

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21770251

研究課題名（和文） 微量試料からの高効率クロマチンプルダウン法の開発

研究課題名（英文） Development of an efficient chromatin pull-down method from small cell numbers

研究代表者 栗本 一基 (KURIMOTO KAZUKI)
京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20415152

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、哺乳類（マウス）の、始原生殖細胞をはじめとする少数の細胞における転写制御因子の結合部位を決定するための手法を開発することである。特定の転写因子に結合したゲノム DNA を効率よく精製するため、その転写因子に目印（タグ）をつけた遺伝子改変マウスや細胞を作成した。転写因子に結合したゲノム DNA を増幅する手法を開発し、定量的な増幅が行われる条件を見出した。これらを総合し、10,000 個の細胞において転写因子に結合したゲノム部位を決定できるようになった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this research project is to develop a method to determine the binding sites of specific transcription factors that play important roles in specific cell lineages, such as primordial germ cells. To purify genomic DNA bound to a specific transcription factor, I developed knock-in mice that carry tags in the particular transcription factor. Furthermore, I developed a method to quantitatively amplify genomic DNA bound to a transcription factor. By these methods, it has become plausible to determine genomic sites bound to a transcription factor in a small cell number, such as 10,000 cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 22 年度	700,000	210,000	910,000
平成 23 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景
哺乳類の生殖細胞系列は、胚発生の初期にご

く少数の細胞が分化して生ずる。この過程で

転写調節因子 **Blimp1** は重要な働きをしており、始原生殖細胞分化の初期の遺伝子発現動態の大半を支配しているが、それがゲノム上のどこに結合するのか、それがどのようなクロマチン構造により規定されているのか、また、**Blimp1** による分化決定の結果、クロマチン構造がどのように変化し維持されるのかなど、始原生殖細胞形成におけるエピゲノム構造に関する知見は存在しなかった。また **Blimp1** は生殖細胞系列のみならず、さまざまな細胞系譜の分化に決定的な役割を果たすが、そのような機能の多様性を保証する機構もほとんど明らかになっていなかった。この状況は現在も変わっていない。これは、転写調節因子の結合部位やクロマチンの後成的修飾を解析するために多数の細胞が必要であり、生体内の特定の細胞系譜に適用することが技術的に困難なためである。

2. 研究の目的

本研究では少数細胞における転写因子の結合部位を決定するための技術基盤として、少数細胞からのクロマチン免疫沈降 (ChIP) を初めとしたプルダウン法、微量な ChIP DNA の増幅法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

クロマチンプルダウン法は通常、免疫沈降によっており (ChIP 法)、抗体の質により精度・効率が大きく左右される。このため一般的な方法論を確立しにくい。この困難を回避するため、転写因子に適切なタグを付与し、そのタグに対する ChIP 法、ChIP されたゲノム DNA 断片の増幅法を確立することにした。タグとしては、質の高い多様な抗体が容易に入手できる EGFP と、ビオチン-ストレプトアビジンの強力な結合を利用できるビオチンリガーゼ標的配列 (BT) を選択した。

相同組み換え技術を用い **Blimp1** の N 末端にそれぞれのタグをノックインしたマウスを作成した (理化学研究所 CDB 動物資源開発室との共同研究)。

少数細胞からの ChIP および、ChIP DNA の増幅法を開発するためには、培養細胞株など大量の試料を得られる系を用い、適切なコントロールを取りながら条件検討を重ね、方法論を検証する必要がある。しかしながら **Blimp1** の発現は知られているほとんどの細胞種において一過的であり、培養細胞系における安定した発現は知られていない。このため、代表的な培養細胞の一つ ES 細胞において、結合部位が良く知られている Oct3/4 を、方法論開発のためのコントロール系とすることにした。すなわち、薬剤依存的に内在性の Oct3/4 を除去することができる ES 細胞 (ZHBTC4 株: 丹羽仁博士にご提供頂いた) に、タグ付き Oct3/4 (Oct3/4-Linker-EGFP, Oct3/4 - Linker - BT) を導入し、Oct3/4 に代わりタグ付き Oct3/4 を発現する ES 細胞を作成した。これらの細胞をもちい、少数の細胞から効率よく ChIP するための条件検討、ChIP DNA を効率よく増幅するための方法論の開発を行った。

4. 研究成果

(1) タグつき **Blimp1** ノックインマウス作成

相同組み換えにより **Blimp1** の N 末端に EGFP および BT を挿入したノックインマウスを作成した。BT-**Blimp1** ノックインマウスについては、ビオチンリガーゼを恒常的に発現するマウス (古関明彦博士にご提供頂いた) と掛け合わせ BT-**Blimp1**、ビオチンリガーゼの両方がホモ接合体となるマウスを作成した。EGFP-**Blimp1**, BT-**Blimp1** とともにホモ接合体マウスは正常な生殖能力を有してい

