

次世代エピゲノム解析手法 CUT&Tag に適したマグネットビーズの開発

1. 発表者：

藤原 靖浩（東京大学定量生命科学研究所病態発生制御研究分野 助教）
牧野 吉倫（東京大学定量生命科学研究所病態発生制御研究分野 助教（研究当時））
岡田 由紀（東京大学定量生命科学研究所病態発生制御研究分野 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆CUT&Tag 法（注1）に適したマグネットビーズ（注2）の改良に成功。
- ◆細胞と結合したマグネットビーズがダマになりにくく操作性が向上し、CUT&Tag の感度が向上する。
- ◆最新のエピゲノム解析（注3）技術をより多くの人々が快適に行えるようになると期待される。

3. 発表概要：

CUT&Tag 法は、少量の細胞で目的タンパク質等のゲノム局在を高解像度に解析することができるエピゲノム解析手法であり、これまで主流であった ChIP-seq 法に代わる次世代の実験手法として期待されている。しかし、既存の CUT&Tag 法プロトコルで使われる細胞吸着マグネットビーズは、ダマになりやすく懸濁性が悪いため酵素反応などを阻害する懸念があった。東京大学定量生命科学研究所の岡田由紀教授らのグループは、疎水性のマグネットビーズを改良することでダマが生じにくくし、CUT&Tag に適したビーズの開発に成功した。この改良型マグネットビーズを使用すると、細胞の操作性が向上しただけでなく、従来のビーズと比べて高い感度でヒト培養細胞の H3K4me3 を検出した。近年、エピジェネティクス（注4）研究分野において多くの研究者が CUT&Tag 法を使うようになってきており、今回開発した改良型マグネットビーズを使用することで、より多くの研究者が少ないトラブルでエピゲノム解析を行えるようになることが期待される。

4. 発表内容：

エピジェネティクス研究において、転写因子やエピゲノム修飾がゲノム上のどこに存在するかを知ることは極めて重要である。この目的のために、近年まではクロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-seq）法が主流であった。しかし、ChIP-seq 法では多くの細胞が必要となるため、希少細胞や生検材料に用いることが難しい上に、高い解像度で転写因子やエピゲノム修飾の局在を調べる事がしばしば困難であった。近年 Henikoff 教授らによって開発された CUT&Tag 法は、これらの問題点を克服し、少量の細胞で目的タンパク質等のゲノム局在を高解像度に解析することができる新たなエピゲノム解析手法である。この CUT&Tag 法では、解析対象となる細胞をマグネットビーズに吸着させることで、少数細胞であっても、酵素反応や抗体反応を効率よく行えるよう工夫されている。しかしながら、既存の CUT&Tag 法プロトコルで使われる細胞吸着用マグネットビーズは、細胞を吸着すると凝集しやすい、サンプリングチューブの壁面に付着しやすい等、操作性や懸濁性に問題があった。特に懸濁性の悪化は、酵素や抗体の反応を阻害する懸念があり、改善が求められていた。

研究グループは、上記のマグネットビーズの代替として、細胞を吸着させる作用を持つ concanavalin A (conA) という物質を結合した改良型マグネットビーズを開発した (図左)。この改良型マグネットビーズは水や細胞をはじく性質を持つ疎水性表面を有することから、細胞吸着後であっても凝集することなく、懸濁性が飛躍的に改善した (図中)。サンプリングチューブ壁へのビーズの付着・残存も軽減し、細胞のロスを減らすことができた。次に、従来のマグネットビーズと改良型マグネットビーズを使用して CUT&Tag 法を行い、ヒト培養細胞におけるヒストン修飾 (H3K4me3) のゲノム局在を比較解析した。その結果、改良型マグネットビーズは、従来型マグネットビーズと比較して、より高い感度でヒストン修飾を検出できた (図右)。これらの結果は、改良型マグネットビーズの懸濁性が改善されることで、抗体反応や酵素反応が改善した結果だと思われる。

近年は少数細胞・希少細胞を対象としたエピゲノム研究が盛んになり、多くの研究者が ChIP-seq の代わりに CUT&Tag 法を使うようになってきている。したがって、CUT&Tag 法の検出感度をさらに高めることができる改良型マグネットビーズは、CUT&Tag 法の普及とともに今後エピゲノム研究分野の発展に貢献することが期待される。さらに今回は疎水性表面のビーズを用いたが、他にも異なる種類のビーズが市販されており使用可能であることから、解析する細胞の種類に応じた使い分けも可能である。細胞操作を容易で効率に行うことが可能である本研究で開発したマグネットビーズは、エピゲノム研究のみならず様々な研究分野への応用展開が期待される。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「PLOS ONE」 (オンライン版：11月17日公開)

