

【目的】 血管内皮細胞への炎症刺激により、RNAポリメラーゼ II (Pol II) を抑制される遺伝子から誘導される遺伝子へ再配分する転写複合体仮説を検証する。そのため、本研究では、1. Pol IIのChIP-Seqを1分間隔で実施し、近接する遺伝子間でのPol IIの動員を比較し、2. captureHi-C法により経時的クロマチン構造との一貫性を確認し、3. enChIP法によりこの転写複合体の蛋白成分を同定する。

【方法】 1. TNF α 刺激後1分間隔でPol II抗体によるChIP-Seqのための検体調製：1分時間解像度で転写を再現性良く観察するため、ChIP 検体調整自動化装置を開発し、ChIP-Seqに適した各種活性型 Pol II抗体を樹立する。2. captureHi-Cによる時系列相互作用解析：全3C産物に対して、エンハンサーやプロモーター等観察すべき相互作用領域に設計された修飾RNAプローブをハイブリさせることによって検体を濃縮し、十分な経時変化のデータを取得することを目指した。3. enChIP法による転写複合体精製：enChIP法を用いて転写複合体を精製・濃縮する。蛋白成分は、ショットガンプロテオミクスによって同定する。

【結果】 1. TNF α 刺激後1分間隔でPol II抗体によるChIP-Seqのための検体調製：TNF α 刺激によって誘導されるSAMMD4A遺伝子領域に於いて刺激後10分頃からPol IIの波が出現した。また、刺激23分から27分の間CTDの3カ所がリン酸化されている活性型Pol IIの結合シグナルが一旦消失し、その後28分から再度出現した。2. captureHi-Cによる時系列相互作用解析：新たなシーケンス方法(Nova-Seq)の普及により大量のシーケンスを効率的に実施し、captureを行わずとも当初目指したデータを取得することが可能となった。3. enChIP法による転写複合体精製：SAMMD4A上第一イントロンにあるエンハンサー領域に設計したガイドRNA領域から精製されたDNAの配列を決定したところ、ケモカイン、接着因子などTNF α に応答して発現量が変動する遺伝子領域の配列が検出された。本報告書作成段階ではこの蛋白成分の同定を行っている。

1分間隔ChIP-Seqと30分間隔ChIA-PETを統合して時間解像度1分でクロマチン構造の変化を推定する数理モデル

