

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：15101

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21200038

 研究課題名（和文）標的ゲノム領域上の蛋白-RNA 機能複合体解析に向けた人工染色体の活用
 研究課題名（英文）A novel proteomics approach for identification of protein-RNA complex associated with specific gene loci using a human artificial chromosome (HAC)

研究代表者

久郷 裕之 (KUGOH HIROYUKI)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40225131

研究成果の概要（和文）：

本研究では、選定したタグシステム（LacO/LacI-GFP システム）を用いて一定サイズの DNA (3.5kb) を安定的に回収することに成功した。LacO/LacI-GFP システムを用いて巨大な CHO 染色体の回収に成功した。これらの研究より LacO/LacI-GFP のタグシステムの実用性を明らかにした。さらに、複数個の遺伝子を搭載可能な人工染色体上へタグ配列（LacO 配列）および本研究において着目した *XIST* ゲノム領域、*LIT1/KCNQ1OT1* ゲノム領域、疾患関連反復配列（CGG：100 リピート）をそれぞれ搭載した。

研究成果の概要（英文）：

To recover the CHO chromosome that carry 3.5kb of the lacO repeat sequences in the cells, we carried out immunoprecipitation by using anti-GFP antibody after the introduction of the LacI-GFP vector. As a result, a large size of CHO chromosome was recovered by anti-GFP antibody. These results suggest that the possibility of recovery of the HAC by chromatin immunoprecipitation. In addition, our colleague has developed a new HAC vector (MI-HAC) with multi-integrase recombination sites. MI-HAC enables to introduce various large genes or genomic loci. Furthermore, we produced MI-HAC that contains the lacO repeat sequences and targeted gene loci (*Xist*, *LIT1/KCNQ1OT1* and CGG repeat sequence).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：染色体工学

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な生命現象や染色体起因疾患に非コード RNA の関与が明らかにされ、その分子機構の解明が進んできた。その結果、未

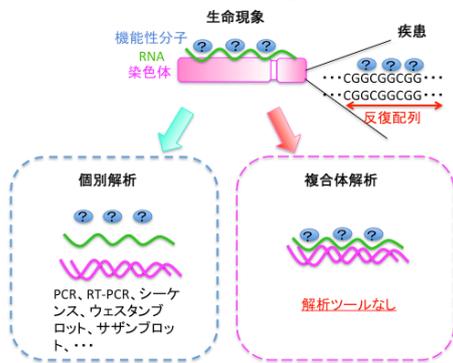
知の機能性非コード RNA が引き起こすエピジェネティックな変化が生物の多様性あるいは細胞内のゲノム機能に重要な制御分子として働いていることが推測されてきた。そ

の中でも、以前から X 染色体の不活化に関与する *XIST* RNA を中心としてエピジェネティクスの研究領域で注目されてきた。近年、ゲノム刷り込みに関与する *LIT1/KCNQ1OT1*、*Air*、*ANRIL* など、いくつかの長鎖非コード RNA の存在が報告されてきた。

またゲノム上に散在する DNA 反復配列は、多くの遺伝性疾患、がんを含む染色体起因疾患が報告されている。その中でも X 染色体長腕上に存在する CGG リピートの伸長は脆弱 X 症候群の原因であることが知られる。*FMR1* 遺伝子のプロモーター下流 5'UTR 領域の中に存在する CGG リピートが 200 以上に伸長することにより高度にメチル化される。そして自身にコードされている *FMR1* 遺伝子がヘテロクロマチン化され、転写が抑制される。

上述した長鎖非コード RNA および疾患関連反復配列の制御分子機構は不明である。この最大の問題は、これらの RNA あるいは DNA 配列と共役するタンパク質複合体の同定が困難であり、DNA/(RNA)/タンパク複合体として捉え、解析する技術がないためである。したがって、今後ゲノムネットワークを理解していく上で複合体解析に向けた新たな解析技術の開発が必要である (図 1)。

