

総説

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発現調節機構の生化学的解析

藤井穂高

抄録 転写やエピジェネティック制御をはじめとするゲノム機能発現調節の分子機構の解明には、解析対象とするゲノム領域に結合している分子を同定することが必須である。筆者らのグループは、これを実現するための新規方法として「遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法(遺伝子座特異的 chromatin immunoprecipitation (ChIP) 法)」を開発してきた。遺伝子座特異的 ChIP 法は、細胞から分子間相互作用を保持したまま解析対象ゲノム領域を特異的に単離する生化学的技術であり、質量分析法 (mass spectrometry: MS) や次世代シーケンス法 (next-generation sequencing: NGS) などの手法と組み合わせることにより、当該ゲノム領域結合分子の網羅的同定が可能である。遺伝子座特異的 ChIP 法は、insertional ChIP (iChIP) 法と engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP (enChIP) 法から構成される。本稿では、遺伝子座特異的 ChIP 法の基本原理や応用例について紹介する。

弘前医学 69 : 10—18, 2019

キーワード : クロマチン免疫沈降法 ; ChIP ; 遺伝子座特異的 ChIP 法 ; iChIP ; enChIP.

REVIEW

BIOCHEMICAL ANALYSES OF MOLECULAR MECHANISMS OF REGULATION OF GENOME FUNCTIONS USING THE LOCUS-SPECIFIC CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION TECHNOLOGIES

Hodaka Fujii

Abstract For comprehensive understanding of molecular mechanisms of regulation of genome functions including transcription and epigenetic regulation, it is essential to identify molecules associated with the genomic regions to be analyzed *in vivo*. To this end, the author's research group has developed the locus-specific chromatin immunoprecipitation (locus-specific ChIP) technologies consisting of insertional ChIP (iChIP) and engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP (enChIP). The locus-specific ChIP technologies are biochemical methods to purify specific genomic regions retaining molecular interactions from cells and combined with mass spectrometry (MS), next generation sequencing (NGS), and other methods to identify molecules associated with the genomic regions. In this review, I describe the basic principles and applications of the locus-specific ChIP technologies.

Hirosaki Med. J. 69 : 10—18, 2019

Key words: ChIP; chromatin immunoprecipitation; locus-specific ChIP; iChIP; enChIP.

緒 言

転写やエピジェネティック制御をはじめとするゲノム機能発現調節の分子機構の解明には、解析対象とするゲノム領域に結合している分子を同定することが必須である。従来、ゲノム機能発現調節機構の解析として、いくつかの方法が考案されて来た。例えば、まず、適当なレポーターアッセイによってゲノム機能発現制御に重要なゲノム領域を同定し、その配列に結合する分子を electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 等の方法により検出した後、当該DNA配列をビーズに結合させたアフィニティーカラムに核抽出液を通して結合してくる蛋白質を濃縮し、最終的に質量分析解析 (mass spectrometry: MS) 等の方法によって同定する方法が挙げられる。また、こうした生化学的な方法の他に、酵母細胞にゲノム機能発現制御に重要なゲノム領域に連結したレポーター系を導入し、転写活性化ドメインをコードする DNA 配列との融合遺伝子を発現するような cDNA ライブラリーを当該レポーター酵母細胞に遺伝子導入して、レポーター分子の発現を指標として、当該 DNA 配列に結合する蛋白質を探索する酵母ワンハイブリッド法も利用されている。これらの方法を使用することで、重要な DNA 結合蛋白質が多数同定されてきた。しかし、これらの方法は、いずれも、生理的なコンテキストを無視して、DNA に結合しうる蛋白質を同定するものであり、当然、生理的な条件下の核内で当該 DNA 配列に結合するものの他に、非生理的な結合蛋白質を検出する可能性がある。従って、検出した蛋白質が生理的条件下で核内の当該 DNA 配列に結合するか否かを注意深く検証する必要があり、多大な労力と手間・長い時間がかかるものであった。

こうした従来法の問題点を解決するために、筆者らのグループは、細胞内で実際に解析対象ゲノム領域に結合する分子を同定する方法として遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法 (locus-specific ChIP: 遺伝子座特異的 ChIP 法) を開発した。遺伝子座特異的 ChIP 法では、解析対象とするゲノム領域を外来性 DNA 結合分子でタグ付けし、その後、タグ付けしたゲノム領域をアフィニティー

