

Short Report

モデルきのこ「ウシグソヒトヨタケ」のヌクレオソーム解析

栄養菌糸細胞のヌクレオソーム分布

村口元, 増田亮, 浅野亮樹, 岡野桂樹

秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

細胞核内において DNA はヒストン 8 量体に巻き付いてヌクレオソーム構造を作り、さらに凝集したクロマチン構造をとっている。ヌクレオソーム分布と遺伝子発現の関連が様々な生物で明らかにされてきた。本実験では、担子菌のモデル生物であるウシグソヒトヨタケの栄養菌糸細胞におけるヌクレオソーム分布を調べた。ヌクレオソーム構造を維持した状態の DNA を種々の濃度の Micrococcal Nuclease によって消化し、ヒストン 8 量体に巻き付いているヌクレオソーム DNA だけにする条件を検討した。得られた約 150 bp サイズのヌクレオソーム DNA の塩基配列を次世代シーケンサーにより解読し、ゲノム情報上に位置付けることによってヌクレオソーム分布を調べた。アクチン遺伝子を含むいくつかの高発現遺伝子において、遺伝子領域の前後でヌクレオソーム分布が少ない領域 (Nucleosome-free region: NFR) が存在することが分かった。今後、子実体発生過程におけるヌクレオソーム分布と遺伝子発現情報を関連付けて解析する必要がある。

キーワード：担子菌, ウシグソヒトヨタケ, 栄養菌糸, ヌクレオソーム

ウシグソヒトヨタケは、担子菌のモデル生物として、2003 年にゲノム情報が解読され、その後、アメリカ、イギリス、ドイツ、香港、日本の研究者らが協力してゲノム情報を解析してきた (Stajich et al., 2010)。さらに 2011 年からアメリカ・エネルギー省の Joint Genome Institute (JGI) において「Functional genomics in the model mushroom *Coprinopsis cinerea*」プロジェクトが始まり、Strand-specific RNA-seq 解析が行われ、子実体形成過程における全遺伝子の発現状況が明らかになっている (Muraguchi et al., 2015)。

真核生物の DNA は、核内でヒストン 8 量体に巻き付いたヌクレオソーム構造を取っており (Kornberg, 1974)、ヌクレオソームは凝集してクロマチンとなり、細胞分裂時にはさらに凝集して染色体となる。発生過程でヒストンが様々な修飾を受けることにより、ヌクレオソームの分布は変化し (クロマチンリモデリング)、遺伝子発現にも影響が及ぶことが知られている (Bell et al., 2011)。

ヌクレオソーム構造を維持している DNA を Micrococcal nuclease で消化すると、ヌクレオソーム間をつなぐリンカー DNA 部分だけが消化され、ヒストン 8 量体に巻き付いているおよそ 150 bp の DNA が消化されずに残る。この残った DNA の塩基配列を解読し、ゲノム情報にマッピングすることでヌクレオソーム分布が調べることができる (Chen et al., 2013)。

本実験では、栄養菌糸細胞から得たヌクレオソーム構造を維持した DNA に対して、Micrococcal nuclease を働かせて DNA を消化し、残った DNA を次世代シーケンサーによって塩基配列を解読し、ヌクレオソーム分布を調べた。RNA-seq 解析から得られている read mapping と合わせ、遺伝子発現状況との関連性を観察したので報告する。

材料と方法

菌株と培地

本実験ではウシグソヒトヨタケの二核菌糸株 #292'Cc.TupA-EGFP#2 (*A3B1 Cc.tupA-EGFP*) + Okayama-7 (*A2B2 ade8-1*) (Masuda et al., 2016) を使用した。栄養菌糸を得るために、MYG (1% Malt extract, 0.4% Yeast extract, 0.4% Glucose, 1.5% Agar) 培地 (Rao and Niederpruem, 1969) にセロハンを敷き、その上に菌糸片を置いて、28°Cで4日間培養した。

ヌクレオソーム DNA の単離

ヌクレオソーム構造を維持した DNA の単離は、*Aspergillus nidulans* で使われた方法 (Gonzalez and Scazzocchio, 1997) を改変して行った。セロハン上で培養した栄養菌糸湿重量 0.1 g に対して、0.5 g のガラスビーズ (G8772, Sigma) と氷冷した 1 mL の MNase 消化バッファー (250 mM sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.05 mM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 15 mM HEPES-KOH pH7.6) を加え、氷中で冷やしながら、ソニケーターで菌糸を破碎した。破碎液をナイロンメッシュ (φ190 μm) でろ過した。ろ液 200 μL に Micrococcal Nuclease (M0247S, New England Bio Lab) を種々の濃度になるように加え、37°Cで5分間消化した。等量のストップ溶液 (40 mM EDTA, 2% SDS) を加えて反応を停止させた。中和 Phenol-chloroform (chloroform:isoamylalcohol=24:1) で2回処理し、chloroform で1回処理した。RNaseA (Nippon Gene) を 100 μg/mL になるように加え、30分 37°Cで保温し、RNA を分解した。再び、Phenol-chloroform 処理した後、エタノール沈殿して DNA を回収した。

