

五十嵐 和彦

東北大学大学院医学系研究科・教授

定量的エピゲノム解析法の開発と細胞分化機構の解明

## §1. 研究実施体制

### (1)「東北大学」グループ

- ① 研究代表者:五十嵐和彦 (東北大学医学系研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・定量的 ChIP-Seq (Q-ChIP-Seq) 法の開発
  - ・エピゲノムマップ-転写因子結合マップ-発現プロファイルの統合解析によるドライバーエピゲノム同定
  - ・骨髄腫のエピゲノム比較

## § 2. 研究実施内容

### 定量的 ChIP-Seq (Q-ChIP-Seq) 法の開発

ChIP-Seq 技術は、免疫沈降した DNA のシーケンス反応を行い、ゲノム上にはり付いたタグ数をカウントすることでヒストン修飾量や転写因子結合量を判定する方法である。現行の方法では、全タグ数が同一であるという前提条件下ではじめて、サンプル間の比較が可能となるが、これは現実的には成立しない可能性がある。特に、細胞分化の際には、ヘテロクロマチン量やユークロマチン量が増加する可能性があり、このような場合、従来法を用いた比較は困難であると予想される。そこで、サンプル間でヒストン修飾総量や転写因子結合量を補正するために、マイクロアレイでよく使われるスパイクイン(内部標準)に相当する補正技術を開発する。

本プロジェクトで対象とする形質細胞は、ゲノムの多くがヘテロクロマチン化していること、そのヘテロクロマチン領域が核膜直下に密集して車軸状核を形成することが知られている。本年度は、まず、B リンパ球が形質細胞へ分化する際のヒストン修飾を定量的に比較することを行った。マウス脾臓 B リンパ球を精製し、CD40 リガンドとインターロイキン 4 を組み合わせて刺激し、形質細胞へ

の分化を誘導した。細胞表面マーカーの発現を指標に形質細胞をソートし、そのクロマチン分画を用いてウエスタンブロット解析を行った。抗体はヒストン H3K4 のジメチル、トリメチル、H3K9 のジメチル、トリメチルを用いた。この解析により、予想通り、これら修飾の総量は形質細胞分化とともに大きく変動することを見いだした。ウエスタンブロット法で修飾総量を定量してシークエンスタグ総数を補正する可能性を含め、次年度に検討したい。

#### エピゲノムマップ・転写因子結合マップ・発現プロファイルの統合解析によるドライバーエピゲノム同定

Bリンパ球を試験管内で活性化すると、その一部は形質細胞へ分化する。形質細胞分化に必須の Blimp-1 遺伝子を EGFP でマークしたリポーターマウスを用い、脾臓より Bリンパ球を採取し、LPS などで活性化する。経時的に EGFP 陽性細胞を回収し、発現プロファイリングを行うことを目指した。

しかし、野生型細胞では形質細胞分化効率がどうしても悪く、また、ソートすることで細胞状態が悪くなり質のよい RNA を準備できなかった。そこで、Bach2 ノックアウト B 細胞を CD40 リガンドとインターロイキン 4 で活性化し、3 日目には培養細胞集団の 5 割以上が形質細胞へと分化する系を確立した。これを用いて、0 日、1 日、3 日と遺伝子発現プロファイルの変化を野生型(一部だけ形質細胞に分化し、多くは活性化状態に留まる)と Bach2 ノックアウト B 細胞を用いて実施した。発現変動遺伝子を抽出すると、以下のパターンに大別できた。(1)発現量の時間変化が野生型と Bach2 ノックアウトで異なっている 243 遺伝子を、6 パターンに分類した。(2)野生型あるいは Bach2 ノックアウトで発現量の 10 倍以上の時間変化を示した遺伝子、野生型で 630 遺伝子、Bach2 ノックアウトで 645 遺伝子を同定し、それぞれ大きく 2 パターンに分類した。また、いくつかの遺伝子座がヘテロクロマチン化のモデル領域となる可能性を見いだした。

次年度は、これら変動遺伝子の中からクロマチン構造機能制御に関与することが想定される候補について機能解析を進める。また、ヒストン修飾マップとの統合も進める。