

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20710150
 研究課題名（和文）哺乳動物細胞における翻訳後修飾を受けた転写制御因子結合部位の網羅的解析法の確立
 研究課題名（英文）Establishment of genome-wide analysis of post-translational modified proteins binding sites in mammalian cells
 研究代表者
 窪崎 敦隆 (Kubosaki Atsutaka)
 独立行政法人理化学研究所・LSA システム構築ユニット・研究員
 研究者番号：30425673

研究成果の概要（和文）：

ユビキチン様蛋白質 ISG15 の発現を阻害した THP-1 細胞を PMA で単球様細胞へ分化を誘導すると、48 時間で多くの死細胞が出現することを見いだした。ISG15 遺伝子のプロモーター領域に IFN 刺激応答配列があること、THP-1 細胞で IRF8 の発現が有為に高いことから、ISG15 遺伝子発現に IRF8 の関与が考えられた。IRF8 発現阻害時の発現網羅解析および IRF8 に対する ChIP-chip 解析を行った結果、IRF8 が ISG15 や 84 種類の様々な遺伝子の発現を直接制御していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

ISG15, an ubiquitin-like molecule, knockdown THP-1 myelomonocytic leukemia cells were induced cell death following PMA stimulation. ISG15 gene promoter region contains an interferon response element. Since interferon regulatory factor 8 (IRF8) is a transcription factor expressed predominantly in THP-1 cells, IRF8 was thought to play a role of gene regulation of ISG15. To find the functional direct target genes of IRF8, the gene expression profiles of siRNA knockdown samples and genome-wide binding locations by ChIP-chip were analyzed in THP-1 cells. Consequently, ISG15 and other 84 genes were identified as functional direct targets of IRF8.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学 ・基礎ゲノム科学

キーワード：(1) ChIP-chip (2) 転写因子 (3) ユビキチン様蛋白質 (4) IRF8 (5) IFN 刺激応答配列 (6) ISG15

1. 研究開始当初の背景

これまで遺伝子の発現調整を理解する目的で、転写開始点の情報からプロモーター領域を同定し、配列情報を元に結合する転写制御因子を類推したり、プロモーターアッセイやゲルシフトアッセイなどの実験法を用いて、実際の転写制御因子の結合を確認したりする研究方法が用いられてきた。しかし、これらの方法は転写制御因子の転写調節を総合的に解析するには、網羅性に欠ける問題があった。近年、クロマチン免疫沈降法で得たDNA断片をタイリングアレイで解析するChIP-chip法が開発された。

研究代表者は、哺乳動物細胞の転写調節の網羅的解析にChIP-chip法が有効であると考え、同僚と共に実験系の構築に努力してきた。本研究開始前までに再現性の高い実験結果を得られるようになり、その実績から研究代表者は、文部科学省ゲノムネットワークプロジェクトへ様々な転写制御因子や修飾ヒストンの結合部位を明らかにするChIP-chipデータを提供することで貢献していた。さらに、研究代表者が所属する研究室が主催したThe Functional Annotation of the Mammalian Genome (FANTOM4)では、ヒト単芽球様細胞株THP-1細胞のホルポールエステルによる細胞分化を実験モデルとして、転写制御ネットワークの解明を行っていた。

2. 研究の目的

哺乳動物細胞における翻訳後修飾を受けた転写制御因子結合部位を考える上で重要な基礎データを得る目的で、翻訳後修飾に関わる分子の発現および転写制御について検討することにした。数多くの蛋白質翻訳後修飾が報告されているが、本研究では、転写制御との関わりが指摘されているユビキチン様蛋白質 (small ubiquitin-like modifier)のうち、SUMO1・SUMO2・SUMO3・SUMO4・NEDD8・ISG15を選んだ。これらの分子が、ヒト単芽球様細胞株THP-1細胞のホルポールエステルによる細胞分化時に、どのような発現変動をするのか、また siRNA による発現抑制時にTHP-1細胞は、どのような表現型を示すのかを検証した。

