

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 23 年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

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などを解析する。また、核内構造体、転写ファクトリーとヘテロクロマチンの形成については、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 24 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) 解析を行った。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、などの知見を得ている。

ヒト疾患関連の遺伝子クラスターに焦点を絞って、解析を進めた。具体的には、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 INK4/ARF 遺伝子座、炎症性サイトカイン TNF/LT 遺伝子座における CTCF 依存性の高次エピゲノム解析を報告した。3C 解析を用いて、INK4/ARF 遺伝子座 (p15/ARF/p16) では、線維芽細胞の老化時に、CTCF の発現低下によるクロマチン・ループ形成の解除と転写抑制能の減少がおこり、INK4 (p15/p16) 遺伝子が発現誘導されることが判明した¹⁾。また、炎症刺激を受けた肝癌細胞の TNF/LT 遺伝子座 (TNF/LT・LT・) では、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が動的に変化することで、この 3 遺伝子が経時的に発現誘導がおこることを実証した²⁾。このように、高次エピゲノムは、細胞状態に固有の特徴をもつことが分かった。これらの成果を基に、ホメオボックス転写因子 HOXA、エストロゲン受容体 ESR1 などの遺伝子座の高次エピゲノムの解析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、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ほぼ構築した。また、正常細胞と癌細胞、多能性幹細胞において、とくに核小体と PML ボディの新たな形態と機能を発見したので、その解析を進めている。

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、核小体の形成に影響を与える因子を探索する実験を行い、約 20 種の分子が同定されたので、解析を進めている。免疫染色法による核小体の形成、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と形態計測を適用して、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機構解明を進めている。24 年度では、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ックルと Polycomb body に焦点をあて、これら構造体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と解析を行った。

1) 核内ドメインの形成と機能の解析

現在までの解析により放線菌培養上清ライブラリーから分離した核スペックル形成に影響を与

える低分子化合物トヨカマイシンとツベルシジンについて、遺伝子発現制御への影響を解析した。トヨカマイシンは核スペックルの肥大化(スプライシング因子の集積)を、ツベルシジンは核スペックルの分散化(スプライシング因子の分散)を引き起こし、同時にClk遺伝子における選択的スプライシングを変化させた。エキソンアレイ解析を行い、ゲノムスケールでこれら二種類の化合物処理によって選択的スプライシングが影響を受ける遺伝子群を同定した。更に、影響をうけるエキソンやイントロンの配列解析を行い、mRNA前駆体におけるスプライシング因子の結合配列分布と、選択的スプライシング変化の間に相関がある可能性を見いだした。核スペックルがスプライシング因子の核内における濃度調節機能を持つ可能性が示唆された。今後ミニ遺伝子の作成等を介して、核スペックルの変化と選択的スプライシングによる遺伝子発現制御の関係を明らかにする予定である。

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

核スペックルを変化させる新たな化合物を分離するため、多様な二次代謝化合物が含まれる放線菌の培養上清約1,500サンプルをスクリーニングし、核スペックル形成に影響を与える25種類の上清サンプルを新規に同定した。それらのいくつかは、mRNAの核から細胞質への輸送も同時に阻害することが示された。今後、上清サンプルに含まれる活性化合物の同定と、得られた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。

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放線菌培養上清ライブラリーを用いて行った。2,156種類の上清サンプルについて、Polycomb bodyに局在するBmi1に対する抗体染色で可視化スクリーニングを行ったところ、Polycomb bodyを分散化させる33種類の上清サンプルが分離された。それらのサンプルは、Bmi1が核内に分散するもの、核小体周辺領域に集積するもの、核内に小さなドット状構造体として分散化するものなど、様々な局在変化を示した。今後、活性化合物の同定を行い、Polycomb body形成とクロマチン修飾による遺伝子発現抑制の関連やその作用機構の解明を行う予定である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. A. Hirosue, 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. **Aging Cell** 11: 553-556, 2012.
2. T. Watanabe, K. Ishihara, A. Hirosue, 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.

3. 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** 11: 251-264, 2012.

4. 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.** 32: 1581-1590, 2012.

(3-2) 知財出願

① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)