

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830131

研究課題名(和文) iChIP法によるゲノム結合分子の高感度解析法の確立及び転写制御機構解明への応用

研究課題名(英文) Optimization of iChIP for highly sensitive identification of genome interacting molecules and application to analysis of transcriptional regulation mechanisms.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内に内在的に存在する1コピーの標的ゲノム領域を生化学的に単離し、その領域に結合している蛋白質・RNAを網羅的に高感度に同定する技術の開発を進めた。我々が開発したiChIP法と、SILAC法やRNAシーケンス解析を組み合わせることで、DT40細胞内の1コピーの内在性Pax5遺伝子プロモーター領域に結合している蛋白質・RNAの網羅的同定に成功した。さらに、同定蛋白質の一つであるThy28について解析した結果、Thy28はMYH9との結合を介して、Pax5遺伝子発現を制御していることが判明した。本研究で開発した技術は、ゲノム機能の分子機構の解明に有用である。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of molecular mechanisms of genome functions requires identification of molecules interacting with genomic regions of interest in vivo. In this study, we applied iChIP, one of the locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies, to isolate a single-copy genomic locus and comprehensively identify proteins and RNAs interacting with the locus in vivo. By combining iChIP with SILAC or RNA-sequencing, we could identify proteins or RNAs interacting with the promoter region of the endogenous single-copy chicken Pax5 gene. In addition, biochemical analysis revealed that Thy28, an identified interacting protein, is functionally required for B cell-specific transcription of the Pax5 gene via recruitment of MYH9 to the Pax5 locus in DT40 chicken B cell line. Thus, iChIP is a useful tool to elucidate molecular mechanisms of genome functions.

研究分野：総合生物

キーワード：ゲノム科学 ゲノム生物学 遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現は複雑に制御されており、その転写には RNA ポリメラーゼや転写因子に加え、クロマチン構成因子やヒストン修飾などのエピジェネティックな制御機構の関与も知られている。また、近年、ノンコーディング RNA が遺伝子プロモーター上にクロマチン修飾因子を繋ぎ止めることで転写を制御することも知られている。これら遺伝子転写制御機構の包括的理解には、クロマチン構造を保持した状態で、当該ゲノム領域を単離して、そこに結合している分子を生化学的に解析することが必要不可欠であることが、次第に認識されるようになってきた。このため、世界的にその方法論の開発をめぐる競争が繰り広げられている。現在までのところ、解析対象とするゲノム領域に結合する分子の単離・解析方法には以下が挙げられる。

- (i) クロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation: ChIP): 既知の蛋白質が解析対象のゲノム領域に結合することが分かっているならば、ChIP 法により、そのゲノム領域を単離することが可能である。しかし、一般に、ゲノム上の 1 箇所のみ結合する蛋白質の報告は無いため、ChIP 法では、解析対象とするゲノム領域のみを単離することは不可能である。
- (ii) Chromosome Conformation Capture (3C) 法: ゲノム間の相互作用を検出する方法である。3C 法は、解析対象とするゲノム領域に結合している別のゲノム領域を、架橋・制限酵素切断・ライゲーション・PCR の順で同定する。本方法では、ライゲーション反応・制限酵素反応に由来するバイアスが存在する。
- (iii) Proteomics of Isolated Chromatin segments (PiCh) 法: 特異的な核酸プローブを用いて、標的ゲノム領域を単離する方法である。PiCh 法では、標的ゲノム領域に結合する分子 (蛋白質・DNA RNA) の同定が理論的には可能であるが、これまでに数万コピー存在するテロメア配列に結合する蛋白質の同定が報告されているだけであり、1 コピーのゲノム領域への応用や DNA・RNA の同定については不明である。

一方、申請者らは、生体内でのクロマチン構造を保存したまま解析対象とするゲノム領域を単離する方法として、挿入的クロマチン免疫沈降法 (insertional chromatin immunoprecipitation: iChIP) を考案した (*J. Biosci. Bioeng.*, 2009、日本・米国特許取得済み、図 1)。iChIP 法は、(A) 細菌の DNA 結合蛋白質である LexA の結合塩基配列を、解析対象ゲノム領域近傍に挿入した細胞を樹立、(B) 3xFLAG タグを付けた LexA 蛋白質の DNA 結合ドメイン (3xFLNDD) の上記細胞への発現、(C-1) 必要であればホルムアルデヒドで分子間の結合を架橋後、超音波処理等によりゲノム DNA を断片化、(C-2) 3xFLAG タグを認識する抗体を用いた免疫沈

