

93. T 細胞分化の遺伝子座特異的生化学的ゲノム機能解析

藤井 穂高

Key words: エピジェネティクス, クロマチン,
T 細胞分化, 制御性 T 細胞, *Foxp3* 遺伝子

大阪大学 微生物病研究所
感染症学免疫学融合プログラム推進室

緒 言

エピジェネティック制御や転写制御等のゲノム機能の発現制御には, DNA のメチル化・DNA 結合蛋白質・機能性非コード RNA を含む RNA・他のゲノム DNA 領域との相互作用・ヒストン修飾などの諸因子が関わっていることが解明されつつあるが, その制御機構の詳細には不明の点が多い. あるゲノム領域が持つゲノム機能発現制御の分子機構を解明するためには, その領域でゲノム機能発現制御に関わる分子の総体の同定と機能解析が不可欠であるが, 従来, そのための技術は限られていた.

我々の研究グループは, こうした「遺伝子座特異的生化学的ゲノム機能解析」を行うため, 生体内のクロマチン構造を出来るだけ保持したまま特定のゲノム領域を単離する方法として, insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP) 法¹⁻⁴⁾と engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP (enChIP) 法⁵⁻⁸⁾とから構成される遺伝子座特異的 ChIP 法を開発した. 本研究では, 遺伝子座特異的 ChIP 法を用いて, ゲノム機能を担っている特定ゲノム領域を単離して, そこに結合している蛋白質・RNA・ゲノム DNA の網羅的な同定を行い, その制御機構の解明を目指した. ゲノム機能の例として, リンパ球分化を制御している転写因子の発現調節機構に着目し, リンパ球の中でも免疫制御に重要な役割を果たしている制御性 T 細胞 (T-reg) の分化を制御する転写因子をコードする *Foxp3* 遺伝子の発現調節機構を対象とした. こうした解析によって, リンパ球分化, ひいては細胞の分化とその維持の基本原理の解明を目指した.

方 法

iChIP 法の概要は以下の通りである (図 1 左).

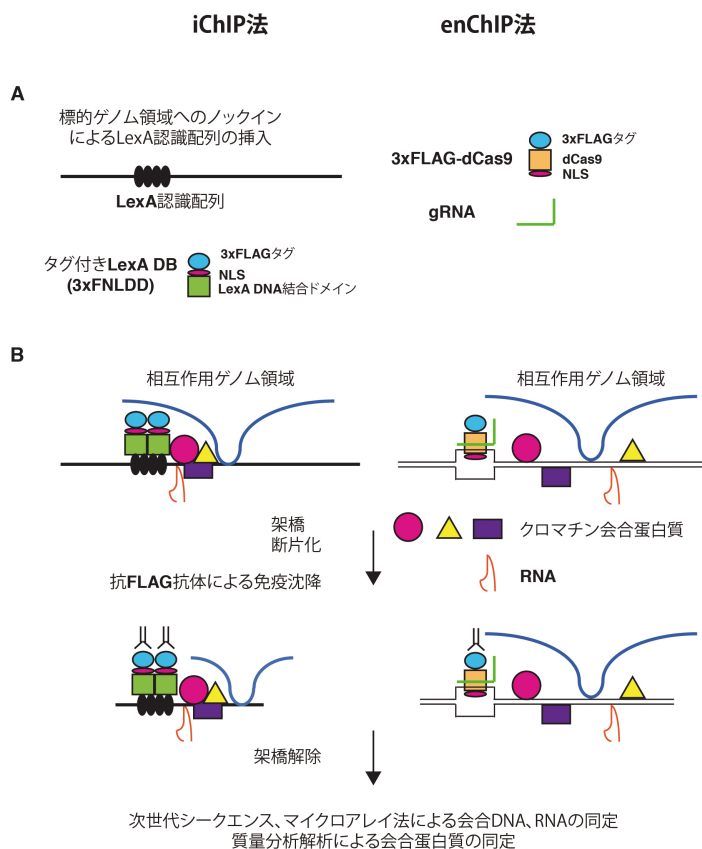


図1. 遺伝子座特異的 ChIP 法のスキーム.