図1.DNA/RNA/タンパク質複合体



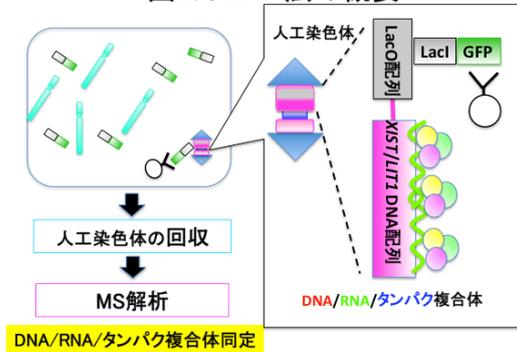
2. 研究の目的

本研究では、非コード RNA および疾患関連反復配列に集積する DNA/(RNA)/タンパク複合体の同定を目的とした新たな複合体解析法 (ChrIP 法) の開発を行う (図 2)。

ChrIP 法は人工染色体ベクターの利点と LacO/LacI システムを組み合わせた新たな複合体解析技術である。まず人工染色体に標的ゲノムローカスおよびタグ配列となる LacO リピートを搭載させる。その後 LacI-GFP fusion タンパクを発現させたヒト細胞に移入し、LacI-GFP fusion タンパクに対して、抗 GFP 抗体により免疫沈降を行う。その免疫沈降産物の質量分析 (MS) 解析により、ターゲットゲノムローカスに集積する複合体を

網羅的に同定し、解析する技術である。ChrIP 法に使用する長鎖非コード RNA のターゲット配列として *XIST*、*LIT1/KCNQ1OT1* および疾患関連反復配列として CGG リピートを選定し、各々の DNA 配列あるいは RNA に結合するタンパク複合体の同定を目指す。

図2.ChrIP法の概要



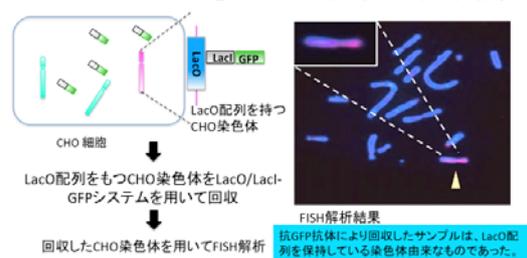
3. 研究の方法

1) LacO/LacI-GFP システムによるプラスミド DNA の回収。

LacI-GFP 融合タンパクを介した免疫沈降を行うため、LacO 配列を有するプラスミドを LacI-GFP 融合タンパクが安定的に発現する 293T 細胞へ導入した。導入した細胞を固定し、回収した後、GFP 抗体によるクロマチン免疫沈降を行った。

(2) LacO/LacI-GFP システムによる巨大なクロマチン DNA の回収 (図 3)

図3.LacO/LacIシステムを用いたCHO染色体の免疫沈降結果



巨大なクロマチン DNA を LacO/LacI-GFP システムにより回収可能か評価した。LacI-GFP 融合タンパク発現下で抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降を行い、LacO 配列を持つ CHO 染色体の回収を試みた。

3) *XIST* および *LIT1/KCNQ1OT1* ゲノム配列を有する人工染色体の作製

ChrIP 法に用いる *XIST*、*LIT1/KCNQ1OT1* ゲノム領域を有する人工染色体の作製を行った。まずタグ配列である部位特異的組換え酵素を用いて LacO 配列を有する人工染色体を作製した。LacO 配列をプロ

ブとし、FISH 解析を行った。

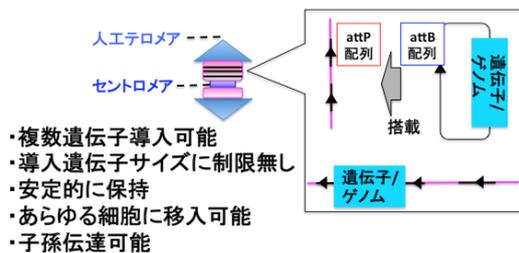
〈LacO 配列を有する人工染色体の作製〉

人工染色体は、染色体ベクターとして Multiple-gateway システムを利用して複数の巨大かつ特定のゲノム領域をそのままクローニングできる (図 4)。

〈XIST、LIT1/KCNQ1OT1 ゲノム領域を有する人工染色体の作製〉

部位特異的組み換え酵素である LR 反応を用いて、XIST、LIT1/KCNQ1OT1 の各々の相同領域をもつコンストラクションを作製した。その後、大腸菌内の組み換え反応 (Retrieve 法) により BAC 由来の XIST、LIT1/KCNQ1OT1 ゲノム DNA を人工染色体へ対応する部位特異的組み換えサイトをもつものへと改変後、インテグレースを用いて LacO 配列を有する人工染色体に搭載した。

