

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640113

研究課題名(和文)クロマチン立体構造に基づく遺伝子発現制御のゲノムワイドな解析

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of gene expression regulated by three dimensional chromatin structure

研究代表者

曽根 正光 (Sone, Masamitsu)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：90599771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの体を形作る細胞はどれも、完全な一揃いの遺伝情報を持ち、DNAとして細胞核に保持しています。筋肉細胞や神経細胞といった異なる細胞タイプでは、異なる遺伝子を選択的に発現することでその細胞らしさを確立しています。DNA上には、エンハンサーと呼ばれる制御領域が存在し、ループ構造を取ることで、遺伝子のプロモーターと相互作用し、その発現を活性化しています。本研究では、エンハンサーと遺伝子の相互作用を網羅的に解析するための手法を開発してきました。この研究を進展させることでそれぞれの細胞において、エンハンサーがいかにして遺伝子を選択的に活性化しているのかが分かると考えられます。

研究成果の概要(英文)：All the cells constituting our bodies possess complete genetic information that is encoded by DNA within the nuclei. Different cell types (i.e. muscle cells and neural cells) establish their own identities by selectively expressing different subsets of genes. Enhancers are DNA elements that interact with promoter regions of genes by looping from distant area to activate them. In this study, we tried to develop a method to globally analyze interactions between enhancers and genes. In future, using this method, we may elucidate the mechanism how enhancers selectively activate the gene expression in different cell types.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチン高次構造 エンハンサー

## 1. 研究開始当初の背景

エンハンサーと呼ばれる DNA 上の制御領域が、遺伝子のプロモーター領域と相互作用し、その発現が適切な時期、適切な場所で活性化するのに重要な役割を果たすことが知られています。過去の知見から、活性の高いエンハンサーを特徴づけるヒストン修飾や結合タンパク質が知られており、それらに対する抗体によるクロマチン免疫沈降と高速シーケンシングを組み合わせた ChIP-Seq 法を用いたゲノムワイドな解析が精力的に行われています。しかしながら、クロマチンが折り畳み構造を取ることで、エンハンサーは 1Mb 以上の非常に長い距離を超えて遺伝子に作用することがあり、各エンハンサーがどの遺伝子を活性化するのかを対応づけることはこれまで困難でした。

近年、核内空間において物理的近傍にあるクロマチン領域を検出できる Chromosome Conformation Capture (3C) 法に高速シーケンシングを組み合わせた様々な手法(3C-Seq 法と総称する)が開発され、クロマチン立体構造が細胞タイプによって異なっていることが明らかになってきました。私たちは、3C-Seq 法を応用すればクロマチンの立体構造に基づいて遺伝子とその制御領域を対応づけることが可能であり、多能性幹細胞と体細胞でその対応関係を網羅的に比較解析できるだろうと考えました。

## 2. 研究の目的

エンハンサーは染色体上遠く離れているながら、ループ構造を取ることで遺伝子のプロモーターに作用し、その発現を促進します。また、エンハンサーとプロモーターとの相互作用は細胞の分化過程で大きく変化すると考えられています。し

かし、そのようなダイナミックな相互作用をゲノムワイドに解析する手法はまだ確立されていません。本研究では、エンハンサートラップ 3C (ET3C) 法と名付けた、新しい解析手法を開発し、次のような課題を解決することを目的としています。

- (1) 個々のエンハンサーがどの遺伝子のプロモーターと相互作用してその発現を促進しているかを網羅的に明らかにすること。
- (2) その相互作用が細胞の分化に伴ってどの様に変化するのかを解析すること。
- (3) エンハンサーによる転写活性化の新しい作用機序を解明すること。

## 3. 研究の方法

初めに、遺伝子領域に組み込まれる割合が高いことが知られている piggyBac トランスポゾンに基づいてエンハンサートラップベクターを作製します(図 1)。トランスフェクションによってトランスポザーゼとともにマウス ES 細胞株に導入し、薬剤選択により多様なベクター挿入箇所を持つ安定発現細胞のプールを作製します。

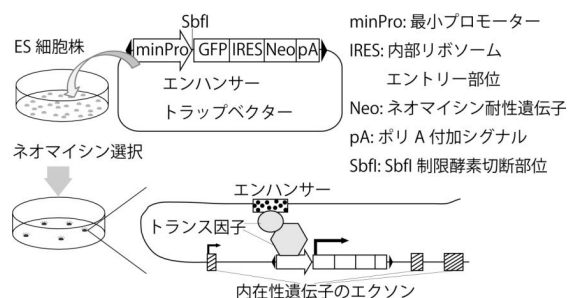


図 1 : ET3C 法で用いるエンハンサートラップ細胞の作製法

次に、そのエンハンサートラップ ES 細胞を用い、次のような手順で 3C-Seq を行います(図 2)。

- (1) 細胞をホルマリンで固定する。
- (2) 超音波により DNA を平均 300bp 程度になるように断片化する。
- (3) DNA ポリメラーゼより DNA 末端を平滑化する。
- (4) 希釈液中でライゲーション反応を行い、図のようにタンパク質を介して架橋された DNA 断片間で結合させキメラ DNA 断片を作製する。
- (5) DNA を精製し、平滑末端にシーケンサー用のアダプターをライゲーションする。
- (6) エンハンサートラップベクター内に設計されたプライマーとアダプター配列のプライマーで PCR 反応を行う。
- (7) こうして得られた PCR 産物の中にはキメラ DNA ではない DNA 断片も含まれる。そこで鎖長の違いを利用して、キメラ DNA 断片のみを電気泳動により選択的に回収し、高速シーケンサー HiSeq2000 (illumina) で両端の DNA 配列を決定する。次いでベクター挿入箇所とその相互作用領域をゲノム上にマッピングする。

