

## 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 5 月 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510219

研究課題名（和文） 架橋反応の頻度で測るクロマチン構造と幹細胞研究への応用

研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF A CROSSLINKING-BASED ASSAY FOR CHROMATIN RESEARCH

研究代表者

石原 悟（ISHIHARA SATORU）

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：00300723

研究成果の概要（和文）：クロマチンをホルマリンで処理すると、ヌクレオソーム間が架橋されます。この反応では、ヌクレオソームの密度が大きいほどよく架橋されて大きな粒子になります。その大きさの異なる粒子を沈降速度法で分画することにより、密なヌクレオソームのクロマチンと疎なヌクレオソームのクロマチンを分離することに成功しました。SEVENS 法と名付けたこの方法の汎用性を向上させるため、さらに架橋条件などに改良を加えました。

研究成果の概要（英文）：The treatment of chromatin with formaldehyde makes nucleosomes to be cross-linked to each other. When there are more nucleosomes in the vicinity, the cross-linking reaction occurs well to produce larger particles including the nucleosomes. These particles can be fractionated in the sedimentation velocity centrifugation, in which nucleosomes cross-linked well are separated from ones cross-linked poorly. Here, the fractionation (designated as the SEVENS assay) was developed for chromatin research applicable to all mammalian cell types.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：ゲノム解析技術、クロマチン、ヌクレオソーム、ホルマリン

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞内での DNA はクロマチンと呼ばれる構造物中に収納されており、その構造の状態はゲノム上で起こるすべてのイベントに影響します。一般に、DNA が露出した open なクロマチンでのゲノム活動は活発であるのに対し、DNA が構造物中に折り畳まれた closed なクロマチンでは不活化されると考えられています。しかし、このようなデジタ

ル的な考えがある一方で、生物の活動が単純なオンとオフから構成されていないことは明らかです。実際、転写現象では RNA が全く合成されないオフの状態とともに、ごく微量から大量の RNA を合成し得る様々なオンの状態が考えられ、このようなアナログ現象に反映されるクロマチンが本来の構造であると予想されます。

クロマチンの構造を解析するには、従来、

DNase I などのヌクレアーゼに対する感受性を指標に推定する方法や、タンパク質成分の有無をフェノール抽出により判断する方法が行われてきました。前者の方法では、ヌクレアーゼ切断から回避された画分を closed なクロマチン構造が濃縮したものとして回収する一方、切断された側を観察することはできません。同様に、FAIRE 法と呼ばれる後者では、フェノール処理後の水層に回収される画分をタンパク質が乏しい open なクロマチンと判断するのみで、closed と推定される画分はその実験系から除かれてしまいます。つまり、両方法ともクロマチンが open と closed のどちらか一方からのみ構造を推定する方法であり、クロマチン構造のアナログ的側面を評価するには不都合な点を案じさせました。

## 2. 研究の目的

クロマチンの open 状態と closed 状態に加えて、それらの中間状態を連続的に捉えることが可能な方法を開発するために、ヌクレオソームの局所密度が異なるクロマチンを沈降速度法で分画することを着想しました (図 1)。SEVENS (Sedimentation velocity centrifugation normalized by the size of DNA) と名付けたこの方法は、当初、マウス T 細胞を用いて開発し、得られたデータが示すクロマチンの open-intermediate-closed は転写活性の強-中-弱とよい相関を示しました。そして、今回、T 細胞に比べて容積の大きい付着性細胞に応用するにあたり、SEVENS 法の有効性を検証する必要が生じました。とりわけ、分化時に細胞形態の変化を伴う幹細胞研究では、形態の異なるステージの細胞間での比較が必要となります。そこで、本研究課題において、如何なる細胞に対しても応用できるよう、SEVENS 法の実施条件、及びデータの表現方法を改良することを目的としました。

## 3. 研究の方法

SEVENS 法の作業工程において、クロマチン内のヌクレオソームの局所密度が正確に保存される必要があります。そこで、アームの極めて短いクロスリンカーであるホルマリンをクロマチンの前処理に用いました。ヌクレオソームの密度が局所的に小さければ、ホルマリンによる架橋反応をあまり起こらず小さい粒子になります。その一方で、ヌクレオソームが混み入ったクロマチンでは、ホルマリンが多数のヌクレオソーム間を架橋し大きな粒子になります。そして、その粒子の大きさは沈降速度の違いをもたらします (図 1)。したがって、ホルマリンの濃度は SEVENS 法にとって極めて重要であり、何れの細胞のクロマチンにおいても同等に架橋条件を再

現する必要が生じました。そこで、ホルマリンの濃度をふって SEVENS 法を実施し、その至適濃度を決めます。

SEVENS 法でのクロマチン分画の成否は、各フラクションから回収される DNA の長さから判断されます。通常、短い DNA 断片は小さい粒子ゆえの遅い沈降速度で上部フラクションに残り、長い DNA を含んだ大きな粒子が下部フラクションに短時間で沈降します。したがって、図 2 のように、階段状の電気泳動パターンが見られます。このような DNA パターンを様々な細胞で検証し、SEVENS 法の有効性を判断します。

