

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2011
課題番号：23659050
研究課題名（和文） 血管でのスタチンによるクロマチン構造変化をした KLF 遺伝子持続誘導機構の解析
研究課題名（英文） Analysis of molecular dynamics of constitutive KLF induction through chromatin conformation change by statin
研究代表者 和田 洋一郎 (WADA YOUICHIRO)
東京大学、先端科学技術研究センター、特任准教授
研究者番号：10322033

研究成果の概要（和文）：高脂血症の治療薬として広く用いられているスタチン系薬剤には、その他にも多くの効果があると考えられているが、その仕組みには不明の点が多い。特に、動脈硬化を防止するなど血管への作用を明らかにするために、スタチンで刺激した血管内皮細胞における遺伝子誘導を網羅的に検討した。其の結果、MEK-ERK-MEF2 というシグナル伝達経路を介して KLF2 と KLF4 という遺伝子の誘導が顕著であることが判った。KLF4 遺伝子は、MEF2C によって遺伝子構造が大きく変わり、そのために持続的な発現がもたらされることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, statins, are known to exert athero-protective effects through the induction of specific transcriptional factors in multiple organs. Here, we focus on the beneficial effect in vascular wall, and analyzed comprehensive gene expression profile induced by pitavastatin. Through microarray analysis, we identified KLF4 and KLF2 as significantly induced genes. Using the chromatin immunoprecipitation with deep sequencing (ChIP-seq) analysis, we identified a novel functionally important MEF2C binding site within *KLF4* gene. Chromatin conformation analysis revealed this MEF2C-bound enhancer had spatial proximity to transcription start site and the frequency was increased by pitavastatin treatment. Thus, in statin treated endothelium, MEF2C was activated through MEK5/ERK5 pathway, and spatial proximity of MEF2C occupied enhancer was increased in KLF4 induction, suggesting dynamic chromatin conformation change was involved in statin mediated gene induction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：スタチン、転写調節、KLF ファミリー、内皮細胞、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害や心筋梗塞の発症に関わる動脈硬化の形成、進展には血管内皮機能の変化が与る。HMG-CoA Reductase を阻害するスタチンは血中 LDL-C 低下薬として汎用される薬剤であるが、その機序が明らかになっていない抗動脈硬化作用を有し “Pleiotropic effect” として知られる。我々はスタチンによる血管内皮細胞における網羅的転写解析を実施して KLF ファミリー遺伝子群が最も効率よく誘導されること、そして MEK5/ERK5/MEF2 経路が関与することを明らかにした。一方申請者らは内皮細胞の炎症刺激による転写の波を観測して、クロマチン構造の変化が病態の理解に重要であることを報告した (Wada ら, PNAS, 2009, Previewed in Editor' s Choice in Science, 2009)。

2. 研究の目的

そこで本申請は、スタチンにより KLF をはじめとするターゲット遺伝子への転写因子の動員と結合を次世代シーケンサーによって網羅的に明らかにすること、スタチンが引き起こすダイナミックなクロマチン構造変化を Chromatin conformation capture (3C) を基本とした技術によって明らかにすることを目的とする

3. 研究の方法

【方法 1】Chromatin immunoprecipitation followed by deep sequencing (ChIP-seq)

内皮細胞をスタチンによって刺激 4 時間後 1%ホルマリンで細胞を固定、超音波処理によって核蛋白と DNA 複合体を断片化し、MEF2A, MEF2C に対するそれぞれの抗体によって免疫沈降する。その後 DNA を回収して、リンカー付加後 Solexa 次世代シーケンサーによってその配列を決定し、それをヒトゲノム上に配置して MEF2 の結合部位を全ゲノム上で同定する。実際 MEF2C の結合を観察したところ、

KLF4 上では転写開始点の上流 2 kb 周囲と第一イントロンから第二イントロン周辺に MEF2C の結合が認められたが、スタチンの添加によって転写開始点の結合部位はより下流に移動し、新たに第二イントロン付近へ新たな結合が認められた。元来 KLF4 には CTCF, RAD21 などのインスレーターの結合に加え、H3K4me1, 3 の結合が認められることから、MEF2 の結合は、これら活性型ヒストンマークの局在併せ、スタチンによって KLF4 直ちに誘導されるクロマチン構造を持っていることを示唆している。しかし、スタチンによる KLF4 の誘導は持続的であることから、単なる転写因子の動員にとどまらず、永続的なクロマチン構造の変化が起こっていることが示唆されるので、今後、これらヒストン修飾を経時的に観察する必要がある。このようなスタチンによる転写因子結合部位と程度の変化を、ヒストン修飾、インスレーター結合、RNA ポリメラーゼ II 結合の変化を種々のスタチン応答性遺伝子において解析し、クロマチン構造変化を伴った転写誘導メカニズムに必要と考えられる遺伝子上の部位を特定する。

さらに、H3K4me1, p300 などの結合によってしめされるエンハンサー部位は、mediator complex によってプロモーター領域に近接することが推測されるので。