図4. Multiple-gateway人工染色体の概要



4) CGG 反復配列を有する人工染色体の作製

脆弱 X 症候群は X 染色体長腕上の CGG リピートが伸長することにより起こる精神遅滞病である。この CGG リピートは正常では ~100 以下のリピートであるが、患者では 200 以上のリピートに伸長する。このリピートは伸長することにより非常に不安定でクローニングが困難になるため、保因者より (CGG)100 を PCR にて増幅し、TA クローニング後、(CGG)100 リピートのタンデム化を行った。タンデム化を行った CGG リピートを (CGG) 100 を 1 ユニットとし、1, 2, 4, 8 ユニートをそれぞれ作製し、LacO 配列を有する人工染色体へ搭載した。

4. 研究成果

1) LacO/LacI-GFP システムによるプラスミド DNA の回収。

DsRedd 内に設計したプライマーを用いて、PCR により免疫沈降サンプル内に LacO 配列を有するプラスミドの有無を確認した。その結果、抗 GFP 抗体により免疫沈降を行ったサンプルにおいて特異的なバンドが検出された。またプラスミドが環状のまま回収できているかどうか確認するため、免疫沈降を行ったサンプルを大腸菌へ形質転換し、コロニー形成率を比較した。その結果、抗 GFP 抗

体を用いた免疫沈降産物では、590 個のコロニー形成が認められた。一方、抗 IgG 抗体コントロールサンプルでは 140 個のコロニーを形成し、免疫沈降産物はコントロールと比較して、およそ 4.2 倍の形質転換能を示した (図 5)。LacO/LacI-GFP システムを用いた免疫沈降によりプラスミド DNA を安定に回収できたことが示唆された。

図5. Plasmid IPの免疫沈降結果

免疫沈降産物のPCR結果



免疫沈降産物の形質転換によるコロニー形成数(個)

input	抗GFP IP	抗IgG IP
1	590	140

(2) LacO/LacI-GFP システムによる巨大なクロマチン DNA の回収

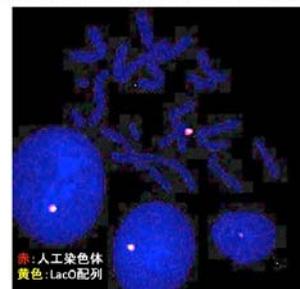
LacO 配列を有する染色体を保持する CHO 細胞を FISH 解析により確認した。その結果、CHO 染色体内に LacO 配列を保持する CHO 染色体を検出することに成功した。これをもって、LacO 配列を有する染色体を保持する CHO 細胞の樹立とした。

同細胞を用いて抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降を行い、その免疫沈降産物をプローブとして FISH 解析を行った。その結果、LacO 配列を有する CHO 染色体を特異的に検出することに成功した (図 3)。このことから、LacO/LacI-GFP タグシステムにより、巨大な染色体を特異的に免疫沈降により単離可能であることが示唆された。

(3) XIST、LIT1/KCNQ1OT1 ゲノム配列を有する人工染色体の作製

インテグレースを用いて部位特異的組み換え反応により LacO 配列を有する人工染色体を作製した。LacO 配列を導入した人工染色体を保持する細胞に LacO 配列をプローブとして、FISH 解析を行った。その結果、人工染色体上に LacO 配列のシグナルを検出した。このことより LacO 配列を有する人工染色体の作製に成功したことを示唆する (図 6)。

図6. LacO配列を有する人工染色体のFISH解析

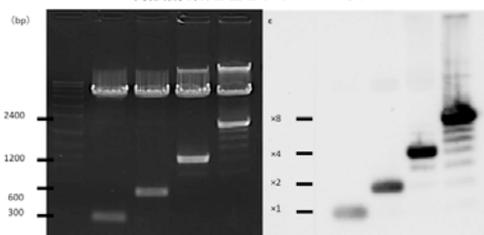


Retrieve 法を用いて各々のゲノム領域を有する BAC DNA を改変し、PCR によりゲノム領域および部位特異的組み換えサイトを確認した。その後、LacO 配列を有する人工染色体上にインテグラーゼを用いた部位特異的組み換えによりクローニングした。PCR によりゲノム領域の搭載を確認し、タグ配列と *XIST*、*LIT1* ゲノム領域を持つ人工染色体の完成とした。

