

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06895

研究課題名(和文) in vitro enChIP法の技術基盤の確立およびゲノム機能解析への応用

研究課題名(英文) Development of in vitro enChIP and its applications to analysis of molecular mechanisms underlying genome functions

研究代表者

藤田 敏次 (Fujita, Toshitsugu)

大阪大学・微生物病研究所・招へい准教授

研究者番号：10550030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、生体内でのクロマチン構造を保存したまま、標的とするゲノム領域を単離する方法として、in vitro enChIP法の開発を進めた。まず、精製CRISPR分子を利用することで、in vitro enChIP法の技術基盤を確立した。次に、in vitro enChIP法と次世代シーケンス解析を組み合わせることで、標的ゲノム領域と相互作用しているゲノム領域を同定することに成功した。さらに、標的ゲノム領域内に存在する遺伝子の発現制御を担うエンハンサー領域を同定することにも成功した。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 underlying genome functions requires identification of molecules interacting with genomic regions of interest in vivo. In this study, we developed in vitro enChIP using purified CRISPR complexes to isolate a target genomic region while retaining molecular interactions. Combining in vitro enChIP with next-generation sequencing analysis, we succeeded in identifying genomic regions that interact with a target locus in vivo. In addition, we showed that an interacting genomic region works as an enhancer to upregulate transcription from the target locus. Thus, in vitro enChIP is a useful tool for elucidation of molecular mechanisms underlying genome functions.

研究分野：分子生物学

キーワード：in vitro enChIP enChIP locus-specific ChIP ChIP CRISPR TAL chromatin chromosomal conformation

1. 研究開始当初の背景

ゲノム上では、クロマチン構造の維持や転写、DNA複製・修復といったゲノム機能が、ゲノムを取り巻く核内環境、とりわけ、ヒストンバリエーションやDNA/ヒストン修飾、蛋白質・RNA (ノンコーディングRNAなど)・DNA (エンハンサー・遺伝子座制御領域など)との相互作用によって遺伝子座特異的に制御されている。解析対象とするゲノム領域におけるゲノム機能の分子機構の解明には、当該ゲノム領域の修飾状態に加え、細胞内において結合している分子 (蛋白質・RNA・DNA) を網羅的に同定することが必要であるが、そのための生化学的手法は限られていた。

そこで、申請者らは、生体内でのクロマチン構造をできるだけ保持した状態で、解析対象とするゲノム領域を細胞内から単離する方法として、insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP) (Fujita and Fujii, *PLoS ONE*, 2011, US patent : 8415098, 国内特許:第5413924号) および engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP (enChIP) (Fujita *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, *Sci. Rep.*, 2013, 国際特許出願 PCT/JP2013/74107, 国内特許:第5954808号) からなる遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法を開発した。単離したゲノム領域に結合している分子を網羅的に同定することで、ゲノム機能の分子機構の解明につながる。enChIP法は、ゲノム編集技術として注目されているジンクフィンガーヌクレアーゼやTALENテクノロジー (TAL蛋白質)、CRISPR系などで利用されている人工DNA結合分子のDNA認識領域を利用することで、解析対象とするゲノム領域を特異的に単離する方法論である。具体的には、図1Aに示すように、

- i. 解析対象とするゲノム領域内に特異的に存在する塩基配列 (約 20 bp) を認識する人工 DNA 結合分子をデザインする。
- ii. 人工 DNA 結合分子に、必要であればエピトープタグや核移行シグナルなどを付けた融合分子を、解析対象とする細胞内で発現させる。また、必要であれば、ゲノム上に存在する分子が外れないようにクロスリンクを行い、その後、ゲノムをソニケーションなどで断片化する。
- iii. 抗エピトープタグ抗体を用いた免疫沈降法によって、発現させた人工 DNA 結合分子が結合した解析対象ゲノム領域を特異的に単離する。
- iv. 単離したゲノム領域複合体に結合している分子 (蛋白質・RNA・DNA) を、質量分析法や次世代シーケンス解析 (NGS 解析) などで網羅的に同定する。