遺伝子座特異的 ChIP 法は、iChIP 法 (図左) と enChIP 法 (図右) とから構成される.

(1) 外来性 DNA 結合蛋白質の認識配列を、解析対象ゲノム領域に挿入する. (2) その外来性 DNA 結合蛋白質の DNA 結合ドメイン (DB) にタグや核移行シグナルを融合させた蛋白質を発現させる. (3) 必要であれば、細胞を刺激し、ホルムアルデヒドや他のクロスリンカーを用いてクロスリンクする. (4) 細胞を破碎し、超音波処理等によって DNA を断片化する. (5) 外来性 DB を含む複合体を、タグに対する抗体による免疫沈降や他のアフィニティー精製によって単離する. (6) 単離された複合体は、解析対象ゲノム領域と相互作用している分子を保持している. クロスリンクを解除し、DNA、RNA、蛋白質や他の分子を精製して、その同定と解析を行う. 筆者らは、外来性 DNA 結合蛋白質及びその結合配列として、細菌の DNA 結合蛋白質である LexA 蛋白質とその結合エレメント (LexA-binding element: LexA BE) を用いている.

これに対して、enChIP 法では、標的 DNA 配列に結合する DNA 結合分子を作製し、これを用いて特定ゲノム領域を単離する (図1右). 従って、外来配列のゲノム中への挿入は必要無い. DNA 結合分子としては、zinc-finger 蛋白質、TAL 蛋白質、不活性型 Cas9 蛋白質を用いた CRISPR システム等が挙げられる.

遺伝子座特異的 ChIP 法を用いて、*Foxp3* 遺伝子の発現調節機構の解明を試みた.

結果

1. *Foxp3* 遺伝子転写調節を解析するための iChIP 解析用マウスの作製

まず、マウス *Foxp3* 遺伝子の転写開始点 (TSS) を決定した⁹⁾. 次に、ジーンターゲット法を用いて、*Foxp3* 遺伝子の TSS 近傍に LexA 結合配列を挿入したマウス ES 細胞を作製した (図2). この細胞を用いて、マウス個体を作製し、これと全身の細胞で Cre リコンビナーゼを発現している CAG-Cre マウスとの掛け合わせによって、ES 細胞の選択に用いたネオマイシン耐性遺伝子を除去した.

