

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：26402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14527

研究課題名(和文) タンパク質とゲノムの相互作用を組織特異的に検出する方法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of methods for identifying protein-DNA interactions in a tissue-specific manner

研究代表者

蒲池 雄介 (Kamachi, Yusuke)

高知工科大学・環境理工学群・教授

研究者番号：90263334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内におけるタンパク質とゲノムDNAとの相互作用の解析は、遺伝子発現の制御機構の理解に重要である。これには、クロマチン免疫沈降法と呼ばれる手法が用いられるが、これに適した高品質の抗体が必要であるなど、現在はさまざまな技術的な制約がある。本研究は、目的タンパク質にビオチンタグなどの特定の短いアミノ酸配列を導入することで、タンパク質-DNAの相互作用を動物胚の特定の組織で高感度に検出する、汎用性がきわめて高い方法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)： Analysis of the interaction between protein and genomic DNA in cells is important for understanding gene regulatory mechanism. A technique called chromatin immunoprecipitation is used for this purpose, but there are various technical limitations such as the requirement of high quality antibodies. This research aims to develop a versatile method that detects protein-DNA interactions in specific tissues of animal embryos with high sensitivity by introducing a specific short amino acid sequence such as a biotin tag to the target protein.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：転写因子 クロマチン免疫沈降 エピトープタグ

1. 研究開始当初の背景

胚発生過程をはじめとして、多様な生命現象を担う遺伝子発現の制御は、多種のタンパク質とゲノム DNA との相互作用によりもたらされる。したがって、遺伝子発現の制御機構を理解するには、細胞あるいは生体内においてタンパク質と DNA がどのように相互作用しているのかを詳細に調べる必要がある。培養細胞を利用したタンパク質と DNA の相互作用の解析では、化学的に固定したタンパク質と DNA 複合体を、目的のタンパク質に対する特異的抗体をもちいて免疫沈降法により精製する、いわゆるクロマチン免疫沈降法(ChIP)が一般的に用いられる。近年、次世代シーケンサーの利用が広がるにつれ、クロマチン免疫沈降法をゲノムワイドに行う、網羅的なタンパク質-DNA 相互作用の解析(ChIP-seq)が幅広く行われるようになってきた。胚発生過程におけるダイナミックな遺伝子発現の制御を研究する上でも、同様の手法は強力な研究手段となるが、下記のような問題が残されており、実施された例は少ない。

(1) 生体、特に胚を出発材料とする場合は、細胞数が限られているため、きわめて親和性と特異性が高い抗体が必要であるが、そのような抗体を得るのは非常に困難であり、研究の進展の妨げになっている(Kidder et al., 2011, Nat Immunol)。したがって、タンパク質-DNA 相互作用の研究は、未だに培養細胞を利用した例がほとんどである。

(2) タンパク質と DNA の相互作用は、組織によって異なることが予想されるので、特定の組織に限った解析が必要となる場合がある。培養細胞の場合は、均質な細胞集団を実験に使用できるが、胚などの生体における解析には、特定の組織・細胞の分離が必要となる。しかし、そのような操作は容易ではなく、かつその間に細胞の内部環境が変化してしまう危険性が伴う。

このような背景から本研究課題では、モデル生物としてゼブラフィッシュを利用して、タンパク質-DNA 相互作用を生体内の特定の組織で高感度に検出する方法の開発を行うことを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、目的タンパク質にビオチン化配列などの短いペプチド配列をタグとし

て導入することで、タンパク質-DNA の相互作用を動物胚の特定の組織で高感度に検出する、汎用性がきわめて高い方法の開発を行い、Sox 転写因子に応用することを目的とした。ビオチンタグやエピトープタグを用いることで、特異性の高い抗体の入手が不要になるばかりか、高い精製度のタンパク質-DNA 複合体が得られることが期待できる。本研究では、まず免疫沈降を最大限効率よく行うことを目指して、免疫沈降を定量的にモニターするシステムを構築する。さらに、ビオチン化酵素あるいは組換え酵素を特定の組織で発現させることで、その組織のみにおける相互作用が検出できるシステムを構築する。タグ配列は、ゲノム編集技術である CRISPR-Cas システムを用いてゼブラフィッシュの内在遺伝子に挿入する。