## 4. 研究成果

はじめに、ヒト胎盤絨毛膜由来の JEG-3 細胞を用いて SEVENS 法の有効性を検討しました。マウス T 細胞に比べてこの細胞の容積は大きく、ホルマリンが反応するタンパク質など物質が 1 細胞あたり多く含有されることが予想されました。そこで、T 細胞と同様の架橋状態が JEG-3 細胞で再現されるために、より高濃度のホルマリンが必要とされると考え、従来の 0.75%に加えて、0.8、0.9%と濃度をふって SEVENS 法による分画を行いました。その結果、 $\beta$  チューブリン (TUBB) や  $\beta$  アクチン (ACTB) などの恒性的に発現する遺伝子座のクロマチンは期待通り open 構造として上部フラクションに濃縮されたのに対し、closed クロマチンと予想される非発現の臭覚受容体 (OR1A1) やミエリン特異的転写因子 (MYT1) などの遺伝子座が下部フラクションに沈降しませんでした。これらの遺伝子座の行方を詳細に解析したところ、その多くが不溶性画分として遠心チューブの底に沈殿することが分かりました。つまり、0.75%以上の濃度のホルマリンによる架橋反応では、closed 構造を取るクロマチンが選択的に可溶化されず実験系から除かれてしまうので、サンプル調製の条件としては適当でないことが分かりました。そもそも、広く用いられているクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法の架橋条件は 1%であり、遠心分離後の可溶化された上清のみ用いられるために不溶性画分は注目されませんでした。しかし、今回の観察で、ホルマリン架橋反応後に抽出されるクロマチンには遺伝子座によって回収率にバイアスが掛かっていることを分かり、SEVENS 法や ChIP 法を実施する時の留意すべき点として考えられました。そこで、SEVENS 法のためのクロマチン可溶化には次の 1 ステップを加えました。クロマチンを 0.75%ホルマリンで架橋して従来と同様に 10 秒間の超音波処理により断片化した後、1%SDS 溶液で懸濁し 2 時間 37°C で保温しました。その結果、JEG-3 細胞、及びそれ以外に用いたヒト肝臓由来の HepG2 細胞、ヒト卵巣由来の KGN 細胞、

ヒト子宮由来の HeLa 細胞のいずれにおいても、約 95% のクロマチンが上清へと回収されました。ヌクレオソーム間のホルマリン架橋の保持に対しては、この程度のマイルドな保温では影響ないものと思われます。

上述のように可溶化された 4 種の細胞株のクロマチンに対し、沈降速度法による分画を実施しました。ところが、各フラクションから回収された DNA のアガロース電気泳動法での確認は、細胞によって異なる泳動パターンを示しました。JEG-3 細胞と HepG2 細胞 (図 2 の左) はマウス T 細胞と似て、上部から下部フラクションにかけて DNA サイズのレンジが広がるのに対し、KGN 細胞 (図 2 の右) と HeLa 細胞では上部フラクションでありながら長い DNA を含む傾向が見られました。この原因には、未架橋の長い DNA が多く含まれるクロマチンであったためと考えられます。つまり、ホルマリンの 0.75% という濃度は、JEG-3 細胞と HepG2 細胞のクロマチンを架橋するには十分である一方、KGN 細胞と HeLa 細胞では薄すぎた可能性を示唆します。このように、同一条件であっても細胞によって架橋効率が異なるので、SEVENS 法での分画パターン (つまり、各フラクションへの回収率) で任意遺伝子座のクロマチン構造を細胞間で比較することはできませんでした。したがって、代替案として、各細胞のクロマチンについて内部標準を設定し間接的に比較することを行いました。何れの細胞においても常に発現している遺伝子座の 3 つ、TUBB、ACTB、GAPDH 遺伝子座を open 構造の内部標準に、一方、ここで用いた 4 細胞株のすべてで発現していない OR1A1、MYT1、IL2RA 遺伝子座を closed クロマチンの内部標準に用いました。図 3 に示したように、それらの遺伝子座のクロマチンには、SEVENS 法により得られた個々の値にばらつきが見られるものの、open と closed の内部標準の間には大きな差が見られました。この結果、任意遺伝子座の SEVENS 法の値がどちらの標準に近いのか、または中間の値であるのかを判断することにより、クロマチン構造の open-intermediate-closed が評価され細胞間での比較が可能になりました。

