

クロマチン高次構造変換解析による転写調節領域の同定

福井大学医学部医学科生命情報科学講座分子生体情報学領域
水谷 哲也, 宮本 薫

はじめに

近年のクロマチン免疫沈降法の普及やゲノム解析技術の進歩（次世代高速シーケンサーや全ゲノムを網羅したマイクロアレイの普及）によって、転写因子の結合領域やクロマチン構造変換を司るヒストン修飾などをゲノムワイドに解析することが可能となった。目的の転写因子やヒストン修飾に対する良い抗体と均一な細胞さえあれば、ゲノム上における転写因子の結合領域やヒストン修飾を同定することが可能である。一方、実際にゲノムワイドに転写因子の結合領域を同定してみると、転写因子はきわめて多様な領域に結合しており、どの転写因子結合部位が標的遺伝子の転写を制御しているのか見当がつかない。実際、転写調節領域が標的遺伝子の近傍にあるとは限らず、 β -globin 遺伝子のように非常に離れた転写活性化領域が存在する場合 [1] や、極端な例では *Wsb1/Nf1* 遺伝子のように異なる染色体上に転写活性化領域が存在するケースも報告されている [2]。

こういった問題を解決できる方法の1つが Chromosome Conformation Capture assay (3C アッセイ) である。3C アッセイは、核内で3次的に近接する領域を検出できる [3] ため、標的遺伝子のプロモーター領域と核内で近接している領域を同定ことができ、標的遺伝子と（一次的に）離れた位置に存在する転写活性化領域を同定する有用なツールである。本稿では、3C アッセイやその応用例とともに筆者らが3C アッセイを用いて同定した *StAR* 遺伝子の新たな転写活性化領域について紹介する。

3C アッセイ

上述のように3C アッセイは核内で3次的に近接する領域を検出する方法である。3C アッセイの概略を図1に示す。その実験の原理および手順は以下のとおりである。

- (1) ホルムアルデヒドによる DNA-タンパク質およびタンパク質-タンパク質の固定
- (2) 任意の制限酵素による消化
- (3) 低濃度 DNA 下におけるライゲーション (DNA 濃

度を低くすることで、ランダムなライゲーションを抑える)

ライゲーション後、脱クロスリンク、DNA 精製を行い、PCR を用いてライゲーション効率を確認する。タンパク質の相互作用がある領域同士の DNA は物理的に近接するため、ライゲーション効率が高くなり、PCR 産物が検出される。

3C アッセイによるヒト *StAR* 遺伝子の新たな転写活性化領域の同定

筆者らは間葉系幹細胞に転写因子 SF-1 を導入することにより、効率よくステロイドホルモン産生細胞へ分化誘導させることに成功している [4]。そこで SF-1 導入幹細胞における SF-1 結合領域をゲノムワイドに明らかにするために、ChIP-on-Chip アッセイを行った。その結果、*StAR* 遺伝子近傍では転写開始点のみならず上流 3 kb、15 kb 付近において新たな SF-1 結合領域が同定さ

