

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04329

研究課題名(和文) 遺伝子座特異的ChIP法によるゲノム領域間相互作用の同定とその意義の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of interactions between genomic regions using the locus-specific chromatin immunoprecipitation technology

研究代表者

藤井 穂高 (Fujii, Hodaka)

大阪大学・微生物病研究所・招へい教授

研究者番号：30302665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子座特異的ChIP法を用いて、グロビン遺伝子座5'HS5領域と恒常的あるいはNaBによる分化誘導に伴って相互作用する多数のゲノム領域を同定した。分化誘導に伴って5'HS5領域と相互作用するあるゲノム領域近傍遺伝子群は、分化誘導に伴って発現が誘導されていた。このことから、分化誘導に伴う5'HS5領域との相互作用が、協調的な遺伝子発現誘導に関与していることが示唆された。また、インターフェロン誘導性遺伝子群の核内における動的制御機構の解析の一環として、異なる種由来のdCas9及びタグを使用したenChIP系を開発し、これら系を用いたenChIPの効率が、実用上十分に高いことを示した。

研究成果の概要(英文)：Using the locus-specific chromatin immunoprecipitation (ChIP) technology, we identified many genomic regions interacting with the  $\beta$ -globin gene 5'HS5 region constitutively or inducibly by induction of differentiation with sodium butyrate (NaB). Expression of a group of genes in the vicinity of the interacting sites was induced by NaB stimulation, suggesting that NaB-induced interactions between genomic regions is involved in regulation of the cooperative gene expression program. In addition, in an effort to elucidate molecular mechanisms of dynamic regulation of interferon-inducible genes, we developed enChIP systems using different dCas9 orthologues and tags. We further showed that the yields of the novel enChIP systems are sufficiently high for their practical use.

研究分野：分子生物学、エピジェネティクス、クロマチン

キーワード：クロマチン エピジェネティクス ゲノム生化学 enChIP iChIP 核内三次元構造

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム領域間相互作用が、核内高次構造の形成を介して、ゲノム機能発現調節に重要な役割を果たしていることが示唆されているが、そもそも、ゲノム領域間相互作用を曖昧性無しに検出する方法は存在していなかった。ゲノム領域間相互作用を検出するための直接的な方法は、解析対象ゲノム領域を単離して、その複合体中に含まれる他のゲノム領域を同定することである。しかし、生体内での構造を保持した状態で特定ゲノム領域を単離し、構成する未知の蛋白質・DNA・RNA を同定するための方法は限られていた。

研究代表者は、生体内でのクロマチン構造を保存したまま特定のゲノム領域を単離する方法として遺伝子座特異的 ChIP 法を開発した。そして、遺伝子座特異的 ChIP 法を用いて、特定ゲノム領域を単離してそこに結合している蛋白質を質量分析法を用いて同定することに成功した (*PLoS One*, 2011; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013; *Sci. Rep.*, 2013; *PLoS One*, 2014)。また、特定ゲノム領域に結合する RNA や他のゲノム領域の網羅的同定にも成功している。

グロビン遺伝子座 5'HS5 領域は、古くからゲノム領域のループ形成や相互作用が示唆されているが、その実際やその生理学的役割には不明の点が多い。

インターフェロンをはじめとするサイトカインの遺伝子発現制御も、エンハンサーとプロモーター領域等のゲノム領域間相互作用が示唆されているが、その実際や生理的意義には不明の点が多い。

最近の解析によって、dCas9 のゲノムへの非特異的結合が示唆されている。従って、より特異性を向上させる技術の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、生体内のクロマチン構造を保持したまま特定のゲノム領域を単離する新規方法として、insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP) 法及び engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法からなる遺伝子座特異的 ChIP 法を開発した。そして、遺伝子座特異的 ChIP 法と次世代シーケンシング法を組み合わせることにより (enChIP-Seq 解析) 特定ゲノム領域と相互作用する他のゲノム領域の網羅的同定に成功した。本研究提案では、主に enChIP-Seq 法を用いて、解析対象ゲノム領域と相互作用

