構造解析ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
胡桃坂　仁志（東京大学　定量生命科学研究所・教授）

FTP

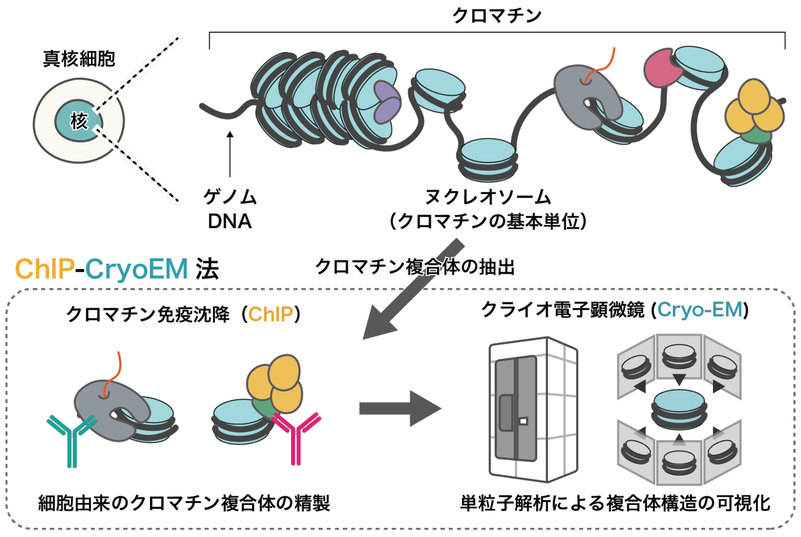
細胞由来クロマチン複合体の構造とゲノム解析情報を統合する ChIP-CryoEM-seq法の開発

補助事業分担者（所属・職名）
油谷 浩幸（東京大学 先端科学技術研究センター・特任研究員）
補助事業参加者（所属・職名）
永江 玄太（東京大学 先端科学技術研究センター・客員教授）、野中 綾（東京大学 先端科学技術研究センター・特任研究員）、畠澤 卓（東京大学 定量生命科学研究所・特任助教　※発表者）

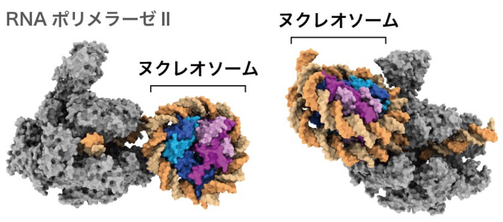
本発表に関して開示すべき利益相反(COI)関係にある企業・法人組織や営利を目的とした団体はありません

Fast Track Project　背景

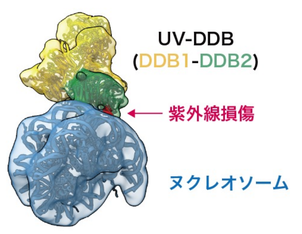
真核生物のゲノムDNA収納様式であるクロマチンは、多様なクロマチン結合因子の作用によってその構造を動的に変化させ、ゲノム機能の発現を制御する。転写因子をはじめとしたクロマチン結合因子の生物学的機能を理解するためには、ゲノムワイドな結合情報と、分子レベルの立体構造情報を統合した解析が必要である。しかし、ゲノム解析とクライオ電子顕微鏡（cryo-EM）による構造解析は独立した試料で行われる場合が多く、「あるゲノム領域に存在する複合体が、どのような立体構造を形成して、何に機能しているのか」という問いを解決する技術は確立されていない。そこで本プロジェクトでは、胡桃坂および油谷の両チームの技術基盤を融合し、ChIP-CryoEMによって得られるクロマチン結合因子を含む細胞由来のクロマチン複合体の立体構造情報と、ChIP-seqに代表されるゲノム解析情報を統合する新技術「ChIP-CryoEM-seq法」を確立することを目的とする。並行して、本技術を大量培養が困難な細胞種や組織試料へと応用するため、ChIP-CryoEM-seqにおける試料調製プロセスの少数細胞化に取り組む。



ChIP-CryoEM法により可視化された細胞由来のネイティブなクロマチン複合体



ヌクレオソームDNAを転写中のRNAポリメラーゼII複合体群 (Kujirai et al., Nat. Commun., 2025)