その結果をもとに、THP-1細胞の分化誘導時に重要なユビキチン様蛋白質を1つ選び、

制御している転写制御因子や転写制御メカニズムについて siRNA による転写抑制実験や ChIP-chip 法を用いて検討することにした。

3. 研究の方法

細胞培養および分化誘導：THP-1細胞は、37°C・5% CO₂の条件のもと、10%FBS、1% penicillin/streptomycin、10 mM HEPES、1 mM sodium pyruvate、50 μM 2-mercaptoethanolを添加したRPMI1640 (Invitrogen社)で培養した。分化を誘導する為に、30 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma社)を培養液中に添加し、最大96時間THP-1細胞を培養した。

siRNA：SUMO1・SUMO2・SUMO3・SUMO4・NEDD8・ISG15およびIRF8に対するsiRNAを設計・合成した。THP-1細胞を1x10⁶細胞 / 6 cmディッシュで培養し、20 nMのsiRNAを1.6 μg/ml Lipofectamine 2000 (Invitrogen社)で細胞内に導入した。siRNA導入48時間後、細胞を回収し、以後の解析の為にRNAを抽出した。

リアルタイムRT-PCR：THP-1細胞のRNAはFastPure RNA kit (Takara Bio社)を用いて精製した。各5 μgのRNAをThermoScript RT-PCR system (Invitrogen社)で逆転写反応を行い、作成したcDNAを用いてABI Prism 7900HT (Applied Biosystems社)でリアルタイムPCR解析を行った。

マイクロアレイ解析：FastPure RNA kitで精製したTHP-1細胞のRNAから500 ngをIllumina TotalPrep RNA amplification kitで増幅し、Illumina Human Sentrix-6 bead chips ver.2で測定した。

Western blot解析：THP-1細胞の核抽出蛋白質9 μgを用いて、IRF8の産生量を抗IRF8抗体(sc6058X、Santa-cruz社)で検出した。

クロマチン免疫沈降：ホルマリン固定をしたTHP-1細胞をBranson 450 sonicatorを用いてDNA断片が平均150 - 600塩基長になるように超音波破碎した。断片化したクロマチンを抗IRF8抗体(sc6058X、Santa-cruz社)で免疫沈降し、脱クロソリンク後、DNAを精製することでIRF8が結合している領域のDNAを回収した。

ChIP-chip: クロマチン免疫沈降で回収した DNA断片をLM-PCR法で増幅後、末端にビオチンのラベルを付加した。ラベルしたサンプルをAffymetrix社のhuman promoter 1.0 arrayにハイブリダイズした。得られた結果のうち、連続した5箇所以上のプローブが $p < 1e-5$ であるところを有為な濃縮部位と定義し、その領域に最も近い遺伝子を制御遺伝子とした。

ChIP-qPCR: クロマチン免疫沈降で回収した DNA断片を、SYBR Premix ExTaq (Takara Bio社) と標的特異的プライマーを用いてABI PRISM 7500 Fast Real-Time System (Applied Biosystems社) で測定し、その領域の濃縮率を算出した。

4. 研究成果

本研究では、蛋白質翻訳後修飾としてユビキチン様蛋白質 SUMO1、SUMO2、SUMO3、SUMO4、NEDD8、ISG15 に着目し、ヒト単芽球様細胞株 THP-1 細胞のホルボールエステルによる細胞分化を実験モデルとして解析を進めた。まず、それらのユビキチン様蛋白質の発現を特異的に阻害出来る siRNA を設計し、THP-1 細胞に導入した。それぞれの siRNA の阻害効果は、特異的プライマーを用いた qRT-PCR で確認した。観察の結果、どの siRNA を導入した細胞においても、形態および増殖性に大きな変化は認められなかった。

一方、THP-1 細胞は、ホルボールエステルである PMA の刺激で単球様細胞へ分化することが知られている。今回、ISG15 に対する siRNA を導入後 PMA で分化を誘導すると 48 時間で多くの死細胞が観察されたが、他のユビキチン様蛋白質に対する siRNA では同様な変化は観察されなかった。THP-1 細胞の PMA による分化誘導時の ISG15 の発現変動を経時的に確認したところ、8~10 時間をピークに発現の上昇が観察された。これらのことから ISG15 が THP-1 細胞分化時に重要な働きをしていると推測された。