する他のゲノム領域を網羅的に同定し、ゲノム領域間相互作用がゲノム機能発現調節に果たす役割を解析した。こうした解析により、ゲノム領域間相互作用の同定法を確立するとともに、ゲノム機能発現調節の分子機構の解明を狙った。

## 3. 研究の方法

### (1) グロビン遺伝子座 5'HS5 領域と相互作用するゲノム領域の同定とその意義の解析

3xFLAG-dCas9 蛋白質と グロビン遺伝子 5'HS5 領域近傍の配列を認識する 2 種類の sgRNA を発現するレトロウイルスベクターを構築し、これらを発現するヒト白血病細胞株 K562 細胞由来細胞を樹立した。この細胞を用いて、enChIP-Seq 法により、5'HS5 領域と相互作用しているゲノム領域を網羅的に同定した。K562 は、ナトリウム酪酸塩 (NaB) 処理により分化が誘導され、グロビン遺伝子を発現する。分化に伴うゲノム領域相互作用の変化も解析した。

さらに、enChIP-Seq 法により検出された、5'HS5 領域と相互作用するゲノム領域は、グロビン遺伝子の発現調節領域として機能している可能性に加えて、赤芽球への分化に伴って発現が協調的に制御されている遺伝子群である可能性がある。こうした可能性を調べる目的で、5'HS5 領域と相互作用するゲノム領域近傍に存在している遺伝子の発現を解析した。

### (2) インターフェロン誘導性遺伝子群の核内における動的制御機構の解析

3xFLAG-dCas9 蛋白質と、インターフェロン (IFN) 誘導性遺伝子である *IRF-1* 遺伝子プロモーター領域の配列を認識する sgRNA を発現するレトロウイルスベクターを構築し、これらを発現するヒト線維肉腫細胞株 HT1080 細胞由来細胞を樹立した。この細胞を用いて、enChIP-Seq 法により、*IRF-1* 遺伝子プロモーター領域と相互作用しているゲノム領域を、IFN 刺激の無い状態とある状態とで、網羅的に同定した。その結果、*IRF-1* 遺伝子プロモーター領域と恒常的あるいは IFN 刺激に伴って相互作用する多数のゲノム領域を同定することに成功した。これらの相互作用ゲノム領域は、*IRF-1* 遺伝子プロモーター領域と同一染色体上にあるもの (intra-chromosomal interactions) と異なる染色体上にあるもの (inter-chromosomal interactions) を含んでいた。

enChIP 法を実施する際に問題となり得る

のが、dCas9 の off-target sites への結合である。これを回避するための方法としては、(i) 刺激の有無や、異なる細胞間での比較により、特異的なシグナルを検出する、(ii) 標的ゲノム領域内に複数の異なる sgRNA を設計し、共通して検出するシグナルを "true positives" とする、等の方法がある。本研究提案では、これらに加えて、(iii) dCas9 orthologs を用いた sequential enChIP 法を開発することによって、off-target sites への結合による影響を回避することを目指した。

#### 4 . 研究成果

##### (1) グロビン遺伝子座 5'HS5 領域と相互作用するゲノム領域の同定とその意義の解析

解析の結果、5'HS5 領域と恒常的あるいは NaB による分化誘導に伴って相互作用する多数のゲノム領域を同定することに成功した。これらの相互作用ゲノム領域は、5'HS5 領域と同一染色体上にあるもの (intra-chromosomal interactions) と異なる染色体上にあるもの (inter-chromosomal interactions) を含んでいた。Real-time RT-PCR 法を用いて、5'HS5 領域と相互作用しているゲノム領域近傍の遺伝子発現を解析したところ、NaB による分化誘導に伴って発現が誘導されていることが分かった。このことから、NaB による分化誘導に伴う 5'HS5 領域との相互作用が、協調的な遺伝子発現誘導に関与しており、"transcription factory" を形成していることが示唆された。この成果を *Genes to Cells* 誌に発表した。