降により、3xFLNDD が結合した DNA・RNA・蛋白質複合体を単離、(C-3) 架橋を外し、免疫沈降複合体中の分子 (DNA、RNA、蛋白質) をマイクロアレイや次世代シーケンス、質量分析法などで同定、という手順による。

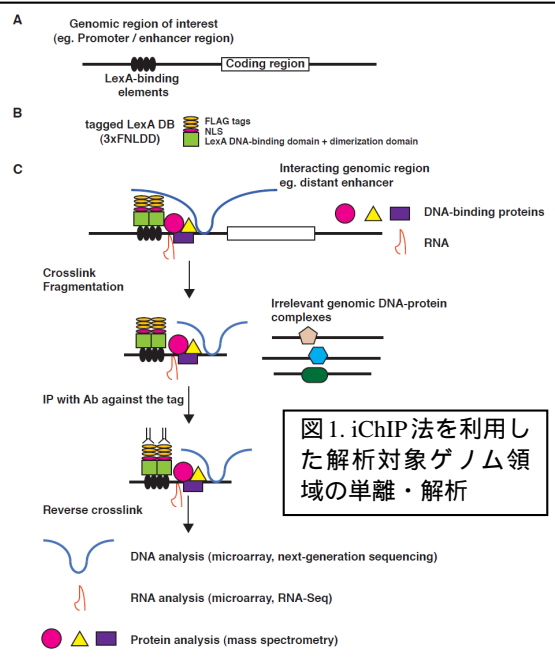


図 1. iChIP 法を利用した解析対象ゲノム領域の単離・解析

申請者らは、脊椎動物細胞のトランスジーン系の系において、iChIP 法を用いることで、ゲノム上に挿入した 24 コピーの標的ゲノム領域を細胞内でのクロマチン構造を維持した状態で単離することに成功した。次いで、同様の系で、ゲノム領域間の「しきり」として働くことで遺伝子発現を調節するインスレーター領域に結合する蛋白質・RNA を同定することに成功した (**Fujita and Fujii, *PLoS One*, 2011**)。これらの結果は、低コピー数の標的ゲノム領域に、生理的条件に近い状況で結合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。

今後、iChIP 法を用いて、細胞内に内在的に存在する 1 コピーのゲノム領域に結合する分子を網羅的に同定できることが期待される。とりわけ、転写因子やクロマチン関連因子といった蛋白質やノンコーディング RNA を網羅的に同定できる技術を確認することが出来れば、エピジェネティックな制御機構を含む転写制御機構を包括的に理解でき、従来の方法論では得られなかった生命現象の発見につながると考える。

2. 研究の目的

本申請課題では、iChIP 法により、細胞内に内在的に存在する 1 コピーの標的ゲノム領域を単離し、そこに結合する蛋白質・RNA を網羅的に高感度で同定する技術を確認する。具体的には、iChIP 法を利用することで、B リンパ球分化を担う主要分化制御因子である Pax5 の遺伝子プロモーター領域に結合する蛋白質・RNA を網羅的に同定する技術

を確立する。また、同定した蛋白質・RNAの機能解析を通して、*Pax5* 遺伝子の転写制御機構の理解に迫る。

3. 研究の方法

本研究では、ニワトリの B 細胞株 DT40 細胞を用いて研究を進める。その理由として、B 細胞の分化・機能発現はヒト・マウス・ニワトリで高い類似性が見られること、また、DT40 細胞は DNA 相同組換え効率が ES 細胞以上に高く、内在性 *Pax5* 遺伝子プロモーター領域への LexA 結合塩基配列の挿入が容易であること、が挙げられる。なお、既に、DT40 細胞における *Pax5* 遺伝子プロモーター領域を同定している (Fujita and Fujii, *Gene*, 2011)。研究は、下記の通り進める。

(1) 使用する細胞株の樹立

ニワトリ B 細胞株 DT40 の *Pax5* 遺伝子の内在性プロモーター領域を iChIP 法で単離するための細胞株および陰性対象細胞株を用意する。

(2) *Pax5* 遺伝子プロモーター領域結合蛋白質の網羅的同定法 (iChIP-SILAC 法) の確立

(1) で樹立した細胞株を用いた iChIP 法によって、内在性 *Pax5* 遺伝子プロモーター領域に結合している蛋白質の網羅的同定法を確立する。具体的には、従来の iChIP 法では、質量分析法への使用抗体由来の夾雑蛋白質の混入が多かったため、今回、夾雑蛋白質を減少させつつ標的ゲノム領域複合体の回収率を上昇させるため、抗 FLAG 抗体からの免疫沈降複合体の溶出条件 (3xFLAG ペプチドの使用等) の最適化を図る。さらに、安定同位元素を利用した定量的質量分析技術である SILAC (Stable Isotopic Labeling using Amino Acids in Cell Culture) 法を組み合わせることで、残存する夾雑蛋白質の影響を受けずに、内在性 *Pax5* 遺伝子プロモーター領域に結合している蛋白質を網羅的に同定する。

