

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650059

研究課題名(和文) enChIP法を用いたミトコンドリアDNAの高次構造解析

研究課題名(英文) Analysis of higher-order structures of mitochondria DNA using the enChIP technology

研究代表者

藤井 穂高 (Fujii, Hodaka)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：30302665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者が開発したengineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法を用いて、分子間相互作用を保ったままmtDNAの転写調節領域を単離し、そこに結合している分子(蛋白質・RNA等)を網羅的に同定して、それらの分子がmtDNAからの遺伝子発現等の機能発現に果たす役割を解析することを計画した。こうした解析によって、mtDNAのクロマチン構造や転写制御機構の詳細を解明することを狙った。

研究成果の概要(英文)：Genetic information in mammalian cells is separately stored in two organelles, the nucleus and the mitochondria. Extensive analyses have been done to elucidate chromatin structures and transcription factors of the nuclear DNA, whereas only limited information is available on higher order structures and transcription mechanisms of mitochondria DNA (mtDNA). In this study, we aimed to isolate transcriptional regulatory regions of mtDNA, which retains molecular interactions, using the engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) technology to perform non-biased identification of molecules (proteins, RNAs, and others) associated with the region. Subsequently, their roles in regulation of functions of mtDNA such as gene expression will be explored in the hope to elucidate higher-order structures of mtDNA chromatin and gain mechanistic insight on transcriptional regulation of genes on mtDNA.

研究分野：分子生物学

 キーワード：ミトコンドリア 遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法 クロマチン enChIP ミトコンドリアDNA TA  
L

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類動物細胞の遺伝情報は、核とミトコンドリアという二つの細胞内小器官に存在している。核内 DNA については、クロマチン構造や転写因子等が詳細に解析されている。一方、mtDNA については、核内 DNA とは異なり、ヒストンを含むようなヌクレオソーム構造は無く、DNA に結合する非ヒストン蛋白質が存在することや (Caron, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979)、Polrmt, Tfam, Tfb2m といった基本的な転写機構も知られているが (Leigh-Brown, *Genome Biol.*, 2010)、その高次構造や転写調節機構については未知の点が多い。その主要な理由として、分子間相互作用を保持したまま、mtDNA の特定領域を単離する方法が存在しなかったことが挙げられる。

本研究提案では、申請者が開発した engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法を用いて、分子間相互作用を保ったまま mtDNA の転写調節領域を単離し、そこに結合している分子 (蛋白質・RNA 等) を網羅的に同定し、それらの分子が mtDNA からの遺伝子発現等の機能発現に果たす役割を解析する。enChIP 法は、(1) zinc-finger 蛋白質や transcription activator-like (TAL) effector 蛋白質、不活性型 Cas9 蛋白質 (dCas9) とガイド RNA (gRNA) の複合体を用いた CRISPR システムからなるタグ付き標的 DNA 配列結合分子の解析対象細胞への発現、(2) 必要があれば、ホルムアルデヒド等でクロスリンク後、超音波処理または制限酵素処理等により DNA を断片化、(3) 上記タグを認識する抗体による免疫沈降により、DNA-蛋白複合体を単離、(4) クロスリンクをはずし、複合体中の蛋白質・DNA・RNA を同定、という手順による ( *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, *Sci. Rep.*, 2013、国内・国外特許出願済 )。enChIP 法を発表したこの最初の論文は、掲載誌全論文中、過去 90 日間のダウンロードランキングで第 1 位になるなど、注目を集めている (2013 年 10 月 8 日～2014 年 3 月 13 日)。こうした解析によって、mtDNA の高次構造やその転写制御機構についての理解が飛躍的に深まることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究提案では、申請者が開発した enChIP 法を用いて、分子間相互作用を保ったまま mtDNA の転写調節領域を単離し、そこに結合している分子 (蛋白質・RNA 等) を網羅的

に同定し、それらの分子が mtDNA からの遺伝子発現等の機能発現に果たす役割を解析する。こうした解析によって、mtDNA のクロマチン構造や転写制御機構の詳細を解明する。