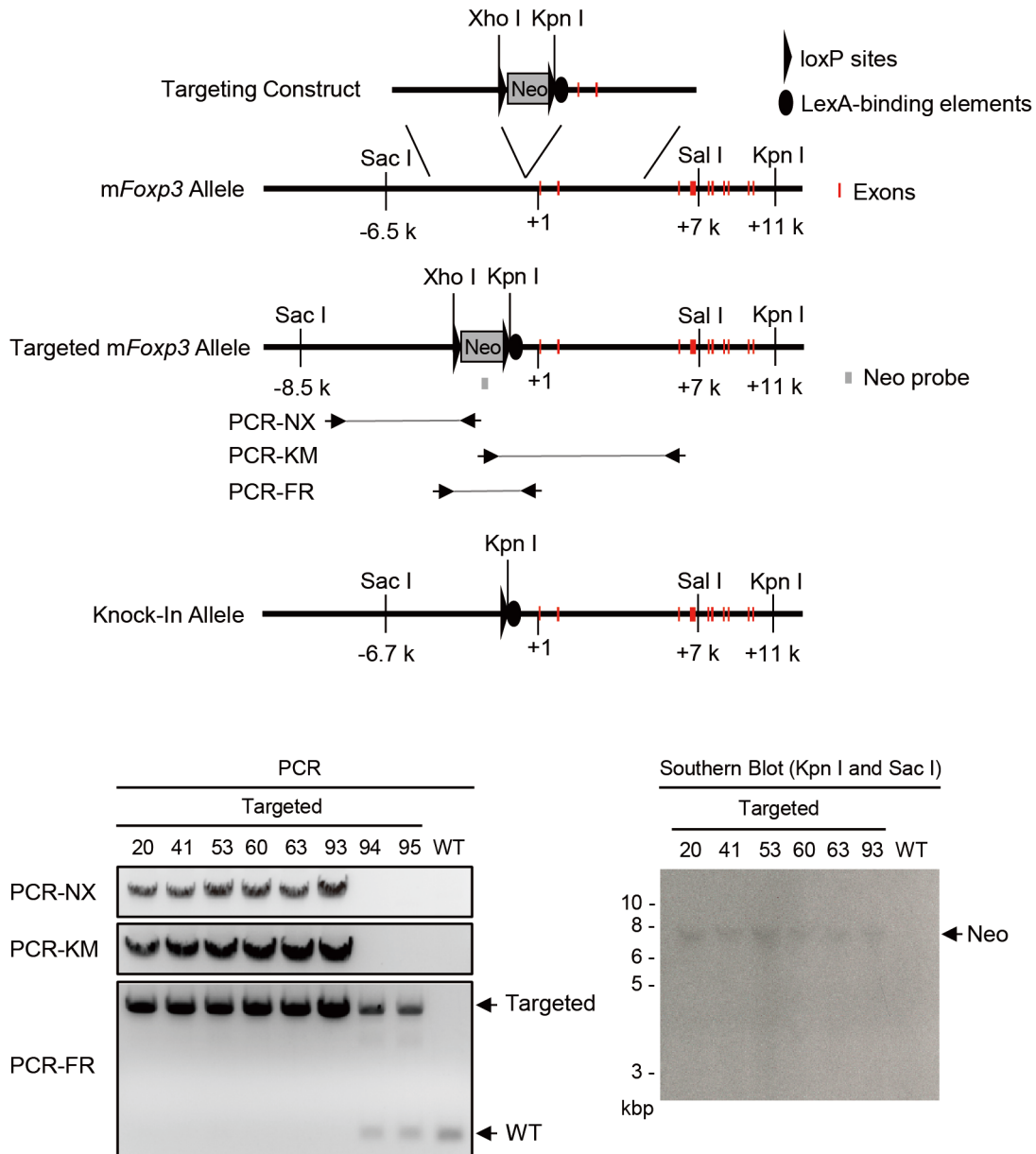


図2. *Foxp3* 遺伝子プロモーターに LexA BE を挿入したマウスの作製.

ジーンターゲティング法を用いて、*Foxp3* 遺伝子プロモーター領域に LexA BE を挿入したマウスを作製した。ES 細胞の選別に用いたネオマイシン耐性遺伝子は、CAG-Cre マウスとの交配により除去した。LexA BE の挿入を PCR 法とサザンブロット法を用いて確認した。

作製した *Foxp3* LexA-KI マウスは、特に異常を示さず、T-reg の数や各リンパ球分画の数及び割合も正常であった。

2. *in vitro* iChIP 法の開発

従来の iChIP 法では、タグ付き LexA 蛋白質を解析対象細胞内に発現させる必要があった。しかし、マウス個体由来の細胞を用いる場合には、①タグ付き LexA 蛋白質を解析対象細胞で発現しているトランスジェニックマウスを作製し、LexA BE をノックインしたマウスと交配させる、②マウス個体由来の細胞にレトロウイルスベクター等を用いて、タグ付き LexA 蛋白質を発現させる、といったステップが必要であった。しかし、①の場合には、マウスを交配することが必要なため時間や手間・費用がかかる、といった問題がある。②の場合には、細胞の種類によっては、レトロウイルスベクター等によるトランスダクションの効率が必ずしも高くないことから、1 回の実験で得られる iChIP

解析対象細胞数が少ないため、多くのマウスが必要である、といった問題があった。こうした問題点を解決するため、タグ付き LexA 蛋白質を解析対象細胞内に発現させる必要がない *in vitro* iChIP 法を開発した³⁾。

in vitro iChIP 法は、組換え蛋白質としてタグ付き LexA 蛋白質を作製し、これと、LexA BE を挿入してある細胞のクロマチンを断片化したものとを試験管内で混合し、組換えタグ付き LexA 蛋白質と結合したクロマチン断片を、タグに対するアフィニティー精製により単離する技術である (図 3)。