精製によって単離する。その後、単離したゲノム領域に結合している分子を、適当な方法を用いて同定する。一般には、蛋白質の同定には MS 解析が、RNA や他のゲノム領域等の DNA といった核酸は次世代シーケンス法 (next-generation sequencing (NGS)) が用いられる。必要に応じて、他の解析方法も適宜選択される。遺伝子座特異的 ChIP 法は、タグ付けのやり方によって、insertional ChIP (iChIP) 法と engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP (enChIP) 法に分けられる。

iChIP 法

iChIP 法では、外来性 DNA 結合分子とそれが特異的に結合する外来性塩基配列を利用して、解析対象ゲノム領域をタグ付けする。筆者らのグループは、外来性 DNA 結合分子として、細菌の DNA 結合蛋白質である LexA を使用しているが、他にも LacI-LacO 系や TetR-TetO 系も利用できる。iChIP 法は、外来性 DNA 結合分子を解析対象細胞内に発現させる "in cell" iChIP 法¹⁾(図 1) と、組換え蛋白質等を用いて外来性 DNA 結合分子を細胞内に発現させる必要がない "in vitro" iChIP 法²⁾(図 2) とに分けられる。

"in cell" iChIP 法では、まず、LexA 等の外来性 DNA 結合分子の結合塩基配列を、解析対象細胞の解析対象とするゲノム領域に相同組み換え法などで挿入する。次に、エピトープタグ等を付加した外来性 DNA 結合分子を発現させる。必要に応じてホルムアルデヒド等の架橋剤を用いて分子間の相互作用を保持し、超音波処理や DNA 切断酵素処理等によってクロマチンを断片化する。次に、エピトープタグに対する抗体等を用いて、解析対象とするゲノム領域をアフィニティー精製する。架橋剤を用いた場合には、脱架橋処理を行い、解析対象ゲノム領域結合分子を適当な方法を用いて同定する。

"in vitro" iChIP 法では、LexA 等の外来性 DNA 結合分子の結合塩基配列を、解析対象細胞の解析対象とするゲノム領域に相同組み換え法などで挿入するステップは同じだが、その後、必要であれば架橋剤による架橋処理、クロマチンの断片化に進み、断片化されたクロマチンと組換え

