

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 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710185

研究課題名（和文） 挿入的クロマチン免疫沈降法（iChIP法）を用いた転写伸長一時停止機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of promoter-proximal pausing of transcription by using insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP)

研究代表者

藤田 敏次 (FUJITA TOSHITSUGU)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10550030

研究成果の概要（和文）：本研究では、転写伸長一時停止機構の全容解明を目的とし、挿入的クロマチン免疫沈降法（iChIP法）を用いて、*c-fos* 遺伝子上の転写伸長一時停止領域を単離し、そこに結合している因子（蛋白質・DNA・RNA）を網羅的に同定することを目指した。まず、ニワトリのB細胞株であるDT40の*c-fos* 遺伝子上の転写伸長一時停止部位にLexA結合配列を挿入するためのターゲティングベクターを作製した。現在、LexA結合配列を挿入するためのターゲティングを進めている。ターゲティングできた細胞株を得しだい、転写伸長一時停止領域を単離・解析する。また、iChIP法を最適化することで、低コピー数の解析対象とするゲノム領域を効率よく単離し、そこに結合する蛋白質およびRNAを同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）： To understand mechanisms of promoter-proximal pausing of transcription, we aimed to specifically isolate the promoter-proximal region of the *c-fos* gene and to identify molecules (proteins, DNA, RNA) binding to the isolated region by using insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP). As a step of iChIP, we constructed a targeting vector for insertion of the binding elements of LexA, a bacterial DNA-binding protein, around the *c-fos* promoter-proximal region. We are now conducting gene targeting with the vector. On the other hand, we optimized iChIP for isolation of low copy number of a target genomic region and identification of proteins and RNA binding to the region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学
キーワード：遺伝子発現調節、*c-fos*、iChIP

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現機構のうち、主要な制御機構の一つが転写機構である。転写機構は開始・伸長・終結の三つの主要機構から構成されており、RNAポリメラーゼ II (pol II) がその中心的な役割を担っている。これまでの研究では、遺伝子の転写開始、つまり pol II や転写因子に代表される DNA 結合因子のプロモーター領域への結合が転写機構の律速段階として考えられてきた。一方、ある種の遺伝子においては、転写伸長段階が転写機構の律速段階であることが報告されており、転写開始後における pol II の挙動制御が転写の効率を決定する。つまり、これらの遺伝子では、発現未誘導時においても遺伝子転写はすでに開始されており、転写が 100 base 程度行われた後に停止している。そして、発現誘導刺激後に転写伸長一時停止部位から転写伸長が再開され、完全長 mRNA が合成される。

転写伸長一時停止機構の分子機構については、1990 年代後半から盛んに研究され、転写伸長一時停止機構において pol II の挙動を制御する蛋白質として、転写伸長促進因子 P-TEFb (positive transcription elongation factor b) と転写伸長抑制因子 DSIF (DRB sensitivity inducing factor) および NELF (negative elongation factor) が同定された。これまでに、これら因子の作用機構として、(1) DSIF と NELF が複合体 (DSIF/NELF) として、転写開始後の pol II をプロモーター近傍で停止させる、(2) キナーゼである P-TEFb が pol II および DSIF をリン酸化する、(3) NELF が外れ転写伸長が再開される、ことが見出しされてきた。

転写伸長一時停止機構は転写機構の一段階として認識されつつある一方、その分子機

構については、完全に解明されたとは言い難い。例えば、DSIF が mRNA の 5' キャッピングを行う Capping enzyme と結合することや、クロマチン構成蛋白質であるヒストンをメチル化する酵素複合体 PAF/Set1 と結合することが報告されており、転写伸長一時停止機構が mRNA の修飾やクロマチンの構造変化の場であることが示唆されている。しかし、転写伸長一時停止機構が全ての遺伝子上で作用していないことや、mRNA の修飾やメチル化酵素複合体によるクロマチン修飾は基本的には遺伝子共通の機構であることを考えると、これらの修飾については、転写伸長一時停止機構に特有な分子機構が存在する可能性が考えられる。また、最近では、DSIF/NELF による転写伸長一時停止機構が、遺伝子間の絶縁体であるインスレーターのような働きをすることも報告されているが、その真偽や分子機構については未知のままである。さらに、インスレーター様の機能のみならず、転写伸長一時停止機構の新規な機能の存在も否定できない。以上のような理由から、転写伸長一時停止機構の転写時における分子機構の全容解明が期待されており、そのことは、転写伸長一時停止機構を転写機構の一段階として位置づける上で必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、転写伸長一時停止機構の分子機構の全容解明を目的とし、転写伸長一時停止機構に関与する因子 (蛋白質・DNA・RNA) を網羅的に同定・解析する。具体的には、申請者の所属する研究室で開発された、生体内でのクロマチン構造を維持したまま特定のゲノム領域を単離することができる新手法 < 挿入的クロマチン免疫沈降法

