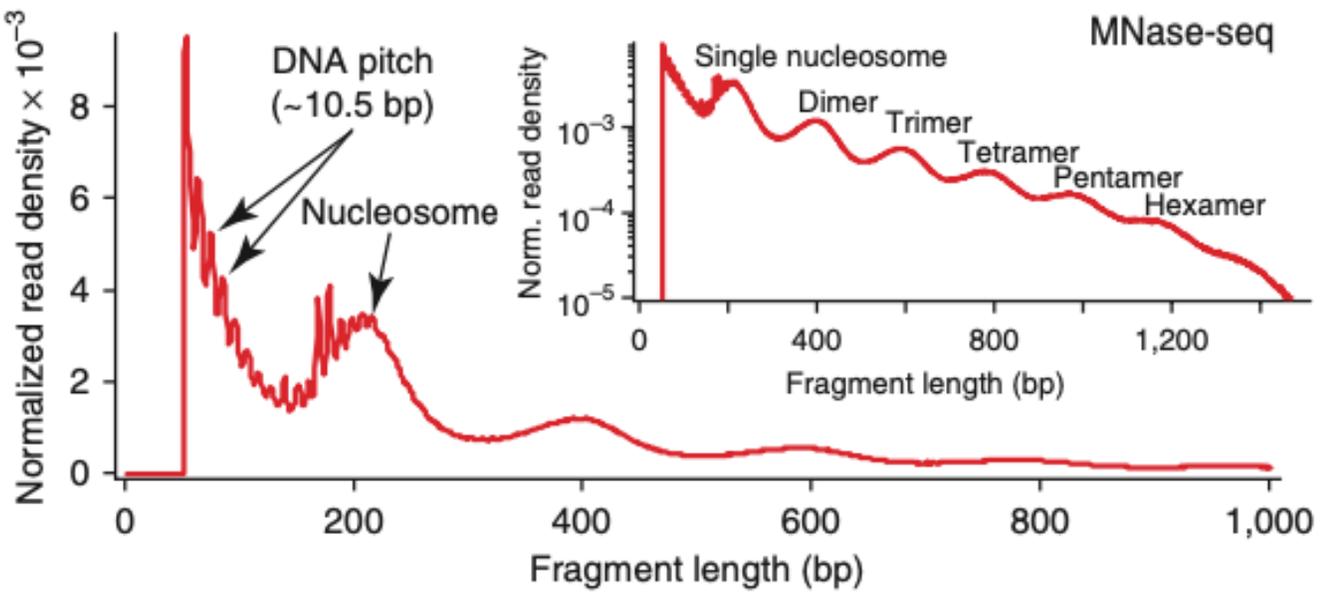
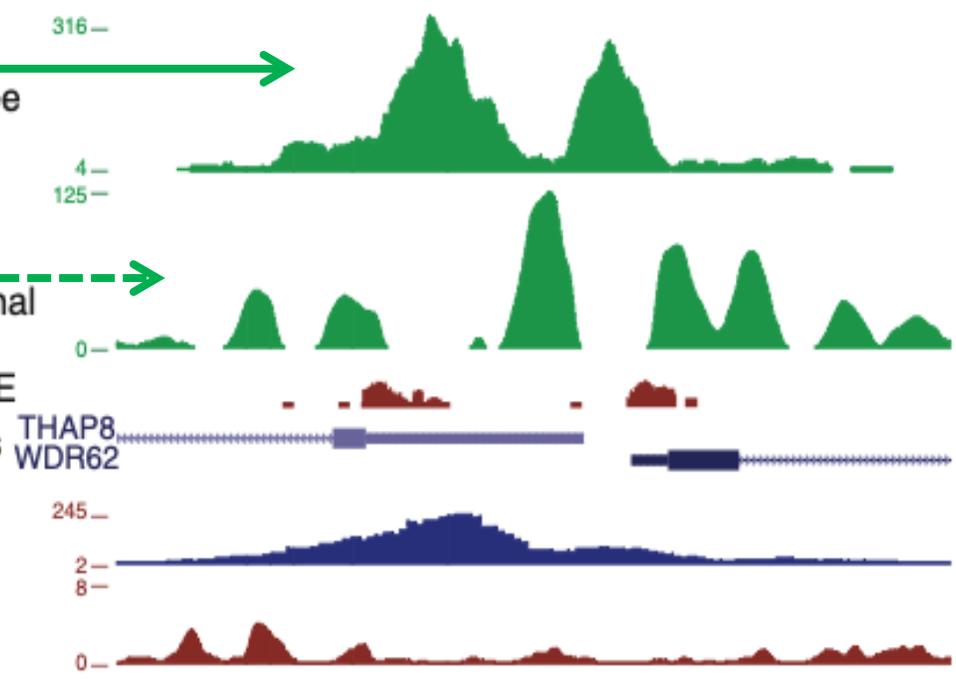
ENCODE CAGE

RefSeq genes

DNase (UW)

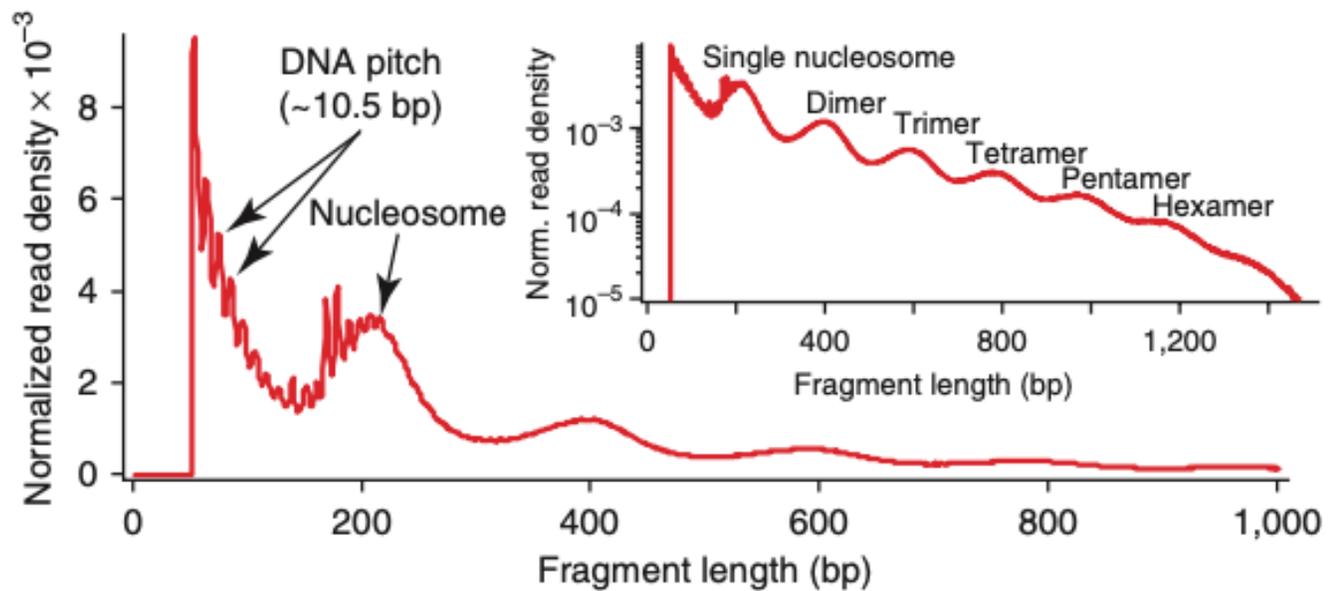
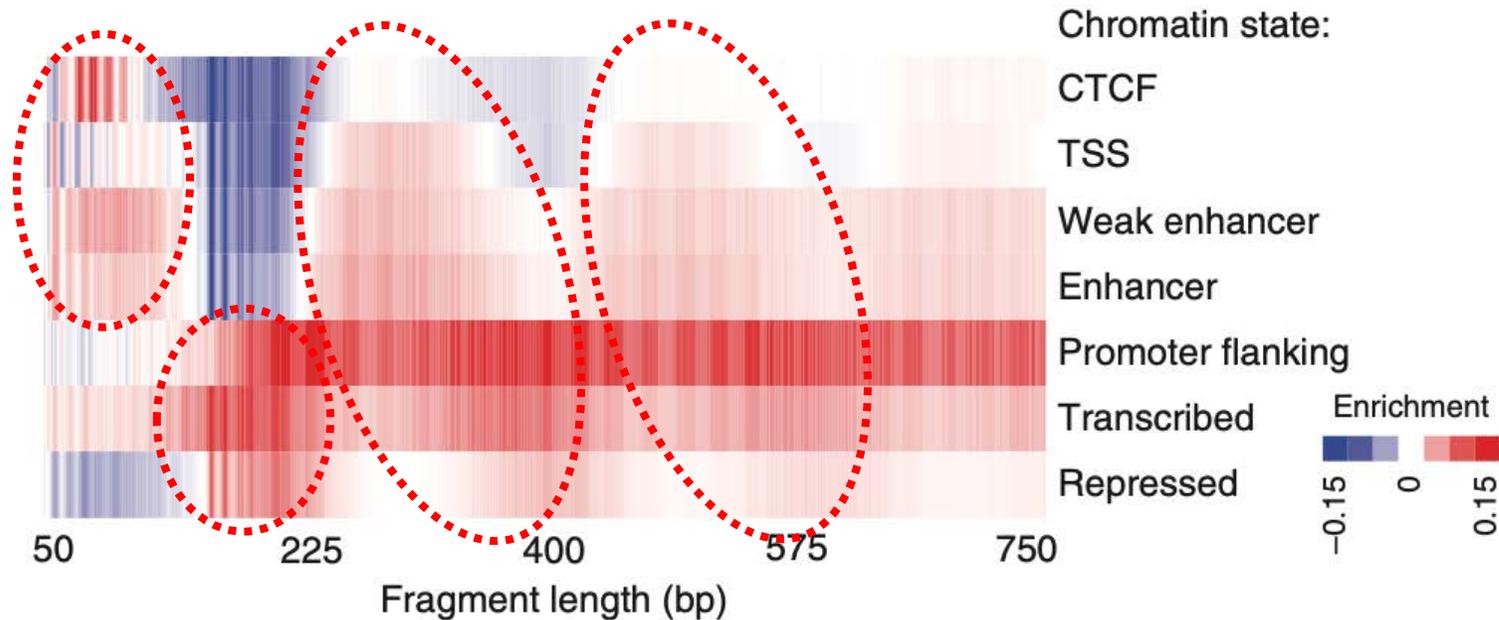
MNase-seq