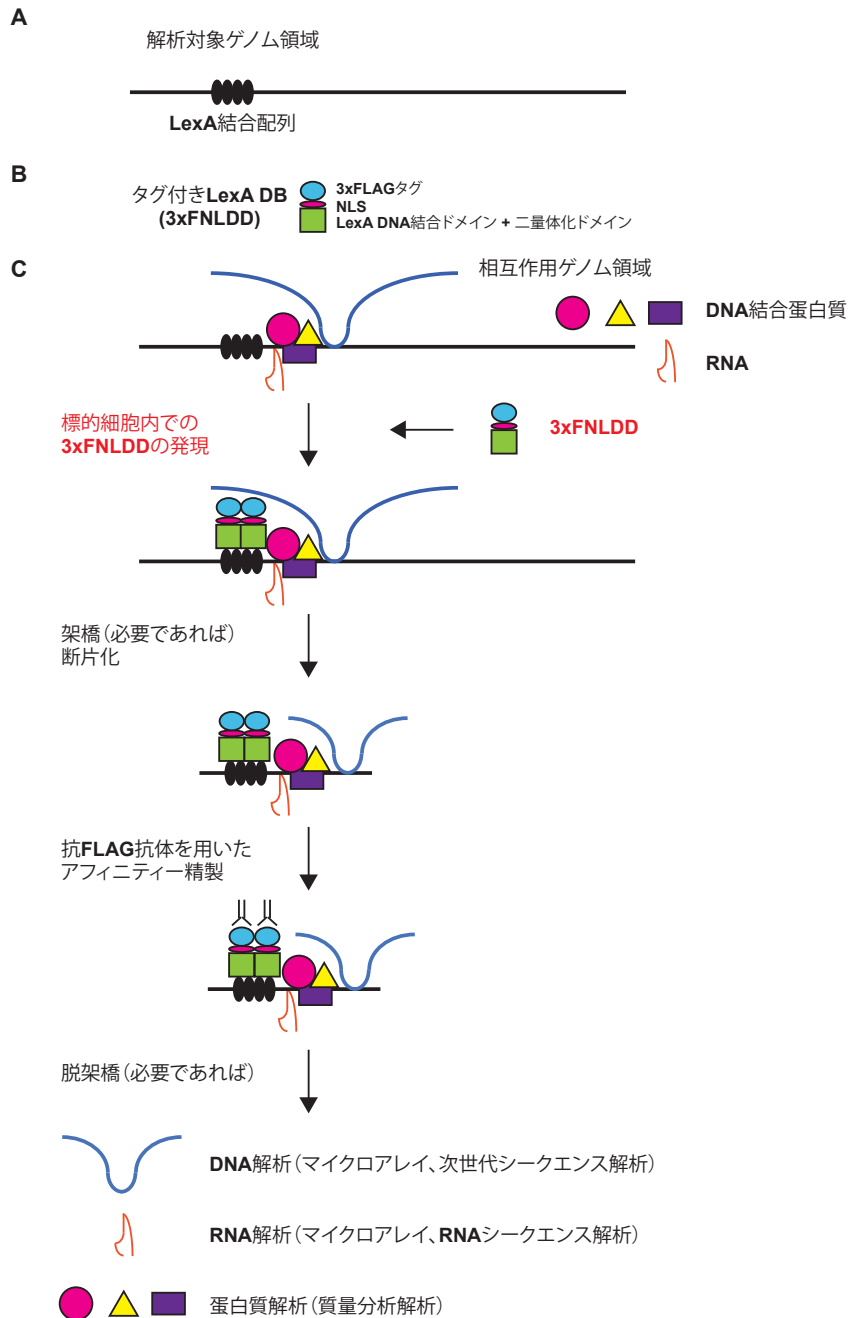


図1 細胞内 iChIP 法の模式図。細胞内 iChIP 法では、LexA 蛋白質等の外来性 DNA 結合分子とそれが特異的に結合する外来性塩基配列を利用し、細胞内で解析対象ゲノム領域をタグ付けする。その後、タグ付けしたゲノム領域を細胞から単離する。(A) 解析対象ゲノム領域に挿入された LexA 結合配列。(B) タグ付き LexA DNA 結合ドメイン蛋白質。3xFLNDD 蛋白質は、3xFLAG タグ、核移行シグナル (NLS)、LexA 蛋白質の DNA 結合ドメイン及び二量体化ドメインから構成される。(C) 細胞内 iChIP 操作のスキーム。(文献¹⁴⁾から改変。)

蛋白質として作製しておいた LexA 蛋白質等の外来性 DNA 結合分子を試験管内で接触させ、標的ゲノム領域をタグ付けする。最後に、外来性 DNA 結合分子に付加したエピトープタグ等に対する抗体等を用いて、解析対象とするゲノム領域

をアフィニティー精製する。解析対象ゲノム領域結合分子の同定は、"in cell" iChIP 法の場合と同様である。"in vitro" iChIP 法では、細胞内に外来性 DNA 結合分子を発現させる必要が無いため、外来性 DNA 結合分子の結合による悪影響、例え

