

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）「改良型 ChIP-seq 解析によるタンパクプロファイリング技術の高度化
（ChIP 技術の高度化）」
（英 語）Improving the protein profiling technique based on
modified ChIP-seq analysis: Improving ChIP technique

補助事業担当者 （日本語）東京工業大学科学技術創成研究院 教授 木村 宏
所属 役職 氏名：（英 語）Hiroshi Kimuar, Professor, Institute of Innovative Research,
Tokyo Institute of Technology

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

（日本語）
創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業における機能ゲノミクス解析に必要な支援と高度化を行った。

1. ChIP-seq 解析基盤技術提供

代表機関である東京大学分子細胞生物学研究所の白髭克彦教授と共同で、ChIP-seq の技術支援を行った。ChIP-seq の技術支援に関して、様々な研究機関に所属する研究者からの事前相談に乗った (10 件以上)。また、採択課題に対応するため、ヒストン H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3, H3K14ac, H3K27ac, H3K27me3, RNA polymerase II Ser2ph, RNA polymerase II Ser5ph の抗体の精製とクオリティチェックを行った後、依頼者及び代表機関に提供した (13 件)。

特に、徳島大学に関する支援では、ブロードな局在を示すヒストン修飾の局在解析に成功したことに加え、ヒストンメチル化酵素欠損細胞と脱メチル化酵素欠損細胞における分布の変化を明らかにした。

2. 抗体スクリーニング

1 万細胞の ChIP-seq に使用するため、概ね 10%以上の回収率を達成するための条件を検討した。反応バッファー中の SDS の濃度を通常の 1%から 0.5%に下げることによって、結合効率が上昇する場合があることが分かった。また、インプットの濃度を減少させることによって、回収効率が改善された。これらの条件検討および新規抗体の検討の結果、H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me2, H3K9me3, H3K14ac, H3K27ac, H3K27me3, H3K36me3, H4K20me1, RNA polymerase II Ser2ph, RNA polymerase II Ser5ph, RNA polymerase II K7me2 等、20 種類の主要なクロマチン修飾や RNA ポリメラーゼ II 修飾に関して、ChIP で 9%以上の回収率を達成する条件を確認でき、少数細胞へ適用できることが示された。

3. 極少数細胞からの ChIP-seq 法

100 細胞を用いた微量エピゲノム解析法の開発のために、新規技術の開発を行った。この方法（特許申請中）では、接着性の細胞を可溶化する前に抗体を反応させることで非特異的吸着を抑え、また、抗体が結合した領域の DNA を増幅することができる。そのため、100 細胞あるいはそれ以下の細胞数でのエピゲノム解析が可能であると考えられた。また、単一細胞レベルまで少数化できる可能性を示す結果も出ており、通常の ChIP に替わる方法として期待できた。

(英語)

We have provided technical supports for functional genomics analyses towards many researchers, and developed new techniques as following.

1. Support for ChIP-seq materials and techniques

In collaboration with Prof. Katsuhiko Shirahige, the leading PI of the project at the Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Tokyo University, we provided technical supports on ChIP seq analysis for small number of cells. We were consulted on the ChIP-seq support by more than ten researchers in various organizations. For approved projects, we provided total 13 antibodies, including H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3, H3K14ac, H3K27ac, H3K27me3, RNA polymerase II Ser2ph, RNA polymerase II Ser5ph, after purification and quality check.

Among the supports, a collaborative work with Tokushima University has been one of the most successful projects. We have been able to demonstrate the difference of a histone modification that broadly distributed on the genome in the wild type and enzyme-knockout cells, although the analysis of broadly distributed marks are generally difficult.

2. Screening the antibodies and ChIP conditions suitable for small scale ChIP-seq

For ChIP-seq using a relatively small number, such as 10,000, of cells, we screened various antibodies and reactions to achieve 10% input recovery, as previous analysis indicated such high recovery conditions are essential for small scale ChIP-seq. We found out that reducing SDS concentration from 1% (usual concentration) to 0.5% could improve the immunoprecipitation efficiency in some antibodies. Reducing the input material concentration also improved the efficiency. As a result, 20 different antibodies, including H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me2, H3K9me3, H3K14ac, H3K27ac, H3K27me3, H3K36me3, H4K20me1, RNA polymerase II Ser2ph, RNA polymerase II Ser5ph, RNA polymerase II K7me2, was able to recover the target chromatin regions more than 9% efficiency. These antibodies can be applied for small scale ChIP-seq.