Scale 1 kb | hg19  
Chr19: | 36,545,000 | 36,545,500 | 36,546,000 | 36,546,500 |



Buenrostro et al.  
Nat Methods  
10(12):1213-1218  
(2013)

フラグメント長さと  
periodicityの違い

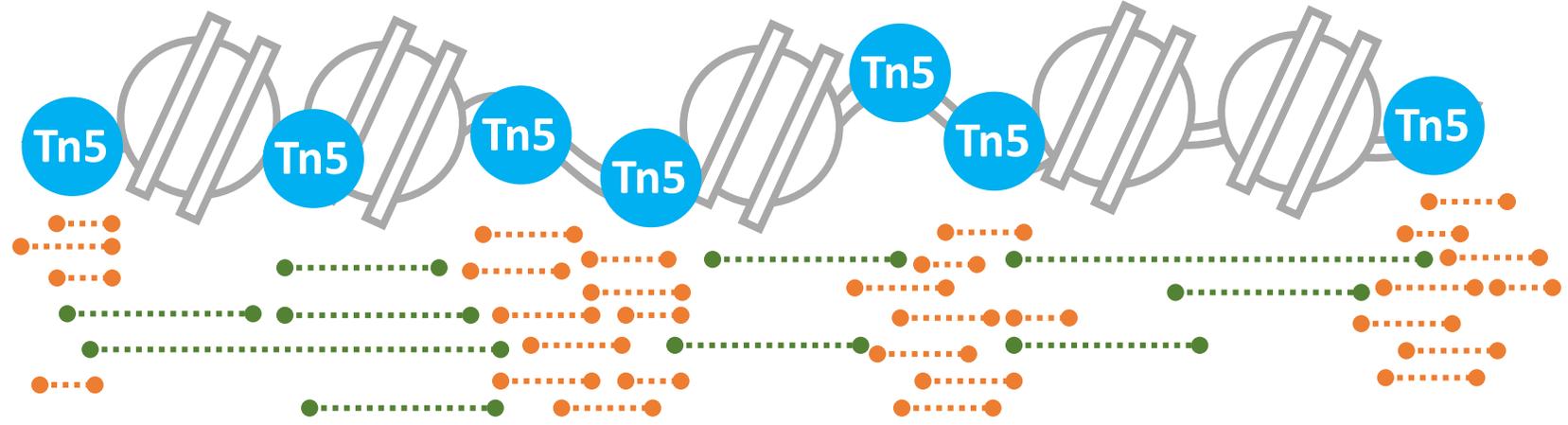


Buenrostro et al.  
Nat Methods  
10(12):1213-1218  
(2013)

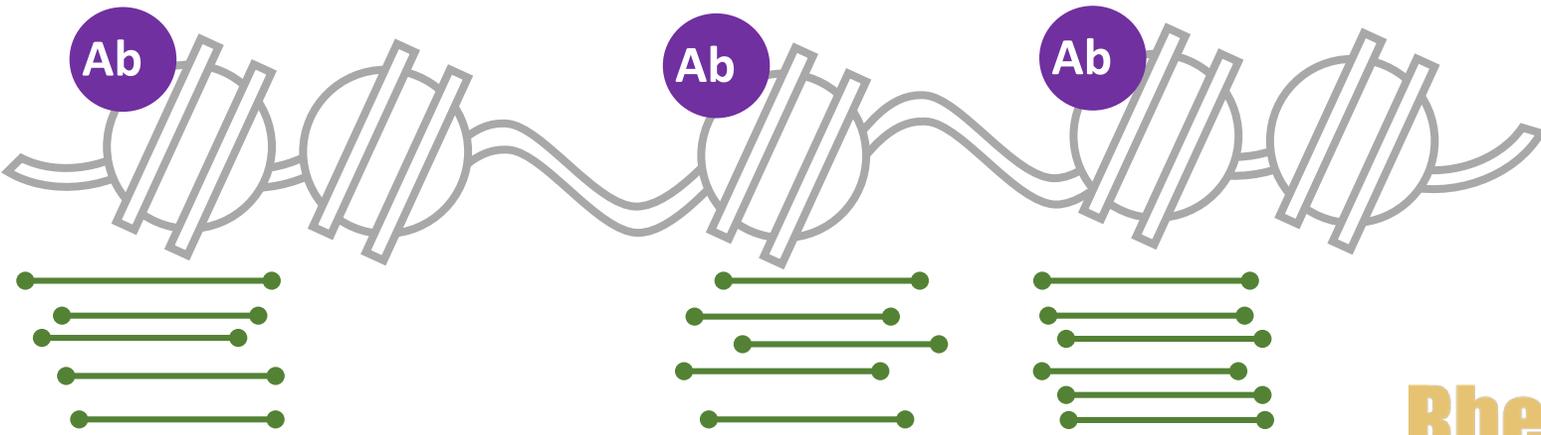
**Rhelixa**  
Decoding Life, Creating Future

# ChIP-seqとATAC-seqの解析方法の違い

ATAC-seq

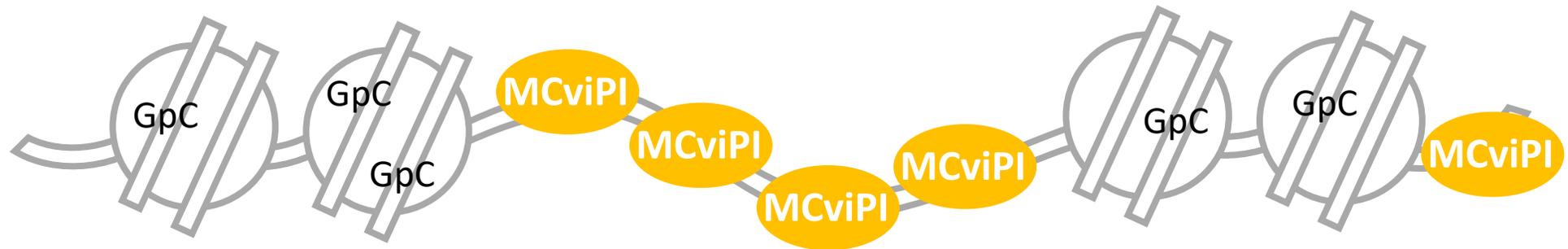


ChIP-seq

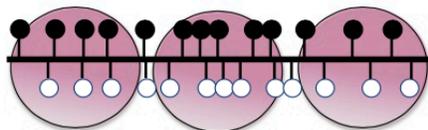


## NoME-seq:

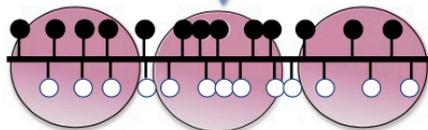
GpCメチルトランスフェラーゼ (M.CviPI) を使ってアクセシブル領域をマーク



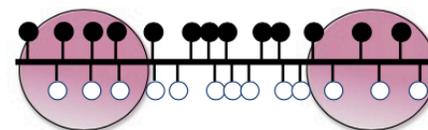
Methylated/  
Nucleosome Occupied



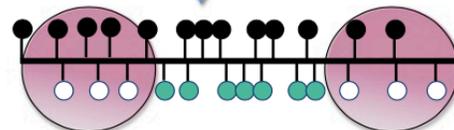
+ M.CviPI



Methylated/  
Nucleosome Depleted



+ M.CviPI

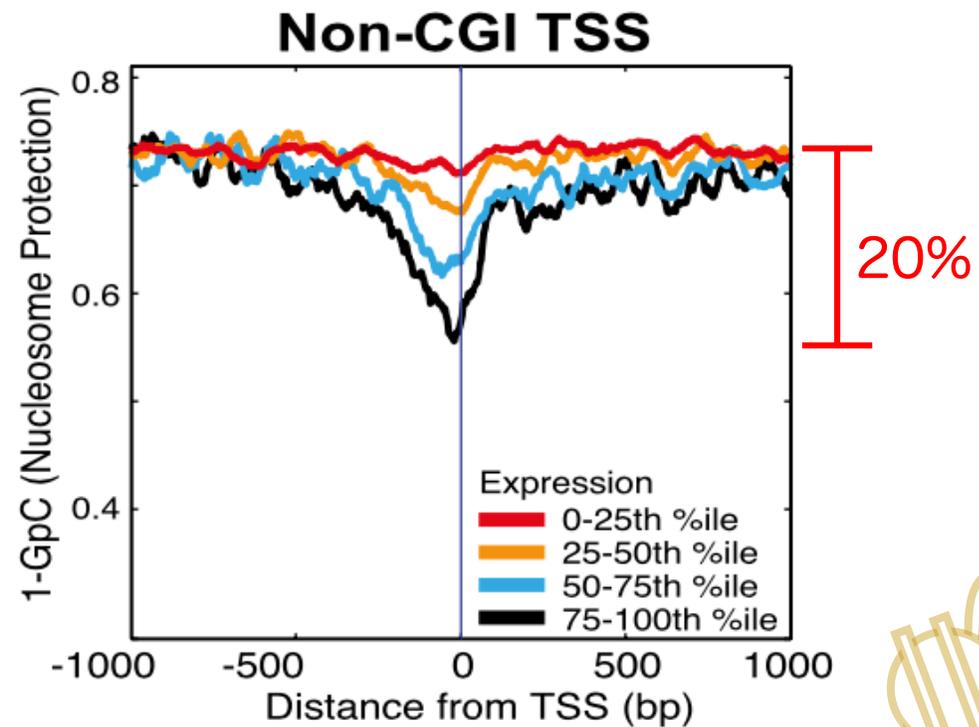
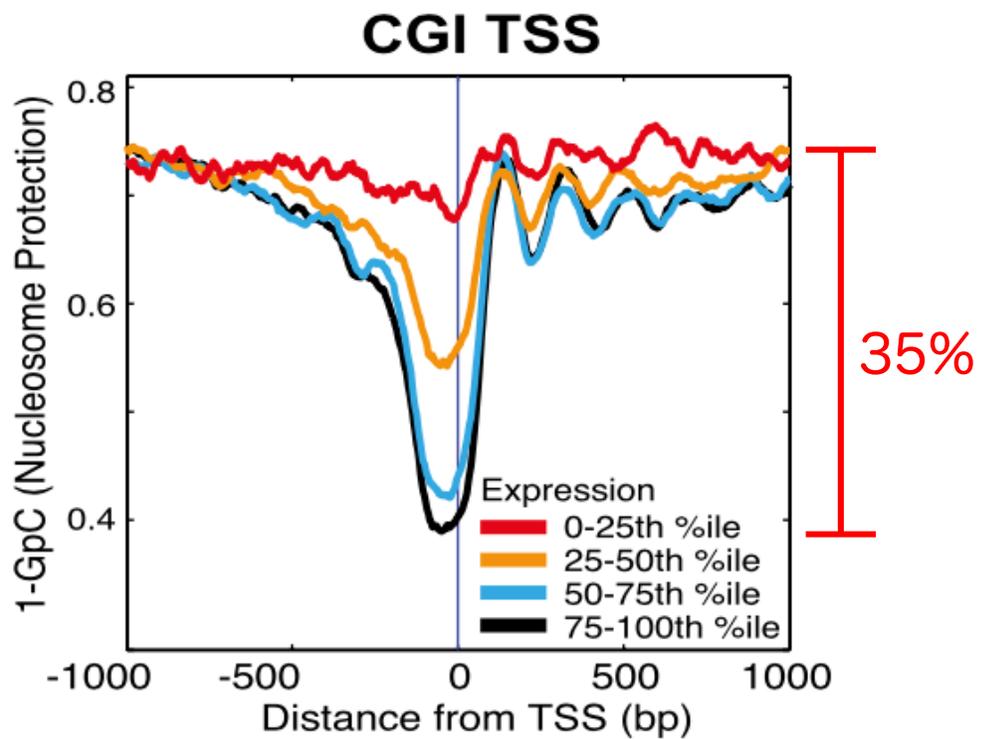


