

クロマチン免疫沈降法を用いた染色体遺伝子検査検出の試み

神崎, 秀嗣

Venture Laboratory, Kyoto Institute of Technology | Department of Cell Biology, Institute for Virus Research, Kyoto University | Department of Viral Oncology, Institute for Virus Research, Kyoto University

<https://hdl.handle.net/2324/25945>

出版情報：日本染色体遺伝子検査学会雑誌. 28 (1), pp.126-130, 2010. 日本染色体遺伝子検査学会
バージョン：
権利関係：



クロマチン免疫沈降法を用いた染色体遺伝子検査検出の試み

神崎秀嗣^{1,2,3,4}

Key words : ChIP assay, chromosomal abnormality, endoreplication, gene amplification, Polyomavirus

はじめに

我々はこれまで「染色体異常とがん化」について研究を進めてきた^{1,2,3,4}。染色体異常は癌化の原因なのか結果なのか議論のあるところである。「がんは染色体異常によって引き起こされる。」とDavid von Hausemann, Theodor Boveriは約1世紀前に考察した¹⁾。しかし同じがんでも染色体の異常（構造と数）がまちまちであり、永きにわたってこの仮説は顧みられることはなかった¹⁾。吉田富三は「がんには個性がある。」といった。その中に染色体の本数と構造の違いを見いだしていた¹⁾。これら染色体異常の原因には様々な原因が考えられるが、近年各種ウイルス感染によって引き起こされるという知見が蓄積し始めている^{5,6,7)}。我々はポリオマウイルス（Py）や酵母の染色体DNAの分子メカニズムの解明に従事してきた^{2,8,9,10)}。

Pyと酵母の研究経験と現在解析を進めてい

るショウジョウバエを例に染色体異常の初期反応について考察し、クロマチン免疫沈降法（chromatin immunoprecipitation assay: ChIP assay）の染色体異常初期段階の検出への適用法について紹介したい^{11,12,13)}。

染色体複製の初期反応

Jacob, BrennerとCuzinは大腸菌のプラスミドの複製から、染色体DNAの複製開始制御には特定のDNA配列（レプリケーター）と開始制御因子（イニシエーター）の相互作用が必要であるというReplicon仮説を提案した²⁾。これは各種ウイルスゲノムや高等真核生物でもほぼ正しいと分かった。我々が研究していたPyやSV40はがん遺伝子であり、DNAヘリカーゼでもある大型T抗原（Large T antigen: LT）がウイルスの染色体複製開始点にリクルートされDNA鎖が解け、開裂反応が開始する²⁾。一方真核生物である酵母やショウジョウバエ、哺乳類や古細菌はOrc（origin recognition complex）がイニシエーターと考えられているがヘリカーゼ活性など持たずlanding pad（言わば橋頭堡）として、Orc上に複製開始複合体を構築すべく様々な因子が会合して来て、細胞周期進行シグナルが伝えられ、染色体複製が開始していく²⁾。ではどのような細胞外増殖シグナルが細胞内

1 京都大学ウイルス研究所細胞生物学部門

2 京都大学ウイルス研究所がんウイルス研究部門

3 京都工芸繊維大学大学院ベンチャーラボラトリー

4 京都保健衛生専門学校臨床検査学科

所在地(4) 〒602-8155

京都市上京区千本通竹屋町東入主税町910

Tel : 075-801-2593 Fax : 075-723-5708

E-mail : hide.kohzaki@nifty.com

受付 : 2009年12月28日

に入り、どのようにこのゲノム複製装置に伝わるのだろうか？我々のPyゲノム複製の解析からPyはearlyのpromoter/enhancerが必要であることが明らかになっている^{2,8,10)} (図1)。実際そこに結合する転写因子AP1 (C-Jun, C-Fos) やRunx1 (PEBP2 (Polyoma virus enhancer binding protein2)/CBF (core binding factor)) はPyのゲノム複製を活性化し、その他の転写因子の結合部位を人工的に導入しても、その転写因子で活性化している^{2,8,10)}。転写因子は細胞外シグナルの核内への最終地点と考えると高等真核生物のゲノム複製でも転写因子が染色体ゲノム複製を調節していてもいいのではないだろうか²⁾。実際転写が活性な部位は複製開始点として機能しているという知見が蓄積している^{2,3)}。多くの場合、転写因子が原がん遺伝子産物であることを考えるとがん化を考える上でも意義深いと思われる²⁾。