3. 研究の方法

本研究課題では、モデル生物としてゼブラフィッシュを利用して、タンパク質-DNA 相互作用を生体内の特定の組織で高感度に検出する方法を開発する。さらに、この手法を胚発生の制御に中心的な役割を果たしている Sox 転写因子に応用する。本研究課題では、以下の研究を関連づけて実施した。

(1) 各種エピトープタグおよびビオチンタグを用いて免疫沈降を行う際に、免疫沈降の効率を定量的に測定出来るシステムを構築し、以降の研究の基盤とする。

(2) 各種エピトープタグおよびビオチンタグを用いてクロマチン免疫沈降を行う際に、効率よく、かつ精製度高くクロマチン免疫沈降を行える条件を見いだす。

(3) GAL4-UAS 発現システムを利用することで、領域特異的にビオチン化酵素 BirA あるいは Cre 組換え酵素を発現するトランスジェニックフィッシュを確立する。

(4) CRISPR-Cas 法を利用したゲノム編集により、タグ配列を内在の sox 遺伝子に挿入する。領域特異的にタグが付加された Sox に対して、クロマチン免疫沈降法を行い、Sox 転写因子の標的遺伝子を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 定量的免疫沈降法の開発とエピトープタグ抗体の親和性の定量解析

ビオチンタグを含めて様々なタグを用いた ChIP における免疫沈降そのものの効率を定量的に測定するアッセイシステムの開発を行った。これまでは、免疫沈降において複合体が適切に回収されているかどうかを定量的に調べるのは困難であった。そこで HiBiT system と呼ばれる NanoLuc ルシフェラーゼの2つの断片の相補性を利用した発光定量法を用いて、免疫沈降の効率をモニターする方法を開発し、HiBiT-based quantitative immunoprecipitation (HiBiT-qIP) と名付けた。この方法では、目的タンパク質に 11 アミノ酸の HiBiT タグを付加することで、免疫沈降された微量のタンパク質の定量を可能にしている (図 1)。

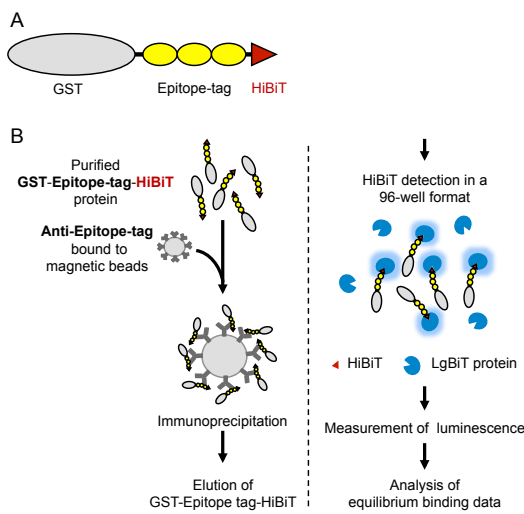


図 1. HiBiT-qIP法

この HiBiT-qIP 法を用いて、まず 5 種類のエピトープタグ FLAG, HA, PA, Ty1, V5 に対するモノクローナル抗体について、ChIP と同条件の免疫沈降における結合親和性を定量的に調べた。その結果、タグに対する親和性はモノクローナルクローン間で大きな差があることがわかった (図 2)。親和性が高い抗体を使用することで、ChIP の効率が良くなることが予想される。

(2) ゼブラフィッシュ胚を用いた ChIP におけるタグの効率の比較

さらに、5 種類のエピトープタグ (3 量体タグとして使用) とビオチンタグについて、まずこれらを Sox3 に付加した。mRNA の顕微注入によりタグ付き Sox3 をゼブラフィッシュ胚に導入後、ChIP を行い、タンパク質と DNA の架橋時間、各エピトープタグの抗体、並びに回収ビーズが免疫沈降におけるタン

