

「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

H25 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. 研究実施の概要

細胞核内では、ゲノムの DNA、転写物としての RNA、多くのタンパク質が協働して、立体的な構造体(クロマチンとよぶ)を形成している。その結果、ゲノム上の遺伝子機能は適切に調節されている。この機能的な構造体を「高次エピゲノム」と名付けて、その時空間的な制御機構および作動原理をモデル化し、細胞状態(正常細胞、老化細胞、幹細胞、癌細胞)に固有の高次エピゲノムを同定する技術開発につなげることが、本研究で目指す全体概要である。具体的には、3次元のクロマチン・ループの形成、遺伝子のプロモーター、エンハンサー、インスレーター(エピゲノムの境界)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(転写が活性なところ)とヘテロクロマチン(転写が不活性なところ)の形成について、自動画像取得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・分類法の効率化を目指す。

中尾グループでは、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。ヒト疾患関連の遺伝子クラスターに焦点を絞り、細胞老化に関わるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 INK4/ARF 遺伝子座 (p15/ARF/p16)、炎症性サイトカイン TNF/LT 遺伝子座における高次エピゲノムを明らかにした。さらに、乳癌の発生・悪性化に関わるエストロゲン受容体 ESR1 遺伝子座の高次エピゲノムの解析を進めている。これらの結果、高次エピゲノムが細胞状態を特徴づけることが分かった。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・FISH 法を行い、そのイメージを Cellomics と wnd-charm のソフトウェアを用いて形態計測するシステムを構築した。とくに核小体および PML ボディの新たな形態を見だし、その解析を進めた。3)高次エピゲノムの制御因子の探索と解析 約 1,000 種の核内タンパク質をそれぞれ阻害する siRNA ライブラリーを用いて、核小体の形成に影響を与える新規因子を探索し、約 10 種の分子を同定した。免疫染色法による核小体の形態解析には、上記のソフトウェアとハイスループット顕微鏡を組み合わせで行った。

谷グループでは、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 (PcG) body に焦点をあて、これら構造体の形成を阻害する化合物のスクリーニングと得られた化合物の作用機構に関する解析を行った。その結果、核スペックルを分散化する低分子化合物として同定したツベルシジンが、核スペックルに局在する MALAT1 non-coding RNA の分解を介して核スペックルを構成するスプライシング因子の分散と選択的 pre-mRNA スプライシングの変化を惹起していることを明らかにした。また、エクソンアレイを用いた網羅的解析を行い、ヒト全遺伝子の中からツベルシジン処理によって選択的スプライシングが影響を受ける 16 種類の遺伝子を同定した。更に、ミニ遺伝子を用いた解析により、ツベルシジンの作用に関わる mRNA 上のシスエレメント配列を同定した。また、高次エピゲノム制御の三次構造体として重要な PcG body の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 5,396 サンプルについて実施し、PcG body 形成阻害活性を示す 80 種類の上清サンプルを分離した。今後、活性化合物の同定を行い、PcG body 形成と遺伝子発現制御の関連及び作用機構の解明を行う。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

- 1 Sasai N, Saitoh N, Saitoh H, and Nakao M. The transcriptional cofactor MCAF1/ATF7IP is involved in histone gene expression and cellular senescence. *Plos One* 87: e68478, 2013.
- 2 Hino S, Nagaoka K, and Nakao M. Metabolism-epigenome crosstalk in physiology and diseases. *J. Hum. Genet. (Special Section on Epigenomics: biological understanding and clinical application)* 58: 410-415, 2013.
- 3 Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Sakamaki K, Nakao M, and Baba H. LINE-1 hypomethylation, DNA copy number alterations, and CDK6 amplification in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2014 (doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1645)
- 4 Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Morita M, Nakao M, and Baba H. IGF2 DMR0 methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2014 (doi: 10.1245/s10434-013-3414-7)
- 5 Kanda S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Horiuchi T, Sato Y, Hino S, Suzuki Y, Sander M, Sugano S, Nakao M, and Nishinakamura R. Sall1 co-operates with Six2 to actively maintain nephron progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014 (in press)
- 6 Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang C-Y, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung B-C, and Morohashi K. Glycolytic genes as the targets of a nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Nature Commun.* 2014 (in press)
- 7 Kurogi Y, Matsuo Y, Mihara Y, Yagi H, Shigaki-Miyamoto K, Toyota S, Azuma Y, Igarashi M, and Tani T. Identification of a chemical inhibitor for nuclear speckle formation: Implications for the functions of nuclear speckles in regulation of alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014 (in press)
- 8 Ideue T, Cho Y, Nishimura K, and Tani T. Involvement of satellite I non-coding RNA in regulation of chromosome segregation. *Genes Cells* 2014 (in press)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 25 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内1件)