塩基配列解読とマッピング

電気泳動でヌクレオソーム DNA の回収が確認できたサンプルについて、次世代シーケンサー Illumina Hi-seq2000 を用いて塩基配列を解読した。ゲノムプロジェクトによって全塩基配列が解読されている Okayama-7 株のゲノム情報に対して、Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) を使って、リードをマッピングし、BAM ファイルを作成した。IGV

(Robinson et al., 2011) に BAM ファイルを読み込み、遺伝子位置情報、遺伝子発現情報と比較した。

結果

ヌクレオソーム DNA の単離

栄養菌糸細胞を採取後、MNase 消化バッファーとガラスビーズを加え、ソニケーターで破碎する方法を採用した。液体窒素で凍結後、乳鉢と乳棒で細胞を破碎する方法と比較したが、ソニケーター破碎の方が電気泳動した際に明瞭なバンドとしてヌクレオソーム DNA を観察することができた (図1)。

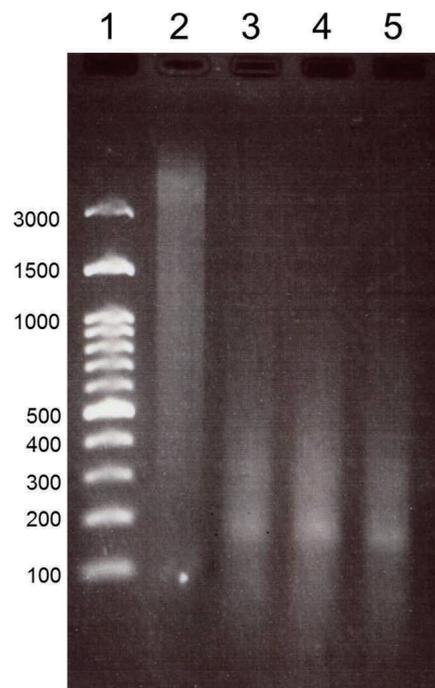


図1 単離したヌクレオソーム DNA

Lane 1: 100 bp ラダーマーカー

Lane 2, 3, 4, 5: 0, 1, 2, 4 Gel units of MNase

150 bp 付近に明瞭なバンドが観察できたサンプル (図1, lane 4) について次世代シーケンサーによる塩基配列解読を行った。RNA-seq 解析から、栄養菌糸において遺伝子発現量が高いと分かっている遺伝子領域のヌクレオソーム分布を調べたところ、アクチン遺伝子 (CC1G_08232) の前後でヌクレオソーム分布が少ない領域 (Nucleosome-free region) が存在することが分かった (図2)。

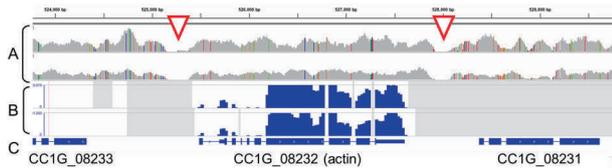


図2 アクチン遺伝子近傍のヌクレオソーム分布

- A: ヌクレオソーム DNA のリード分布
 - B: RNA-seq のリード分布
 - C: エクソン-イントロン構造
- A と B では 2 回の解析結果が示されている。
 赤色▽ : Nucleosome-free region (NFR)

考察

ウシグソヒトヨタケの野生型栄養菌糸のヌクレオソーム分布を調べた。アクチン遺伝子を含むいくつかの遺伝子領域の前後において、ヌクレオソーム DNA の分布が少ない領域 (NFR) が存在し、クロマチンがオープンになっていることが分かった。プロモーター側の NFR には転写因子が結合している可能性がある。栄養菌糸で高い発現を示す遺伝子のプロモーター領域に必ず NFR が存在するとは限らないので、NFR の存在は遺伝子発現量とは関係がなさそうである。

全ゲノムに渡るヌクレオソーム配置が出芽酵母や分裂酵母で調べられている (Lantermann et al., 2010; Yuan et al., 2005)。分裂酵母では Chd1 タンパク質がプロモーター領域およびコーディング領域におけるヌクレオソーム配置を適切に定めることで、適切な転写を可能にするだけでなく、逆鎖からの転写を抑制していることが報告されている (Pointner et al., 2012)。出芽酵母では転写共抑制因子である Tup1 が特定の遺伝子のプロモーター領域におけるヌクレオソーム配置に影響を与えることが報告されている (Chen et al., 2013)。ウシグソヒトヨタケにおいて、Tup1 相同タンパク質の Cag1 が欠損している突然変異体 (Masuda et al., 2016) や Chd1 相同タンパク質 (Cc.Chd1) の突然変異体 (未発表) が単離されており、これらの突然変異体におけるヌクレオソーム配置を調べることで、Cag1 や Cc.Chd1 がヌクレオソーム配置にどのように関わっているかを明らかにすることができるだろう。

謝辞

Nucleosome DNA の塩基配列決定に関して、秋田県立大学バイオテクノロジーセンターの皆様にご感謝致します。本研究は平成 28 年度学長プロジェクト「重点プロジェクト研究」の支援を受けて行った。

The authors would like to thank Enago (www.enago.jp) for the English language review.