4) CGG 反復配列を有する人工染色体の作製 (CGG) 100×1、×2、×4、×8 を有するコンストラクションを作製した。作製した 4 パターンのコンストラクションを制限酵素処理および CGG リピートを有したサザンブロットにより評価した (図 7)。その結果、(CGG)100×1、×2、×4、×8 全てのコンストラクションにおいて目的のサイズに (CGG)100 のバンドを確認できた。このことより (CGG)100×1、×2、×4、×8 を有するコンストラクションの完成とした。

各々のコンストラクションを LacO 配列を有する人工染色体上へクローニングした。人工染色体上へのクローニングの確認は、PCR およびサザンブロットにより確認した。また人工染色体が独立に存在していることを FISH 解析により確認できた。このことより、(CGG)100 リピートとタグ配列を有する人工染色体の完成とした。

図7. (CGG)100リピートを有するコンストラクションの制限酵素処理とサザンブロット



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 13 件)

1. Osaki M, Chinen H, Yoshida Y, Ohhira T, Sunamura N, Yamamoto O, Ito H, Oshimura M, Kugoh H. Decreased PITX1 gene expression in human cutaneous malignant melanoma and its clinicopathological significance European Journal of Dermatology, in press 査読(有)
2. Fujii H, Ikeuchi Y, Kurata Y, Ikeda N, Bahrudin U, Li P, Nakayama Y, Endo R, Hasegawa A, Morikawa K, Miake J, Yoshida A, Hidaka K, Morisaki T, Ninomiya H,

Shirayoshi Y, Yamamoto K, Hisatome I.: Electrophysiological properties of prion-positive cardiac progenitors derived from murine embryonic stem cells. *Circ J*. 査読(有), 76(12):2875-83. 2012

3. Li J, Koike J, Kugoh H, Arita M, Ohhira T, Kikuchi Y, Funahashi K, Takamatsu K, Boland CR, Koi M, Hemmi H. Down-regulation of *MutS* homolog 3 by hypoxia in human colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta -Molecular Cell Research*, 査読(有), 1823(4), 889-899, 2012 doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.017.
4. Yamaguchi S, Kazuki Y, Nakayama Y, Nanba E, Oshimura M, Ohbayashi T: A method for producing transgenic cells using a multi-integrase system on a human artificial chromosome vector. *PLoS One*. 査読(有), 6, e17267, 2011
5. Li YC, Matsumori H, Nakayama Y, Osaki M, Kojima H, Kurimasa A, Ito H, Mori S, Katoh M, Oshimura M, and Inoue T: SIRT2 downregulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis. *Genes to Cells*, 査読(有), 16, 34-45, 2011
6. Nawata H, Genro Kashino G, Tano K, Daino K, Shimada Y, H Kugoh H, Oshimura M, Watanabe M. Dysregulation of Gene Expression in the Artificial Human Trisomy Cells of Chromosome 8 Associated with Transformed Cell Phenotypes. *PLoS ONE*, 査読(有), 6(9), e25319, 2011 doi: 10.1371/journal.pone.0025319.
7. Qi DL, Ohhira T, Fujisaki C, Inoue T, Ohta T, Osaki M, Ohshiro E, Seko T, Aoki S, Oshimura M & Kugoh H. Identification of *PITX1* as a *TERT* suppressor gene located on human chromosome 5. *Mol. Cell Biol.*, 31(8), 査読(有), 1624-1636, 2011 doi: 10.1128/ MCB.00470-10.
8. Qi DL, Ohhira T, Oshimura M, Kugoh H. Human chromosome 5 carries a transcriptional regulator of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Biochem Biophys Res Commun*. 査読(有), 398(4): 695-701, 2010 doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.003.
9. Katoh M, Kazuki Y, Kazuki K, Kajitani N,

