

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06176

研究課題名(和文) in vitro enChIP法を利用した細胞系列特異的な染色体三次元構造の解明

研究課題名(英文) Analysis of lineage-specific chromosomal conformation by in vitro enChIP

研究代表者

藤田 敏次 (Fujita, Toshitsugu)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10550030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞から標的とするゲノム領域を特異的に単離できる in vitro enChIP 法と次世代シーケンス解析(NGS解析)を組み合わせること(in vitro enChIP-Seq法)で、B細胞特異的な染色体三次元構造の解析を行った。具体的には、B細胞分化制御転写因子Pax5をコードするPax5遺伝子に焦点を当て、当該遺伝子にヒトおよびマウスB細胞で共通して相互作用しているゲノム領域の網羅的同定を行った。さらに、ChIP-Seq法によるヒストン修飾解析やゲノム編集によるゲノム領域欠損実験を行い、ゲノム領域間相互作用の生理的意義について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、in vitro enChIP-Seq法が、特定遺伝子座を中心とした染色体三次元構造の解析に有用な技術であることを示している。in vitro enChIP-Seq法は、高度なバイオインフォマティクス処理を必要せずにゲノム領域間相互作用が解析できる技術であることから、3C法やその派生法と比較して汎用性が高い技術と考える。Pax5遺伝子座の転座が、B細胞リンパ腫に関連することが報告されていることから、本研究は、B細胞特異的な染色体三次元構造の生理的意義の解明のみならず、染色体三次元構造と転座の関連性の解明につながる可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文)：We previously developed in vitro enChIP, which is a biotechnology to isolate a target genomic region from cells. In this study, we combined in vitro enChIP with next-generation sequencing analysis (in vitro enChIP-Seq) to analyze B cell-specific chromosomal conformation. We focused on the Pax5 gene that encodes a master regulator of B cell-lineage commitment and succeeded in identifying genomic regions that interact commonly with the mouse and human Pax5 gene by in vitro enChIP-Seq. In addition, we analyzed histone marks on identified interacting genomic regions by ChIP-Seq and deleted those regions by genome editing to analyze physiological importance of the genomic interactions for Pax5 expression and B cell homeostasis.

研究分野：分子生物学

キーワード：ChIP ChIP-Seq locus-specific ChIP CRISPR enChIP in vitro enChIP in vitro enChIP-Seq

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

染色体は、細胞系列、細胞周期や核内環境変化、ヒストンバリエーションやヒストン修飾、蛋白質(転写因子等)・RNA(ノンコーディングRNA等)・DNA(他のゲノム領域)との相互作用によって変動している。染色体三次元構造の動的変化の理解には、解析対象とするゲノム領域と相互作用しているゲノム領域を網羅的に同定することが重要である。これまでに、Chromosome Conformation Capture (3C)法やその派生法である Hi-C 法などが利用されてきたが (Nat. Rev. Genet., 2013, 14: 390-403) これら方法は、クロスリンク下という非最適条件下での制限酵素やライゲースによる酵素反応を含んでおり、非生理的な相互作用の検出も危惧されている。そのため、実験操作や結果の解析には注意が必要であった。

申請者らは、生体内でのクロマチン構造を保持した状態で、解析対象とするゲノム領域を細胞から単離する方法として、遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法(遺伝子座特異的 ChIP 法)を開発した(US patent: 8415098、国内特許: 第 5413924 号・第 5954808 号)。単離したゲノム領域に結合しているゲノム DNA・RNA は、次世代シーケンス解析(NGS 解析)等によって同定することができる。また、蛋白質については、質量分析法等によって同定することができる。

遺伝子座特異的 ChIP 法の一つである engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP (enChIP) 法は、ゲノム編集で利用されている CRISPR/Cas9 などの人工 DNA 結合分子の細胞内発現によって、“細胞内”で標的ゲノム領域のタグ付けを行い、当該ゲノム領域をアフィニティー精製する技術である。近年、申請者らは、組換え精製 CRISPR/Cas9 分子を利用し、“試験管内”で標的ゲノム領域のタグ付けが行える *in vitro* enChIP 法を開発した(図 1)(Fujita et al. *Genes Cells* 2016, 21: 370-377)。CRISPR/Cas9 を利用した *in vitro* enChIP 法は、下記のようなスキームで行う(図 1)。