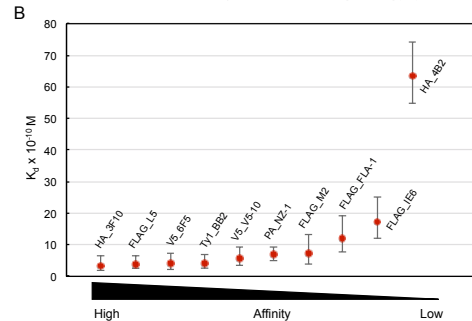
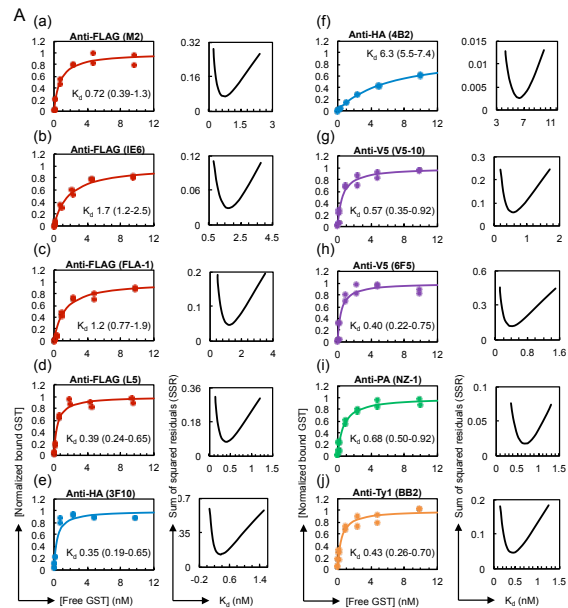


図 2. エピトープタグ抗体の親和性の定量

パク質の回収率に与える影響を調べたところ、条件によって回収率が異なることがわかった (図 3)。同時に、タンパク質-DNA 複合体が特異的に回収されているかを、既知のターゲットを用いて ChIP-qPCR で調べたところ、種々の条件が複雑に影響を与えていることがわかった (図 4)。

