

組換え CRISPR リボヌクレオ蛋白質を利用した *in vitro* enChIP 法の開発

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 ゲノム生化学研究グループ
 藤田 敏次 助教 藤井 穂高 准教授

【お客様からのコメント】

組換えCRISPRリボヌクレオ蛋白質を利用した *in vitro* enChIP 法の開発を目指し、DNA切断活性の無い変異型Cas9 (dCas9) の発現・精製をProCube® サービスでお願いしました。160 kDa という高分子量にもかかわらず、高純度な精製蛋白質を準備していただき、本方法論を開発することができました。

ゲノム機能の分子機構の解明には、細胞内において解析対象とするゲノム領域に結合している分子を網羅的に同定することが理想的です。我々の研究室では、細胞から解析対象とするゲノム領域を遺伝子座特異的に単離し、当該ゲノム領域に結合している分子を網羅的に同定する方法として、遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法 (iChIP法およびenChIP法) を開発してきました。enChIP法は、ゲノム編集などで注目されているCRISPRなどの人工DNA結合分子を解析対象とするゲノム領域に結合させた後、当該分子をアフィニティー精製することで、解析対象ゲノム領域を単離する技術になります。質量分析法などと組み合わせることで、単離したゲノム領域に結合している分子を網羅的に同定することができます。今回、細胞内での人工DNA結合分子の発現を必要としない *in vitro* enChIP法の開発を進めました(図1)。

まず、ProCube®サービスを利用することで、dCas9 (N末3xFLAG-tag, C末Dock-tag付) を精製蛋白質として用意し(r3xFLAG-dCas9-D、図2)、化学合成したgRNAと共にCRISPRリボヌクレオ蛋白質を形成させました(図1)。次に、精製したゲノムDNAに対して、標的とする *IRF-1* 遺伝子座が単離できるかどうか評価したところ、当該ゲノム領域が高効率で単離できることが判明しました(図3A, B)。

さらに、細胞から調製したクロマチンを用いて同様の操作を行った場合でも、当該ゲノム領域を特異的に単離できることが判明しました(図3C)。以上の結果から、*in vitro* enChIP法は、特定DNAの精製や、解析対象ゲノム領域上に結合している分子の同定に利用できる可能性が考えられます。また、本技術によって、ゲノム機能解析がより迅速に進むことが期待されます。

参考文献 Hoshino and Fujii (2009) J Biosci Bioeng, 108(5):446-449 Fujita et al., (2013) Sci Rep, 3:3171
 Fujita and Fujii (2013) Biochem Biophys Res Commun, 439(1):132-136 Fujita et al., (2016) Genes Cells, 21:370-377

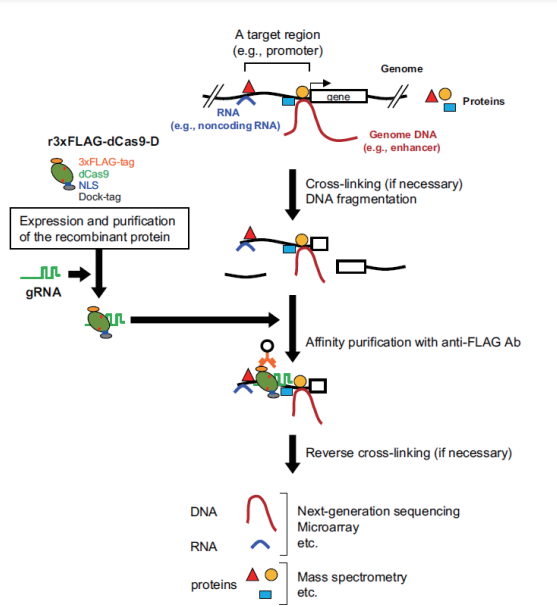


図1 組換えCRISPRリボヌクレオ蛋白質を利用した *in vitro* enChIP法による標的ゲノム領域の単離および解析

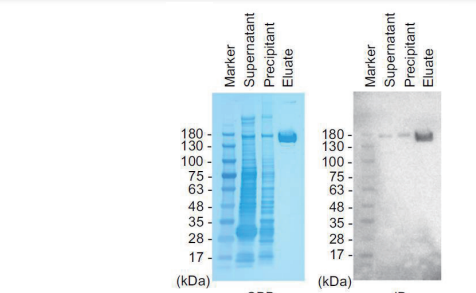


図2 r3xFLAG-dCas9-D蛋白質の精製

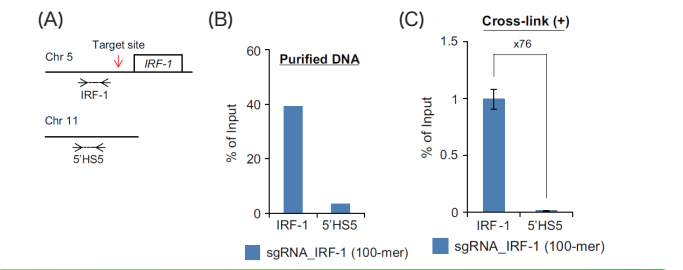


図3 *in vitro* enChIP法による標的ゲノム領域の単離。
*IRF-1*遺伝子座(A)を精製ゲノムDNA(B)あるいはクロマチン(C)から単離。

本事例で掲載している図表は藤田助教よりご提供いただきました

ProCube® カイコーバキュロウイルス発現系を用いたリコンビナントタンパク質生産サービス
 Harness the Power of Nature ProCube® についての詳細は... procube.sysmex.co.jp メールでのお問い合わせは... procube.japan@sysmex.co.jp

製造販売元
シスメックス株式会社
 本社 神戸市中央区臨海海岸通 1-5-1 〒651-0073
 研究開発センター 神戸市西区室谷 1-1-2 〒651-2241 Tel 078-991-2212 Fax 078-992-1082
 東京支社 東京都品川区大崎 1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557
www.sysmex.co.jp

ISO 9001:2008 Management System
 TÜV Rheinland CERTIFIED
 www.tuv.com ID 0910589004
 注：活動及びサイトの適用範囲は規格により異なります。
 詳細は www.tuv.com の ID 0910589004 を参照。
 Notes: Scopes of sites and activities vary depending on the standard.
 For details, refer to the ID 0910589004 at www.tuv.com