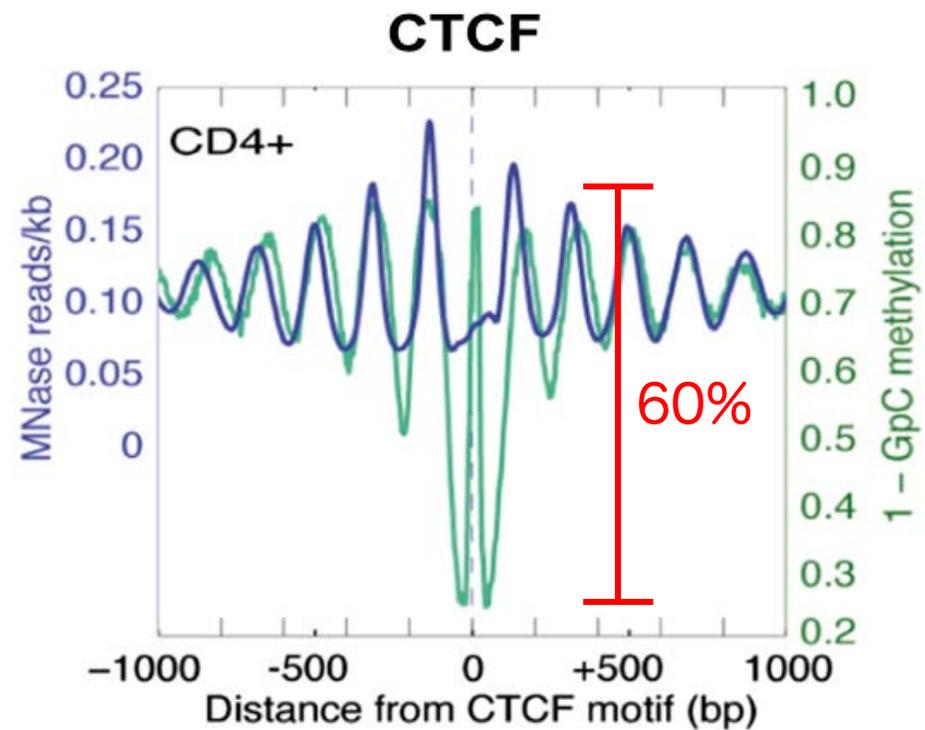
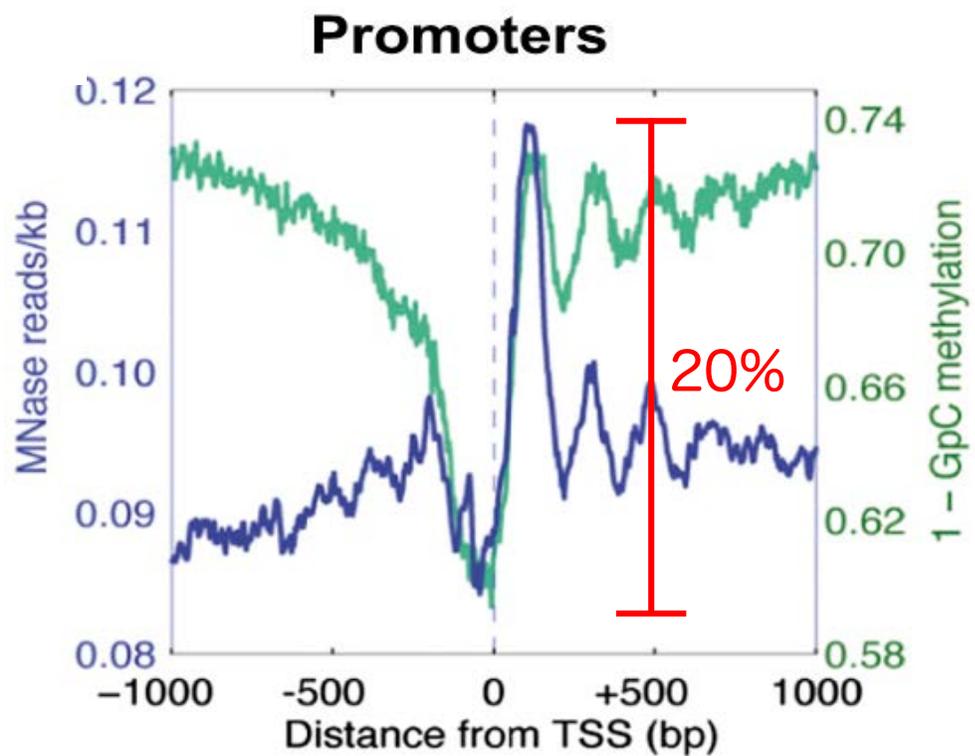
利点：正確なオープンゲノム（細胞・アレルごと）の割合がわかる。DNAメチル化も同時に見ることができる。

欠点：全ゲノム解析が必要。コスト高。

Kelly et al.  
Genome Res  
22:2497-2506 (2012).