- Takiguchi M, **Nakayama Y**, Nakamura T, Oshimura M: Exploitation of the interaction of measles virus fusogenic envelope proteins with the surface receptor CD46 on human cells for microcell-mediated chromosome transfer. *BMC Biotechnology*, 査読(有), 10:37, 2010
10. Abe S., Tanaka H., Notsu T., Horike S., Fujisaki C., Qi DL., Ohhira T., Gilley D., Oshimura M., **Kugoh H.** Localization of an hTERT repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineering. *Genome Integrity*, 査読(有), 1(1): 6, 2010 doi: 10.1186/2041-9414-1-6.
 11. Inoue T, **Nakayama Y**, Yamada H, Li YC, Yamaguchi S, Osaki M, Kurimasa A, Hiratsuka M, Katoh M, Oshimura M: SIRT2 downregulation confers resistance to microtubule inhibitors by prolonging chronic mitotic arrest. *Cell Cycle*, 査読(有), 8(8): 1279-91, 2009
 12. Morikawa K, Bahrudin U, Miake J, Igawa O, Kurata Y, **Nakayama Y**, Shirayoshi Y, Hisatome I: Identification, isolation and characterization of HCN4-positive pacemaking cells derived from murine embryonic stem cells during cardiac differentiation. *PACE*, 査読(有), PACE-09-0353.R1 (2009, online only)
 13. Murakami, K., Ohhira, T., Oshiro, E., Qi, D., Oshimura, M., **Kugoh, H.** Identification of the chromatin regions coated by non-coding Xist RNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 査読(有), 125(1):19-25, 2009
- [学会発表] (計 26 件)
1. 吉川なつこ, 末松知久, 大平崇人, 押村光雄, **久郷裕之**, 井上敏昭 hTERT発現を抑制するPitX1から解き明かすhTERT発現制御ネットワーク 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡 平成24年(2012)12月11-14日
 2. 砂村直洋, **中山祐二**, 荻野由加利, 難波栄二, 押村光雄, **久郷裕之** 染色体免疫沈降法(ChrIP)を用いた疾患関連リピート配列に結合する因子の探索 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡, 平成24年(2012)12月11-14日
 3. 大平崇人, 尾崎充彦, 砂村直洋, 吉田雄一, 山元 修, 押村光雄, **久郷裕之** 新規テロメレース抑制遺伝子PITX1は悪性黒色腫の増殖を抑制する 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡, 平成24年(2012)12月11-14日
 4. **久郷裕之**, 大平崇人, 砂村直洋, 井藤久雄, 押村光雄, 尾崎充彦: PITX1発現低下は、ヒトメラノーマの進展に関する第71回日本癌学会学術総会, 札幌, ホテルロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館, 平成24年(2012)9月19-21日
 5. 逸見 仁道, 有田 通恒, 小池 淳一, 菊池由宣, 船橋 公彦, 大平 崇人, **久郷 裕之**, 近藤 元就: 低酸素によるhMSH3の発現抑制と大腸がんにおけるゲノム不安定性 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, ホテルロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館, 平成24年(2012)9月19-21日
 6. **H. Kugoh**: Characterization of a novel telomerase associated protein using microcell-mediated chromosome transfer. Interdisciplinary approaches for the study of senescence (UK/Japan Collaborative Symposium in association with The Japan Society for the Promotion of Science), Cambridge, UK, Cancer Research UK, Cambridge Research Institute, Feb. 9, 2012
 7. M. Oshimura, Y. Kazuki, M. Hiratsuka, T. Ohbayashi, Y. Iida, N. Uno, E. Ueno, K. Ueda, T. Ohhira, H. Kurosaki, S. Abe, **H. Kugoh**. Human artificial chromosomes for gene delivery and stable expression. PepTalk, Coronado, CA, USA, HotelDel Coronado, January 9-13, 2012
 8. 瀬古朋美, 山口繁幸, 吉村祐貴, **中山祐二**, 加藤基伸, 大林徹也, 押村光雄, **久郷裕之**: 特定染色体領域に集積する機能分子複合体の解析 第56回日本人類遺伝学会, 幕張, 幕張メッセ, 平成23年(2011)11月9-12日
 9. **久郷裕之**, Dong-Lai Qi, 大平崇人, 太田力, 井上敏昭, 押村光雄: 染色体導入による新規テロメラーゼ抑制遺伝子の同定 第56回日本人類遺伝学会, 幕張, 幕張メッセ, 平成23年(2011)11月09-12日
 10. **H. Kugoh**, K. Murakami, E. Ohshiro, T. Ohhira and M. Oshimura: Identification of the chromatin regions coated by non-coding