研究期間内の目標は以下の通りである。

1. mtDNA を標的とした enChIP 法を開発する。
2. enChIP 法を用いて、分子間相互作用を保持したまま、mtDNA の特定 DNA 領域を単離する。
3. 単離した mtDNA の特定 DNA 領域に結合している蛋白質を、質量分析法を用いて同定する。
4. 同定した mtDNA 結合蛋白質が、mtDNA からの転写等の機能に果たす役割を、shRNA や CRISPR 系を用いた loss-of-function 実験等を用いて解明する。

## 3. 研究の方法

### 3-1. ミトコンドリア・マトリックスに局在するタグ付き TAL 蛋白質の作製

mtDNA は、ミトコンドリア内のマトリックスに局在している。従って、mtDNA を標的とする enChIP 法を実施するには、enChIP 法に用いるタグ付き人工 DNA 結合分子をそこに局在させる必要がある。そこで、まず、mtDNA の転写を制御している D-loop 領域近傍に結合する TAL 蛋白質をコードする遺伝子に、3xFLAG タグとミトコンドリア局在シグナル (mitochondria localization signal: MT) (Otterlei *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1998, 26:4611-4617) を融合させた蛋白質 3xFM-MT-TAL を発現するプラスミドを作製する。TAL 蛋白質は、D-loop 領域で、既存の DNA 結合蛋白質が結合することが知られていない DNA 配列を認識するように設計し、mtDNA からの転写に影響を与える確率を低くする。また、TAL 蛋白質の認識配列は、mtDNA や核 DNA の他の領域には存在しない配列を選定する。この発現ベクターを HeLa 細胞等の哺乳動物細胞に導入し、発現させた 3xFM-MT-TAL がミトコンドリア・マトリックスに局在することを、蛍光抗体イメージング法を用いて確認する。また、3xFM-MT-TAL の発現の有無による mtDNA 由来の転写産物の量を比較し、3xFM-MT-TAL の発現が mtDNA からの転写に重大な影響を与えないことを確かめる。

### 3-2. enChIP 法による mtDNA の単離効率の検定

次に、実際に enChIP 法による mtDNA の単離が可能か否かを検討する。HeLa 細胞等の

標的哺乳動物細胞に、上記 3xFM-MT-TAL を発現させ、enChIP 操作後、免疫沈降物中に含まれる mtDNA 量を特異的なプライマーを用いたリアルタイム PCR 法を用いて定量し、input に対する%としてスコア化する。核内 DNA の場合には、1 - 7%程度の% input が実現できているので、これに近い値が得られるよう、実験条件を最適化する。

### 3-3. 単離した mtDNA に結合している蛋白質及び RNA の同定

上記 2 により enChIP 法による mtDNA を効率良く単離することができることが示されれば、単離した mtDNA に結合している蛋白質及び RNA を、それぞれ質量分析 (MS) 解析及び RNA-Seq 解析によって同定する。同定した分子が、野生型細胞で mtDNA D-loop 領域近傍に結合していることを、蛋白質については ChIP 法を、RNA については CHART 法を用いて確認する。

### 3-4. mtDNA 結合蛋白質及び RNA が mtDNA 機能発現に果たす役割の解析

上記 3 で同定した分子が、mtDNA の機能発現に果たす役割を、shRNA によるノックダウン実験や、CRISPR による欠失実験等の loss-of-function 実験によって明らかにする。リードアウトとしては、リアルタイム RT-PCR 法を用いた mtDNA からの遺伝子発現の定量、リアルタイム PCR 法を用いた mtDNA のコピー数の定量、ミトコンドリア機能の指標としての ATP 産生能、細胞死アッセイ等を用いる。

こうした解析によって同定した候補分子がミトコンドリア機能発現に関与していることが分かれば、候補分子と相互作用している分子を、タグ付き候補分子を発現させた細胞でのプルダウンと質量分析解析などによって同定し、候補分子機能発現の分子機構を明らかにする。