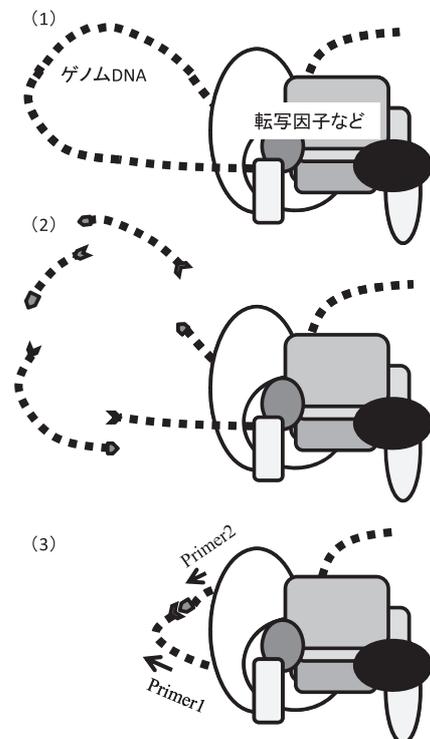


図1 3C アッセイの概略図

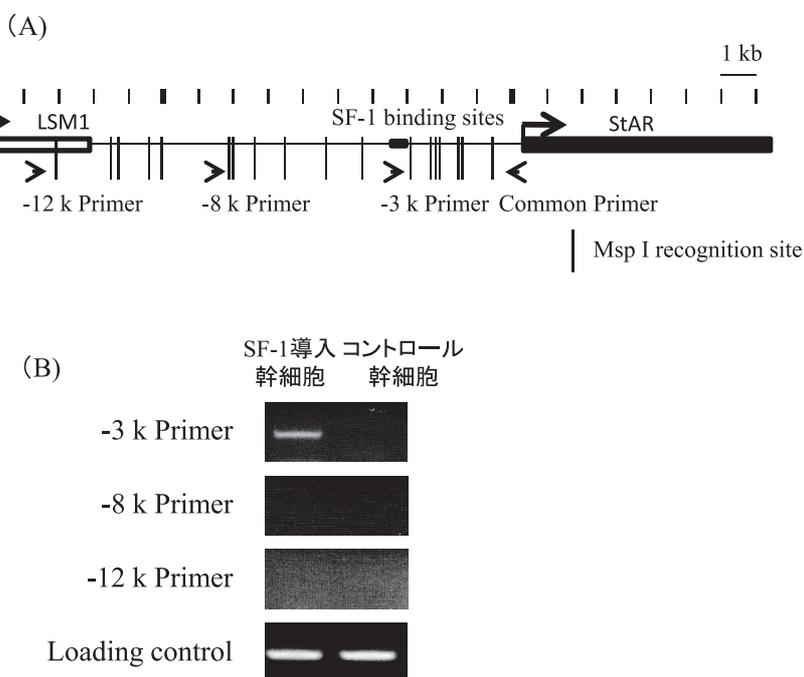


図2 ヒト *StAR* 遺伝子における SF-1 依存的なクロマチン構造変換
 (A) ヒト *StAR* 遺伝子近傍の概略図
 (B) コントロールまたは SF-1 導入幹細胞を用いた 3C アッセイ
 SF-1 導入幹細胞で、転写開始点 (Common Primer) と上流 3 kb (-3 k Primer) の
 プライマーを用いた場合のみ、PCR プロダクトが検出された

れた。そこでこれらの領域が *StAR* プロモーター領域との間でループを形成しているか否か、3C アッセイを用いて検討した。その結果、SF-1 導入幹細胞特異的にプロモーター領域と上流 3 kb の SF-1 結合領域との間でループ形成が認められた。しかしプロモーター領域と上流 15 kb の SF-1 結合領域を含む他の領域とでは、ループ形成は認められなかった (図 2)。この結果から、SF-1 導入幹細胞ではプロモーターと上流 3 kb の SF-1 結合領域との間で特異的にループが形成 (3 次元的に近接) され、*StAR* の転写が活性化されると考えられた [5]。

3C アッセイを応用した解析法

3C アッセイは核内で 3 次元的に近接する領域を検出する有用な方法であるが、特定の領域同士のみしか検出できないため、複雑な核内高次構造を解析するには困難なケースも考えられる。近年、3C アッセイを改良した 4C、5C、6C アッセイが開発され、多領域間の高次構造を検出する方法や未知の近接領域を同定する方法が報告されている [6]。またクロマチン免疫沈降法と組

み合わせることで転写因子やコファクター依存的な核内高次構造を検出する ChIP-3C や ChIA-PET 法も開発されており、核内高次構造変換解析が今後さらに発展していくものと考えられる [6]。

おわりに

近年、プロモーター領域近傍以外の転写活性化領域に関する報告が相次いでいる。高等生物が状況に応じて精巧な遺伝子発現調節を行うには、プロモーター領域以外が関与する発現調節が多く遺伝子に存在すると考えられる。今後 3C アッセイをはじめとした方法により、さまざまな遺伝子の新たな転写活性化領域が同定されると考えられる。しかしながら 3C アッセイは実験方法の性格上、シグナルノイズ比が低く、非特異的なバンドが検出されやすい傾向があり、アーティファクトによる結果を招きやすい要素を含んでいる。さまざまなアプローチと組み合わせることでそのリスクを軽減させ、可能であれば SF-1 [7, 8] や Sox9 [9] の転写活性化領域の同定のように最終的には *in vivo* でそれらを証明していく

ことが大切と思われる。

引用文献

1. Tolhuis B, Palstra RJ, Splinter E, Grosveld F, de Laat W (2002) Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell* 10, 1453-1465.
2. Ling JQ, Li T, Hu JF, Vu TH, Chen HL, Qiu XW, Cherry AM, Hoffman AR (2006) CTCF mediates interchromosomal colocalization between *Igf2/H19* and *Wsb1/Nf1*. *Science* 312, 269-272.
3. Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N (2002) Capturing chromosome conformation. *Science* 295, 1306-1311.
4. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K (2006) Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology* 147, 4104-4111.
5. Mizutani T, Yazawa T, Ju Y, Imamichi Y, Uesaka M, Inaoka Y, Matsuura K, Kamiki Y, Oki M, Umezawa A, Miyamoto K (2010) Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. *J Biol Chem* 285, 28240-28251.
6. Fullwood MJ, Ruan Y (2009) ChIP-based methods for the identification of long-range chromatin interactions. *J Cell Biochem* 107, 30-39.
7. Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K (2006) Two-step regulation of *Ad4BP/SF-1* gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by *Ad4BP/SF-1*. *Mol Cell Biol* 26, 4111-4121.
8. Shima Y, Zubair M, Komatsu T, Oka S, Yokoyama C, Tachibana T, Hjalt TA, Drouin J, Morohashi K (2008) Pituitary homeobox 2 regulates *adrenal4* binding protein/steroidogenic factor-1 gene transcription in the pituitary gonadotrope through interaction with the intronic enhancer. *Mol Endocrinol* 22, 1633-1646.
9. Sekido R, Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of *SRY* and *SF1* on a specific *Sox9* enhancer. *Nature* 453, 930-934.