た。タグ付き Blimp1 が、始原生殖細胞における正常な発現と局在を示すことを免疫蛍光染色にて確認し、かつ、タグと Blimp1 本体が分解することなく発現していることをウェスタンブロットにて確認した。これらのことから目的通りのタグ付き Blimp1 を発現するマウスが得られたと考えられる。これらのマウスは始原生殖細胞の ChIP 解析のみならず、形質細胞や皮脂腺を初めとする数多くの Blimp1 陽性細胞の解析、とくに生化学的な解析に広く用いることができる有用なリソースであると考えられる。

(2) 少数細胞からの ChIP

Oct3/4-Linker-EGFP、Oct3/4-Linker-BT をもちい、少数の細胞から効率よく ChIP を行うための条件を検討した。適切な分子を適量添加することにより、チューブ、ビーズ、カラムなどへの非特異的吸着を抑制し、 1×10^4 個程度の細胞から ChIP を行うことができるようになった。

(3) 少量の ChIP DNA の増幅

多数 (1×10^7 個) の細胞から調製した ChIP DNA を希釈し ($1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個相当)、さまざまな条件で増幅を行い、Oct3/4 の既知の結合部位の DNA 量を、元の ChIP DNA と比較し、定量的増幅の可否を評価した。次世代シーケンス用のアダプター、プライマー、各ライブラリー化ステップの反応条件等を改善することにより、 1×10^4 個細胞に相当する ChIP DNA をも定量的に増幅できる手法を確立した。増幅の正しさは、既知の Oct3/4 結合部位 (6 つの遺伝子の制御領域と、各々の近傍の非結合部位 ; 計 12 か所) に対するリアルタイム PCR で検証し、10 回以上の実験で高い再現性が得られた。さらに実際の少数細胞から ChIP を行い、開発した手法

を用いて DNA を増幅することができるかどうかを検証した。一枚のディッシュで細胞を培養し、それを少数の細胞集団 (1×10^4 , 3×10^4 , 1×10^5 個) と、多数の細胞集団 (1×10^6 個) に分け、それぞれ独立に ChIP を行い、少数細胞から調製した ChIP DNA を増幅した。リアルタイム PCR で増幅した DNA と増幅しない DNA (1×10^6 個細胞) を比較し、増幅した DNA が正しいプロファイルを示すことを確認した。これにより、少数細胞において転写因子に結合する DNA を ChIP で回収し、次世代シーケンサーに即時適用可能な形態で定量的に増幅することができるようになった。

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 6 件)

(1) Saitou, M., Kagiwada, S., Kurimoto, K. (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*, 139, 15-31. (査読無し) DOI: 139/1/15 [pii], 10.1242/dev.050849

(2) Kurimoto, K., and Saitou, M. (2011). A global single-cell cDNA amplification method for quantitative microarray analysis. *Methods Mol Biol* 687, 91-111. (査読無し) DOI: 10.1007/978-1-60761-944-4_7

(3) Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 146, 519-532. (査読あり) DOI: S0092-8674(11)00771-9 [pii], 10.1016/j.cell.2011.06.052

(4) Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoto,

K., Chuma, S., and Saitou, M. (2011). TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. *J Cell Biol* 192, 781-795. (査読あり) jcb.201009043 [pii], 10.1083/jcb.201009043

(5) Kurimoto, K., and Saitou, M. (2010). Single-cell cDNA microarray profiling of complex biological processes of differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 20, 470-477.

(査読無し) DOI: S0959-437X(10)00103-6 [pii], 10.1016/j.gde.2010.06.003

(6) Yamaguchi, S., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Sasaki, H., Nakatsuji, N., Saitou, M., and Tada, T. (2009). Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Development* 136, 4011-4020. (査読あり) DOI: 136/23/4011 [pii], 10.1242/dev.041160

[学会発表] (計1件)

(7) Saitou, M., Kurimoto, K., (Honolulu, Hawaii, USA, Dec. 19, 2010) Global transcription profiling of complex biological processes of cellular differentiation at the single-cell resolution. Pacificchem 2010, Recent Advances in Bioanalysis: Ultra-Small Volumes, Global Metabolite Profiling and Single Cells

[図書] (計4件)

(8) 栗本一基, 斎藤通紀 (2011) 卵子学 第I章 卵子の発生と新生/3 生殖系列の決定機構とその特性 (京都大学学術出版・総ページ数 1195)

(9) 栗本一基, 斎藤通紀 (2010) 単一細胞 cDNA 増幅法. 実験医学別冊・新遺伝子工学ハンドブック (羊土社・総ページ数 365)

(10) 栗本一基, 山路剛史, 関由行, 斎藤通

紀(2009) 哺乳類の生殖細胞形成を制御する分子機構. 実験医学 Vol. 27 No. 3 (2月号) (羊土社・総ページ数 480)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗本一基 (KURIMOTO KAZUKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 20415152