### 発現量とオープンクロマチン領域の頻度



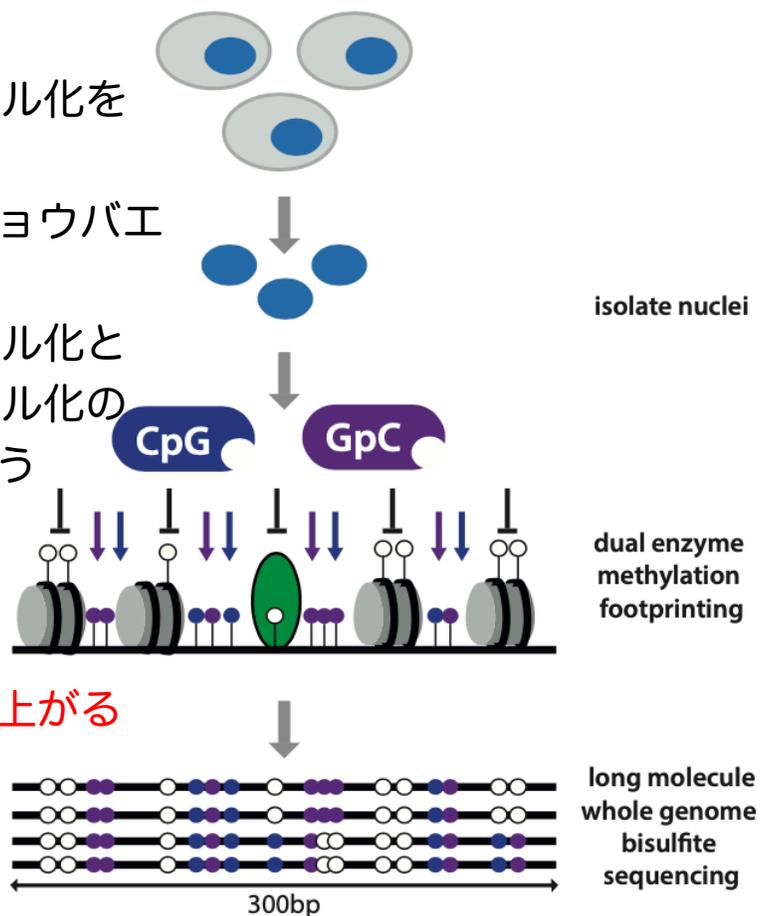


ショウジョウバエを用いた高密度NoME-seq:  
M.CviPIとSssIを使ってアクセシブル領域を高密度にマーク。

CpGメチル化を  
持たない  
ショウジョウバエ

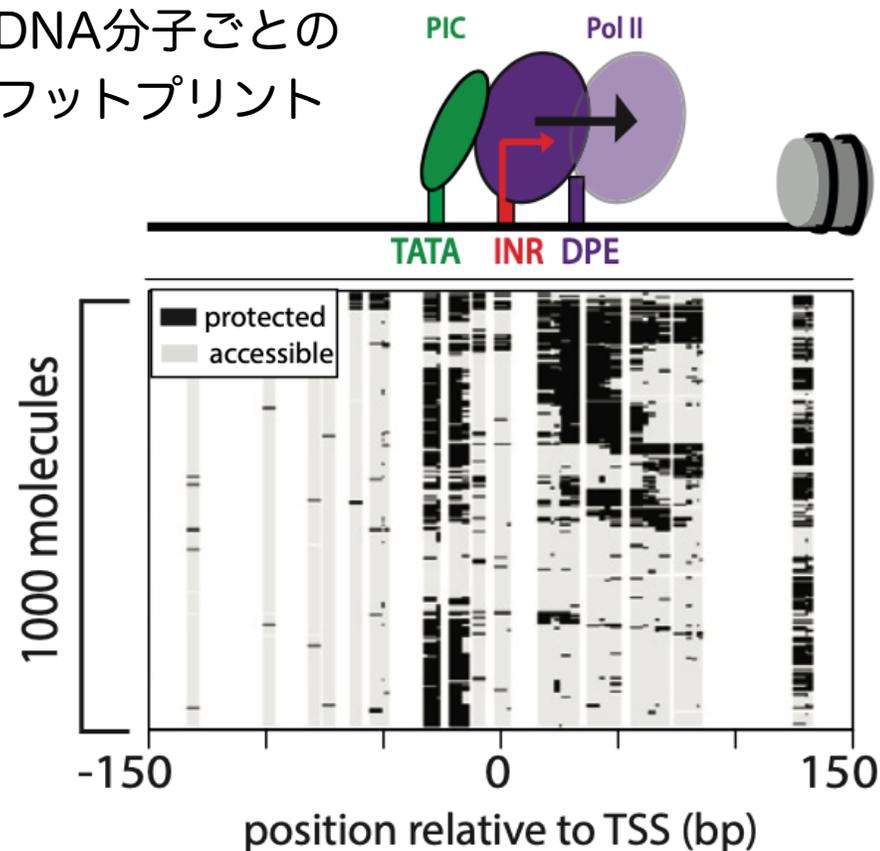
CpGメチル化と  
GpCメチル化の  
両方を行う

解像度が上がる



DNA分子ごとのパターンが得られる

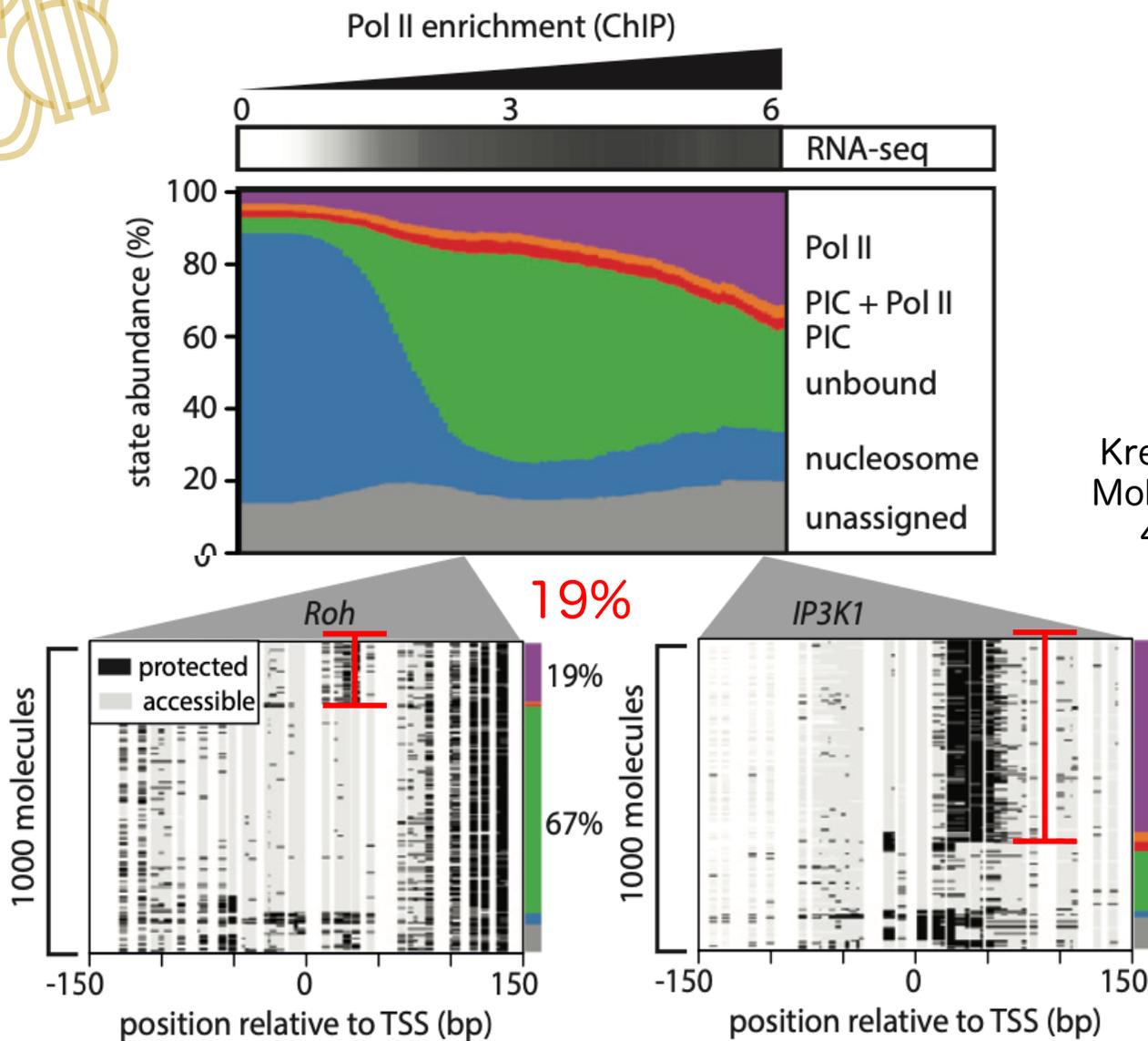
DNA分子ごとの  
フットプリント



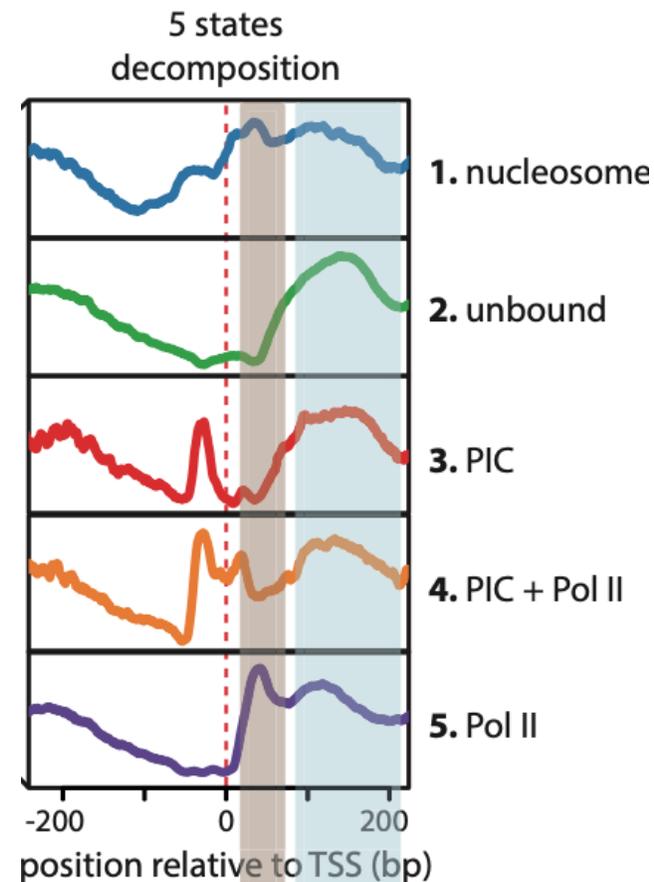
Krebs et al.  
Mol Cell 67,  
411-422  
(2017).

ヌクレオソームの有無と  
独立にPol IIの結合が発現と相関する

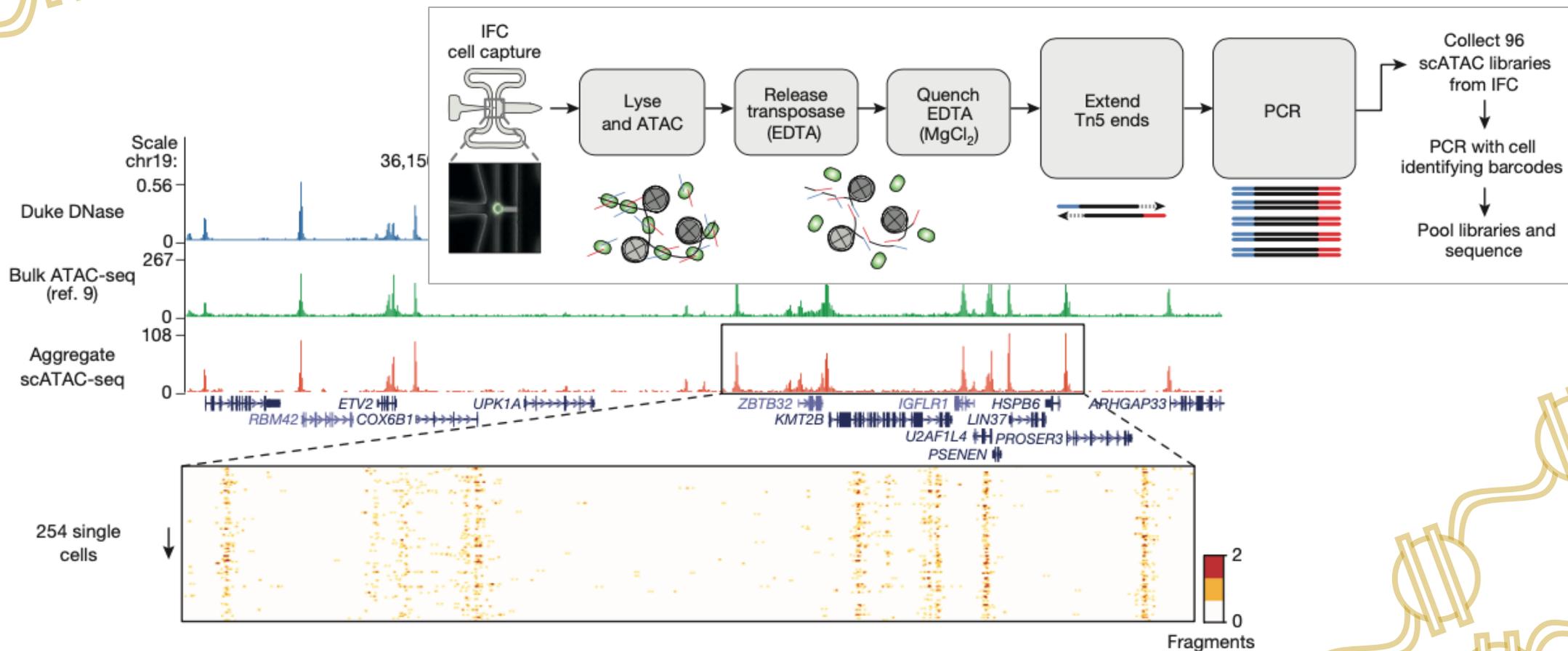
分子ごとにイベントが  
観測できる



Krebs et al.  
Mol Cell 67,  
411–422  
(2017).