これまでに、申請者らは、TAL蛋白質を利用した enChIP 法を確立し、テロメア領域に結合している蛋白質・RNA の同定に成功した

(Fujita *et al.*, *Sci. Rep.*, 2013, *PLoS ONE*, 2015) また、不活性型 Cas9 を用いた CRISPR 系による enChIP 法も確立し、細胞あたり 2 コピーしか存在しない *IRF-1* 遺伝子のプロモーター領域に結合している蛋白質の同定にも成功した (Fujita and Fujii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, *PLoS ONE*, 2014) enChIP 法は申請者ら独自の方法論であり、enChIP 法のためのプラスミドを寄託した Addgene (<http://www.addgene.org/CRISPR/Purify/>) には、既に 100 件以上のリクエストが世界中から来ている。一方、enChIP 法は、人工 DNA 結合分子の細胞内発現が必要であり、形質導入効率の低い細胞株や、マウスなどの個体から単離した細胞を解析に使用する場合には、人工 DNA 結合分子の発現が律速となることが考えられる。もし、人工 DNA 結合分子の細胞内発現を必要としない enChIP 法が確立できれば、その利便性・応用性は計り知れない。

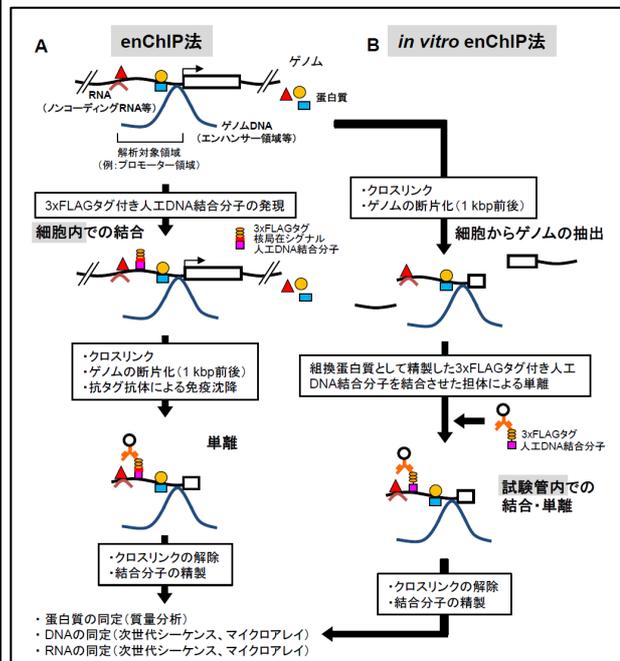


図1. enChIP法の原理

(A) enChIP法の模式図。解析対象とするゲノム領域に存在する塩基配列を認識する人工DNA結合分子 (必要であればエピトープタグ付き) をデザインし、細胞内で発現・結合させた後、解析対象ゲノム領域を単離し、結合分子を網羅的に同定する。なお、TAL蛋白質ではDNA認識領域を、CRISPR系では不活性型Cas9とgRNAをenChIP法に使用する。

(B) in vitro enChIP法の模式図

2. 研究の目的

本研究では、人工DNA結合分子の細胞内発現を必要としない、in vitro enChIP法の技術基盤を確立し、ゲノム機能解析に応用する。in vitro enChIP法は、組換え蛋白質として精製した人工DNA結合分子と、細胞から抽出・断片化したゲノム複合体を、試験管内で

結合・アフィニティー精製することで、解析対象ゲノム領域を単離する技術である（図1B）。

### 3. 研究の方法

本研究では、モデル系として *IRF-1* 遺伝子プロモーター領域などを解析対象ゲノム領域とし、CRISPR 系を利用した *in vitro* enChIP 法の技術基盤を確立する。次に、確立した *in vitro* enChIP 法を用いて、解析対象ゲノム領域と細胞内で相互作用しているゲノム領域を網羅的に同定する。具体的には、下記（1）～（3）の研究を進める。