(Kagey ら Nature, 2010)、この二点の空間的近接関係を方法 2 に詳説する方法で確認し、その時系列変化を詳細に観察する。

【方法 2】Chromatin conformation capture (3C)

MEF2C の KLF4 遺伝子への結合において、転写開始点上流には MEF2 の結合コンセンサス配列があるが、新たに見出された第二イントロン結合領域にはない。このような領域への結合は、未知のコンセンサスの存在を示唆するか、あるいは他の共役因子を介したクロマ

チン構造変化によって、プロモータ領域と第二イントロンが空間的に隣接関係に至った事を示唆する。特に後者の可能性を検討する為“3C”を行うことができるが、網羅的な観察のためには、得られた DNA による”3C-PCR”と paired end di-sequencing (PET)によって相互作用可能なゲノム上の部位を同定する必要がある。これによって、スタチンによるターゲット遺伝子誘導の持続性が単なる転写因子動員にとどまらず、クロマチン構造変化を介したダイナミックな機序によることを明らかにすることができると推測される。現在共同研究を進めているシンガポール国立ゲノム研究所（代表、Yijun Ruan）は既にエストロゲン受容体を中心とする ChIA-PET で実績（Fullwoodら、Nature, 2010。Guolinagら Cell, 2012）をあげており、申請者らも本方法によって p53 による ChIA-PET の preliminary data を得ている。今後上記抗体によるクロマチン免疫沈降を加えることによって、バックグラウンドを抑制し、ゲノム上の相互作用を観察できると考えている。

4. 研究成果

我々は内皮細胞をスタチンによって刺激 4 時間に誘導される遺伝子群について、MEK-ERK-MEF2 カスケードが関与していることを明らかにした。そこで、MEF2A, MEF2C に対するそれぞれの抗体を用いて、全ゲノム上での結合部位を ChIP-Seq によって検討した。其の結果、MEF2C について良好なデータがえられ、従来知られているエンハンサー部位と異なる転写開始点の上流 148 kb の領域に結合が増加することを明らかにした。この新規エンハンサー領域は、網羅的なクロマチン相互作用解析（chromatin interaction analysis using paired-end tag sequencing:ChIA-PET）によって、転写開始点と相互作用していることが明らかになっ

た。スタチンによる KLF4 の誘導は持続的であることから、単なる転写因子の動員にとどまらず、永続的なクロマチン構造の変化が起こっていることが示唆されたので、さらに定量的なクロマチン相互作用解析である Taqman- Chromatin Conformation Capture (3C)によって、スタチン刺激によってこの相互作用が増強することが確認した。以上のことから、スタチンによる持続的な KLF4 遺伝子誘導には、MEF2C を介したクロマチン構造変化が関与していることが示され、現在 Proceedings of the National Academy of Science 誌に投稿、改訂中である。

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 5 件）

①Kanki Y, Kohro T, Wada Y, et al. Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression. The EMBO Journal, vol. 30, p2582-95, 2011

DOI: 10.1038/emboj.2011.173

② Tozawa H, Kanki Y, Wada Y, et al. Genome-wide approaches reveal functional interleukin-4-inducible STAT6 binding to the vascular cell adhesion molecule 1 promoter. Molecular and Cellular Biology, vol.31, p2196-209, 2011.

DOI: 10.1128/MCB.01430-10

③Fox R, Wada Y, et al. Mitochondrial DNA polymerase editing mutation, PolgD257A, reduces the diabetic phenotype of Akita male mice by suppressing appetite. Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 108, p8779-84, 2011.

DOI: 10.1073/pnas.1106344108

④ Pandya K, Kohro T, Wada Y, et al.

Distribution of histone3 lysine4 trimethylation at T3-responsive loci in the heart during reversible changes in gene expression. Gene Expression, in press, 2012.

⑤Mimura I, Wada Y, et al. Dynamic change of the chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of HIF1 and KDM3A. Molecular and Cellular Biology, in press, 2012.

[学会発表] (計4件)

①和田洋一郎、Renewal of histone modification during a wave of transcription caused by inflammatory stimulation in endothelial cells. 第5回日本エピジェネティクス研究会、2011/5/19-20

②和田洋一郎、超高速シーケンサーが明らかにした転写に伴うダイナミックな染色体構造変化と新たな転写装置の概念。第2回ARTセミナー2011/5/25。岡山大学。

③和田洋一郎、A wave of nascent transcription on activated big genes in human endothelial cells、Keystone Symposia 2012 Chromatin Dynamics、January 17 - 22, 2012

④前島崇司、和田洋一郎、Identification of novel MEF2C binding site indispensable for KLF4 induction in endothelial cells by statin treatment. 第19回日本血管生物医学学会学術集会。2011年12月8日-10日東京ステーションコンファレンス、東京。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田洋一郎 (WADA YOUICHIRO)
東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授
研究者番号：10322033