# シングルセルATAC-seq: 1細胞ごとのオープンクロマチン領域の解析。



Buenrostro et al. Nature  
523:486-496 (2015)

**Rhelixa**  
Decoding Life, Creating Future

## 本日のテーマ

1. エピゲノム研究のデザイン
2. ATAC-seq: オープンクロマチン解析の原理と歴史
3. エピゲノム研究の応用



## ATAC-seq解析の応用

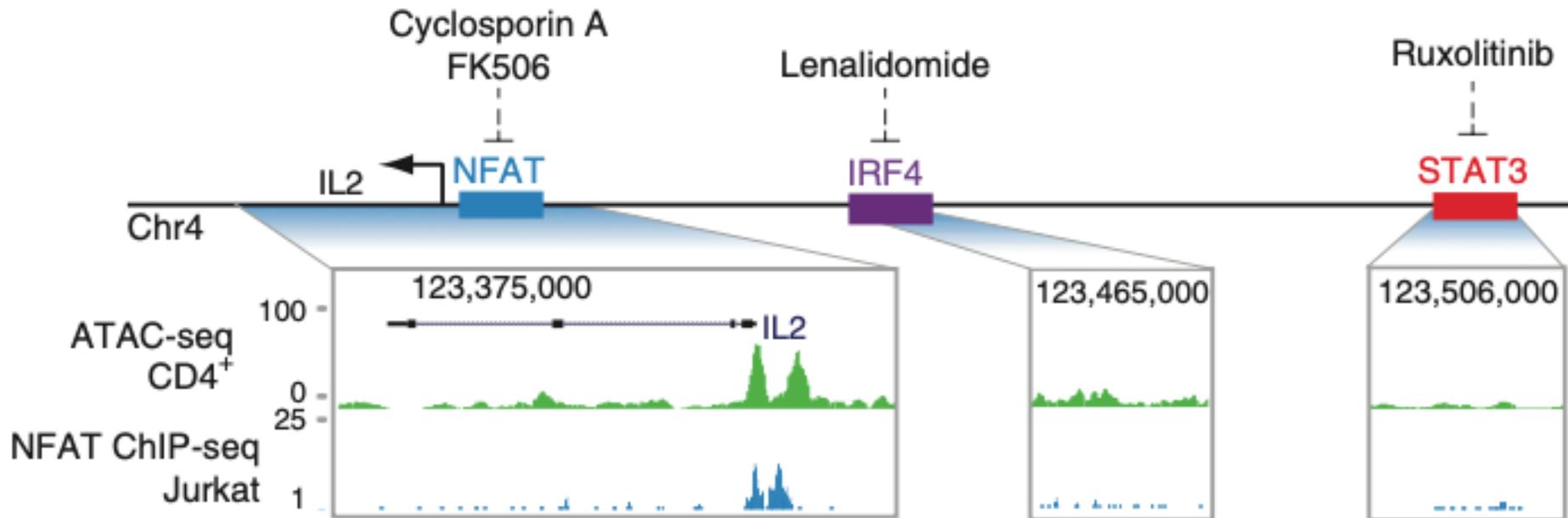
1. エンハンサーのアクセシビリティ解析
2. 転写因子フットプリント解析
3. アレル特異的アクセシビリティ解析の応用

## エンハンサーのアクセシビリティ解析:

ATAC-seqを用いて結合している転写因子を予想する。

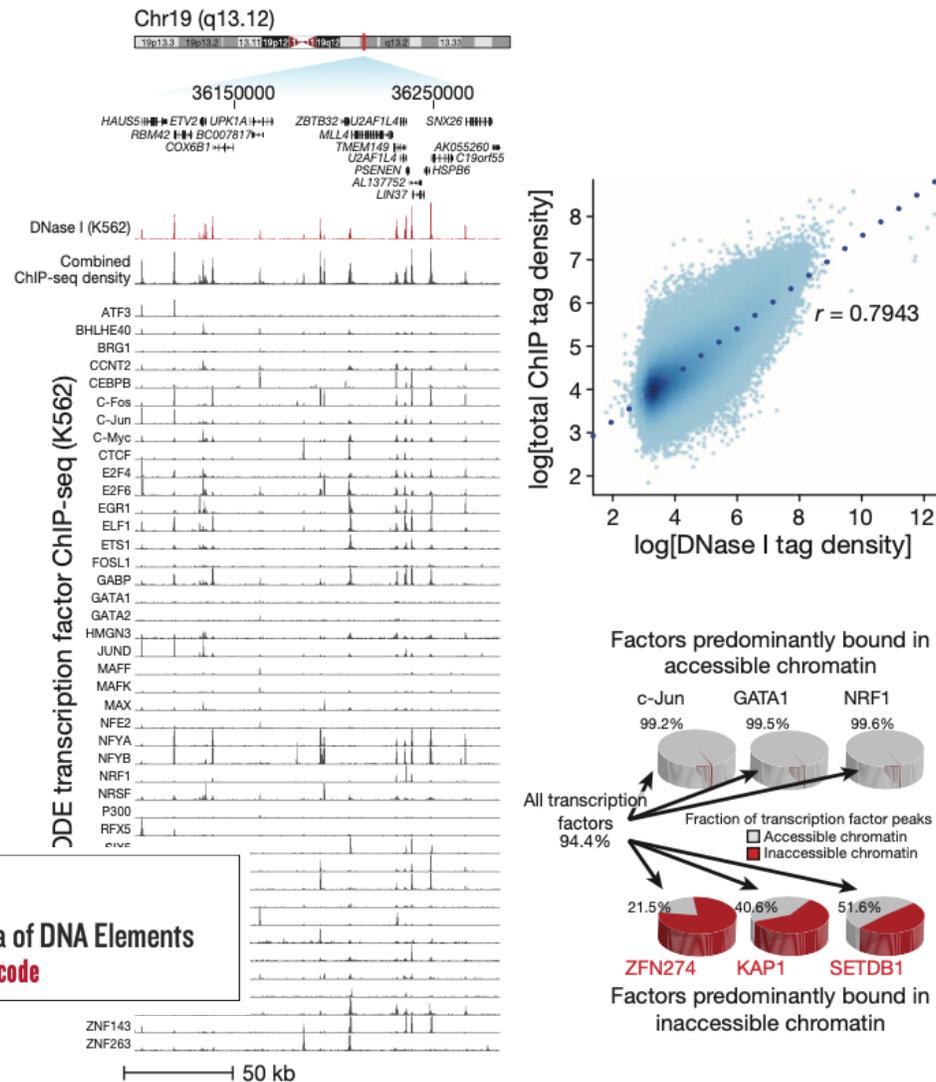
標的となる遺伝子がどの転写因子で制御されているか調べる。

→制御している転写因子に対する分子標的薬の選択ができる。



Buenrostro et al.  
Nat Methods  
10(12):1213-1218 (2013)

# エンハンサーのアクセシビリティ解析: ATAC-seqを用いて結合している転写因子を予想する。



ENCODE projectで解析された転写因子 1,108,081 ChIP-seqピークの94.4%がアクセシブル領域にあった。

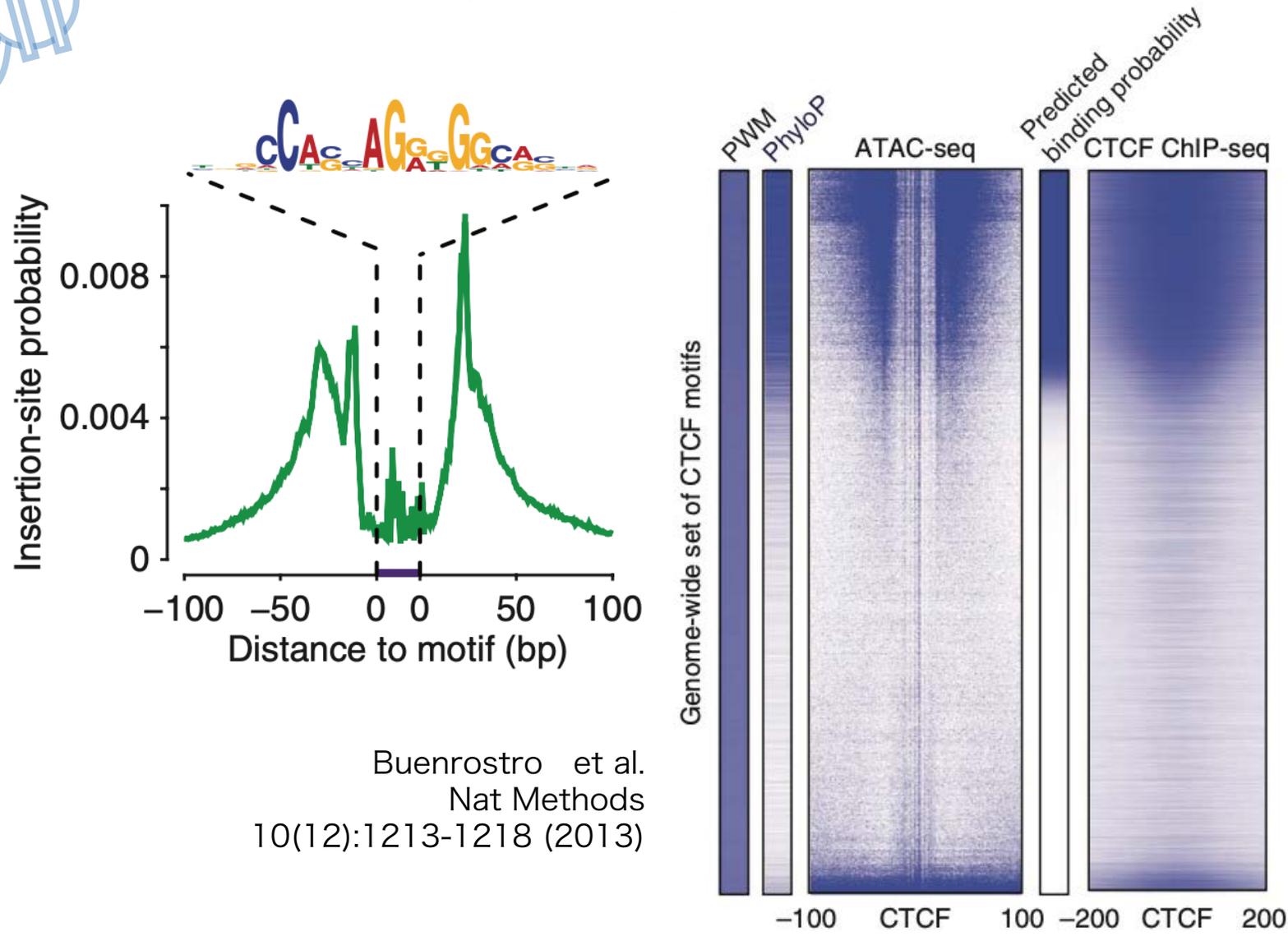
→ 遠位アクセシブル領域の多くは転写因子の結合を伴う。

→ 細胞の差異・変化によって生じるアクセシブル領域のモチーフ解析・ChIP-seq解析により制御転写因子が予想できる。

Thurman et al.  
Nature 489:75-82(2012)