- Xist* RNA. 61th American Society of Human Genetics (ASHG), Montreal, Canada, Montreal Convention Centre, Oct. 11-15, 2011
11. T. Ohhira, S. Abe, H. Tanaka, T. Notsu, S. Horike, D.L. Qi, C. Fujisaki, D. Gilly, M. Oshimura, **H. Kugoh**: Evidence for a *hTERT* repressor gene on human chromosome 3p21.3 by using chromosome engineering. 61th American Society of Human Genetics (ASHG), Montreal, Canada, Montreal Convention Centre, Oct. 11-15, 2011
 12. **Y. Nakayama**, T. Seko, N. Sunamura, Y. Ogino, M. Kato, E. Nanba, M. Oshimura, **H. Kugoh**: Construction of in vitro model system to understand molecular mechanism of CGG repeat expansion in Fragile X syndrome. 61th American Society of Human Genetics (ASHG), Montreal, Montreal Convention Centre, Canada, Oct. 11-15, 2011
 13. T. Seko, S. Yamaguchi, Y. Yoshimura, **Y. Nakayama**, M. Kato, T. Obayashi, M. Oshimura, **H. Kugoh**. A novel proteomics approach for identification of protein-RNA complex associated with specific gene loci using a human artificial chromosome (HAC). 61th American Society of Human Genetics (ASHG), Montreal, Canada, Montreal Convention Centre, Oct. 11-15, 2011
 14. 大平崇人, 阿部智志, 押村光雄, 久郷裕之: 染色体改変技術を応用したテロメラーゼ抑制遺伝子領域 3p21.3 の同定 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 名古屋国際会議場, 平成23年(2011)10月3-5日
 15. 瀬古朋美, 山口繁幸, 吉村祐貴, 青木慎介, 中山祐二, 加藤基伸, 大林徹也, 押村光雄, 久郷裕之: 標的ゲノム領域上の蛋白-RNA機能複合体解析(ChIP法)に向けたヒト人工染色体(HAC)の活用. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸, 平成22年(2010)12月7-10日
 16. 大平崇人, 阿部智志, 田中宏美, 野津智美, 堀家慎一, 藤崎央子, Dong-Lai Qi, 押村光雄, 久郷裕之: 染色体改変技術を用いたヒト3p21.3 領域内の *TERT* 抑制遺伝子の同定, 第33回日本分子生物学会年会, 神戸, 平成22年(2010)12月7-10日
 17. 大平崇人, 阿部智志, 田中宏美, 野津智美, 堀家慎一, 藤崎央子, Qi Dong-Lai, David Gilley, 押村光雄, 久郷裕之 Localization of an *hTERT* repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineeringが 若手研究者ワークショップ 長野 アートランドホテル 蓼科 平成22年(2010)9月3日
 18. 目黒-堀家牧子, 宮野勝, 杉原一司, 成瀬智恵, 久郷裕之, 押村光雄, 浅野雅秀, 堀家慎一: ヒト15番染色体を保持したトランスクロモソミックマウスの作出 第4回日本エピジェネティクス研究会年会 米子 平成22年(2010)5月28-29日
 19. 久郷裕之: 機能性RNAによる染色体機能制御機構の解明 第60回染色体学会 松江 平成21(2009)年11月
 20. N. H. Sykes, A. T. Pagnamenta, G. Lunter, **H. Kugoh**, M. Oshimura, Elena Bacchelli, Elena Maestrini, A. J. Bailey, A. P. Monaco. Further investigation of *IMMP2L*, *LRRN3* and *DOCK4* as potential candidate genes for autism susceptibility. ASHG, Hawaii, 2009, Oct 20-24
- [その他]
ホームページ等
Nature 日本語版 FOCUS : 長鎖 ncRNA が操る「生命現象の裏社会」に 研究が紹介された。2011年12月
<http://www.natureasia.com/japan/nature/ad-focus/111201.php>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者 久郷 裕之 (Hiroyuki Kugoh)
鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 40225131
 - (2) 研究分担者 中山 祐二 (Yuji Nakayama)
鳥取大学・生命機能研究支援センター・助教
研究者番号 : 40432603
 - (3) 連携研究者 ()
研究者番号 :