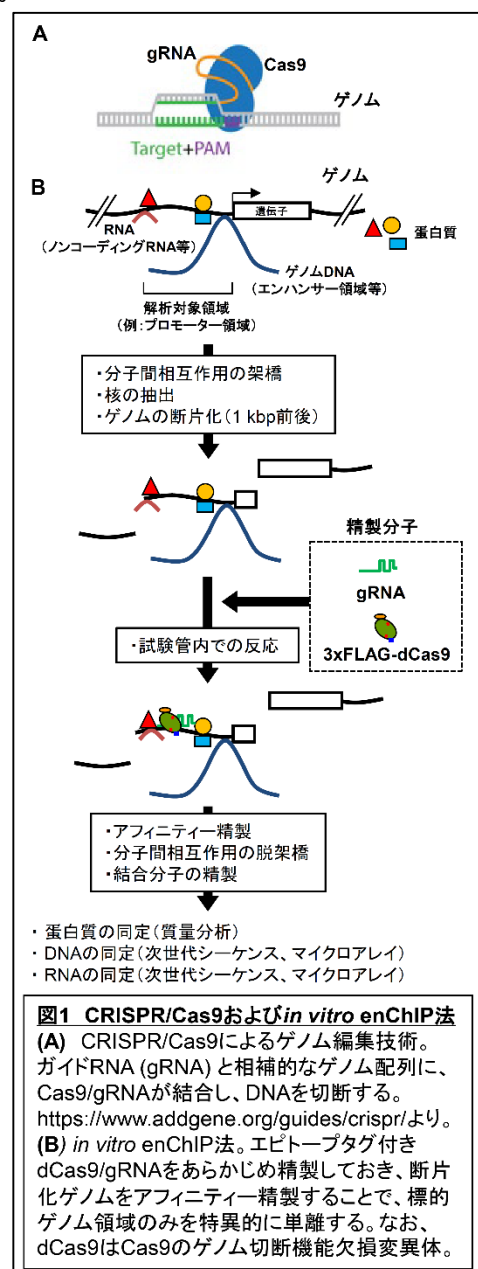
(i) 断片化クロマチン DNA の調整: 細胞内でのゲノム上の分子結合をホルムアルデヒド等でクロスリンクした後、ゲノムを超音波処理等で断片化する。

(ii) 精製 CRISPR/Cas9 分子の調製: エピトープタグを融合した DNA 切断活性欠損型 Cas9 (dCas9) を組換え蛋白質として精製する。また、標的ゲノム領域に特異的に存在する塩基配列を認識するように gRNA をデザインし、化学合成する。

(iii) 標的ゲノム領域のタグ付けおよび単離: (i) で用意した断片化クロマチン DNA と (ii) で用意した精製 CRISPR/dCas9 分子 (dCas9 + gRNA) を試験管内で反応させることで、精製 CRISPR/dCas9 分子を標的ゲノム領域に結合させる(標的ゲノム領域のタグ付け)。引き続き、抗エピトープタグ抗体などを利用したアフィニティー精製によってタグ付けしたゲノム領域を単離する。

enChIP 法は申請者ら独自の的方法論であり、enChIP 法のためのプラスミドを寄託した Addgene (<https://www.addgene.org/crispr/purify/>) には、100 件以上のリクエストが世界中から来ている。enChIP 法は、人工 DNA 結合分子の細胞内発現が必要であり、形質導入効率の低い細胞株や、マウスなどの個体から単離した細胞を解析に使用する場合には、人工 DNA 結合分子の発現が律速となる。一方、*in vitro* enChIP 法は、人工 DNA 結合分子の細胞内発現を必要としないため、その利便性・応用性は計り知れない。

これまでの実験で、*in vitro* enChIP 法と NGS 解析を組み合わせること (*in vitro* enChIP-Seq 法) で、ニワトリ B 細胞株 DT40 内で *Pax5* 遺伝子と相互作用しているゲノム領域の検出(ゲノム領域間相互作用の検出)に成功した (Fujita et al. *DNA Res.* 2017, 24: 537-548)。ニワトリ細胞とヒト・マウス細胞間で



の塩基配列の保存性は低いため、現時点では、ニワトリ B 細胞株において同定したゲノム領域間相互作用が、種を超えて保存されている生命現象かどうか不明である。

## 2. 研究の目的

種を超えて保存されている B 細胞特異的な染色体三次元構造の解明や、医学的視点から B 細胞特異的な染色体三次元構造を捉える場合、ヒト・マウス B 細胞を利用した同様の解析が必要である。本申請では、*in vitro* enChIP-Seq 法が汎用技術となるよう最適化を進めつつ、ヒト・マウスにおいて種を超えて保存されている B 細胞特異的な染色体三次元構造を解析する。さらに、分子生物学的解析を加えることで、B 細胞特異的な染色体三次元構造が担う生理的意義の解明に迫る。