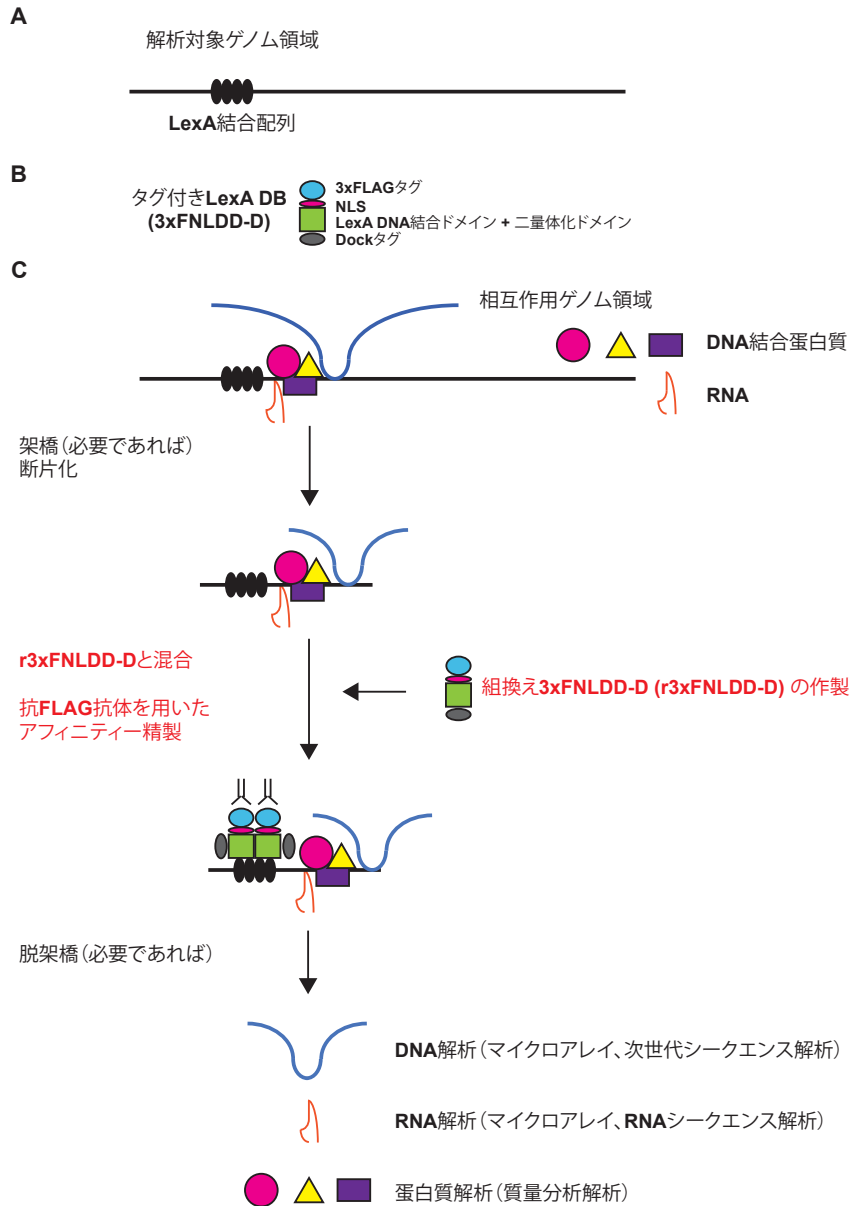


図2 *In vitro* iChIP法の模式図。 *In vitro* iChIP法では、組換えあるいは合成外来性DNA結合分子を利用し、試験管内で解析対象ゲノム領域をタグ付けする。その後、タグ付けしたゲノム領域をアフィニティー精製する。(A) 解析対象ゲノム領域に挿入されたLexA結合配列。(B) 組換えタグ付きLexA DNA結合ドメイン蛋白質。3xFLNDD-D蛋白質は、3xFLAGタグ、NLS、LexA蛋白質のDNA結合ドメイン及び二量体化ドメイン、大腸菌からの精製用のDockタグから構成される。(C) *In vitro* iChIP操作のスキーム。(文献¹⁴)から改変。

ば転写の抑制等、を考慮することがなく、より生理的な条件下でiChIP法を実施することができる。

enChIP法

iChIP法では、外来性DNA結合分子の認識配列を解析対象ゲノム領域に挿入する必要がある。従来、こうしたノックイン操作は、一部の細胞でしか効率良く実施することはできなかつ

た。しかし、近年のゲノム編集技術の発展により、多くの細胞で比較的容易に実施できるようになってきている。しかし、ゲノム編集に利用される人工DNA結合分子を利用することにより、外来性DNA結合分子の認識配列を解析対象ゲノム領域に挿入することなく特定のゲノム領域をタグ付けすることができるのではないかと、という着想を得て開発したのがenChIP法

である。enChIP法では、ジンクフィンガー蛋白質(ZFP)やtranscription activator-like effector (TAL)、DNA切断活性部位2箇所に変異を入れることによりDNA切断活性は持たないがDNAへの結合能を保持するCas9蛋白質(dCas9)とDNAの特異性を決定するガイドRNAから構成されるclustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)系等を利用して、解析対象ゲノム領域をタグ付けし、当該ゲノム領域を単離する。

iChIP法の場合と同様に、解析対象細胞内に外来性DNA結合分子を発現させる"in cell" enChIP法³⁾(図3)に加えて、組換えTAL蛋白質や組換えCRISPRリボヌクレオ蛋白質を用いて、試験管内で当該ゲノム領域をタグ付けする"in vitro" enChIP法(図4)も開発した⁴⁾。

iChIP法とenChIP法の特徴の比較

iChIP法は、外来性DNA結合分子の認識配列を解析対象ゲノム領域に挿入する必要があるため、enChIP法に比べて実施するための細胞の作製に時間と労力がかかる。その一方、父方母方から受け継いだアレルの一方を選択的にタグ付けできることから、アレル特異的なゲノム領域の単離が比較的容易であるという特徴も有している。但し、enChIP法においても、標的DNA配列を選択することで、アレル特異的なゲノム領域単離が可能である⁵⁾。