Chromatin immunoprecipitation assay

ChIP assayはクロマチン結合性タンパク質の動向を検出する目的で多用されている^{11,12)}。細胞周期に依存してクロマチンに離合集散する因子やヒストンのアセチル化やリン酸化や転写因子の修飾状況も検出できる。我々も酵母染色体DNA複製因子Mcm complex (真核生物染色体複製のヘリカーゼ複合体と考えられている。)やLTのウイルスゲノム複製開始点への会合を検出した^{10,11)} (図1 B, C, D)。

特にLTはがん遺伝子であり一回のS期に無秩序な複製を引き起こす原動力であることから染色体異常を引き起こすがん化の初期反応を検出していると思われる。

がん化初期反応のモデル

驚くべきことにendoreplicationや遺伝子増幅は発生段階に広く必要とされている^{2,3,14,15)}。例えば巨核球ではendoplicationが起きている。

ショウジョウバエのOvaryでも発生に必要な形でendoreplicationや遺伝子増幅が4カ所だけで起こっている (図2)。実際我々はイニシエーターであるOrc1 (origin recognition complex 1) が遺伝子増幅される遺伝子座にリクルートされる現象を検出し得た¹⁶⁾。今後哺乳類細胞やマウスでの検出を夢見ている。

まとめ

我々は従来よりも簡便で約16倍高感度のChIP assayを開発し、特許を取得した^{11,12,13)}。近年様々なウイルス感染によって染色体異常が誘導されるという知見が蓄積し始めている^{4,5,6,7)}。我々の開発したChIP assayがウイルス感染による染色体異常や哺乳類の白血病などに見いだされる染色体異常の初期反応に適用できるよう感度を上げ、臨床現場において利用されるようキット化を進め、がんの治療、撲滅に役立てたいと考えている。

文 献

- 1) 神崎秀嗣：染色体異常が癌を導く。Mol.2004;41.
- 2) Kohzaki H, Murakami Y: Transcription factors and DNA replication origin selection. Bioessays. 2005 ; 27 : 1107-1116
- 3) 神崎秀嗣, 村上洋太：転写因子がDNA複製 開始点の位置を決める。生化学。2007 ; 79 : 458-462.
- 4) Kohzaki H, Ito K, Huang G et al. : Block of granulocytic 32Dcl3 cells by AML1/ETO (MTG8) but not by highly expressed Bcl-2. Oncogene. 1999;18:4055-4062.
- 5) Ricciardiello L, Baglioni M, Giovannini, C, et al. : Induction of instability human Polyomavirus JC virus. Cancer Res. 2003;63:7256-7262.
- 6) Velicescu M, Yu J, Herbert BS et al. : Aneuploidy and telomere are independent
- 7) Hodgson JG, Malek T, Bornstein S et al: Copy number aberrations in mouse breast tumors reveal loci and genes important in tumorigenic receptor tyrosine kinase signaling. Cancer Res. 2005;65 : 9695-9704.
- 8) Ito K, Asano M, Hughes P, et al: C-Jun stimulates origin-dependent DNA unwinding by polyomavirus