**Rhelixa**  
Decoding Life, Creating Future

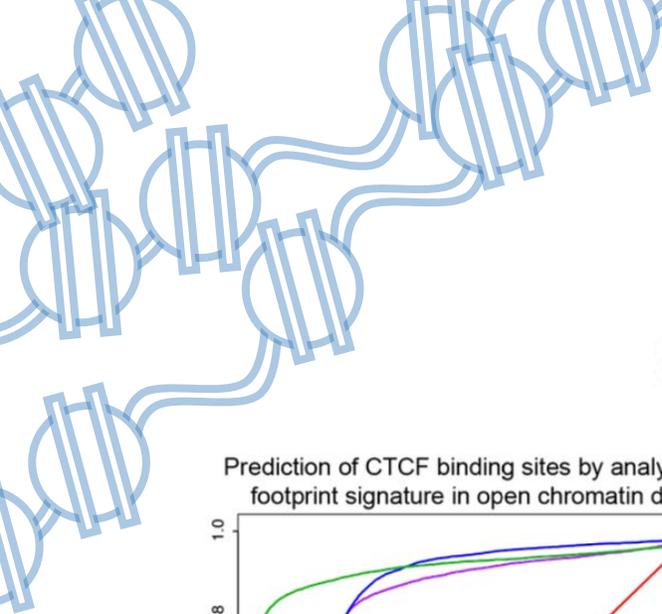
転写因子フットプリンティング解析:  
ATAC-seqを用いて転写因子の結合の有無を解析する。



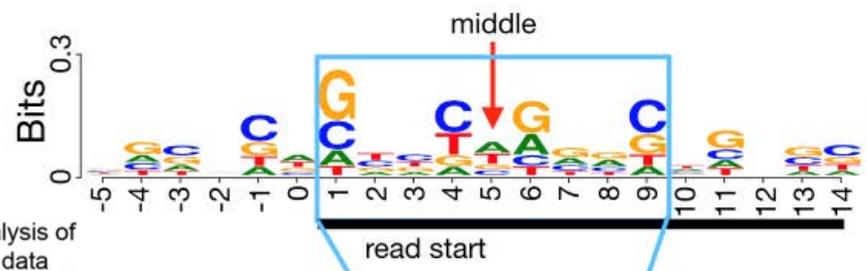
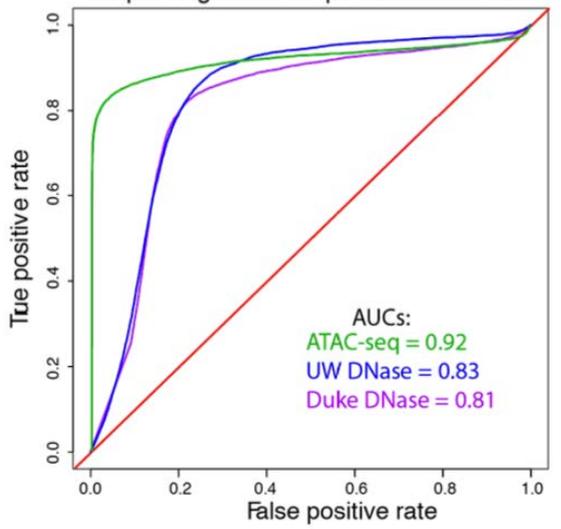
Buenrostro et al.  
Nat Methods  
10(12):1213-1218 (2013)

転写因子の結合は微細なアクセス性の違いをもたらす。

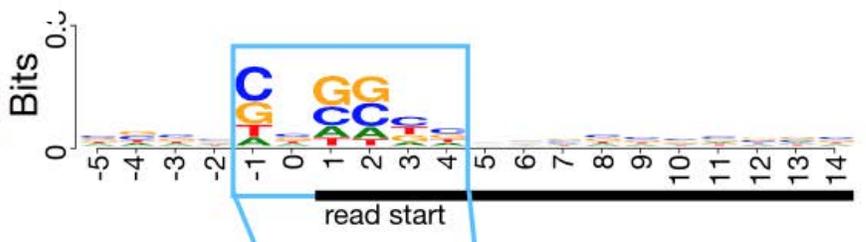
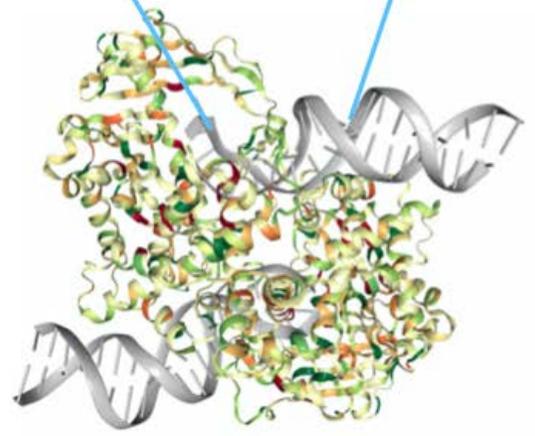
→アクセシブル領域のうち、特定の結合配列モチーフを持つ領域で共通のフットプリントが生成されるかどうかで実際の結合を予測できる。



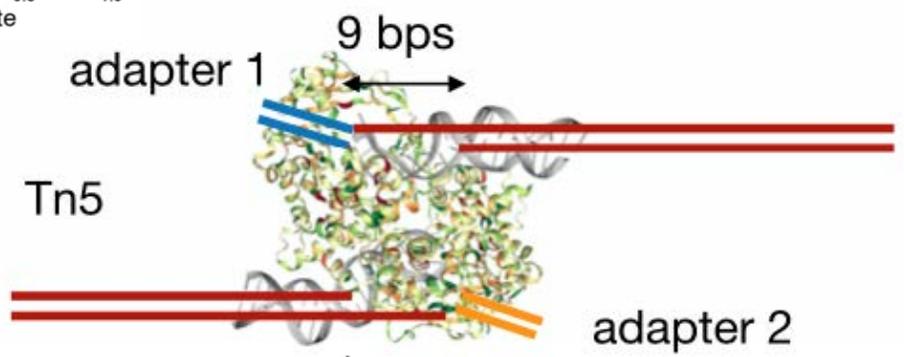
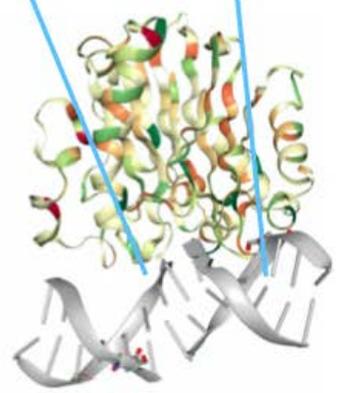
Prediction of CTCF binding sites by analysis of footprint signature in open chromatin data



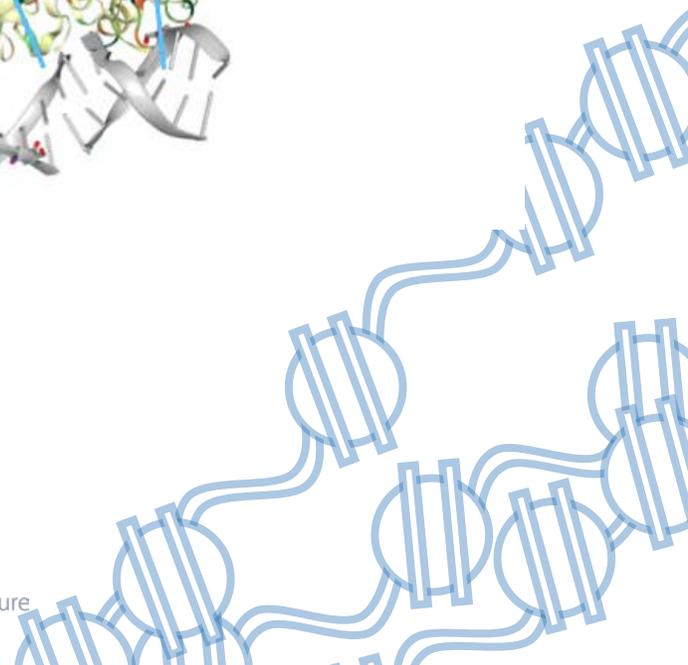
Tn5



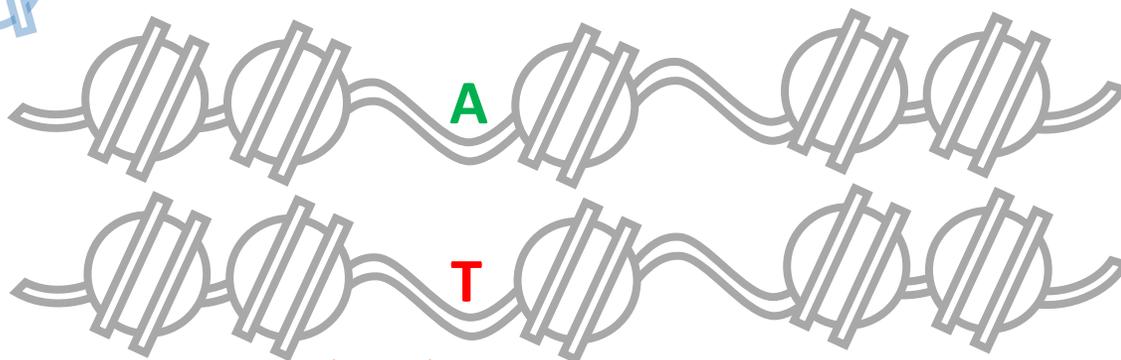
DNase-I



Li et al.  
Genome Biology  
20:45 (2019)