(3) *Pax5* 遺伝子プロモーター領域結合 RNA の網羅的同定法 (iChIP-RNA-Seq) の確立

(1) で樹立した細胞株を用い、(2) で確立した精製度の高い iChIP 法を利用することで、内在性 *Pax5* 遺伝子プロモーター領域に結合している RNA の網羅的同定法を確立する。具体的には、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域を単離後、結合している RNA を精製し、次世代シーケンスによる解析 (RNA-Seq) によって相互作用している RNA を網羅的に同定する。

(4) 同定した蛋白質の機能解析

(2) で同定した蛋白質に焦点を当て、*Pax5* 遺伝子発現における生理的意義について解析する。具体的には、ChIP 法によって、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域上の結合領域について詳細に解析するとともに、RNAi による

ノックダウン実験を行うことで、*Pax5* 遺伝子発現に与える影響を解析する。

4. 研究成果

(1) 研究で使用する細胞株の樹立

これまでに、相同組換え法を用いて、1 コピーの *Pax5* 遺伝子プロモーター領域 (転写開始点の 0.3 kbp 上流) に LexA 結合塩基配列を挿入した DT40 細胞を樹立し、さらに、この細胞に 3xFLNDD を発現させた細胞株 “KI+3xFLNDD#4” を樹立している。iChIP 法によるゲノム結合分子の同定では陰性対象との比較が必須である。そこで、同程度の 3xFLNDD を発現しているが LexA 結合塩基配列が挿入されていない DT40 細胞株 “3xFLNDD 細胞” も樹立した。さらに、B 細胞特異的に *Pax5* 遺伝子プロモーター領域に結合している分子を同定するため、KI+3xFLNDD 細胞をマクロファージ様細胞に分化転換させた細胞株 “KI+3xFLNDD(Mφ)” も陰性対象細胞として樹立した。

(2) *Pax5* 遺伝子プロモーター領域結合蛋白質の網羅的同定法 (iChIP-SILAC 法) の確立

Pax5 遺伝子プロモーター領域に結合している蛋白質を、安定同位元素を利用した定量的質量分析技術である SILAC 法を用いて同定するため、安定同位元素で標識したアミノ酸を含む培地で KI+3xFLNDD#4 細胞を培養し、蛋白質を標識した。また、陰性対照細胞には KI+3xFLNDD(Mφ) を使用し、安定同位元素を含まない培地で培養した (無標識)。両細胞株とも 5×10^7 個の細胞を用意し、ホルムアルデヒド処理することで、ゲノム上の分子間相互作用を保持させた (クロソリンク処理)。次に、ゲノムをソニケーションで物理的に断片化 (2 kbp 前後) 後、抗 FLAG タグ抗体を用いた免疫沈降によって、3xFLNDD が結合している *Pax5* 遺伝子プロモーター領域を単離した。さらに、単離した免疫沈降物に 3xFLAG ペプチドを添加することで、抗 FLAG タグ抗体からゲノム複合体を溶出した。

溶出したゲノム複合体を SDS-PAGE に供し、1 cm 程度泳動した後、銀染色で蛋白質を染色し、全蛋白質をゲルから切り出し回収した。回収した蛋白質をゲル内トリプシン消化後、質量分析法により蛋白質の網羅的同定を行った。なお、質量分析法において、安定同位元素で標識されたペプチド由来のピークの高さを数値化したもの (Heavy) と、陰性対照由来のピークの高さを数値化したもの (Light) を比較 (Heavy/Light) し、Heavy/Light の比率が 1 以上のペプチド (蛋白質) を結合蛋白質として評価した (図 2)。

解析の結果、Heavy/Light の比率が 1 以上の蛋白質を数十個同定することができた。これら B 細胞特異的同定蛋白質の中には、ヒストンバリエント、転写因子、RNA 結合蛋白質、酵素等も含まれていた。