文献

- Bell, O., Tiwari, V. K., Thoma, N. H. and Schubeler, D. (2011). Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nat Rev Genet* 12, 554-564.
- Chen, K., Wilson, M. A., Hirsch, C., Watson, A., Liang, S., Lu, Y., Li, W. and Dent, S. Y. (2013). Stabilization of the promoter nucleosomes in nucleosome-free regions by the yeast Cyc8-Tup1 corepressor. *Genome Res* 23, 312-322.
- Gonzalez, R. and Scazzocchio, C. (1997). A rapid method for chromatin structure analysis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 25, 3955-3956.
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Langmead, B. and Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat methods* 9, 357-359.
- Lantermann, A. B., Straub, T., Stralfors, A., Yuan, G. C., Ekwall, K. and Korber, P. (2010). Schizosaccharomyces pombe genome-wide nucleosome mapping reveals positioning mechanisms distinct from those of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol* 17, 251-257.
- Masuda, R., Iguchi, N., Tukuta, K., Nagoshi, T., Kemuriyama, K. and Muraguchi, H. (2016). The *Coprinopsis cinerea* Tup1 homologue Cag1 is required for gill formation during fruiting

- body morphogenesis. *Biol Open* 5, 1844-1852.
- Muraguchi, H., Umezawa, K., Niikura, M., Yoshida, M., Kozaki, T., Ishii, K., Sakai, K., Shimizu, M., Nakahori, K., Sakamoto, Y., et al. (2015). Strand-specific RNA-seq analyses of fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*. *PLoS one* 10, e0141586.
- Pointner, J., Persson, J., Prasad, P., Norman-Axelsson, U., Stralfors, A., Khorosjutina, O., Krietenstein, N., Svensson, J. P., Ekwall, K. and Korber, P. (2012). CHD1 remodelers regulate nucleosome spacing in vitro and align nucleosomal arrays over gene coding regions in *S. pombe*. *EMBO J* 31, 4388-4403.
- Rao, P. S. and Niederpruem, D. J. (1969). Carbohydrate metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (sensu Buller). *J Bacteriol* 100, 1222-1228.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. and Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat biotech* 29, 24-26.
- Stajich, J., Wilke, S., Ahren, D., Au, C.H., Birren, B., Borodovsky, M., Burns, C., Canback, B., Casselton, L., Cheng, C.K., Deng, J., Dietrich, F., Fargo, D., Farman, M., Gathman, A., Goldberg, J., Guigó, R., Hoegger, P., Hooker, J., Huggins, A., James, T., Kamada, T., Kilaru, S., Kodira, C., Kües, U., Kupfer, D., Kwan, H.S., Lomsadze, A., Li, W., Lilly, W., Ma, L.J., Mackey, A., Manning, G., Martin, F., Muraguchi, H., Natvig, D., Palmerini, H., Ramesh, M., Rehmeyer, C., Roe, B., Shenoy, N., Stanke, M., Hovhannisyan, V.T., Tunlid, A., Velagapudi, R., Vision, T., Zeng, Q., Zolan, M., Pukkila, P.J. (2010). Genome evolution in mushrooms: Insights from the genome and assembled chromosomes of *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 11889-11894.
- Yuan, G. C., Liu, Y. J., Dion, M. F., Slack, M. D., Wu, L. F., Altschuler, S. J. and Rando, O. J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* 309, 626-630.

〔平成 29 年 6 月 30 日受付
平成 29 年 7 月 11 日受理〕

Nucleosome analysis in *Coprinopsis cinerea* Nucleosome distribution in vegetative mycelial cells

Hajime Muraguchi¹, Ryo Masuda¹, Ryoki Asano¹, Keiju Okano¹

¹ *Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

Nucleosomes are the fundamental chromatin structure, where ~150 bp of DNA wind around a histone octamer. Nucleosome distribution has been implicated in the regulation of transcription and DNA repair in a variety of eukaryotes. Nucleosomal DNA is generally less accessible for DNA binding factors than free DNA, suggesting that nucleosome distribution in the gene region influences gene expression. Here, we examined nucleosome distribution in the whole genome of vegetative mycelial cells. We first looked for conditions that can yield nucleosomal DNA by digestion with various concentrations of micrococcal nuclease. The resulting nucleosomal DNA was sequenced using Next Generation Sequencer and mapped onto the genomic sequence, revealing a nucleosome distribution. We examined the relationship between the nucleosome distribution and transcription levels using in RNA-seq data, and found that there are nucleosome-free regions before and behind certain genes with high expression levels, including the actin gene. In future study, changes in nucleosome distribution should be examined and analyzed, combined with the change in gene expression during fruiting body development.

Keywords: basidiomycete, *Coprinopsis cinerea*, Nucleosome, Vegetative mycelium