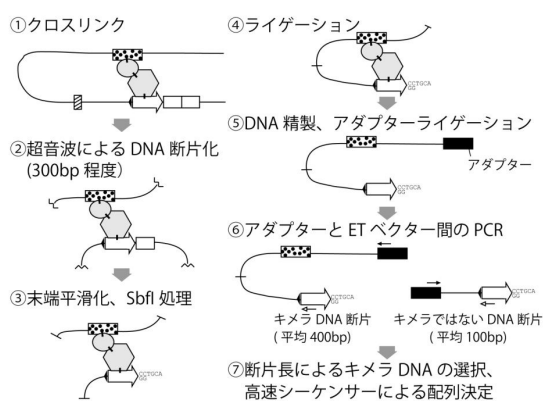


図 2 : ET3C 法の手順

#### 4 . 研究成果

筆者らはまず ET3C に用いるエンハンサートラップベクター(図 1)の作製を試みました。このベクターは、トランスポザゼ依存的に高い効率で宿主細胞のゲノムに組み込まれる piggyBac トランスポゾン をベースとしています。しかしながら、従来型の piggyBac トランスポゾンでは、目的の DNA 配列を組み込むためにその両端に 200-300 bp の末端繰り返し配列(図 1 において黒い逆向き三角形で示された配列)を配置しなければなりません。本研究では ET3C 法によって相互作用する DNA 領域を同定する際に超音波により 300bp 程度に断片化する工程があります。従来型の長い末端繰り返し配列を持つベクターを用いた場合には、その繰り返し配列中で切断される可能性が高く、そうすると、その後の次世代シーケンサーを用いた配列の決定において、トランスポゾンベクターが組み込まれたゲノム領域を同定できなくなります。そこで、近年開発された、35bp と従来型よりもはるかに短い末端繰り返し配列によって組み込むことのできるトランスポゾンベクターを譲り受け、用いることにしました( )。

この短い末端繰り返し配列を有するトランスポゾンベクターを骨格として、CMV 最小プロモーター下に赤色蛍光タンパク質 tdTomato とデルタチミジンキナーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子を挿入したエンハンサートラップベクターを構築しました(図 3)。このベクターを用いると細胞への導入後、ネオマイシン耐性によってエンハンサー活性を獲得した細胞を選択的に生育でき、FACS を用いて tdTomato の発光を指標として、エンハンサー活性の強い細胞と弱い細胞を区別して解析することもできます。また、ガンシクロピルを投与することでエンハンサー

活性を獲得した細胞を選択的に除去すれば、ET3Cの陰性対照として用いることができます。当初、このベクターの作製にあたり、制限酵素を用いてtdTomato以下の遺伝子を挿入しようと試みたが、不明な理由により目的のベクターを得ることができませんでした。その後、Gibson Assembly法を用いることにより、このベクターの作製に成功しました。

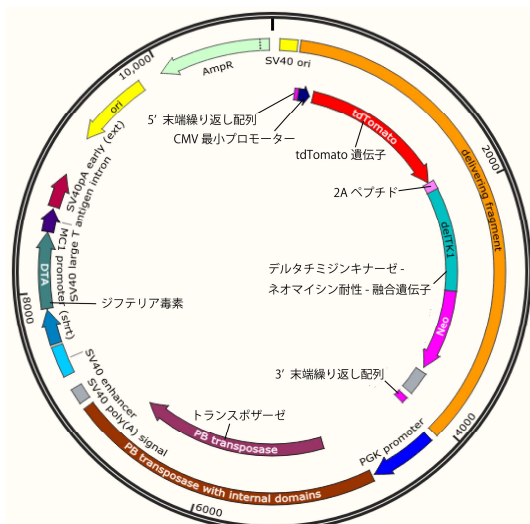


図3 エンハンサートラップベクターの模式図

今後、トランスフェクションによって、このエンハンサートラップベクターをマウスES細胞株に導入し、薬剤選択により安定発現細胞を作製し、上述の方法によりET3Cを行います。

本実験結果の信頼性については以下のような方法によって確かめる予定です。まず、複数のエンハンサートラップES細胞プールを作製してET3Cを行い、再現性を確かめます。さらに、最小プロモーターと相互作用する領域に既知のエンハンサーが含まれているか、ヒストンH3K27のアセチル化など、活性の高いエンハンサーのマークと知られているエピジェネティック修飾が有意に濃縮しているかどうかを過去のChIP-Seqのデータと比較して調べます。また、陰性対照としてエンハンサートラップベクターをマ

ウスES細胞株に導入したのちガンシクロビルを投与した細胞を用いてET3Cを行った場合と、エンハンサートラップES細胞を用いた場合とを比較することで、前者に比べて後者のプロモーターが有意に高い頻度でエンハンサーと相互作用していることを確認します。さらに、多くのリードが得られ相互作用の頻度が有意に高いと予測されるクロマチン領域のペアをランダムに選び出し、親株を用いて従来法の3C-qPCRを行い、その信頼性を確かめます。

本研究によりこれまで研究することが困難であった、一次配列上遠く離れた領域から遺伝子発現を制御するエンハンサーが同定されたり、細胞の分化に伴うダイナミックなエンハンサーとプロモーターの再配線のメカニズムが解明されたりといった成果が期待されます。

<引用文献>

Solodushko, V., et al., Gene Therapy, 21, 2014, 1-9

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]  
特になし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

曾根 正光 (SONE, Masamitsu)  
京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員  
研究者番号: 90599771