##### (2) インターフェロン誘導性遺伝子群の核内における動的制御機構の解析

3xFLAG タグを付与した *Staphylococcus aureus* 由来の dCas9 (Sa-dCas9-3xFLAG) の発現プラスミドを作製した。そして、Sa-dCas9-3xFLAG を利用した enChIP の効率が、Sp-dCas9 と同等であることを示した。また、AM タグを付与した *Streptococcus pyogenes* 由来の dCas9 (Sp-dCas9-2xAM) のレンチウイルス発現プラスミドを作製した。そして、この系を用いた enChIP の効率が、実用上十分に高いことを示した。これらの成果を *BMC Research Notes* 誌に発表した。

##### (3) 関連研究

上記の研究成果を一部利用して (i) ニワトリの B 細胞株における *Pax5* 遺伝子発現調節機構の解析を行い、その成果を DNA

Research 誌に発表した。(ii) 生体由来の細胞で enChIP 解析を実施するために、3xFLAG-dCas9 を発現するトランスジェニックマウス系統を作製し、その成果を *Genes to Cells* 誌に発表した。(iii) スウェーデンのグループと共同で、酸素濃度による *EPAS1* 遺伝子の発現制御機構の解析を行い、その成果を *Biochemical and Biophysical Research Communications* 誌に発表した。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

Promoter-associated proteins of EPAS1 identified by enChIP-MS - A putative role of HDX as a negative regulator. Hamidian A, Vaapil M, von Stedingk K, Fujita T, Persson CU, Eriksson P, Veerla S, De Preter K, Speleman F, Fujii H, Pählman S, Mohlin S. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 May 5;499(2):291-298. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.150. Epub 2018 Mar 26. PMID: 29577908

enChIP systems using different CRISPR orthologues and epitope tags. Fujita T, Yuno M, Fujii H. *BMC Res Notes*. 2018 Feb 27;11(1):154. doi: 10.1186/s13104-018-3262-4. PMID: 29482606

Transgenic mouse lines expressing the 3xFLAG-dCas9 protein for enChIP analysis. Fujita T, Kitaura F, Oji A, Tanigawa N, Yuno M, Ikawa M, Taniuchi I, Fujii H. *Genes Cells*. 2018 Apr;23(4):318-325. doi: 10.1111/gtc.12573. Epub 2018 Feb 26. PMID: 29480524

Locus-specific ChIP combined with NGS analysis reveals genomic regulatory regions that physically interact with the Pax5 promoter in a chicken B cell line. Fujita T, Kitaura F, Yuno M, Suzuki Y, Sugano S, Fujii H. *DNA Res*. 2017 Oct 1;24(5):537-548. doi: 10.1093/dnares/dsx023. PMID: 28586432

Identification of physical interactions between genomic regions by enChIP-Seq.

Fujita T, Yuno M, Suzuki Y, Sugano S, Fujii H.

Genes Cells. 2017 Jun;22(6):506-520. doi: 10.1111/gtc.12492. Epub 2017 May 5. PMID: 28474362

Allele-specific locus binding and genome editing by CRISPR at the p16INK4a locus.

Fujita T, Yuno M, Fujii H.

Sci Rep. 2016 Jul 28;6:30485. doi: 10.1038/srep30485. PMID: 27465215

Isolation of Specific Genomic Regions and Identification of Associated Molecules by enChIP.

Fujita T, Fujii H.

J Vis Exp. 2016 Jan 20;(107):e53478. doi: 10.3791/53478. PMID: 26862718

Efficient sequence-specific isolation of DNA fragments and chromatin by in vitro enChIP technology using recombinant CRISPR ribonucleoproteins.

Fujita T, Yuno M, Fujii H.

Genes Cells. 2016 Apr;21(4):370-7. doi: 10.1111/gtc.12341. Epub 2016 Feb 5. PMID: 26848818

Biochemical Analysis of Genome Functions Using Locus-Specific Chromatin Immunoprecipitation Technologies.

Fujita T, Fujii H.

Gene Regul Syst Bio. 2016 Jan 18;10(Suppl 1):1-9. doi: 10.4137/GRSB.S32520. eCollection 2016. Review. PMID: 26819551

Applications of Engineered DNA-Binding Molecules Such as TAL Proteins and the CRISPR/Cas System in Biology Research.

Fujita T, Fujii H.