遺伝子座特異的ChIP法の実施例

1. 特定ゲノム領域結合蛋白質の同定

筆者らのグループは、遺伝子座特異的ChIP法とMS解析を組み合わせて、解析対象ゲノム領域結合蛋白質の同定に成功してきた。これまでの筆者らのグループによる実施例は以下の通りである。

(i) iChIP法とMS解析を組み合わせて、マウスの血球系細胞株Ba/F3において、ゲノム領域間の仕切りとして機能するインスレーター結合蛋白質として、p68蛋白質及びMatrin-3蛋白質を同定した⁶⁾。そして、その二つの蛋白質が、CTCF蛋白質を介して、インスレーターに間接的に結合していることを明らかにした⁶⁾。

(ii) CRISPR系を利用したenChIP法とMSショットガン解析や定量的MS解析の一つであるstable isotope labeling using amino acids in cell culture (SILAC)法を組み合わせて、ヒト線維肉腫細胞株HT1080において、インターフェロン(IFN)誘導遺伝子である*interferon regulatory factor (IRF)-1*遺伝子プロモーター結合蛋白質を同定した^{3,7)}。中でも、ヒストン脱メチル化複合体を構成しているRBBP4蛋白質やPA2G4蛋白質が、IFN γ 刺激誘導性に*IRF-1*遺伝子プロモーターに結合してくることを発見した⁸⁾。IFN誘導性遺伝子は、他の遺伝子とは異なり、ヒストン脱メチル化複合体が転写活性化に関与していることが知られており、この研究ではそのうちの蛋白質が転写活性化に関与しているのかを明らかにすることができた。

(iii) TAL蛋白質を利用したenChIP法とMSショットガン解析を組み合わせて、Ba/F3細胞において、染色体末端に存在するテロメア結合蛋白質を同定した⁹⁾。既知のテロメア結合蛋白質に加えて、これまで知られていなかったテロメア結合蛋白質多数を同定することができた⁹⁾。

(iv) iChIP法とSILAC解析を組み合わせて、ニワトリ成熟B細胞株DT40細胞において、B細胞の運命決定に必須の転写因子である*Pax5*遺伝子プロモーター結合蛋白質を同定した¹⁰⁾。そのうち、Thy28蛋白質がB細胞特異的に*Pax5*遺伝子プロモーターに結合していることを明らかにした。加えて、Thy28蛋白質がミオシンスーパーファミリーに属するMYH9蛋白質と結合しており、この両者が*Pax5*遺伝子発現に重要な働きをしていることを示した¹⁰⁾。

2. 特定ゲノム領域結合RNAの同定

筆者らのグループは、遺伝子座特異的ChIP法とRNA-Seq解析等を組み合わせて、解析対象ゲノム領域結合RNAの同定に成功してきた。これまでの筆者らのグループによる実施例は以下の通りである。

(i) iChIP法とRT-PCR解析を組み合わせて、Ba/F3細胞において、インスレーター結合RNAであるsteroid receptor RNA activator 1 (SRA1) RNAを検出した⁶⁾。