## 3. 研究の方法

本研究では、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域を標的ゲノム領域とし、CRISPR 系を利用した *in vitro* enChIP-Seq 法によってヒトおよびマウス細胞で共通して *Pax5* 遺伝子と細胞内で相互作用しているゲノム領域を網羅的に同定するとともに、その生理的意義について解析を進める。具体的には、下記(1)～(3)の研究を進める(図2)。

### (1) マウス B 細胞系列特異的な染色体三次元構造の解析

B220 陽性細胞を B 細胞としてマウス脾臓から回収し、*in vitro* enChIP 法により *Pax5* 遺伝子プロモーター領域を単離する。回収した DNA を NGS 解析することで、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域と相互作用するゲノム領域を網羅的に同定する。さらに、*in vitro* enChIP-Seq 法の汎用性を考慮し、実験系の最適化(バッファー、gRNA の設計など)を進める。

### (2) ヒト B 細胞系列特異的な染色体三次元構造の解析

ヒト B 細胞株 Raji 細胞を使用し、研究方法(1)と同様に、*in vitro* enChIP 法により *Pax5* 遺伝子プロモーター領域を単離する。回収した DNA を NGS 解析することで、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域と相互作用するゲノム領域を網羅的に同定する。

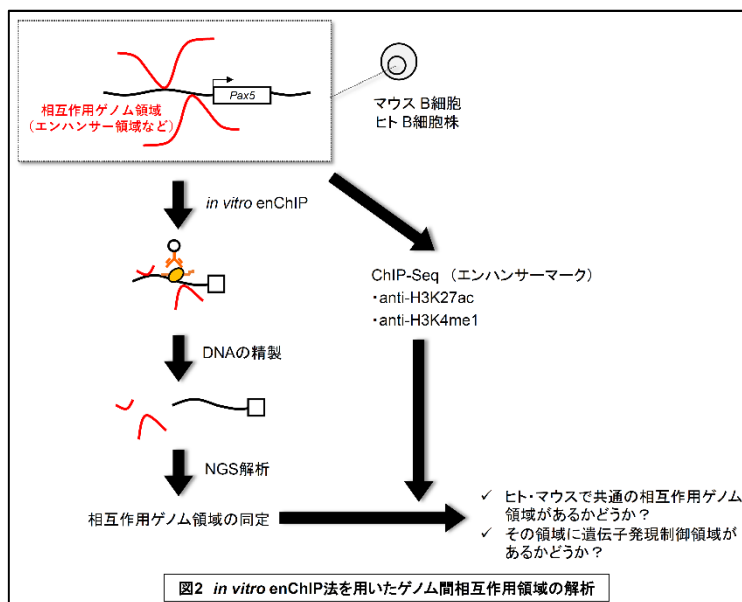
### (3) ヒストン修飾状態の解析

*Pax5* 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について、「転写制御領域」や「物理的的近接領域」などの機能的な評価を加えるため、マウス B 細胞およびヒト Raji 細胞を用いて、エンハンサー領域に濃縮されることが報告されているヒストン修飾(H3K4me3、H3K27ac)に対する ChIP-Seq 解析を行う。

### (4) ゲノム編集による *Pax5* 遺伝子相互作用ゲノム領域の欠損および解析

*Pax5* 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で、転写制御領域として評価されたゲノム領域をゲノム編集によって欠損させる。*Pax5* 遺伝子発現ならびに *Pax5* 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾の変化を RT-PCR や ChIP 法で調べる。

さらに、B 細胞恒常性への影響について解析する。



## 4. 研究成果

### (1) マウス B 細胞系列特異的な染色体三次元構造の解析

B220 陽性細胞を B 細胞としてマウス脾臓から回収し、*in vitro* enChIP-Seq 法によって、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域と相互作用するゲノム領域を網羅的に同定した。なお、これまでの実験ではニワトリ DT40 細胞を利用した *in vitro* enChIP-Seq 法に成功しており、その経験をもとに実験系の最適化(バッファー、gRNA の設計など)を進めた。さらに、陰性対象として、gRNA を用いずに *in vitro* enChIP-Seq 法を行い、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域を標的とした *in vitro* enChIP-Seq 法の結果と比較することで、マウス B 細胞において *Pax5* 遺伝子プロモーター領域と特異的に相互作用するゲノム領域の網羅的同定に成功した(図3)。

### (2) ヒト B 細胞系列特異的な染色体三次元構造の解析

ヒト B 細胞株 Raji 細胞を使用し、*in vitro* enChIP-Seq 法によって、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域と相互作用するゲノム領域を網羅的に同定した。陰性対象として、gRNA を用いずに、あるいは、無関係なゲノム領域を標的とした gRNA を用いて *in vitro* enChIP-Seq 法を行い、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域を標的とした *in vitro* enChIP-Seq 法の結果と比較することで、ヒト B 細胞において *Pax5* 遺伝子プロモ