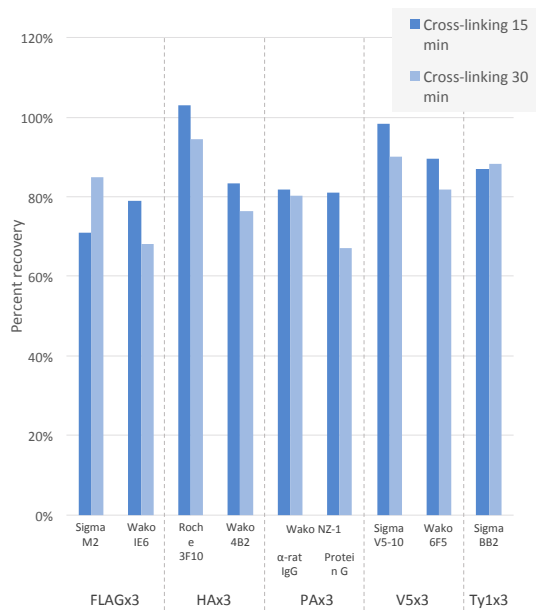


図 3. ChIPにおけるエピトープタグを付加したSox3の回収率

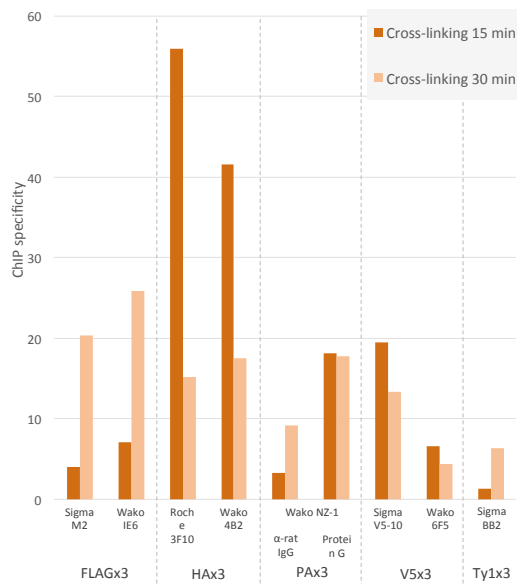


図4. エピトープタグのChIP特異性

(3) 胚の領域特異的にタンパク質にタグを付加する方法の開発

まず、ビオチンタグを用いた ChIP をゼブラフィッシュ胚で効率的に行うための条件検討を行った。この実験では、ビオチン化配列を付加した Sox3 転写因子とビオチン化酵素 BirA の mRNA を胚に同時に顕微注入し、必要とされるビオチン化酵素の発現量を検討した (図5)。また、内在のビオチンだけで

Biotin (μM)	Sox3-HA3		SOX3 FLAG3 HBH			
	0	0	0	25	50	100
BirA(ng/μl)	0	25	10	25	50	100

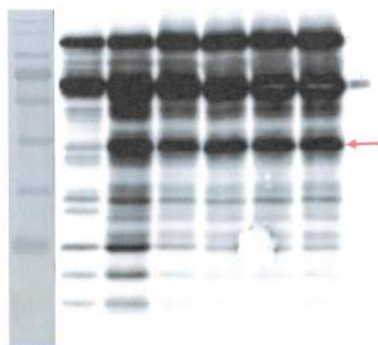


図5. ゼブラフィッシュ胚におけるin vivoビオチン化の検出

も大部分の Sox3 がビオチン化されるが、すべての Sox3 をビオチン化するには、ビオチンを飼育水に添加する必要があることも見いだした。最終的には、ビオチン化酵素 BirA を GAL4-UAS 発現システムを利用して領域特異的に発現させることで、領域特異的なビオチン化を引き起こす。このためのトランスジ

ェニックフィッシュは、現在確立中である。

エピトープタグは、Cre 組換え酵素を GAL4-UAS 発現システムを利用して領域特異的に発現させることで、領域特異的なタグ化を引き起こす。このためのトランスジェニックフィッシュは、現在確立中である。

(4) CRISPR-Cas 法を利用したゲノム編集

CRISPR-Cas 法を利用したタグ配列のノックインは、現在実施中である。エピトープタグとビオチン化配列の複合タグ配列の例を図6に示す。領域特異的な組換えを利用する場合は、loxP 配列で挟んだタグを追加して用いる。



図6. 複合タグ配列の例

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) Okamoto, Y., Nishimura, N., Matsuda, K., Ranawakage, D. C., Kamachi, Y., Kondoh, H, Uchikawa, M. Cooperation of Sall4 and Sox8 transcription factors in the regulation of the chicken Sox3 gene during otic placode development. (2018) Dev. Growth. Differ., Vol.60, 133-145, DOI: 10.1111/dgd.12427 (査読有り)

(2) Yasumi, T., Inoue, M., Maruhashi, M., Kamachi, Y., Higashi, Y., Kondoh, H, Uchikawa, M. Regulation of trunk neural crest delamination by δ EF1 and Sip1 in the chicken embryo. (2016) Dev. Growth. Differ., Vol.58, 205-214, DOI: 10.1111/dgd.12256 (査読有り)

[学会発表] (計1件)

(1) Deshani C. Ranawakage, Takuya Takada, Yusuke Kamachi The HiBiT protein quantitation system facilitates determination of antibody affinities under immunoprecipitation conditions. Tokyo 2018 Cell and Developmental Biology Meeting, 2018年6月3日 タワーホール船堀 (東京)

[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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蒲池 雄介 (Kamachi, Yusuke)
高知工科大学・環境理工学群・教授
研究者番号：90263334