#### (1) 精製した不活性型 Cas9 蛋白質および gRNA を利用した *in vitro* enChIP 法の技術基盤の確立

ヒト培養細胞株を用い、クロスリンク後にゲノムを抽出し、ソニケーションにより断片化（1 kbp 前後）する。

3xFLAG タグ付き不活性型 Cas9 蛋白質をカイコで発現させ、組換蛋白質として精製する。

上記で精製した不活性型 Cas9 蛋白質および化学合成した gRNA（*IRF-1* 遺伝子プロモーター領域内の塩基配列に相補的）と、断片化したゲノムを試験管内で混合し、抗 FLAG タグ抗体付担体でアフィニティー精製することで、不活性型 Cas9 蛋白質/gRNA が結合した *IRF-1* 遺伝子プロモーター領域を単離する。単離効率を評価するとともに、抗体量・バッファー組成などの最適化を図る。

#### (2) 精製した TAL 蛋白質の DNA 認識ドメインを利用した *in vitro* enChIP 法の技術基盤の確立

本研究項目では、研究項目（1）と同様に、TAL-DNA 認識ドメインを利用した *in vitro* enChIP 法の技術基盤を確立する。

#### (3) *Pax5* 遺伝子プロモーター領域と相互作用しているゲノム領域の網羅的同定

（1）あるいは（2）で確立した *in vitro* enChIP 法を利用することで、内在性 *Pax5* 遺伝子プロモーター領域と相互作用しているゲノム領域を網羅的に同定する。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 DNA を精製し、NGA 解析によって相互作用しているゲノム領域を網羅的に同定する。

### 4. 研究成果

#### (1) 精製した不活性型 Cas9 蛋白質および gRNA を利用した *in vitro* enChIP 法の技術基盤の確立

精製した CRISPR 複合体（不活性型 Cas9 蛋白質および gRNA）を利用した *in vitro* enChIP 法の技術基盤の確立を試みた。まず、不活性型 Cas9 蛋白質を組換蛋白質としてカイコ発現系で準備し、化学合成した gRNA（*IRF-1* 遺伝子プロモーター領域内の塩基配列に相補

的）と機能性複合体を形成させた。次にヒト培養細胞株から断片化ゲノムを用意し、上記複合体と試験管内で混合させた後、アフィニティー精製することで、CRISPR 複合体が結合した *IRF-1* 遺伝子プロモーター領域を単離した。単離効率を評価した結果、Input の 1% の効率で標的ゲノム領域を単離できることが判明した。さらに、バッファー組成の最適化などを図ることで、非特異的ゲノム領域の混入を減少させることに成功した。

#### (2) 精製した TAL 蛋白質の DNA 認識ドメインを利用した *in vitro* enChIP 法の技術基盤の確立

数種類の精製組換 TAL 蛋白質を用意し、それを利用した *in vitro* enChIP 法について評価した。カイコ発現系で準備したすべての組換 TAL 蛋白質は分解が激しく、現時点では、精製 TAL 蛋白質を *in vitro* enChIP 法へ利用することは難しいことが考えられた。組換 TAL 蛋白質の発現系の変更など、分解していない精製組換 TAL 蛋白質を準備する工夫が必要であることが示唆された。

#### (3) *Pax5* 遺伝子プロモーター領域と相互作用しているゲノム領域の網羅的同定

技術基盤が確立できた CRISPR 系を利用した *in vitro* enChIP 法を利用し、ニワトリ DT40 細胞内で解析対象ゲノム領域（*Pax5* 遺伝子プロモーター領域）に結合しているゲノム領域の網羅的同定を進めた。*in vitro* enChIP 法と NGS 解析を組み合わせることで、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域と相互作用しているゲノム領域を同定することに成功した。さらに、ゲノム編集を利用したゲノム領域欠損実験や ChIP 法によるヒストン修飾の解析によって、*Pax5* 遺伝子の発現制御を担うエンハンサー領域の同定にも成功した（図2）。

