

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14529

研究課題名(和文) 核内のゲノムDNAとタンパクの相互作用をin situで可視化する技術の開発

研究課題名(英文) Development of a technology that can visualize interactions between genomic DNA and proteins in nuclei in situ

研究代表者

目野 主税(Chikara, Meno)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：20311764

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)：クロマチン免疫沈降法は核内のタンパク質とゲノムDNAの結合を調べる方法であるが、この実験は多くの細胞を必要とし、組織における特定の細胞を調べるためにはFACS等による純化が必要となる。本研究では、組織切片上で特定のタンパク質とゲノムDNAの結合を検出するための汎用的な方法論の開発を目指した。P19細胞におけるPou5f1のPou5f1 エンハンサーへの結合をモデルケースに実験手法を開発したところ、両者の結合を示唆する結果が得られた。しかしながら、本手法を確実なものにするには、さらなる条件検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Although chromatin immunoprecipitation is a useful assay that probes protein-genomic DNA interactions in nuclei, it requires a lot of cells and the purification of specific cells by FACS when tissues are examined. We attempted to develop a general method that detects binding of specific proteins to genomic DNA on tissue sections. We developed the method by examining binding of Pou5f1 to Pou5f1 enhancer in P19 cells as a model case, and obtained results that suggest their interactions. In order to make the method reliable, however, further investigation is required.

研究分野：発生生物学

キーワード：転写因子 ゲノムDNA PLA法

1. 研究開始当初の背景

クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation: ChIP) は、タンパク質とゲノム DNA の結合を調べる方法である。この ChIP と世代シーケンサーによる配列解読を組み合わせたクロマチン免疫沈降シーケンシング法 (chromatin immunoprecipitation sequencing: ChIP-seq) は、更に有用な実験方法であり、特定のタンパク質がゲノム DNA に結合している部位を網羅的に明らかにすることができる。特に、転写因子や修飾ヒストンがゲノム DNA 上のどの部位にどれだけ結合しているかを知ることができるため、遺伝子発現調節やエピゲノム研究において強力な実験手法となっている。

ChIP 及び ChIP-seq は主に培養細胞で行われ、組織や胚が用いられることが少ないが、これには以下の3つの理由がある。1つ目は、サンプル調整に多くの細胞を要することである。通常のプロトコールでは 10^6 個以上の細胞が用いられ、 μ ChIP 法など少数細胞に特化した方法でも 10^3 個の細胞が必要とされる。そのため胚発生における小さな組織や少数の成体幹細胞などに本法を適用することは困難である。2つ目の問題点は、空間情報の欠失である。生体試料を解析に用いる場合は、通常、摘出した組織をトリプシン処理で単一細胞に解離する必要があり、目的の DNA-タンパク相互作用がどの細胞で生じていたのかを特定することは困難である。3つ目の問題点は細胞のコンタミである。上記のようにバルク調整の実験を行うと、組織中の興味ある細胞とは異なる細胞が混入するため、FACS などによる純化作業が必要となる。

以上の問題点を念頭に、Gomez らは 2013 年に *in situ* hybridization (ISH) と proximity ligation assays (PLA) 法を組み合わせた方法 (ISH-PLA 法) により、組織切片上で *MYH11* プロモーター近傍における H3K4me2 の検出を報告した (Gomez et al., Nature Methods 10:171-177)。しかしながら、この方法では、熱変性やホルムアミド処理による変性によって多くのタンパク質の抗原性が失われる。H3K4me2 は例外的に変性に強いタンパク質であることが考えられ、汎用的な方法論には至っていないと考えられる。

2. 研究の目的

私たちは、「背景」で記載したような ChIP の問題点を改善するために、組織切片上でタンパク質とゲノム DNA の結合を検出することができる *in situ* ChIP (*in situ* chromatin-interacting protein assay) 法の開発を試みた。私たちは、当時、上記の Gomez らと同様のアイデアを抱いており、*in situ* ChIP も ISH 法と PLA 法を基盤にしたものであったが、より汎用的な方法論への改良を目指すことにした。

3. 研究の方法

本研究は方法論の開発であるため、実験方法とその結果の詳細は次の「研究成果」に記載し、方法の概略をここに記す。

抗原と抗体：多分化能、エピジェネティクスや発生研究で注目されている因子に注目し、Pou5f1、Nanog、H3.3、Sp1、FoxH1 に対する抗体を用いて系の確立を試みた。

細胞：原理的には、*in situ* ChIP が培養細胞で成立すれば組織切片にも適用することが可能になるため、実験系の確立のためにマウス ES 細胞及び P19 細胞の培養細胞を使用した。

免疫染色：ISH もしくは PRINS (primed *in situ* labeling) 法と PLA 法の共存を可能にするために、変性処理に強い免疫染色法の開発に取り組んだ。