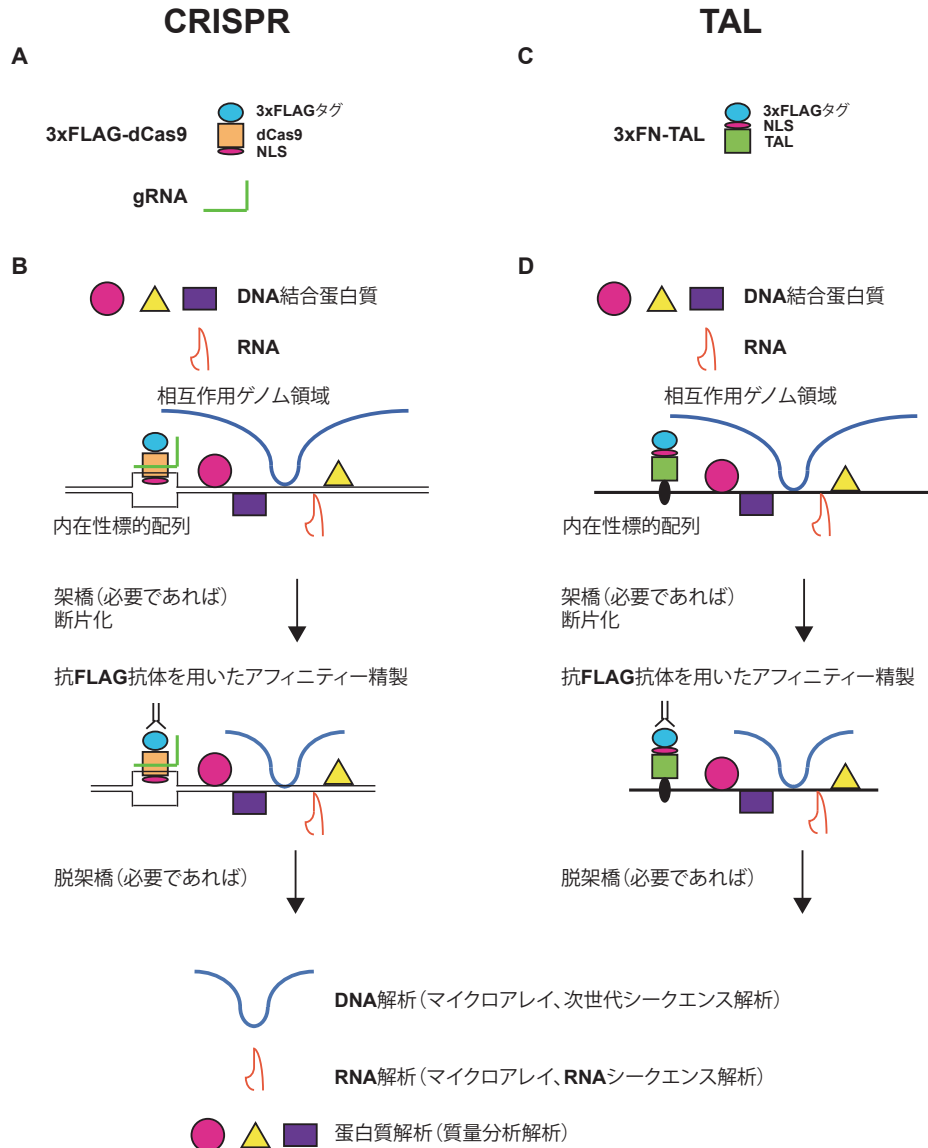


図3 細胞内 enChIP 法の模式図. 細胞内 enChIP 法では, TAL 蛋白質や CRISPR などの人工 DNA 結合分子を利用し, 細胞内で解析対象ゲノム領域をタグ付けする. その後, タグ付けしたゲノム領域を細胞から単離する. 図では CRISPR (A, B) 及び TAL (C, D) の例を示す. (A) タグ付き CRISPR 複合体の構成要素である 3xFLAG-dCas9 と gRNA. 3xFLAG-dCas9 は, 3xFLAG タグ, NLS, DNA 切断活性を持たないが結合活性を有する dCas9 蛋白質から構成される. (B) CRISPR 系を用いた細胞内 enChIP 操作のスキーム. (C) タグ付き TAL 蛋白質. 3xFN-TAL は, 3xFLAG タグ, NLS, TAL 蛋白質から構成される. (D) TAL 蛋白質を用いた細胞内 enChIP 操作のスキーム. (文献¹⁴⁾から改変.)

(ii) TAL 蛋白質を利用した enChIP 法と RT-PCR 解析や RNA-Seq 解析を組み合わせると, Ba/F3 細胞において, テロメア結合 RNA を同定した^{9, 11)}. 既知のテロメア結合 RNA に加えて, これまで知られていなかったテロメア結合 RNA 多数を同定することができた¹¹⁾.

3. 特定ゲノム領域に結合する他のゲノム領域の同定

筆者らのグループは, 遺伝子座特異的 ChIP 法と NGS 解析等を組み合わせると, 解析対象ゲノム領域に結合する他のゲノム領域の同定に成功してきた. こうしたゲノム領域は, エンハンサーやサイレンサー等の遺伝子発現調節領域や,