## 4 . 研究成果

### 4-1. CRISPR 系を用いた enChIP 法による mtDNA 単離の検討

enChIP 法の進展に伴い、まず、CRISPR 系を用いた enChIP 法によって mtDNA が単離できるか否かを検討した。CRISPR 系を用いた enChIP 法では、small guide RNA (sgRNA) を変えるだけで標的 DNA 領域を容易に変更することができるため、mtDNA 内のいろいろな領域を標的とでき、系の柔軟性が高い。MT と精製用タグを融合させた dCas9 と、mtDNA の D-loop 近傍を認識する gRNA を 293T 系細胞に発現させ、D-loop 領域を単離できるか否かを調べた。その結果、単離効率は極めて低く、この系を利用することは難しいことが分

かった。この原因として、dCas9 をミトコンドリア・マトリックスに局在させることはできる一方、sgRNA をミトコンドリア・マトリックスに局在させることが困難である可能性が挙げられる。

### 4-2. TAL 系を用いた enChIP 法による mtDNA 単離の検討

そこで、当初の計画通り、TAL 蛋白質を用いる系に切り替えた。D-loop 領域で、既存の DNA 結合蛋白質が結合することが知られていない DNA 配列を認識するように TAL 蛋白質を設計し、3xFLAG タグと MT を融合させた蛋白質 3xFM-MT-TAL を発現するプラスミドを作製した。3xFM-MT-TAL を 293T 細胞に一過性に発現させ、ミトコンドリア分画及び対照として細胞質分画を生化学的に調製して免疫プロット解析により 3xFM-MT-TAL の発現及びミトコンドリアへの局在を解析した。その結果、3xFM-MT-TAL のミトコンドリアへの局在を確認した。次いで、enChIP 法を実施して、mtDNA の単離ができるか否かを検討した。その結果、input に対して 0.2 - 0.4%の収率で mtDNA を単離することができた。

### 4-3. まとめ

本研究では、まず、CRISPR 系を用いた enChIP 法により mtDNA を単離することを試みた。しかし、十分な単離効率をあげることはできなかった。その理由として、sgRNA をミトコンドリア・マトリックスに局在させることが困難である可能性が挙げられる。この結果から、mtDNA のゲノム編集等においても CRISPR 系を利用することは困難であることが示唆される。

次に、TAL 蛋白質を用いた enChIP 法による mtDNA の単離を試み、十分な収率を上げることができた。今後は、単離した mtDNA に結合している蛋白質の同定を進め、mtDNA の転写制御の分子機構の詳細を解明していきたい。

## 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 5 件)

1. Fujita T, and Fujii H: Isolation of specific genomic regions and identification of associated molecules by enChIP. *J. Vis. Exp.* (2016) issue 107; doi: 10.3791/53478. 査読有
2. Fujita T, Yuno M, and Fujii H: Efficient sequence-specific isolation of DNA fragments and chromatin by in vitro enChIP technology using recombinant CRISPR ribonucleoproteins. *bioRxiv*, doi: <http://dx.doi.org/10.1101/033241>; *Genes to Cells* (2016) 21, 370-377. doi:

- 10.1111/gtc.12341. 査読有
3. Fujita T, and Fujii H: Biochemical analysis of genome functions using locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies. *Gene Regul. Syst. Bio.* (2016) Suppl. 1, 1-9. doi: 10.4137/GRSB.S32520. 査読有
  4. Fujita T, and Fujii H: Applications of engineered DNA-binding molecules such as TAL proteins and the CRISPR/Cas system in biology research. *Int. J. Mol. Sci.* (2015) 16, 23143-23164. doi: 10.3390/ijms161023143. 査読有
  5. Fujii H, and Fujita T: 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.* (2015) 16, 21802-21812. doi: 10.3390/ijms160921802. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/microimm/fujii/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤井 穂高 (FUJII, Hodaka)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：30302665

### (2)研究分担者

無し

### (3)連携研究者

無し