論文タイトル：Preparation of optimized concanavalin A-conjugated Dynabeads® magnetic beads for CUT&Tag

著者：Yasuhiro Fujiwara*, Yuji Tanno, Hiroki Sugishita, Yusuke Kishi, Yoshinori Makino, Yuki Okada

DOI 番号：10.1371/journal.pone.0259846

URL：<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259846>

6. 問い合わせ先：

東京大学定量生命科学研究so病態発生制御研究分野

教授 岡田由紀

Tel: 03-5841-7831

E-mail: ytokada@iqb.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

(注1) CUT&Tag：近年開発されたエピゲノム解析手法の一つ。トランスポザーゼの一種である Tn5 を使用し、抗体が認識した標的因子近傍のゲノムを切断しアダプター塩基配列を挿入することで、標的因子のゲノム局在を研究することのできる手法である。極めて特異性が高いことから、必要となる細胞数が少数で済み、検出感度が極めて高いことが特徴である。

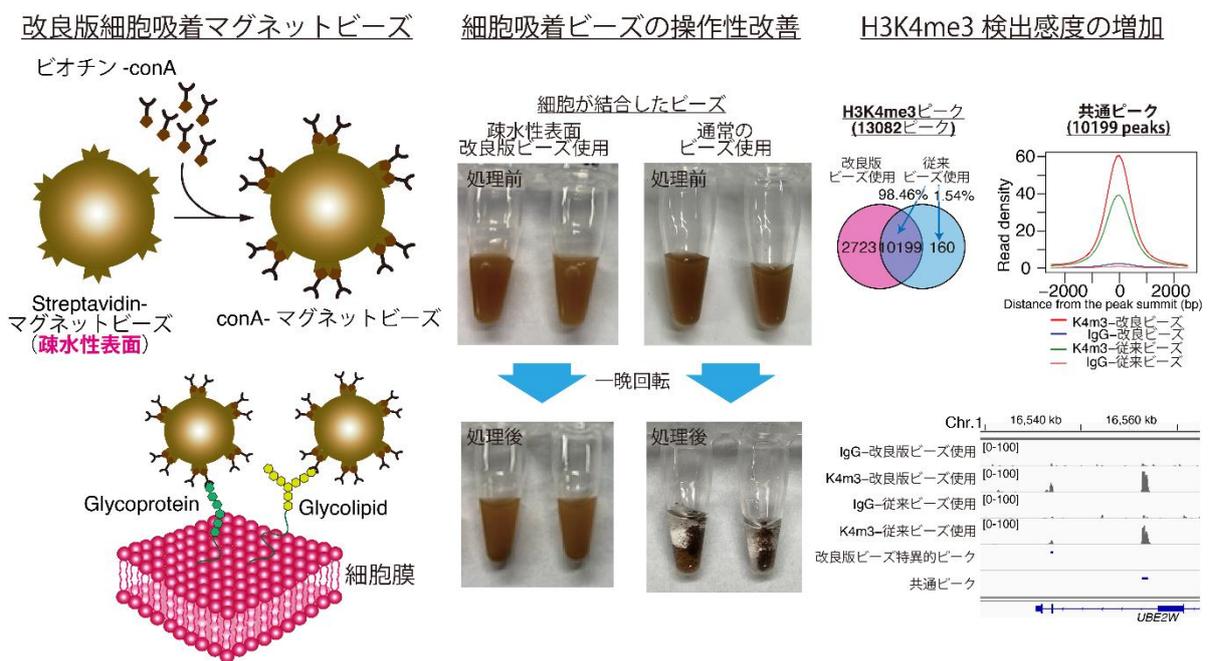
(注2) マグネットビーズ：特殊な表面が施された生化学実験用の磁気ビーズ。用途に応じて様々な種類が販売されており、大きさは、直径 1-3µm 程である。ビーズ表面に付加する物質を変えることで、核酸、抗体、タンパク質、細胞などを吸着させることができる。それによ

り、目的の物質を吸着させ、溶媒を変える作業が容易になり、多種多様な生化学反応を試すことができる。

(注3) エピゲノム解析：転写因子やヒストン修飾などのエピジェネティクス因子が、ゲノム上のどのような領域に局在するかを調べる解析方法。

(注4) エピジェネティクス：DNA上の塩基配列変化に依存せず、DNAのメチル化やヒストン修飾などの非塩基配列情報によって遺伝子発現や細胞表現型が制御される現象。

8. 添付資料：



疎水性表面のマグネットビーズと conA を組み合わせることで、細胞の操作性が改善！！