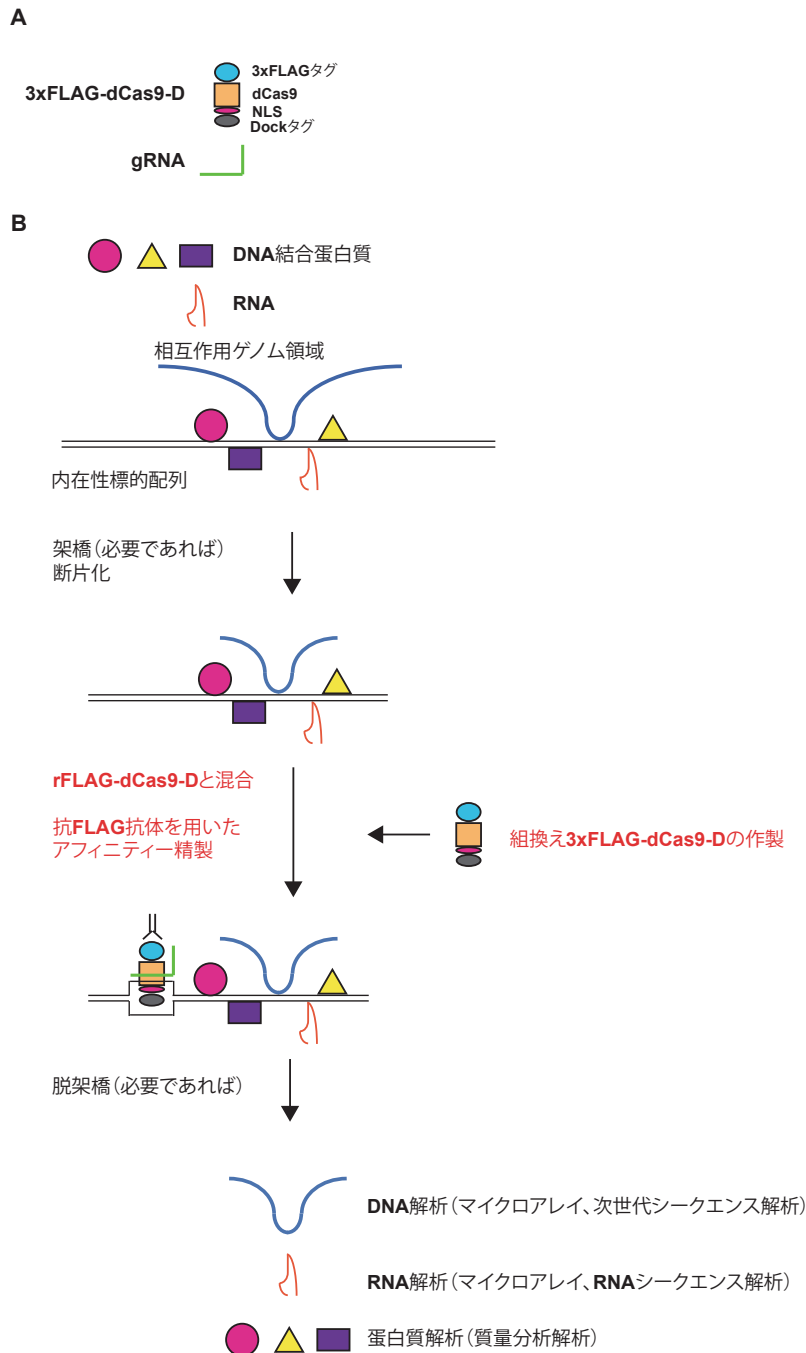


図4 *In vitro* enChIP法の模式図。*In vitro* enChIP法では、TAL蛋白質やCRISPRなどの組換えあるいは合成人工DNA結合分子を利用し、試験管内で解析対象ゲノム領域をタグ付けする。その後、タグ付けしたゲノム領域をアフィニティー精製する。図ではCRISPRの例を示す。アフィニティー精製は、組換えタグ付きdCas9を認識する抗体や標識gRNAを認識する分子(例：ビオチン-アビジン系)を利用して行う。(A) タグ付きCRISPR複合体の構成要素である3xFLAG-dCas9-DとgRNA。3xFLAG-dCas9-Dは、3xFLAGタグ、NLS、DNA切断活性を持たないが結合活性を有するdCas9蛋白質、大腸菌からの精製用のDockタグから構成される。(B) *In vitro* enChIP操作のスキーム。

"transcription factory" に含まれる協調的な制御を受けている遺伝子群の可能性もある。これまでの筆者らのグループによる実施例は以下の通りである。

(i) CRISPR系を利用したenChIP法とNGS解析を組み合わせ、ヒト白血病細胞株K562において、βグロビン遺伝子座に位置しているグロビン遺伝子群の発現制御に関与している5'HS5領域