PLA 法：任意のゲノム DNA を ISH もしくは PRINS 法でラベルし、この近傍にある特定のタンパク質との間で PLA が成立する条件を検討した。

実験の原理：以下の各ステップで各種の変法を試し、ゲノム DNA 標識の順番も検討した。

1) 固定した細胞を熱処理し、プローブを細胞に取り込ませてハイブリさせるか、PRINS 法によって特定のゲノム DNA 領域を DIG/DNP 標識する。

2) 特定の転写因子とゲノム DNA 上の DIG/DNP を、それぞれの抗体で処理する。

3) PLA 反応のためのオリゴ DNA 標識二次抗体でそれぞれの一次抗体を認識させる。

4) PLA 反応を行う。

5) 顕微鏡下で、近接によって生じる PLA 蛍光の観察を行う。

4. 研究成果

in situ ChIP を開発するためのモデルケースとして、始めに多分化能を有するマウス ES 細胞を使用し、*Pou5f1* distal enhancer における Nanog の結合を検出することを試みた。これらの実験では、ISH/PRINS 法によるゲノム DNA の標識の後に、上記転写因子を抗体で認識させ、PLA 法を適用することを試みた。

(固定条件の検討)

細胞形態保持、ISH (FISH による観察)、免疫蛍光染色の観点から 4%PFA の固定時間を検討し、以下の結果を得た。

固定 10 分：細胞形態が損傷。

固定 10 分及び風乾：細胞形態及び ISH は良好であるが、免疫蛍光染色は不良。

固定 1 時間：細胞形態、ISH、免疫蛍光染色のいずれも良好な結果を得た。

固定 4 時間から 24 時間：細胞形態及び免疫蛍光染色は良好であるが、ISH は不良。

この結果を受けて、ISH 及び PRINS 法の前処理を原則として以下の通り行った。

1) 細胞を 4%PFA、4、1 時間で固定。

- 2) 過酸化水素水/PBS+TritonX100 処理。
- 3) EtOH 脱水・風乾。
- 4) 70%Formamide、85 °C での熱変性。
- 5) EtOH 脱水・風乾。

(ゲノム DNA 上での PLA 成立の確認)

ゲノム DNA 上で PLA が成立する距離の目安とするため、4kbp 程度離れた *Pou5f1* distal 及び proximal enhancer を DIG もしくは DNP 標識プローブでハイブリさせて DIG 及び DNP に対する PLA 法を行ったところ、PLA 蛍光が観察されなかった。一方、PRINS 法によって N6 primer を使用し、ゲノム DNA を DIG と DNP で同時標識すると、DIG 及び DNP 間で PLA 蛍光が観察された。従って、ゲノム DNA 上で抗原が近接した場合にのみ、PLA 法が成立することが示された。

(ISH / PRINS 法適用後の抗原性の検討)

ISH もしくは PRINS 法を適用した後に、転写因子の検出が可能であるかどうかについて、免疫蛍光染色で検証した。ISH 法で必要となる熱変性及びハイブリ反応を行った細胞で、*Pou5f1*、*Nanog*、*Sp1*、*FoxH1* のそれぞれに対する免疫染色を行ったところ、いずれも抗原性が消失していた。熱変性の代わりにアルカリ溶液による変性を試みたところ、*Nanog* 免疫蛍光染色では高いバックグラウンドが発生した。PRINS 法での熱変性条件でも、*Nanog* の抗原性は低下しており、熱変性条件を穏やかなものに変更すると、PRINS 法によるゲノム DNA の標識そのものが出来なくなった。

このような抗原性の低下と一致して、*Pou5f1* distal enhancer を ISH 法によって DIG 標識し、*Nanog* と DIG を認識するそれぞれの一次抗体を反応させた後に PLA 法を適用したが、様々な条件検討を行ったにも関わらず PLA の蛍光は検出できなかった。また、PRINS 法の場合は恐らく DIG-11-dUTP の非特異的な結合によってネガティブコントロールでも PLA 蛍光が出現したため、PRINS 法の適用は困難であると判断した。

マウス ES 細胞では *Nanog* は heterogeneity を示すため、*Nanog* の結合を PLA 法で検出できたとしても、その蛍光数は減少する可能性が考えられた。そこで、これ以降の解析ではマウス ES 細胞もしくは P19 細胞を使用して *Pou5f1* distal enhancer への *Pou5f1* 結合の検出を試みた。

(抗原性の維持と賦活化の試み)

ISH 法適用後は、熱とホルムアミドのためにほとんどのタンパク質の抗原性は失われると考えられる。そこで、抗原性の消失を避けるために、*Pou5f1* に対する抗体の反応を行い、この抗原-抗体複合体をクロスリンクした後に ISH 法を適用する試みを行った。まず、一次抗体反応及びクロスリンクの後に ISH を