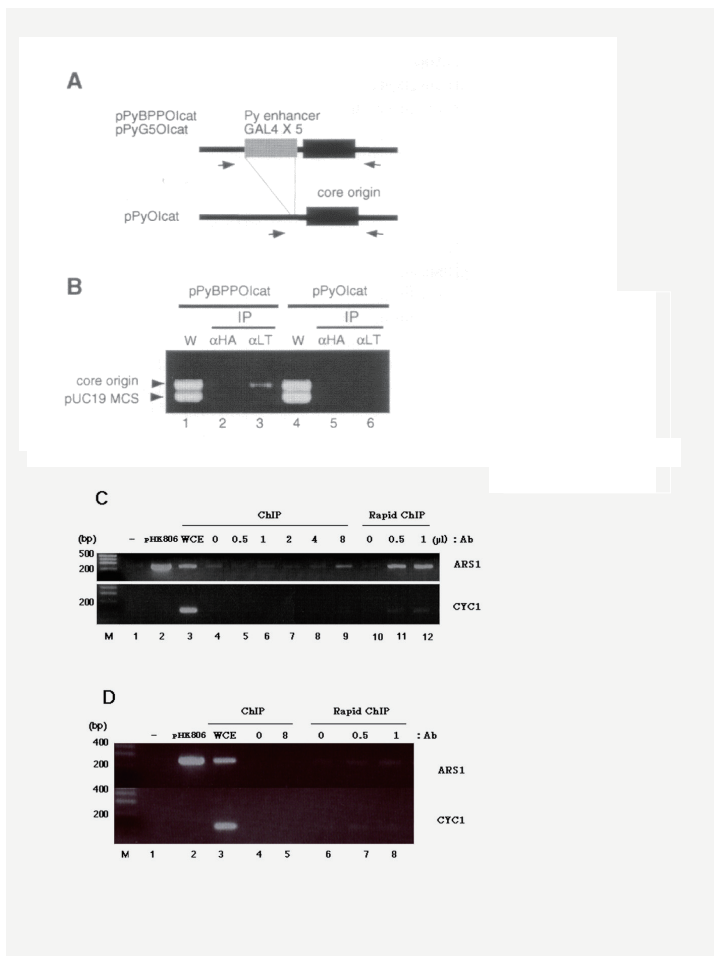


図1 ChIP assayはイニシエーターのレプリケーターへの会合を検出し得る。

(A) Pyの複製にはearly promoter/enhancerが必要である。

(B) Pyの複製開始点であるcore regionへのLTのリクルートにはearly promoter/enhancerである。

(C) (D) 真核生物の複製に必須なヘリカーゼと考えられているMcmはG2/M期(D)ではなくG1/S期(C)に出芽酵母の複製開始点ARS1にリクルートされる。