3. Epigenome analysis from an extremely small number of cells.

We have developed a new method to reveal chromatin modification states from a much smaller number (such as 100) of cells. This method (under patent pending) uses immunoreaction before lysing adherent cells so that non-specific chromatin absorption can be avoided, and can amplify the genome regions close to antibody-binding sites. This method is promising for small scale epigenome analysis down to less than 100 cells.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 3 件、国際誌 6 件)

1. Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Sato Y. Visualizing posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. *Histochem Cell Biol.* 2015, 144(2):101-109.
2. Hayashi-Takanaka Y, Maehara K, Harada A, Umehara T, Yokoyama S, Obuse C, Ohkawa Y, Nozaki N, Kimura H. Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Chromosome Res.* 2015, 23(4):753-66.
3. Dias JD, Rito T, Torlai Triglia E, Kukalev A, Ferrai C, Chotalia M, Brookes E, Kimura H, Pombo A. Methylation of RNA polymerase II non-consensus Lysine residues marks early transcription in mammalian cells. *Elife.* 2015, 19;4.
4. Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep.* 2016, 6:24318.
5. Kujirai T, Horikoshi N, Sato K, Maehara K, Machida S, Osakabe A, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44: 6127-6141.

6. Urahama T, Harada A, Maehara K, Horikoshi N, Sato K, Sato Y, Shiraishi K, Sugino N, Osakabe A, Tachiwana H, Kagawa W, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka, H. Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics Chromatin*. 2016, 9: 2.
7. 田代 聡、木村 宏、ヌクレオソーム解析時代の幕開け、細胞工学 2016, 35, 66-69.
8. 木村 宏、エピゲノム解析手法の標準化：ヒストン修飾解析、実験医学増刊『エピゲノム研究：修飾の全体像の理解から先制・個別化医療へ』（金井弥栄 編集）2017, 34, 32-37.
9. 田代 聡、木村 宏、Nucleome 研究の世界動向、実験医学 2017, 35, 78-82.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Tracking posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. 口頭（招待講演）、Hiroshi Kimura、24th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus and 57th Symposium of the Society for Histochemistry、Schloss Wilhelminenberg, Vienna, Austria、2015/8/20、国外
2. 転写とクロマチン修飾と生細胞ダイナミクス（招待講演）、木村 宏、ATR-X シンポジウム（クロマチンリモデリング因子 ATRX タンパクの異常により発症するX連鎖 α セラセミア/精神遅滞症候群のアミノレブリン酸による治療法の開発研究班主催）、京都、2016/4/2、国内
3. Tracking post-translational modifications in living cells、Hiroshi Kimura、UK-Japan Symposium “From single molecules to cells and tissues”（JSPS-London, Leicester University 主催）Leicester, UK、2016/7/4-5、国外
4. Histone modification dynamics in living cell、Hiroshi Kimura、Colorado Chromatin Meeting 2016(Institute for Genome Architecture and Function 主催)、Fort Collins, Colorado, USA、2016/8/8、国外
5. 転写活性化におけるヒストン修飾の役割、木村 宏、遺伝研研究会『クロマチン・細胞核の動的構造変換とエピジェネティクス制御（オーガナイザー 中山潤一、前島一博）、三島、2016/10/27-28、国内
6. クロマチン修飾動態解析によるクレオーム研究、木村 宏、よこはま MNR 研究会主催 第 56 回ワークショップ、横浜、2017/3/3、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 東京工業大学すずかけ祭 研究室一般公開、木村 宏、蛍光顕微鏡で見る遺伝子と細胞核の働き、2015/5/16-17、国内
2. 渋谷学園幕張高校 模擬講義、木村 宏、「分子生物学入門：生命の設計図である DNA から遺伝子が選択される仕組み」、2015/11/21、国内
3. 東京工業大学すずかけ祭 研究室一般公開、木村 宏、蛍光顕微鏡で見る遺伝子と細胞核の働き、2016/5/14-15、国内

4. 東京工業大学生命理工学院 高校生のための夏休み特別講習会、木村 宏、生きた細胞のなかの DNA の働き、2016/7/28-29、国内

(4) 特許出願
公開希望なし