ーター領域と特異的に相互作用するゲノム領域の網羅的同定に成功した(図3)。

### (3) ヒストン修飾状態の解析

マウスB細胞およびヒトRaji細胞を用いて、エンハンサー領域に濃縮されることが報告されているヒストン修飾(H3K4me1、H3K27ac)に対するChIP-Seq解析を行った。さらに、研究成果(1)と(2)で得られた*in vitro* enChIP-Seq法の結果と比較することで、*Pax5* 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について、「転写制御領域」や「物理的的近接領域」などの機能的な評価を加えることに成功した(図3)。

ヒト・マウスでは、種を超えて保存されているゲノム領域(塩基配列)も多く、そうした領域は、細胞恒常性の維持に重要な領域であることが多い。そこで、研究成果(1)と(2)の結果を比較することで、種を超えて保存されているB細胞特異的な*Pax5* 遺伝子プロモーター領域相互作用ゲノム領域を同定するとともに、同定したゲノム領域に含まれる「転写制御領域」の抽出に成功した(図3)。

### (4) ゲノム編集による *Pax5* 遺伝子相互作用ゲノム領域の欠損および解析

研究項目(3)で同定したヒト・マウス共通の*Pax5* 遺伝子プロモーター領域相互作用ゲノム領域のうち、数種類の「転写制御領域」候補領域について、その生理的意義を評価するため、Raji細胞で欠損させた。まず、標的領域を欠損させるためのゲノム編集実験の最適化を行った。次に、最適化した条件を用いて、標的ゲノム領域の欠損に成功した(図4)。現在、*Pax5* 遺伝子発現ならびに*Pax5* 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾の変化をRT-PCRやChIP法で解析している。また、B細胞としての恒常性の変化についても解析を進めており、同定ゲノム領域が有するゲノム機能について評価中である。

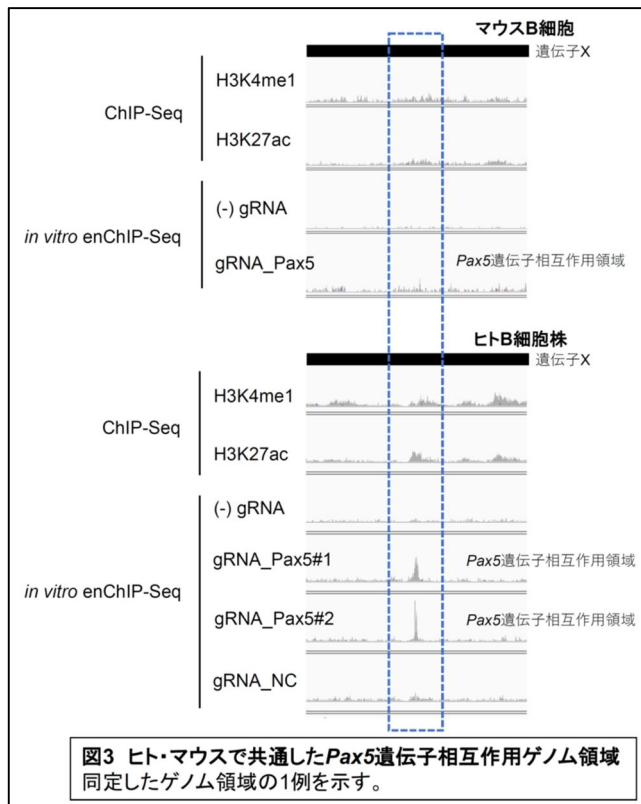


図3 ヒト・マウスで共通した*Pax5*遺伝子相互作用ゲノム領域同定したゲノム領域の1例を示す。



図4 *Pax5*遺伝子相互作用ゲノム領域のゲノム編集による欠損ゲノム領域の欠損の1例を示す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujita Toshitsugu, Fujii Hodaka	4. 巻 4
2. 論文標題 Purification of specific DNA species using the CRISPR system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology Methods and Protocols	6. 最初と最後の頁 bpz008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biomethods/bpz008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Hirotaka, Fujita Toshitsugu, Fujii Hodaka	4. 巻 4
2. 論文標題 Locus-Specific Genomic DNA Purification Using the CRISPR System: Methods and Applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The CRISPR Journal	6. 最初と最後の頁 290-300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/crispr.2020.0038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田敏次、藤井穂高
2. 発表標題 遺伝子座特異的ChIP法によるゲノム領域間相互作用の検出
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田敏次
2. 発表標題 Identification of chromosomal interactions by locus-specific ChIP
3. 学会等名 第1回弘前メディカルサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~bgb/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スペイン	the Health Institute Carlos III			
スウェーデン	Lund University			