ISG15 の発現を制御している転写因子を検討する為に、ISG15 遺伝子のプロモーター領域の配列を観察したところ、インターフェロン刺激応答配列があることを見いだした。FANTOM4 で作成した qRT-PCR の結果から THP-1 細胞には、インターフェロン刺激応答配列に結合出来る 9 種類の interferon regulatory factor (IRF) ファミリー蛋白質のうち、IRF8 mRNA が有為に転写されていることが分かった。さらに Western blot 解析を行った結果、THP-1 細胞で強い IRF8 の産生が確認できた。これらの結果は、IRF8 が ISG15 の発現を制御している可能性を示唆していた。

そこで THP-1 細胞において IRF8 が結合し

ている領域を網羅的に特定し、IRF8 が直接発現を制御している遺伝子を見つける為に、IRF8 発現阻害による変動転写産物のマイクロアレイによる網羅解析および抗 IRF8 抗体を用いた ChIP-chip 解析による結合部位の同定を行うことにした。まず、IRF8 に特異的な siRNA によって発現阻害を行い、IRF8 mRNA の低下を qRT-PCR で確認した。次に、それらの細胞から得られた RNA をマイクロアレイで解析したところ 343 種類の遺伝子の発現量に siRNA 処理をしていない THP-1 細胞との違いが見いだされた。次に抗 IRF8 抗体を用いた ChIP-chip 解析を行い、IRF8 の結合領域を網羅的に検出した。同定された領域のうち 20 カ所について ChIP-qPCR 法で検証し、全ての領域において有為な濃縮を確認した。343 種類の遺伝子のプロモーター領域について検証した結果、84 種類以上の遺伝子の発現が IRF8 によって制御されていること、IRF8 が ISG15 遺伝子プロモーター領域に結合し、ISG15 の発現制御に重要な働きをしていることが明らかになった。

今回、同定した IRF8 に直接制御を受けている遺伝子の中に、多くの IFN 関連遺伝子が含まれていた。特に興味深いことに、IFN-mediated JAK/STAT パスウェイに関連する STAT1、STAT2、IRF9、OAS1、OAS2、OAS3、MX1 が全て標的遺伝子として選ばれていた。このことは、IRF8 が THP-1 細胞で IFN シグナリングパスウェイの制御において重要な働きをしていることを示している。

さらに、IRF8 の標的遺伝子を ChIP-chip 法を用いて網羅的に解析した報告は、本研究が世界で初めてあり、研究代表者によって取得・公表された実験結果は、免疫学の研究者だけではなく、IRF8 の関与が示されている他の生命現象（具合的には骨形成）などの他の生命現象・疾患の原因を考える上で大変有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kubosaki, A., Lindgren, G., Tagami, M., Simon, C., Tomaru, Y., Miura, H., Suzuki, T., Arner, E., Forrest, A. R. R., Irvine, K. M., Schroder, K., Hasegawa, Y., Kanamori-Katayama, M., Rehli, M., Hume, D. A., Kawai, J., Suzuki, M., Suzuki, H., Hayashizaki, Y.: The combination of gene perturbation assay and ChIP-chip reveals functional direct target genes for IRF8 in THP-1 cells. *Mol Immunol*, 査読有り, *In press*, 2010.

[学会発表] (計 1 件)

Kubosaki, A., Tagami, M., Tomaru, Y., Simon, C.,

Suzuki, M., Suzuki, H., Hayashizaki, Y:
The combination of ChIP-chip and gene
perturbation assay reveals high
confidence target genes for ICSBP and PU.1
in THP-1 cells. The 32nd Annual Meeting of
MBSJ, 9th-12th December, 2009, Yokohama,
Kanagawa, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪崎 敦隆 (Kubosaki Atsutaka)

独立行政法人理化学研究所・LSA システム構
築ユニット・研究員

研究者番号：30425673