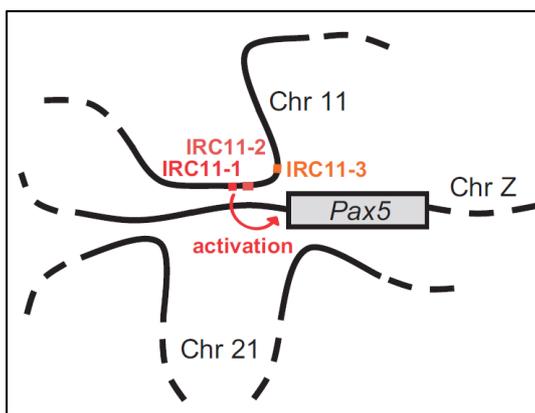


図2. DT40 細胞内での *Pax5* 遺伝子座と他のゲノム領域の相互作用の模式図

### まとめ

本研究では、精製組換 CRISPR 分子を利用することで、解析対象ゲノム領域を細胞から特異的に単離できる技術として *in vitro* enChIP 法の開発に成功した。また、*in vitro*

enChIP 法と NGS 解析を組み合わせることで、*Pax5* 遺伝子プロモーター領域と相互作用しているゲノム領域の同定に成功した。さらに、ゲノム編集を利用したゲノム領域欠損実験や ChIP 法によるヒストン修飾の解析によって、*Pax5* 遺伝子の発現制御を担うエンハンサー領域の同定にも成功した。

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、標的とするゲノム領域のゲノム機能の分子機構の解明ができることが判明した。

#### 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 12 件)

Hamidian, A., Vaapil, M., von Stedingk, K., Fujita, T., Persson, C.U., Eriksson, P., Veerla, S., De Preter, K., Speleman, F., Fujii, H., Pahlman, S., and Mohlin, S. (2018) Promoter-associated proteins of EPAS1 identified by enChIP-MS - A putative role of HDX as a negative regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 499, 291-298.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.150.

Fujita, T., Kitaura, F., Oji, A., Tanigawa, N., Yuno, M., Ikawa, M., Taniuchi, I., and Fujii, H. (2018) Transgenic mouse lines expressing the 3xFLAG-dCas9 protein for enChIP analysis. *Genes Cells*, 23, 318-325.  
doi: 10.1111/gtc.

Fujita, T., Yuno, M., and Fujii, H. (2018) enChIP systems using different CRISPR orthologues and epitope tags. *BMC Res. Notes*, 11, 154.  
doi: 10.1186/s13104-018-3262-4.

Fujita, T. and Fujii, H. (2017) *In vitro* Engineered DNA-binding Molecule-mediated Chromatin Immunoprecipitation (*in vitro* enChIP) Using CRISPR Ribonucleoproteins in Combination with Next-generation Sequencing (*in vitro* enChIP-Seq) for the Identification of Chromosomal Interactions. *Bio-protocol* 7, e2612.  
<http://www.bio-protocol.org/e2612>.

Fujita, T., Kitaura, F., Yuno, M., Suzuki, Y., Sugano, S., and Fujii, H. (2017) Locus-specific ChIP combined with NGS analysis reveals genomic regulatory regions that physically interact with the *Pax5* promoter in a chicken B cell line. *DNA Res.*, 24,

537-548.

doi: 10.1093/dnares/dsx023.

Fujita, T., Yuno, M., Suzuki, Y., Sugano, S., and Fujii, H. (2017) Identification of physical interactions between genomic regions by enChIP-Seq. *Genes Cells*, 22, 506-520.  
doi: 10.1111/gtc.

Fujita, T., Yuno, M., and Fujii, H. (2016) Allele-specific locus binding and genome editing by CRISPR at the *p16INK4a* locus. *Sci. Rep.*, 6, 30485.  
doi: 10.1038/srep30485.