行い、その後に PLA 法を適用したところ、PLA 反応が起こらなかった。次に、一次抗体反応に続いて Alexa488 標識二次抗体を反応させ、クロスリンク、ISH 法、PLA 法の順に進めると、PLA 反応は起こらないが Alexa488 の蛍光が保たれていることに気がついた。

Alexa488 は熱及びホルムアミドに対する耐性が通常のタンパク質よりも高いことが示唆されたため、Alexa488 の抗原性が ISH 操作後でも保たれているかについて検討した。二次抗体として Alexa488 標識抗体を使用し、ISH 法適用後に抗 Alexa488 抗体で検出を試みたが不可能であった。そこで Alexa488 の抗原性を賦活化させる試みを行ったところ、各種賦活化処理のうち Proteinase K 処理を行った場合に Alexa488 を抗体認識できることが明らかになった。標識二次抗体を活用するために、Alexa568 及びビオチンに対しては ISH 処理後の抗原安定性を調べたが、Alexa488 と同等の安定性は見出されなかった。次に、一次抗体及び Alexa488 標識二次抗体反応後のクロスリンクの最適条件を見出した。*Pou5f1* と *Pou5f1* distal enhancer に対して、以上の最適条件で PLA 法を適用したが、それでも PLA 蛍光は観察できなかった。

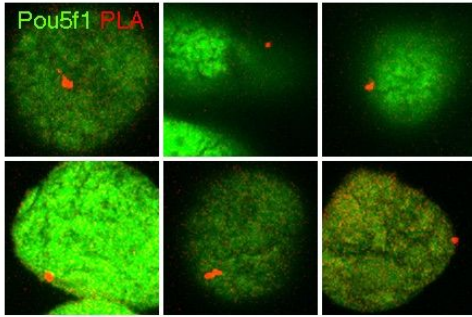
(Tyramide 増感の適用)

エンハンサーに結合する特定転写因子の数は基本的には一つであり、ISH 法による DIG/DNP ラベルと近接する度合いも結合プローブ分子ごとに異なる可能性が考えられる。そこで、Tyramide 増感を組み込むことによってプローブに対する近接機会を増やす試みを行った。

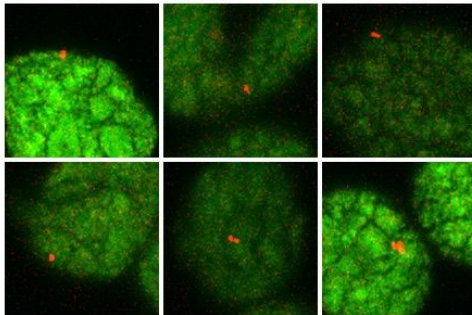
始めに、抗 *Pou5f1* 抗体で P19 細胞を処理した後に HRP 標識二次抗体を作用させ、Tyramide-Alexa488 を反応させた。ISH ハイブリ条件の後に ProteinaseK による賦活化を行うと、Alexa488 が抗体検出されることを確認した。続いて、P19 細胞を抗 *Pou5f1* 抗体もしくは抗 H3.3 抗体で処理し、HRP 標識二次抗体の結合の後に Tyramide-Alexa488 を反応させた。*Pou5f1* distal enhancer に対する ISH を行い、賦活化処理の後に PLA 反応を行ったところ、*Pou5f1* 及び H3.3 の両方で核に PLA 蛍光が出現するに至った (図の上段)。

しかしながら、ネガティブコントロールとして *Pou5f1* の集積が少ないとされるゲノム領域 (negative control region) をプローブとした ISH を行い、*Pou5f1* との PLA 反応を行ったところ、PLA 陽性細胞数は *Pou5f1* distal enhancer よりも少ないものの PLA 蛍光が観察された ($p = 0.115$) (図の下段)。この PLA 蛍光は、本実験のバックグラウンドもしくはゲノムの高次構造による想定外の相互作用によって発生した可能性が考えられた。また、*Pou5f1* と *Pou5f1* distal enhancer の組み合わせでも試行ごとに PLA 陽性細胞の数が変動し、実験条件の最適化の必要性が生じた。

ISH: Pou5f1 distal enhancer



ISH: Negative control region



(総括と展望)

本研究では、組織切片上でタンパク質とゲノム DNA の結合を検出する汎用性の高い方法論の開発を試み、研究期間内にその結合の検出を示唆する結果が得られた。本方法では、抗原安定性の高い Alexa-488 で標識された二次抗体を使用することで、タンパク質の種類によらず標識ゲノム DNA との間で PLA が成立するに至った。しかしながら、安定した結果を得るためには、更なる実験条件の最適化が必要であり、また、様々なコントロール実験を行って PLA 蛍光シグナルの妥当性を検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目野 主税 (MENO, Chikara)

九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：20311764

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

沖 真弥 (OKI, Shinya)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90452713

(4) 研究協力者