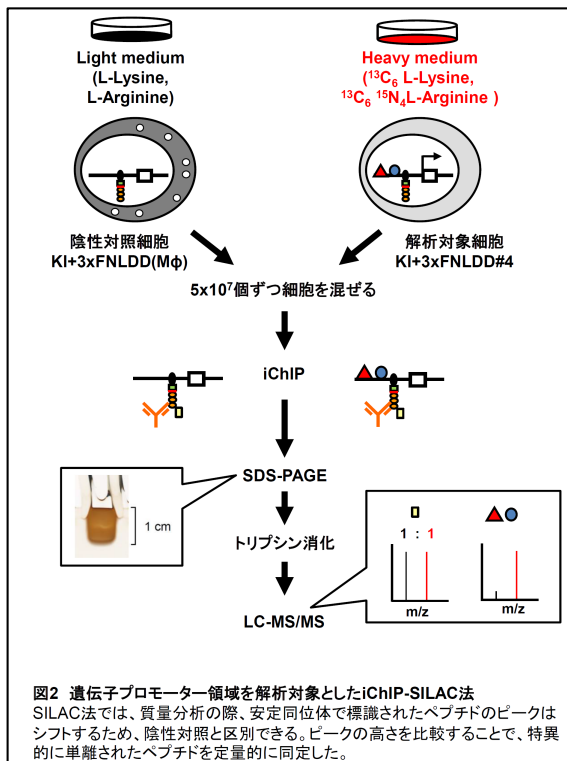


図2 遺伝子プロモーター領域を解析対象としたiChIP-SILAC法
SILAC法では、質量分析の際、安定同位体で標識されたペプチドのピークはシフトするため、陰性対照と区別できる。ピークの高さを比較することで、特異的に単離されたペプチドを定量的に同定した。

(3) Pax5 遺伝子プロモーター領域結合 RNA の網羅的同定法 (iChIP-RNA-Seq) の確立

KI+3xFLNLDD#4 および陰性対照細胞として KI+3xFLNLDD(Mφ) を利用し、(2) と同様に Pax5 遺伝子プロモーター領域を単離した後、3xFLAG ペプチドを添加することで、抗 FLAG タグ抗体からゲノム複合体を溶出した。クロスリンクを解除した後、RNA を精製し RNA-Seq に供することで、Pax5 遺伝子プロモーター領域と相互作用している RNA を網羅的に同定した。陰性対照と比較した結果、B 細胞特異的な RNA を同定することができた。現在、同定 RNA の機能解析を計画している。

(4) 同定した蛋白質の機能解析

(2) で同定した蛋白質の一つとして、Thy28 が含まれていた。Thy28 は、鳥類における B 細胞製造器官であるファブリキウス嚢で強く発現することが報告されていることから、Pax5 遺伝子の発現に関与する可能性が考えられる。そこで、Thy28 と Pax5 遺伝子発現の関連性を調べるため、Thy28 の機能解析を進めた。

まず、Thy28 の Pax5 遺伝子上での局在を ChIP 法によって調べたところ、iChIP 法の結果と一致して、Pax5 遺伝子プロモーター上に結合することが判明した。次に、RNAi によって Thy28 のノックダウンを行ったところ、Pax5 遺伝子発現の顕著な減少が見られた。

次に、Thy28 の結合蛋白質を免疫沈降法と質量分析法で探索したところ、新規 Thy28 結合蛋白質として、ミオシンファミリー蛋白質である MYH9 を同定した。Thy28 と同様に、MYH9 も Pax5 遺伝子プロモーター領域

に結合しており、ノックダウンによって Pax5 遺伝子の発現が減少することも確認できた。さらに、Thy28 のノックダウンによって MYH9 の Pax5 遺伝子上への結合が減少したことから、Thy28 は Pax5 遺伝子上への MYH9 のリクルートを介して、Pax5 遺伝子発現を制御していることが判明した (図 3)。

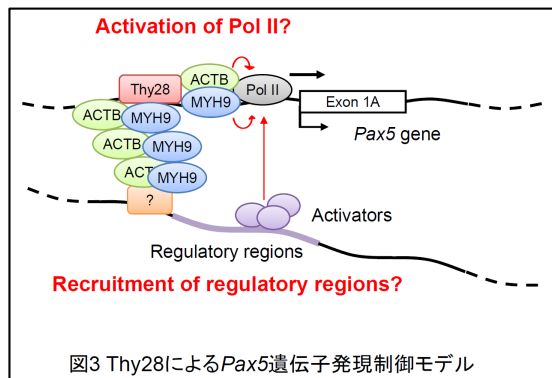


図3 Thy28によるPax5遺伝子発現制御モデル

まとめ

本研究では、iChIP 法と SILAC 法を組み合わせることで、1 コピーの Pax5 遺伝子プロモーター領域に結合している蛋白質を同定する技術を確認することができた。また、iChIP 法と RNA-Seq 法を組み合わせることで、Pax5 遺伝子プロモーター領域に結合している RNA を同定する技術も確立することができた。さらに、同定した蛋白質のうち、Thy28 に焦点を当て、機能解析を進めた結果、Thy28 は MYH9 との相互作用を介して、Pax5 遺伝子発現を制御していることが判明した。以上の結果から、本研究で開発した技術を利用することで、細胞あたり 1 コピーの解析対象とするゲノム領域に結合している分子を同定することができ、当該ゲノム領域のゲノム機能の分子機構の解明につながる事が示された。