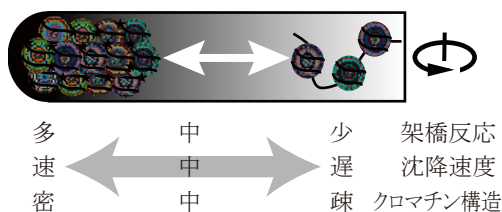


図 1 SEVENS 法の原理  
図中の星印はホルマリンによる架橋を表す。

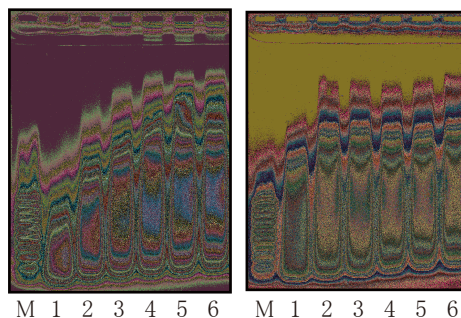


図 2 各フラクションから回収される DNA  
HepG2 細胞 (左) と KGN 細胞 (右) のクロマチンを SEVENS 法で分画後、各フラクションから回収した DNA をアガロースゲル電気泳動にロードした。数字は上部から下部に向かって付けられたフラクション番号、M は分子量マーカーを表す。

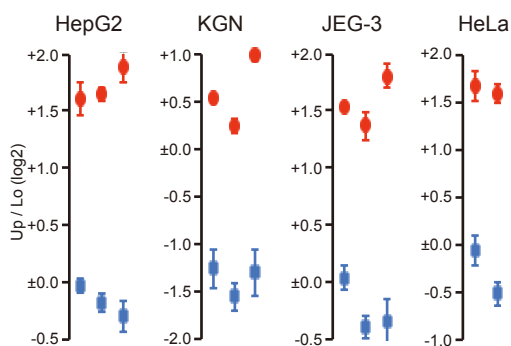


図 3 SEVENS 法の内部標準  
赤は open クロマチン (左から TUBB、ACTB、GAPDH)、青は closed クロマチンの内部標準 (左から OR1A1、MYT1、IL2RA) を表す。単位の Up/Lo はフラクションを上部と下部に二分した時の下部に対する上部に濃縮する割合。

### 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 3 件)

- ① Pandiyan, P., Yang, XP., Saravanamuthu, SS., Zheng, L., Ishihara, S., O' Shea, JJ., and Lenardo, MJ. (2012) The role of IL-15 in activating STAT5 and fine-tuning IL-17A production in CD4 T lymphocytes. *J. Immunol.* 189, 4237-4246. doi: 10.4049/jimmunol.1201476 査読あり
- ② Ishihara, S. and Schwartz, RH. (2011) Two-step binding of transcription factors causes sequential chromatin structural changes at the activated IL-2 promoter. *J. Immunol.* 187, 3292-3299. doi: 10.4049/jimmunol.1003173 査読あり
- ③ Ishihara, S., Varma, R., and Schwartz,

RH. (2010) A new fractionation assay, based on the size of formaldehyde crosslinked, mildly sheared chromatin, delineates the chromatin structure at promoter regions. *Nucleic Acids Res.* 38, e124. doi: 10.1093/nar/gkq203 査読あり

[学会発表] (計7件)

- ① 琴村直恵, 原田信広, 石原悟. The chromatin structure responsible for the degree of the promoter activity. 第35回日本分子生物学会年会. 2012年12月11日~14日. 福岡.
- ② 石原悟, 琴村直恵, 原田信広. CYP19 遺伝子のプロモーター選択機構: 密なクロマチン構造でプロモーターを選択的に抑制する. 第6回日本エピジェネティクス研究会年会. 2012年05月14日~15日. 東京.
- ③ 琴村直恵, 原田信広, 石原悟. The contribution of histone modifications to alternative promoter usage of the human CYP19 gene. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月13日~16日. 横浜.
- ④ 石原悟, 琴村直恵, 西芳寛, 野村政壽, 柳瀬敏彦, 原田信広. ヒストン H3K27 のトリメチル化によるアロマターゼ遺伝子プロモーターの選択的不活性化. 第19回日本ステロイドホルモン学会学術集会. 2011年11月26日. 福岡.
- ⑤ 石原悟, 琴村直恵, 原田信広. Condensed Chromatin Marked by K27-Trimethylated Histone H3 Determines Alternative Promoter Usage of the CYP19 Gene. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会. 2011年5月19日~20日. 熊本.
- ⑥ Kotomura, N., Harada, N., Ishihara, S. Condensed chromatin marked by K27-trimethylated histone H3 determines alternative promoter usage of the CYP19 gene. CDB Symposium "Epigenetic landscape in development and disease". Mar. 14-15, 2011. Kobe, JAPAN.
- ⑦ Ishihara, S., Schwartz, RH. Sequential rearrangement and eviction of nucleosomes allow interleukin-2 transcription following T cell activation. The NIBB Conference "DYNAMICGENOME". Oct. 16, 2010. Okazaki, JAPAN.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石原 悟 (ISHIHARA SATORU)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号: 00300723