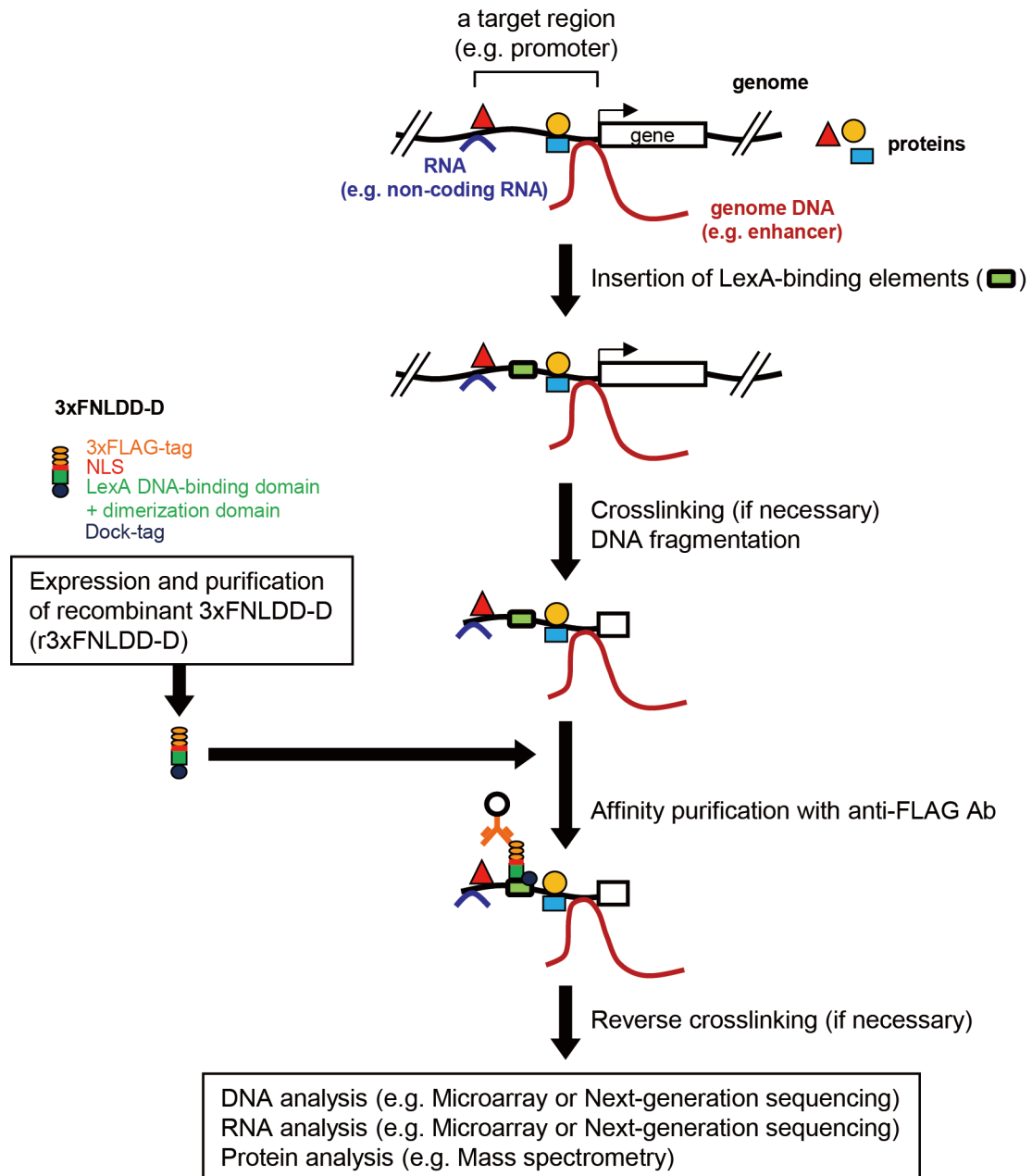


図 3. *in vitro* iChIP 法のスキーム。

in vitro iChIP 法では、組換え蛋白質としてタグ付き LexA 蛋白質を作製し、これと、LexA BE を挿入してある細胞のクロマチンを断片化したものとを試験管内で混合し、組換えタグ付き LexA 蛋白質と結合したクロマチン断片を、タグに対するアフィニティー精製により単離する。