参考文献 9, 10の改変

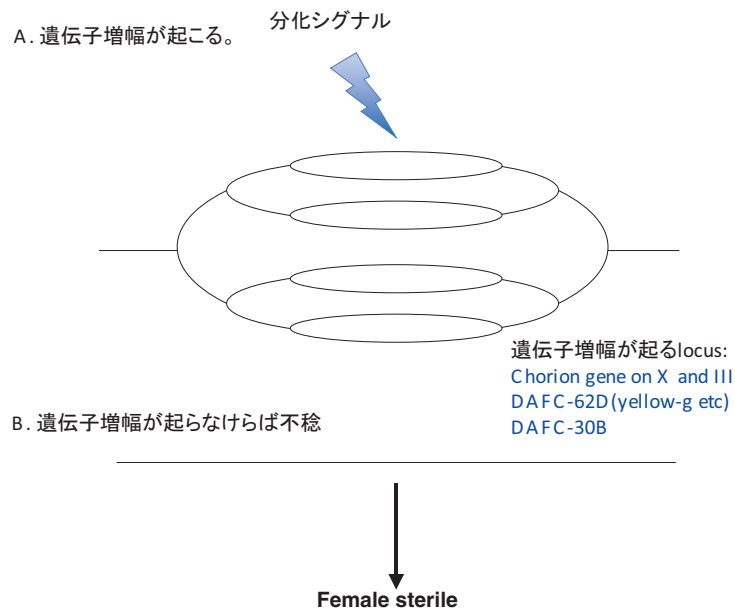


図2 Drosophila follicle cellでは発生分化依存的に4つのlocusで遺伝子増幅が起こる。

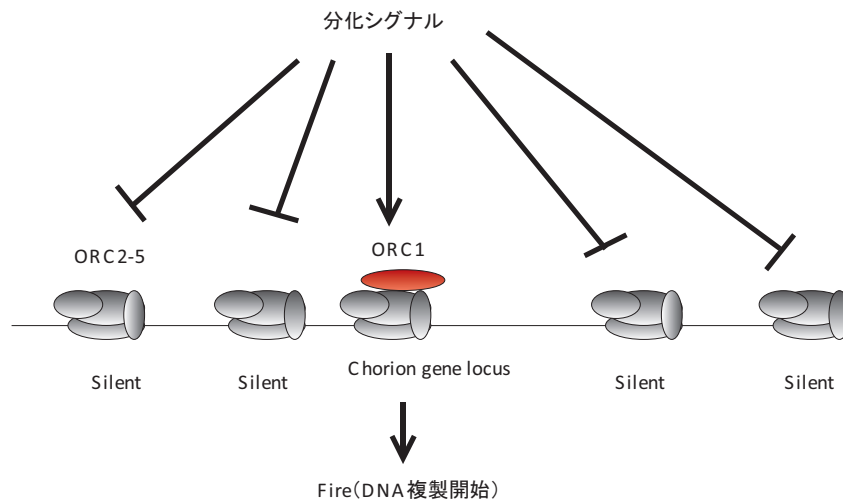


図3 分化シグナルがORC1に伝わり、複製machineryにloadingし、複製が開始して、遺伝子増幅が生じる。

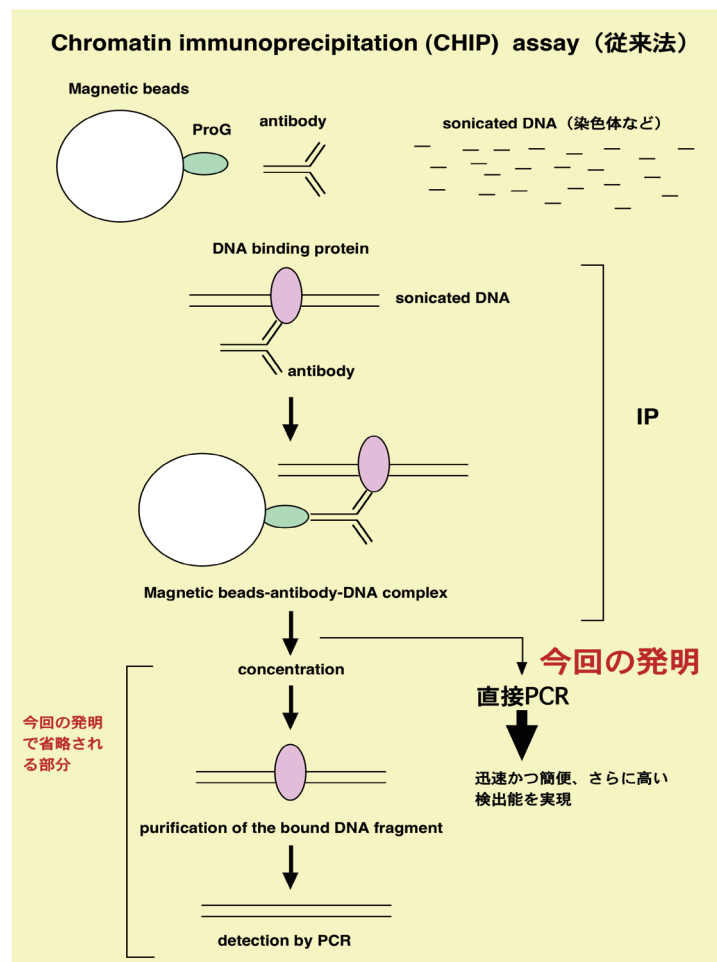


図4 従来のChIP assayは様々な操作が必要でサンプル数が多いと、大変時間がかかるが、今回の方法では数日時間短縮ができる。
参考文献11の改変

- large T antigen. EMBO J. 1996 ; 15 : 5636-5646.
- 9) Kohzaki H, Ito Y, Murakami Y.: Context-dependent modulation of the replication activity of *Saccharomyces cerevisiae* autonomously replicating sequences by transcription factors. Mol Cell Biol. 1999; 19: 7428-7435.
- 10) Murakami Y, Chen LF, Sanekata N, et al.: J. Cell. Biochem. Transcription factor Runx1 recruits the polyomavirus replication origin to replication factories. Journal of Cellular Biochemistry. 2007 ; 100 : 1313-1323.
- 11) Kohzaki, H, Murakami, Y. : Faster and easier chromatin immunoprecipitation assay with high sensitivity. Proteomics 2007 ; 7 : 10-14.
- 12) 神崎秀嗣:新しいクロマチン免疫沈降法の創出と応用. バイオテクノロジージャーナル, 2007 ; 7 : 208-211.
- 13) 神崎秀嗣, 独立行政法人科学技術振興機構:クロマチン免疫沈降用レジンおよびこれを利用したクロマチン免疫沈降法. 公開特許公報 (日本国特許庁 Japan Patent Office) (公開番号2005-156266号) 2005年6月16日
- 14) Calvi BR, Lilly MA, Spradling AC: Cell cycle control of chorion gene amplification. Genes & Dev. 1998 ; 12 : 734-744.
- 15) Claycomb JM, Benasutti M, Bosco G, et al : Gene Amplification as a developmental strategy : isolation of two developmental amplicons in *Drosophila*. Dev. Cell .2004 ; 6: 145-155.
- 16) Kohzaki H, Murakami Y. Ecdysone regulates gene amplification necessary for *Drosophila* development. 投稿中。

Detection of chromosomal abnormality and mutations by Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay.

Hidetsugu Kohzaki^{1, 2, 3, 4}

1 Department of Cell Biology, Institute for Virus Research, Kyoto University

2 Department of Viral Oncology, Institute for Virus Research, Kyoto University

3 Venture Laboratory, Kyoto Institute of Technology

4 Department of Medical Technology, Kyoto College of Health and Hygiene

Shuzei-cho 910, Senbon dori-takeyamachi, Kamigyo-ku, Kyoto, Japan 602-8155

Tel: +81-75-801-2593

Fax: +81-75-723-5708

E-mail: hide.kohzaki@nifty.com