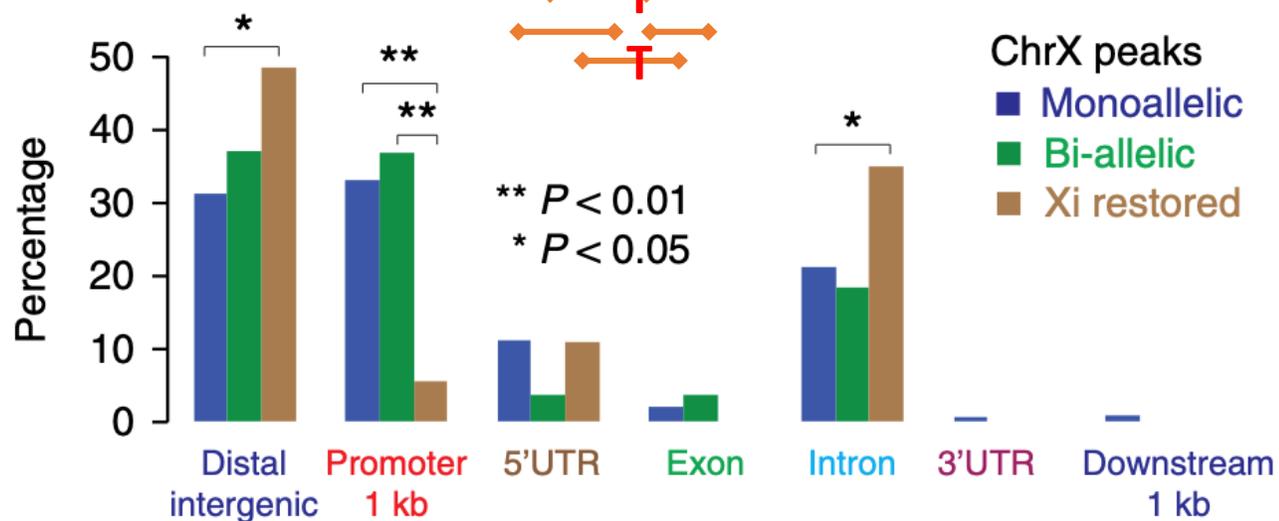


## アレル特異的なアクセシビリティ解析: 活性のあるゲノム・制御領域を見分ける。



アクセシブルな領域から配列情報が得られる。

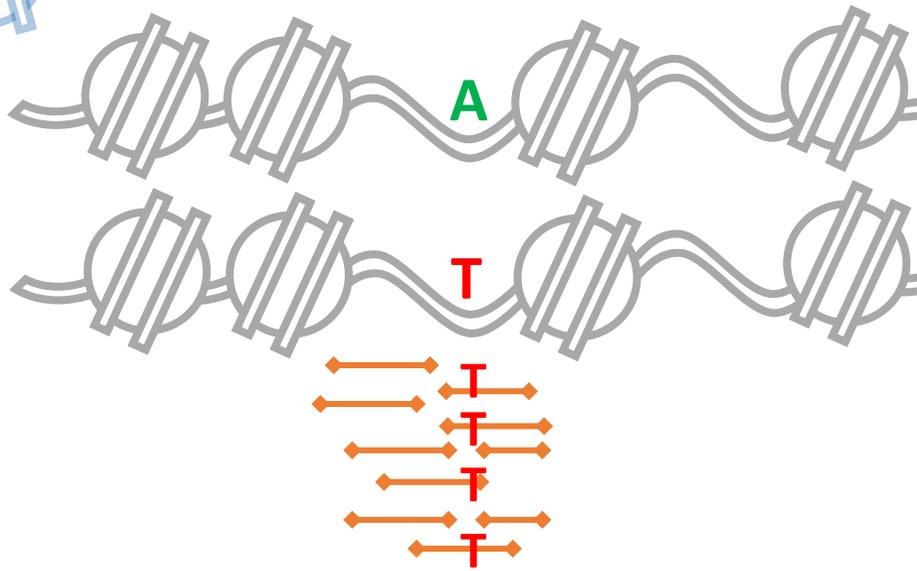
→ 活性のあるアレルを特定できる。



Xu et al. Nat Genet  
49(3):377-386 (2017)

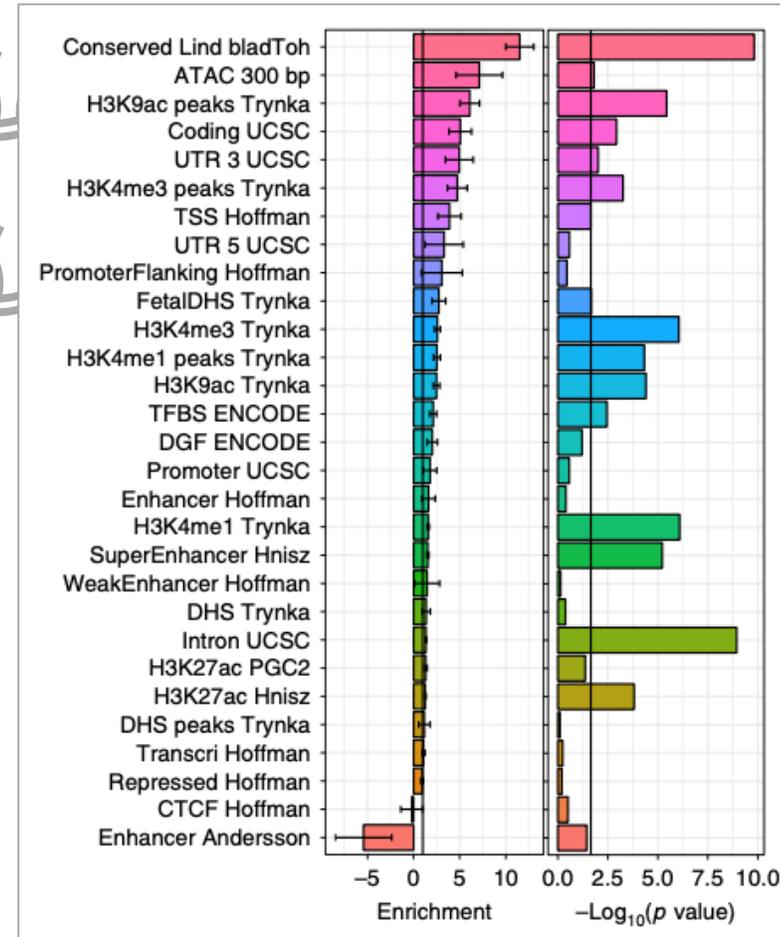
Jégu et al.  
Nat Struct Cell Biol  
26:96-109 (2019)

## アレル特異的なアクセシビリティ解析: 活性のあるゲノム・制御領域を見分ける。



制御領域の配列の違いは、アレルによる遺伝子機能の差を生み出す。

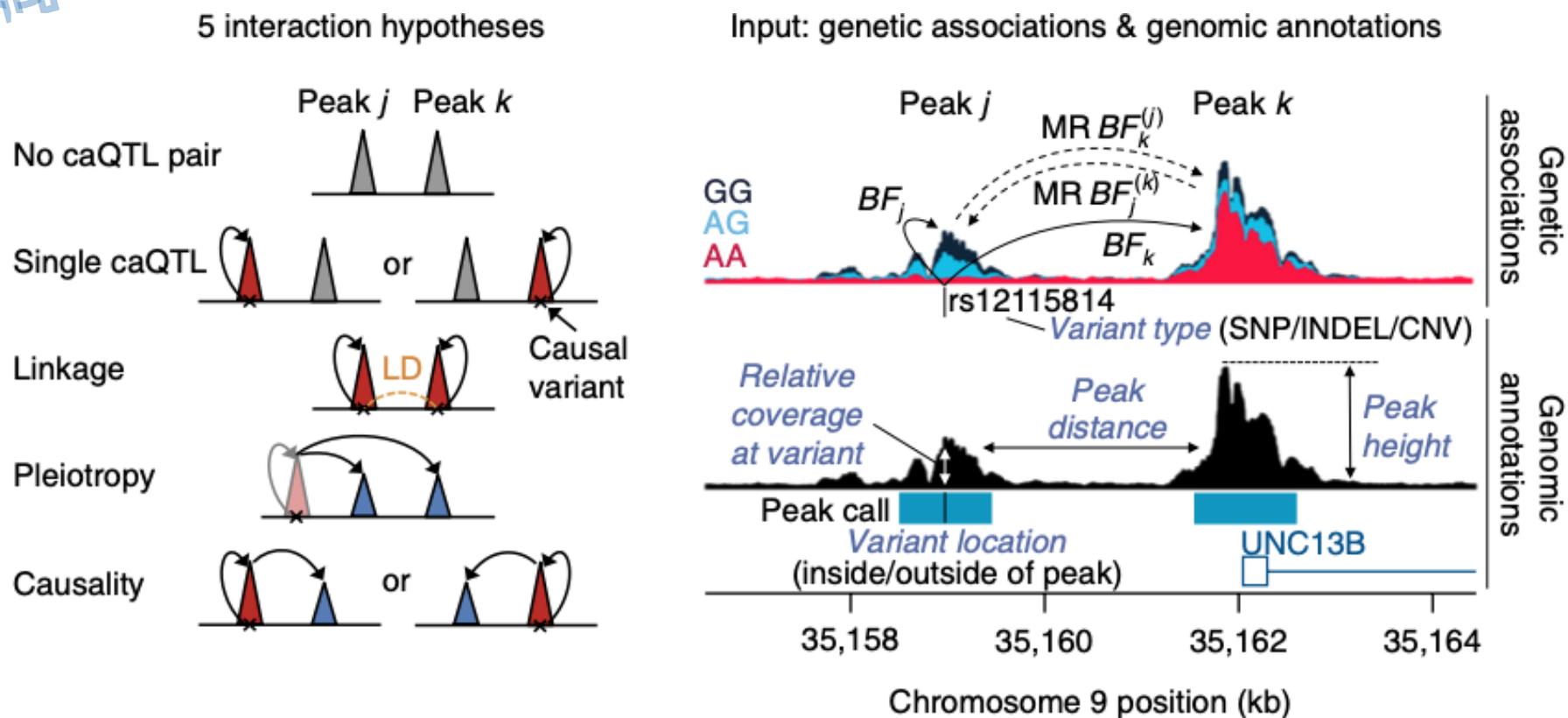
→ アクセシブル領域には、疾患に關与するコード領域外の機能的SNPが多く含まれる。



全ゲノム解析から得られた統合失調症SNPはATACピークに濃縮されていた。

Bryois e tal.  
Nat Commun  
9:3121(2018)