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 8 件)

Fujita, T. Yuno, M., Okuzaki, D., Ohki R., Fujii, H. (2015) Identification of non-coding RNAs associated with telomeres using a combination of enChIP and RNA sequencing. *PLOS ONE*, 10, e0123387. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0123387.

Fujita, T. and Fujii, H. (2015) Isolation of Specific Genomic Regions and Identification of Associated Molecules by Engineered DNA-Binding Molecule-Mediated Chromatin Immunoprecipitation (enChIP) Using CRISPR. *Methods Mol. Biol.* 1288:43-52. 査読有

doi: 10.1007/978-1-4939-2474-5_4.

Fujita, T. Kitaura, F., and Fujii, H. (2015) A critical role of the Thy28-MYH9 axis in B cell-specific expression of the Pax5 gene in chicken B cells. *PLOS ONE*, 10, e0116579. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0116579.

Fujita, T. and Fujii, H. (2014) Efficient isolation of specific genomic regions retaining molecular interactions by the iChIP system using recombinant exogenous DNA-binding proteins. *BMC Mol. Biol.* 15, 26. 査読有
doi: 10.1186/s12867-014-0026-0.

Fujita, T. and Fujii, H. (2014) Identification of proteins associated with an IFN γ -responsive promoter by a retroviral expression system for enChIP using CRISPR. *PLOS ONE*, 9, e103084. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0103084.

Fujita, T. and Fujii, H. (2014) Identification of Proteins Interacting with Genomic Regions of Interest *in vivo* Using Engineered DNA-binding Molecule-mediated Chromatin Immunoprecipitation (enChIP). *Bio-protocol* 4, e1124. 査読有
<http://www.bio-protocol.org/e1124>.

Fujita, T., Asano Y., Ohtsuka J., Takada Y., Saito K., Ohki R., and Fujii, H. (2013) Identification of molecules associated with telomeres isolated by enChIP. *Sci. Rep.* 3, 3171. 査読有
doi: 10.1038/srep03171.

Fujita, T. and Fujii, H. (2013) Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 439, 132-136. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.013.

[学会発表](計7件)

藤田敏次 他、TAL や CRISPR/Cas を利用した enChIP 法による遺伝子座特異的生化的ゲノム機能解析、第 37 回日本分子生物学会年会(2014 年 11 月 25 日)パシフィコ横浜、神奈川県

藤田敏次 他、Capturing chromatin: biochemical analysis of genome functions using the locus-specific chromatin

immunoprecipitation technologies、第 37 回日本分子生物学会年会(2014 年 11 月 26 日)パシフィコ横浜、神奈川県

藤田敏次 他、enChIP: a method for locus-specific biochemical analysis of genome functions、11th EMBL Conference: Transcription and Chromatin (2014 年 8 月 24 日) Heidelberg、Germany

藤田敏次 他、enChIP 法を利用したゲノム機能の生化学的解析、第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会(2014 年 5 月 27 日)東京大学内伊藤国際学術研究センター、東京都

藤田敏次 他、enChIP: a method for locus-specific biochemical analysis of genome functions、第 36 回日本分子生物学会年会(2013 年 12 月 4 日)神戸ポートアイランド、兵庫県

藤田敏次 他、Locus-specific biochemical epigenetics / chromatin biochemistry by insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP)、15th International Congress of Immunology(2013 年 8 月 24 日)Milano、Italy

藤田敏次 他、Locus-specific biochemical epigenetics / chromatin biochemistry by insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP)、第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会(2013 年 5 月 31 日)奈良県新公会堂、奈良県

[図書](計2件)

藤田敏次、藤井穂高(2014)CRISPR/Cas のゲノム編集以外への応用、羊土社、*実験医学*7月号、1732-1736.

藤田敏次、藤井穂高(2013)挿入的クロマチン免疫沈降法(iChIP)による特定ゲノム領域結合分子の網羅的同定、羊土社、*実験医学*10月号、2629-2636.

[産業財産権]
出願状況(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: 大阪大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2013/74107
出願年月日: 2013 年 9 月 6 日
国内外の別: 国際

取得状況(計0件)

〔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