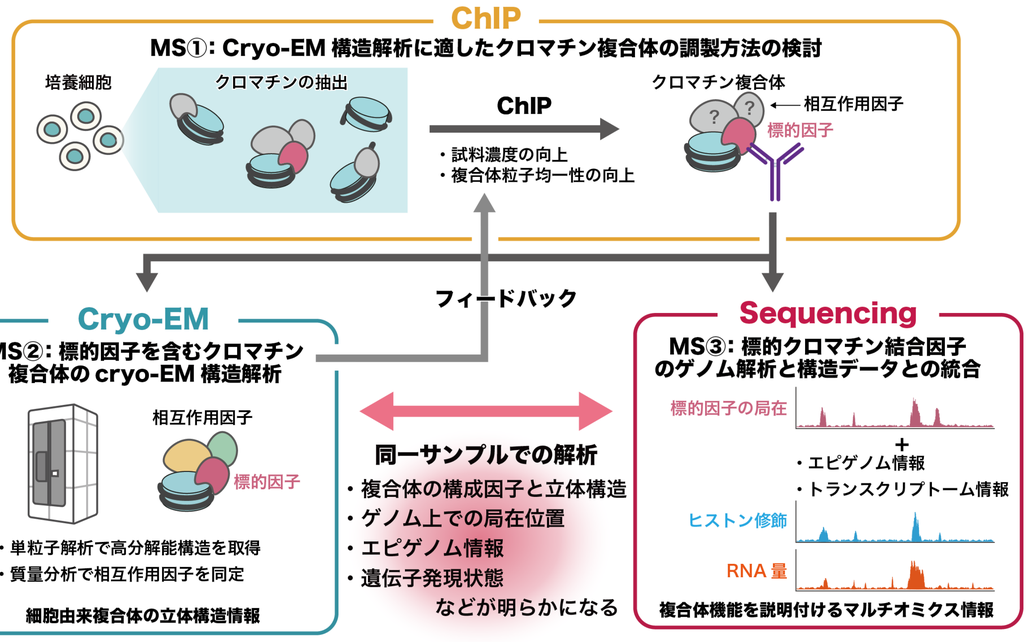


ヌクレオソームDNA上の紫外線損傷に結合したUV-DDBタンパク質-クロマチン複合体 (Matsumoto et al., Nat. Commun., 2025)

生命科学・医療・創薬等の分野における課題を解決するプラットフォームへ発展させるために

- これらのクロマチン複合体は、どのようなゲノム領域に由来するのか？
- 得られたクロマチン複合体構造は、どのような生物学的機能を反映しているか？
- 少数細胞や臨床検体への応用への拡張方法は？

目的： ChIP-CryoEM-seq法の確立



Fast Track Project　連携体制

構造解析ユニット

胡桃坂　研究の総括と実施
畠澤　Cryo-EM構造解析

基盤技術
ChIP-CryoEMによるクロマチン複合体可視化
Kujirai et al., Nat. Commun., 2025
Matsumoto et al., Nat. Commun., 2025

細胞由来クロマチンのcryo-EM構造解析
Hatazawa et al., Genes Cells, 2025

SCoPEグリッドによる試料高密度化
Takizawa et al., in revision



Krios G4 cryo-EM@胡桃坂研究室

・ChIP試料提供
・マルチオミクスデータ提供

・スクリーニングデータ提供
・複合体構造データ提供

発現・機能解析ユニット

油谷　融合研究の推進
永江　データ解析
野中　細胞およびクロマチン調製

基盤技術
転写因子を対象としたマルチオミクス定量的解析
Yamada et al., Sci. Adv., 2023

転写因子HNF4αのChIP-seq解析
Mizutani et al., J. Biol. Chem., 2011



超音波破砕装置
Covaris E-Series



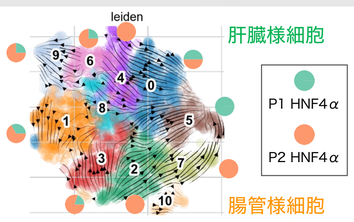
NextSeq 2000

Fast Track Projectの成果

プロジェクトにおける検証モデル：HNF4αを標的としたChIP-CryoEM-seqの実施

HNF4α (Hepatocyte nuclear factor 4α)
- 肝細胞分化と機能維持に重要な転写因子
- 油谷によるChIP-seq解析の実績有り（Mizutani et al., J. Biol. Chem., 2011）
- プロモータースイッチングにより、組織特異的な複数のアイソフォームを発現
- 肝臓特異的アイソフォーム（P1 HNF4α）に対するモノクロ抗体を作製済み

HNF4αアイソフォーム発現プロファイル



1. HNF4α抗体のエピトープの決定

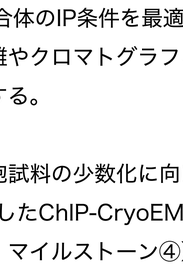
エピトープマッピングで抗HNF4α（K2918）が認識するアミノ酸（AYTTLEF）を同定した

2. HNF4αのIPおよびペプチド溶出条件の検討

抗体によってHNF4αを特異的に免疫沈降し、非変性条件でペプチド溶出できる条件を同定した

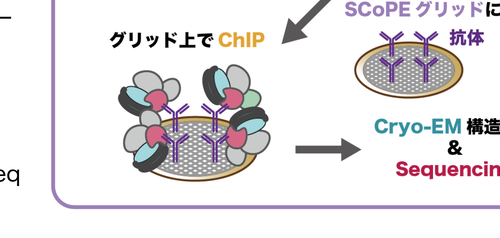
3. HNF4α ChIP試料のcryo-EM解析

試料調製の概要
1. ホルムアルデヒドによる細胞固定
2. 細胞溶解・核画分調製
3. 超音波・MNaseによるクロマチン断片化
4. HNF4α抗体による免疫沈降（ChIP）
5. 免疫沈降試料の洗浄
6. エピトープペプチドによる非変性溶出
7. 試料の濃縮および バッファー置換
8. Cryo-EM観察



Western blot（抗HNF4α）

Cryo-EMによる観察結果



グリッド：QFL Auグリッド+ グラフェン
試料濃度：dsDNA: 188.1 ng/μL, protein: 5.26 μg/μL

Cryo-EMにより、HNF4αを含むと推測される多様な形状・サイズの粒子が観察された

現在進行中
- Cryo-EM 単粒子解析
- ゲノム解析

今後の課題

- Cryo-EMでは多様な形状・サイズの粒子が観察されており、高分解能構造解析のためには試料の均一性向上が課題である。
- 十分な粒子数の確保と試料均一性の向上に向け、HNF4α-クロマチン複合体のIP条件を最適化するとともに、超遠心分離やクロマトグラフィーによる追加精製を検討する。
- 並行して、使用する細胞試料の少数化に向け、SCoPEグリッドを活用したChIP-CryoEM-seq解析を実施する（右図、マイルストーン④）。