(insertional chromatin immunoprecipitation: iChIP, *J. Biosci. Bioeng.*, 2009, 108, 446-449、図1) >を利用することで、転写伸長一時停止領域に存在する因子を網羅的に同定する。iChIP 法は、(1) 細菌の DNA 結合蛋白である LexA の結合塩基配列を解析対象ゲノム領域近傍に相同組換えを用いて挿入し、(2) タグを付けた LexA の DNA 結合ドメイン (FCNLD) を上記細胞へ発現させ、(3) 坑タグ抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行う、ことで、解析対象とするゲノム領域に相互作用する蛋白質・DNA・RNA を網羅的に回収することができる画期的な方法である (図1)。近年、他のゲノム DNA 領域や機能性非コード RNA も転写機構に関与することが知られていることから、蛋白質のみならず DNA や RNA についても同定する。本研究を通じて、転写伸長一時停止機構の分子機構の全容解明に迫る。

3. 研究の方法

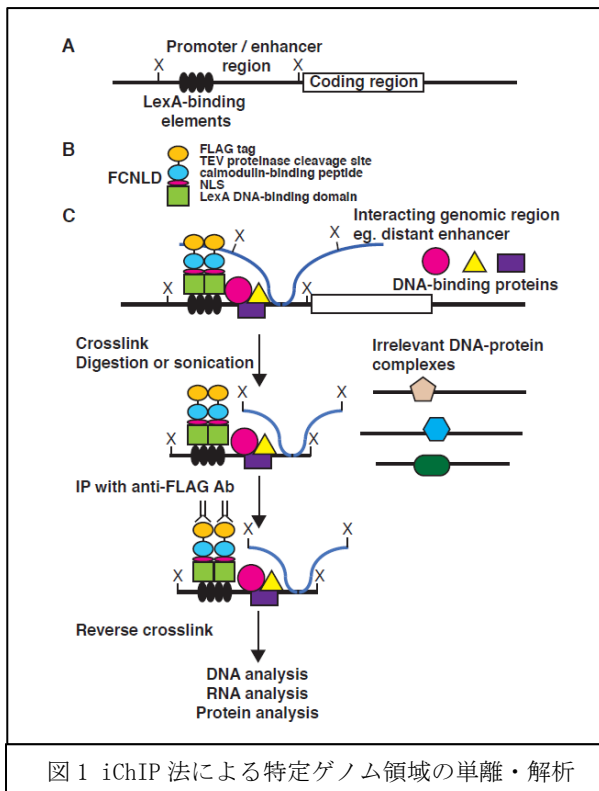


図1 iChIP 法による特定ゲノム領域の単離・解析

本研究では、ニワトリの成熟 B 細胞株である DT-40 を用いた。DT-40 において *c-fos* 遺伝子は血清刺激によって誘導されることがすでに報告されている。また、DT-40 は、ジーンターゲティング時における相同組換えが他の細胞より高頻度で起こるという特徴を持っている。本研究について、下記のように研究を行った。

(1) *c-fos* 遺伝子上の転写伸長一時停止部位近傍に LexA 結合塩基配列を挿入するためのターゲティングベクターを作成した。次に、DT-40 細胞に作製したベクターをトランスフェクションし、薬剤選択することで、LexA 結合塩基配列が相同組換えで挿入された細胞株を選択した。選択した細胞株からゲノム DNA を抽出し、PCR およびサザンブロッティングによって相同組換えを確認した。

(2) iChIP法によって蛋白質およびRNAを同定するにあたり、実験系の最適化を行った。具体的には、ゲノム上の遺伝子間の絶縁体として働くインスレーター領域に LexA 結合塩基配列を挿入した配列を持つベクターを、マウス B 細胞株にランダムインテグレーションで挿入した。この細胞を用いて、iChIP 法の実験系を最適化することで、低コピー数のゲノム領域に結合している蛋白質および RNA を同定できる実験系を構築した。

4. 研究成果

(1) まず、*c-fos* 遺伝子上の転写伸長一時停止部位近傍に LexA 結合塩基配列を挿入するためのターゲティングベクターを作成した。細胞株樹立に用いる薬剤耐性遺伝子は両側に loxP 配列を挿入し、Cre リコンビナーゼを一過性に発現させることにより除去する。なお、LexA 結合配列挿入位置は、既知の転写因子の結合配列を壊さず、また、種間で保存されていない位置を選ぶことで、LexA 結合塩基