と、赤芽球様分化時特異的に相互作用しているゲノム領域を同定した¹²⁾。それらのゲノム領域近傍に位置する遺伝子には、赤芽球様分化に伴って遺伝子発現が増加する遺伝子が多く見られたことから、5'HS5 領域による協調的な遺伝子発現制御を受けている可能性があり、これらの遺伝子群がグロビン遺伝子群と共に "transcription factory" を形成している可能性が示唆された。

(ii) iChIP 法と NGS 解析及び CRISPR 系を利用した enChIP 法と NGS 解析を組み合わせて、DT40細胞において *Pax5* 遺伝子プロモーターと B細胞特異的に相互作用するゲノム領域を探索した¹³⁾。その結果、*Pax5* 遺伝子が位置している Z染色体とは異なる11番染色体上に相互作用ゲノム領域のクラスターを同定した¹³⁾。CRISPR 系を用いたゲノム領域欠失実験により、このうちの一つがエンハンサーとして *Pax5* 遺伝子発現を正に制御していることを明らかにした¹³⁾。

結 語

本総説では、筆者らの研究グループが世界に先駆けて開発した遺伝子座特異的 ChIP 法の原理と、筆者らの研究グループによるその実施例について解説した。遺伝子座特異的 ChIP 法を用いることによって、分子間の相互作用を保持したまま特定のゲノム領域を単離し、その領域に結合している分子を網羅的に同定することができる。遺伝子座特異的 ChIP 法の実施後、適当な解析方法を使うだけで蛋白質・RNA・他のゲノム領域等を同定することができるオール・イン・ワンの解析手法である。今後、遺伝子座特異的 ChIP 法を利用して、転写やエピジェネティック制御をはじめとするゲノム機能発現調節機構の解明が進むことを期待している。

謝 辞

本総説で記載されている遺伝子座特異的 ChIP 法は、藤井研究室の構成員の多大な努力によって開発されたものであり、ここに謝意を表します。特に、藤田敏次准教授は、開発において中心的な役割を果たしており、ここに感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) Hoshino A, Fujii H. Insertional chromatin immunoprecipitation: a method for isolating specific genomic regions. *J Biosci Bioeng.* 2009;108:446-9.
- 2) Fujita T, Fujii H. Efficient isolation of specific genomic regions retaining molecular interactions by the iChIP system using recombinant exogenous DNA-binding proteins. *BMC Mol Biol.* 2014;15:26.
- 3) Fujita T, Fujii H. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;439:132-6.
- 4) Fujita T, Yuno M, Fujii H. Efficient sequence-specific isolation of DNA fragments and chromatin by in vitro enChIP technology using recombinant CRISPR ribonucleoproteins. *Genes Cells.* 2016;21:370-7.
- 5) Fujita T, Yuno M, Fujii H. Allele-specific locus binding and genome editing by CRISPR at the p16INK4a locus. *Sci Rep.* 2016;6:30485.
- 6) Fujita T, Fujii H. Direct identification of insulator components by insertional chromatin immunoprecipitation. *PLoS One.* 2011;6:e26109.
- 7) Fujita T, Fujii H. Identification of proteins interacting with genomic regions of interest in vivo using engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). *Bio-Protoc.* 2014;4:e1124.
- 8) Fujita T, Fujii H. Identification of proteins associated with an IFN γ -responsive promoter by a retroviral expression system for enChIP using CRISPR. *PLoS One.* 2014;9:e103084.
- 9) Fujita T, Asano Y, Ohtsuka J, Takada Y, Saito K, Ohki R, Fujii H. Identification of telomere-associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). *Sci Rep.* 2013;3:3171.
- 10) Fujita T, Kitaura F, Fujii H. A critical role of the Thy28-MYH9 axis in B cell-specific expression of the *Pax5* gene in chicken B cells. *PLoS One.*

- 2015;10:e0116579.
- 11) Fujita T, Yuno M, Okuzaki D, Ohki R, Fujii H. Identification of non-coding RNAs associated with telomeres using a combination of enChIP and RNA sequencing. *PLoS One*. 2015;10:e0123387.
 - 12) Fujita T, Yuno M, Suzuki Y, Sugano S, Fujii H. Identification of physical interactions between genomic regions by enChIP-Seq. *Genes Cells*. 2017;22:506-20.
 - 13) Fujita T, Kitaura F, Yuno M, Suzuki Y, Sugano S, Fujii H. 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*. 2017;24:537-48.
 - 14) Fujita T, Fujii H. Biochemical analysis of genome functions using locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies. *Gene Regul Syst Bio*. 2016;10(Suppl. 1):1-9.