Int J Mol Sci. 2015 Sep 24;16(10):23143-64. doi: 10.3390/ijms161023143. Review. PMID: 26404236

Isolation of Specific Genomic Regions and Identification of Their Associated Molecules by Engineered DNA-Binding Molecule-Mediated Chromatin Immunoprecipitation (enChIP) Using the CRISPR System and TAL Proteins.

Fujii H, Fujita T.

Int J Mol Sci. 2015 Sep 9;16(9):21802-12. doi: 10.3390/ijms160921802. Review. PMID: 26370991

Identification of non-coding RNAs associated with telomeres using a combination of enChIP and RNA sequencing.

Fujita T, Yuno M, Okuzaki D, Ohki R, Fujii H.

PLoS One. 2015 Apr 13;10(4):e0123387. doi: 10.1371/journal.pone.0123387. eCollection 2015. PMID: 25874893

[学会発表](計10件)

Hodaka Fujii, Biochemical analysis of 4D-Nucleome using locus-specific chromatin immunoprecipitation (locus-specific ChIP)、第40回日本分子生物学会年会 / 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (招待講演)、2017年、神戸

Hodaka Fujii, Biochemical analysis of genome functions using locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies: iChIP and enChIP、The International Conference on Transcription Cycle International 2016 (招待講演) (国際学会)、2016年、東京

藤田敏次、藤井穂高、p16INK4a 遺伝子座を標的とした CRISPR によるアレル特異的なゲノム結合およびゲノム編集、第39回日本分子生物学会年会、2016年、横浜

Toshitsugu Fujita、Hodaka Fujii、Development of enChIP and its applications to locus-specific biochemical analysis of genome functions、12th EMBL Conference Transcription and Chromatin (国際学会)、2016年、Heidelberg, Germany

藤田敏次、藤井穂高、エピジェネティック制御機構の生化学的解析に向けた in vitro

enChIP 法の開発、第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会、2016 年、大阪

藤田敏次、藤井穂高、遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法によるゲノム機能発現機構の解析・核内三次元構造解析への応用を中心として、第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会、2016 年、松島

藤井穂高、組換え蛋白質を利用した in vitro 遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法による転写・エピジェネティック制御機構の解析、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会合同年会) (招待講演)、2015 年、神戸

Hodaka Fujii、Locus-specific biochemical analysis of genome functions using enChIP: an application of CRISPR/Cas and TAL to purification of specific genomic regions、TGE2015 Conference on Transposition and Genome Engineering 2015 (国際学会)、2015 年、奈良

Toshitsugu Fujita、Hodaka Fujii、Locus-specific biochemical analysis of genome functions using enChIP: an application of CRISPR/Cas to purification of specific genomic regions、Cold Spring Harbor meeting: Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution (国際学会)、2015 年、Cold Spring Harbor、USA

Toshitsugu Fujita、Hodaka Fujii、Locus-specific biochemical analysis of genome functions using enChIP: an application of CRISPR/Cas and TAL to purification of specific genomic regions、FASEB Science Research Conference "Transcription, Chromatin, and Epigenetics (国際学会)、2015 年、Palm Beach、USA

〔図書〕(計 2 件)

Toshitsugu Fujita、Hodaka Fujii、Academic Press、Handbook of Epigenetics、2017、668

Toshitsugu Fujita、Hodaka Fujii、Springer、Chromatin Protocols、2015、492

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：DNA 間相互作用の解析方法  
発明者：藤井穂高、藤田敏次  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：PCT/JP2016/084358  
出願年月日：2016 年 11 月 18 日  
国内外の別：外国

名称：DNA 間相互作用の解析方法  
発明者：藤井穂高、藤田敏次  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2015-231329  
出願年月日：2015 年 11 月 27 日  
国内外の別：国内

取得状況 (計 1 件)

名称：内在性 DNA 配列特異的結合分子を用いる特定ゲノム領域の単離方法  
発明者：藤井穂高、藤田敏次  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：第 5954808 号  
取得年月日：2016 年 6 月 24 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~bgb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 穂高 (FUJII, Hodaka)  
大阪大学・微生物病研究所・招へい教授  
研究者番号：30302665

(2) 研究分担者

藤田 敏次 (Fujita, Toshitsugu)  
大阪大学・微生物病研究所・招へい准教授  
研究者番号：10550030