配列挿入による *c-fos* 遺伝子の発現異常が起きないように設計した。DT-40 細胞を用い、相同組換えによる LexA 結合塩基配列の目的部位への挿入を行った。薬剤選択の結果、30 クローンが得られ、PCR による解析の結果、2 クローンにおいて、相同組換えによる LexA 結合塩基配列の挿入が確認できた。一方、サザンブロットによる相同組換えの確認を行ったところ、明確な LexA 結合塩基配列の挿入は見られなかった。現在、サザンブロットの系の最適化を行っているとともに、LexA 結合塩基配列が目的部位へ挿入されたクローンをさらに樹立している。今後、サザンブロットにより相同組換えが確認できた細胞株を用いて iChIP を行い、*c-fos* 遺伝子上の転写伸長一時停止領域を単離・解析する。

(2) iChIP 法を利用して解析対象とするゲノム領域に結合している蛋白質を同定する際の実験条件の最適化を行った。トランスジーン系の系を用いて、解析対象とするゲノム領域に結合する蛋白質の同定を試みるため、イ

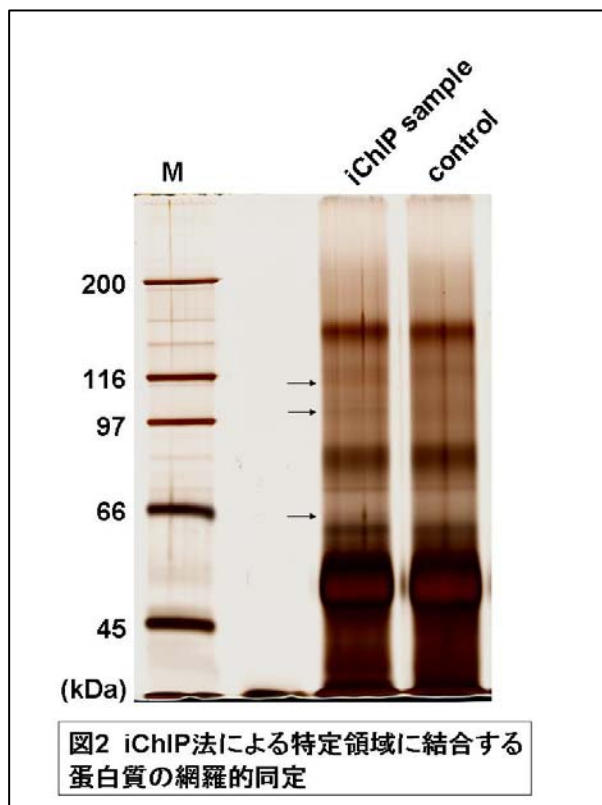
ンスレーター領域と LexA 結合塩基配列を有するベクターを、マウス B 細胞株にランダムインテグレーションで挿入し、ゲノム様の構造を模した。iChIP 法と SDS-PAGE ならびに質量分析法を組み合わせた解析の結果、当該ゲノム領域に結合する数種類の蛋白質を同定することに成功した (図 2)。この結果は、低コピー数の解析対象とするゲノム領域に、生理的条件に近い状況で存在している未知蛋白質を同定することに世界で初めて成功した画期的な成果である。なお、計算上、 1×10^9 個の細胞を用いることで、1 コピーの解析対象とするゲノム領域に結合する蛋白質の同定が可能であることも判明した。さらに、iChIP 法と RT-PCR を組み合わせることで、解析対象とするゲノム領域に結合している RNA についても単離・解析できることが判明した。今後、この最適化された系を、転写伸長一時停止機構の解析に利用する。

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 2 件)

- ① Fujita, T. and Fujii, H. (2011) Direct identification of insulator components by insertional chromatin immunoprecipitation. *PLoS ONE* 6, e26109.
doi:10.1371/journal.pone.0026109
査読あり
- ② Fujita, T. and Fujii, H. (2011) Species-specific 5'-genomic structure and multiple transcription start sites in the chicken Pax5 gene. *Gene* 477, 24-31.



doi:10.1016/j.gene.2011.01.008

査読あり

〔学会発表〕（計1件）

- ① 藤田敏次、藤井穂高、挿入的クロマチン免疫法を利用したインスレーター分子の同定、第34回日本分子生物学会年会（2011年12月16日）パシフィコ横浜、神奈川県

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

①

名称：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：大阪大学

種類：特許

番号：PCT/JP2010/064052

出願年月日：2010年8月20日

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/microimm/fujii/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 敏次 (FUJITA TOSHITSUGU)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10550030