3. *in vitro* iChIP 法による *Foxp3* 遺伝子プロモーター領域の単離

in vitro iChIP 法を用いて、*Foxp3* 遺伝子プロモーター領域を単離できるか否かを検討した。その結果、図 4 に示すように、特異性高く *Foxp3* 遺伝子プロモーター領域の単離ができることが示された。

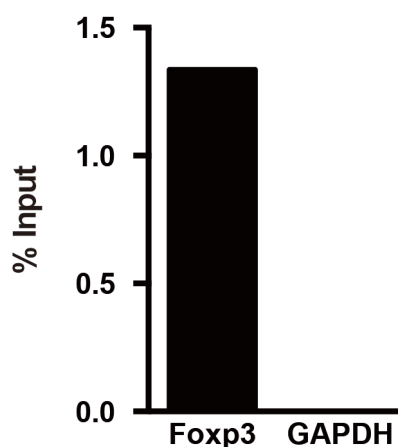


図 4. *in vitro* iChIP 法による *Foxp3* 遺伝子プロモーター領域の単離。

in vitro iChIP 法を用いて *Foxp3* 遺伝子プロモーター領域を単離した。*Foxp3* 遺伝子プロモーター領域が、特異的に単離されている。

4. *in vitro* iChIP 解析のための細胞の単離

上記 3 から、十分高い効率で *Foxp3* 遺伝子プロモーター領域の単離ができることが分かったので、7 週齢程度の対照の C57BL/6 マウスのオスと *Foxp3* LexA-KI マウスのオスから iChIP 解析に用いる T-reg の単離を行った。それぞれ、43 匹のマウスから合計 2×10^7 個の T-reg を単離し、ホルムアルデヒドで固定後、グリシンで中和して -80°C で保存した。

考 察

作製した *Foxp3* LexA-KI マウスは、特に異常を示さず、T-reg の数や各リンパ球分画の数及び割合も正常であったことから、*Foxp3* 遺伝子の発現制御に関わる分子とプロモーター領域との結合状態にも野生型マウスと大きな違いはないことが推測される。また、新たに開発した *in vitro* iChIP 法を使用するため、タグ付き LexA 蛋白質が *Foxp3* 遺伝子プロモーター領域に結合することによって引き起こされうる異常を避けることができる。従って、今回検出される相互作用は、野生型マウス由来の細胞でのものと大きな違いはないことが予想される。また、次のステップとして、野生型マウス由来細胞を用いて、*in vitro* iChIP 法によって検出された相互作用が野生型マウス由来細胞でも検出されることを確認する。

今後は、対照として用いるナイーブ CD4 T 細胞の単離を、野生型マウス及び *Foxp3* LexA-KI マウスから進めていく。細胞の準備が出来次第、*in vitro* iChIP 法による *Foxp3* 遺伝子プロモーター領域の単離、次世代シーケンス法による相互作用ゲノム領域の同定へと進む予定である。本プロジェクトによりもたらされる新しい知見は、遺伝子発現調節・細胞分化・細胞系列決定等の幅広い分野において強いインパクトを与えることが期待できる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学微生物病研究所の藤田敏次、北浦房子および湯野美由紀である。

文 献

- 1) Hoshino, A. & Fujii, H. : Insertional chromatin immunoprecipitation: a method for isolating specific genomic regions. *J. Biosci. Bioeng.*, **108** : 446-449, 2009.

- 2) Fujita, T. & Fujii, H. : Direct identification of insulator components by insertional chromatin immunoprecipitation. *PLoS One*, **6** : e26109, 2011.
- 3) 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.*, **15** : 26, 2014.
- 4) 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*, **10** : e0116579, 2015.
- 5) 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.*, **439** : 132-136, 2013.
- 6) 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.*, **3**: 3171, 2013.
- 7) 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*, **9** : e103084, 2014.
- 8) 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*, **10** : e0123387, 2015.
- 9) Fujita, T. & Fujii, H. : Transcription start sites and usage of the first exon of mouse Foxp3 gene. *Mol. Biol. Rep.*, **39** : 9613-9619, 2012.