

中尾 光善

熊本大学 発生医学研究所・教授

高次エピゲノム機構の作動原理と医学的意義の解明

§1. 研究実施体制

(1)「中尾」グループ

- ① 研究代表者: 中尾 光善 (熊本大学発生医学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・高次エピゲノムの制御機構とその応用基盤の解析

(2)「谷」グループ

- ① 主たる共同研究者: 谷 時雄 (熊本大学自然科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・核内ドメインの形成機構とその制御因子の解析

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(1)「中尾」グループ

高次エピゲノムの時空間的な作動原理を明らかにし、細胞状態を客観的に理解する計測モデルを提示することが本研究の全体概要である。具体的には、3次元のクロマチン・ループの形成、遺伝子のエンハンサー、プロモーター、インスレーターとの相互作用、メチル化 DNA を介したヘテロクロマチンの形成などを解析する。また、核内構造体と転写ファクトリーについては、画像解析とパターン認識のソフトウェアを組み合わせた形態認識・計測・分類法を確立する。平成23年度は、下記の研究内容について実施した。

1) 3次元のクロマチン・ループ形成の解析

組織型の異なる約 10 種類の細胞株の ChIP-Seq/Chip 解析により、CTCF/コヒーシン等のゲノ

ムワイドの集積部位のデータを参照して、細胞核内でのゲノム部位の相互作用を同定する **chromosome conformation capture (3C)** 解析を行う。現在までに、①上記のタンパク質はヒトゲノム上に 10,000 個以上の共有部位を認めるが、単独の集積部位や組合せの異なる集積部位がある、②集積部位は遺伝子のプロモーター近傍、遺伝子のボディ、遺伝子間などに位置する、③エンハンサー遮断、転写のサイレンサー、クロマチン・ループ形成のいずれか一つまたは組合せで働く、④ループ形成に関わる集積部位のペアリングに特異性がある、⑤特定の遺伝子におけるループ形成は細胞種やその状況によって変化する、などの知見を得ており、これらの結果について検証を進めた。ヒト疾患に関連する遺伝子クラスター制御について、炎症性サイトカイン **TNF/LT** 遺伝子座、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 **INK4/ARF** 遺伝子座における **CTCF** 依存性の高次エピゲノム解析を実施した。3C 解析を用いて、**TNF/LT** 遺伝子座 (**TNF/LT α /LT β**) では、炎症応答時のエンハンサー、プロモーター、インスレーターの相互作用の動態と遺伝子発現調節について実証した¹⁾。さらに、**INK4/ARF** 遺伝子座 (**p15/ARF/p16**) では、細胞老化時にサイレンサーとインスレーターの相互作用の減弱、**INK4** 遺伝子の発現誘導について実証した²⁾。この研究成果を基に、高次エピゲノムのモデル化を進める予定である。

2) 核内ドメインの形成と機能の解析

核内構造因子に対する抗体や DNA 標識プローブを用いた免疫染色法および **FISH** 法を各種の細胞株で行い、そのイメージを **Celaview/Cellomics** および **Wnd-charm** のソフトウェアを用いて形態計測するシステムを準備した。また、核細胞質輸送に関わる **RANBP2** が **SR** スプライシング因子の細胞内分布、とくに核スペckルへの局在に重要な役割を果たすことを実証した³⁾。

3) 高次エピゲノムの制御因子の探索と解析

RNA 干渉用の **siRNA** ライブラリーを用いて、上記の核内ドメインの形成に影響を与える因子を探索する予備的な実験を行った。免疫染色法による核内構造体形成、**FISH** 法による核内遺伝子配置の解析には、上記のソフトウェアを組み合わせたハイスループット顕微鏡解析および形態計測を適用し、画像の自動解析によって効率化を進める予定である。

(2)「谷」グループ

生体内に存在するタンパク質の機能を、低分子化合物により制御及び解析する、いわゆる「ケミカルバイオロジー」の手法を核内ドメインの解析に応用し、高次エピゲノムの時空間的な制御の解明を目指す。高次エピゲノム制御において重要な核内ドメインである核スペckルと **Polycomb body** に焦点をあて、これらの形成を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニングを開始した。