Fujita, T., Yuno, M., and Fujii, H. (2016) Efficient sequence-specific isolation of DNA fragments and chromatin by *in vitro* enChIP technology using recombinant CRISPR ribonucleoproteins. *Genes Cells*, 21, 370-377.  
doi: 10.1111/gtc.12341.

Fujita, T. and Fujii, H. (2016) Biochemical Analysis of Genome Functions Using Locus-Specific Chromatin Immunoprecipitation Technologies. *Gene Regul. Syst. Bio.* 10(Suppl 1):1-9.  
doi: 10.4137/GRSB.S32520.

Fujita, T. and Fujii, H. (2016) Isolation of Specific Genomic Regions and Identification of Associated Molecules by enChIP. *J. Vis. Exp.* 107, e53478.  
doi: 10.3791/53478.

Fujita, T. and Fujii, H. (2015) Applications of Engineered DNA-Binding Molecules Such as TAL Proteins and the CRISPR/Cas System in Biology Research. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23143-23164.  
doi: 10.3390/ijms161023143.

Fujii, H. and Fujita, T. (2015) Isolation of Specific Genomic Regions and Identification of Their Associated Molecules by Engineered DNA-Binding Molecule-Mediated Chromatin Immunoprecipitation (enChIP) Using the CRISPR System and TAL Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 21802-21812.  
doi: 10.3390/ijms160921802.

[学会発表](計 8 件)

藤田敏次、藤井穂高: CRISPR を利用した

*in vitro* enChIP 法の開発およびゲノム領域間相互作用の検出への応用、2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会)、2017年12月、神戸市

**Fujita, T.** and Fujii, H. enChIP using CRISPR: a method for identification of molecules interacting with a locus of interest. Cell Symposia, CRISPR: From Biology to Technology and Novel Therapeutics, October 2017, Sitges, Spain

**藤田敏次**、藤井穂高：p16INK4a 遺伝子座を標的とした CRISPR によるアレル特異的なゲノム結合およびゲノム編集、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月、横浜市

**Fujita, T.** and Fujii, H. Development of enChIP and its applications to locus-specific biochemical analysis of genome functions. 12th EMBL Conference Transcription and Chromatin, August 2016, Heidelberg, Germany

**藤田敏次**：遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法の開発およびエピジェネティック研究への応用、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016年5月、豊中市

**藤田敏次**、藤井穂高：エピジェネティック制御機構の生化学的解析に向けた *in vitro* enChIP 法の開発、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016年5月、豊中市

**藤田敏次**、藤井穂高：Locus-specific biochemical analysis of genome functions using the locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies iChIP/enChIP、第38回日本分子生物学会年会、2015年12月、神戸市

**藤田敏次**、藤井穂高：遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法によるゲノム機能の生化学的解析、第9回日本エピジェネティクス研究会年会、2015年5月、東京都千代田区

〔図書〕(計3件)

**Fujita, T.** and Fujii, H. (2017) Biochemical Analysis of Genome Functions Using Locus-Specific Chromatin Immunoprecipitation Technologies. *HANDBOOK OF EPIGENETICS (2nd edition)*, (Elsevier), 635-652 (Chapter 42).

藤井穂高、**藤田敏次**：遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法による特定ゲノム領域結合分子の同定とゲノム高次構造解析、**生体の科学**(医学書院)2017年、68号、189-193.

**藤田敏次**、藤井穂高：遺伝子座特異的ゲノム機能解析のための CRISPR/Cas9 を用いた enChIP 法、**進化するゲノム編集**(株式会社エヌ・ティー・エス)2015年、81-89.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：DNA 間相互作用の解析方法

発明者：藤井穂高、**藤田敏次**

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2015-231329

出願年月日：2015年11月27日

国内外の別：国内

取得状況(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：特許第 5954808 号

取得年月日：2016年6月24日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~bgb/>

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・招へい准教授

研究者番号：10550030