# アレル特異的なアクセシビリティ解析: 活性のあるゲノム・制御領域を見分ける。

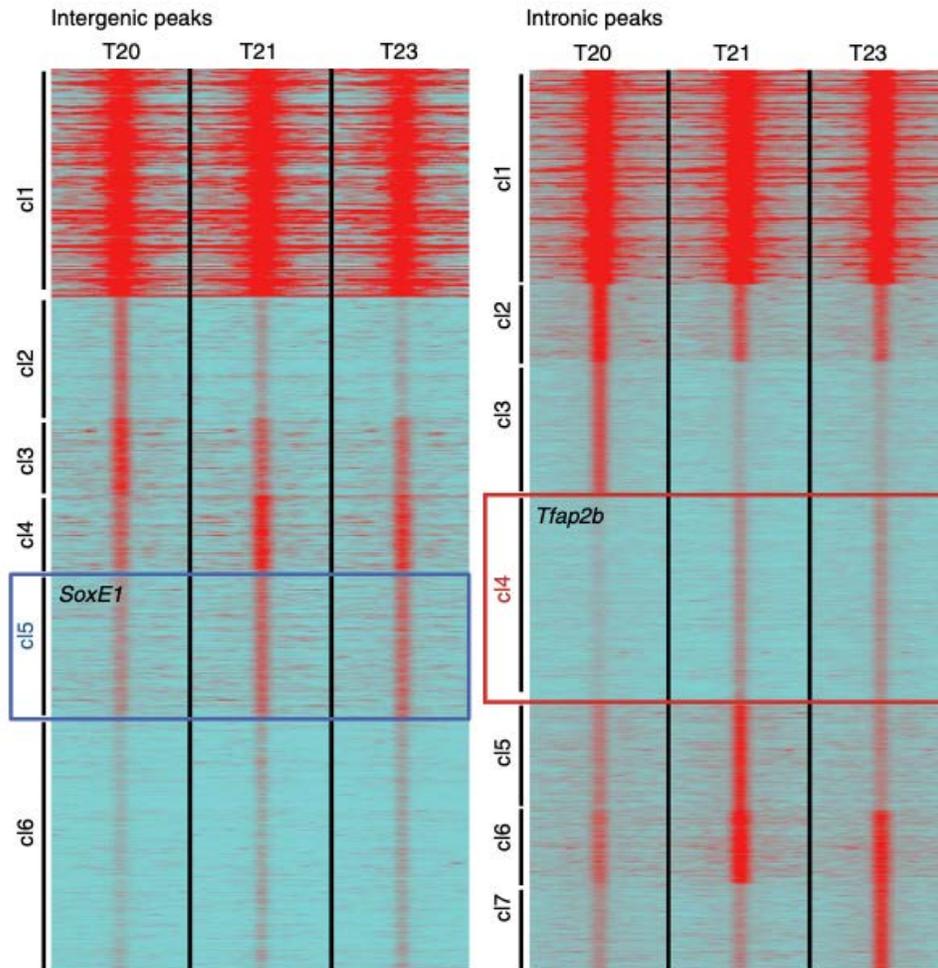


ゲノム変異情報とクロマチン  
状態から因果関係を推測。

Kumasaka et al.  
Nat Genet  
51:128-137 (2019)

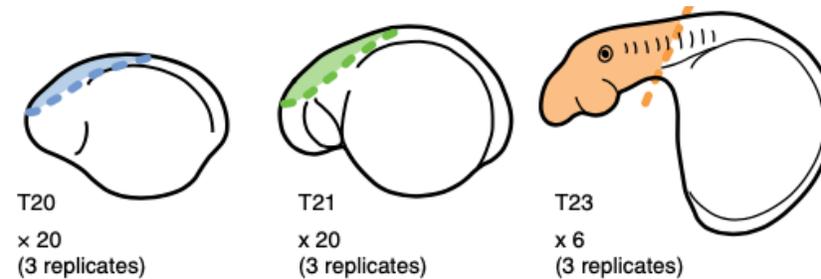
**Rhelixa**  
Decoding Life, Creating Future

## アレル特異的なアクセシビリティ解析: 活性のあるゲノム・制御領域を見分ける。



ATAC-seqにより、少量・特異的な組織領域におけるゲノムの機能領域を濃縮できる。

→ ゲノム情報の少ない生物種でも機能アノテーションが容易に。



ヤツメウナギ亜種の比較による  
制御領域の進化的変化の検証。

Hockman et al.  
Nat Commun  
10:4689 (2019)

**Rhelixa**  
Decoding Life, Creating Future

## 本日のテーマ

1. エピゲノム研究のデザイン
2. ATAC-seq: オープンクロマチン解析の原理と歴史
3. エピゲノム研究の応用



# EPIGENOME

エピゲノムで、生き物の当たり前を超えていく。

Rhelixaはエピゲノム解析のリーディングカンパニーです。

ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームを独自の技術で解析し、  
研究開発の効率・精度を格段に向上させます。



## Rhelixa

Decoding Life, Creating Future

**小田 真由美** 博士（獣医学）

研究開発部 シニアマネージャー

慶應義塾大学医学部 非常勤講師



多様なバイオインフォマティクスニーズに応える  
Rhelixaの次世代シーケンス・データ解析受託サービス

- ✓ 目的に応じた適切な解析プランを提案
- ✓ 豊富なカスタム解析オプション・選べるプラン

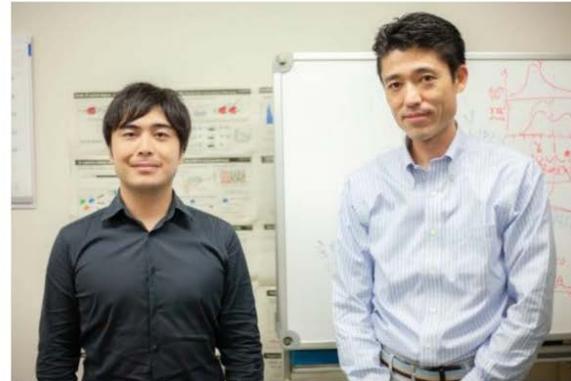
## お客様の声

VOICE OF CUSTOMER

サービスの詳細はウェブサイトでは

レリクサ

検索



東京大学アイソトープ総合センター  
教授 秋光信佳 先生

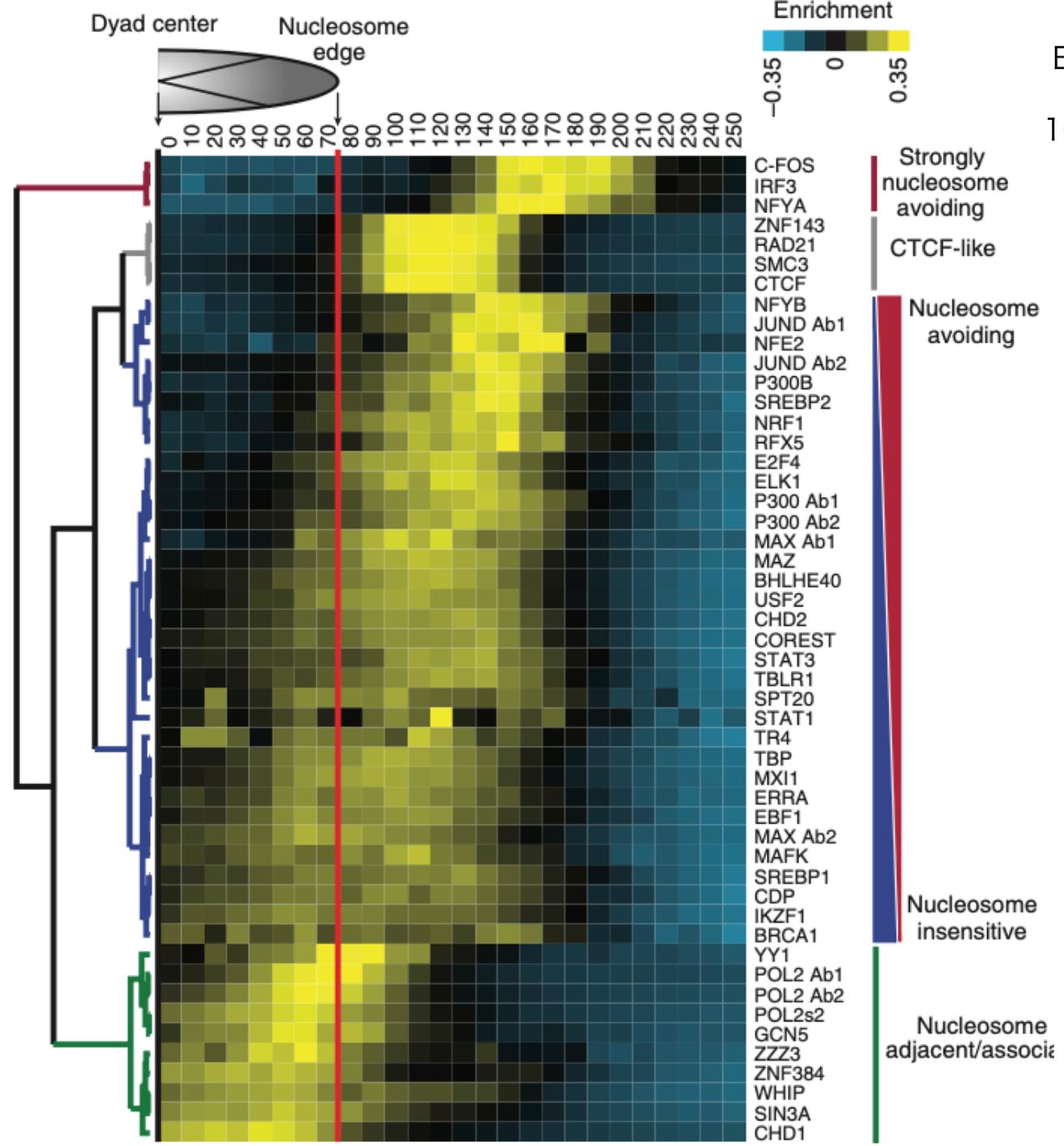
実際のお客様の声として、過去にRhelixaのエピゲノム解析を用いて論文を発表された東京大学アイソトープ総合センター教授 秋光信佳先生に、弊社代表仲木も同席してお話を伺いました。





Buenrostro et al.  
Nat Methods  
10(12):1213-1218  
(2013)

# ENCODE project データから計算された 転写因子結合部位との 距離



## 他の修飾・モチーフとの相関