1) 核内ドメインの形成と機能の解析

核内ドメインの形成に影響を与える低分子化合物を、放線菌培養上清ライブラリーから分離している。現在までに、核スペckルの肥大化/分散化、**PML body** の形成促進、及び **Polycomb body** の消失を引き起こす化合物がそれぞれ得られた。これらの化合物について更に検証を行い、再現性、濃度依存性、処理時間による経時変化に関するデータを取得した。

また、これらの低分子化合物処理による核内ドメインの形成阻害が、エピゲノムの状態や遺伝子

発現の制御に与える影響を解析するため、トリメチル H3K9 や H3K27 などのヒストン修飾に対する抗体染色を行い、核スペckルの肥大化を惹起する化合物 Aclarubicin が、核内のヒストン修飾パターンを変化させることを見いだした。

2) 高次エピゲノムの制御因子と作用化合物の探索と解析

核スペckルを変化させる化合物については、既に化合物ライブラリー及び多様な二次代謝化合物が含まれる放線菌の培養上清ライブラリーを用いたスクリーニングを進めている。今までに約 3,500 種類の放線菌培養上清サンプルをスクリーニングし、核スペckルの形成に影響を与える複数の化合物を同定した。平成 23 年度では、更に 500 種類の放線菌培養上清サンプルについて分与を受けスクリーニングに着手した。また、カテキン類やレスベラトロール類などの植物性化合物 (phytochemicals) ライブラリーから主要化合物 20 種類を入手し、核スペckルの形成阻害を指標にスクリーニングしたところ、3 種類の植物性化合物に核スペckルの球状化などを引き起こす活性があることを見いだした。今後、これらの植物性化合物が遺伝子発現やエピゲノムへ与える影響を解析する予定である。

高次エピゲノム制御の三次構造体として重要な Polycomb body について、過集積・分散・異所的形成など、構造体形成に影響を与える化合物のスクリーニングを行うための条件検討を行った。Polycomb body に局在する Bmi1 に対する抗体染色で形成阻害化合物のスクリーニングを行う至適条件を確立した。今後、放線菌培養上清ライブラリー、化合物ライブラリー、及び植物性化合物ライブラリーを用いて大規模にスクリーニングを開始する予定である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. T. Watanabe, K. Ishihara, A. Hirose, S. Watanabe, S. Hino, H. Ojima, Y. Kanai, Y. Sasaki, and M. Nakao. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in human tumor necrosis factor/lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. **Mol. Cell. Biol.** 32: 1529-1541, 2012.
2. A. Hirose, K. Ishihara, K. Tokunaga, T. Watanabe, N. Saitoh, T. Chandra, M. Narita, M. Shinohara, and M. Nakao. Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells. **Ageing Cell** (in press). (DOI:10.1111/j.1474-9726.2012.00809.x.)
3. N. Saitoh, C. Sakamoto, M. Hagiwara, L.T. Agredano-Moreno, L.F. Jiménez-García, and M. Nakao. The distribution of phosphorylated SR proteins and alternative splicing are regulated by RANBP2. **Mol. Biol. Cell** 23: 1115-1128, 2012.

4. Y. Xi, S. Watanabe, Y. Hino, C. Sakamoto, Y. Nakatsu, S. Okada, and M. Nakao. Hmgal is differentially expressed and mediates silencing of the Cd4/Cd8 loci in T cell lineages and leukemic cells. **Cancer Sci.** 103: 439-447, 2012.
(DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02159.x.)
5. A. Fournier, N. Sasai, M. Nakao and P.A. Defossez. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. **Brief Funct. Genomics** (in press).
6. M. Taura, M.A. Suico, K. Koyama, K. Komatsu, R. Miyakita, C. Matsumoto, E. Kudo, R. Kariya, H. Goto, S. Kitajima, C. Takahashi, T. Shuto, M. Nakao, S. Okada, and H. Kai. Rb/E2F1 regulate innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells. **Mol. Cell. Biol.** (in press).