

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890056

研究課題名(和文) TALを用いたサイトカイン遺伝子の発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of cytokine gene expressions with Transcription Activator-Like (TAL) protein

研究代表者

松島 隆英 (Matsushima, Takahide)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助教

研究者番号：40636560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：免疫・炎症応答において中心的な役割を持つ分子であるサイトカインの遺伝子発現調節機構を解明することは免疫疾患の病態解明や新規治療法の開発に繋がる可能性がある。本研究ではTranscription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)の技術を応用し、任意のサイトカインの上流DNA配列に特異的に結合する人工ドメインを作製し、上流DNA配列およびその周辺に結合する転写因子を回収するTargeted Chromatin Immunoprecipitation (T-ChIP)システムの開発を目指し、改変型TALの作製やT-ChIPの技術開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Cytokines secreted from immune cell are central functional molecules in the immune and inflammation response. For the development of new drug and the investigation of pathogenic mechanism of immune deficient, Understanding expression mechanisms of cytokine genes is important. So, I tried the recovery of cytokine's upstream region involved transcription factors with the technique of Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN). I named this technique, "Targeted Chromatin Immunoprecipitation (T-ChIP) system". In this work, I produced the new TAL vector and investigated the T-ChIP system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：炎症 サイトカイン TALEN TAL 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

生体内において「免疫応答」は微生物を代表とする体外異物に対する防御反応である。免疫応答に付随し、生体内では自然免疫系担当細胞やT細胞が組織に集中して血管拡張や血管透過性の亢進、腫脹や疼痛を引き起こされる「炎症応答」が起こる。炎症応答は免疫細胞の組織への侵潤を助けるなど免疫応答に重要であるほか、組織のリモデリングや代謝制御にも関わっている。しかし、これら免疫・炎症応答の異常化はがんや関節リウマチなどの免疫疾患、アレルギー等を始め、動脈硬化、糖尿病に至るまで様々な疾患に関与することが近年明らかにされつつあり、免疫・炎症応答の開始から持続、そして終結までの分子機構の解明は社会的に重要な課題である。

免疫・炎症応答において中心的な役割を持つ分子として自然免疫細胞から産生されるインターロイキン (IL) ファミリー、tumor necrosis factor (TNF)等のサイトカインが挙げられる。サイトカインは免疫担当細胞同士、あるいは免疫担当細胞と周辺細胞とのコミュニケーションを司る分泌性分子であり、炎症応答を促進する「炎症性」と負に制御する「抗炎症性」のサイトカインに大きく分けられる。これらサイトカインの大量分泌あるいは枯渇が過剰な炎症応答を引き起こすことで疾患の引き金となることが明らかとなっている。よってこれらサイトカインの遺伝子発現調節機構を解明することは免疫疾患の病態解明や新規治療法の開発に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

現在までに炎症応答性サイトカイン遺伝子の調節機構には大きく2つの機構が存在していることが示唆されている。その一つは初期応答遺伝子とよばれる TNF 等のサイトカインであり、これら遺伝子のプロモーター領域に CpG 配列を豊富に持つことで常にクロマチンが開いた状態になり、Polymerase (Pol)が結合した状態で存在し、刺激依存的に Pol が活性化され、多量の mRNA の転写が行われる。これに対して二次的応答遺伝子と呼ばれる IL-6 や IL-12 等のサイトカインでは初期応答遺伝子のような豊富な CpG 配列はあまり存在せず、遺伝子発現時には新規に合成されたあるいは活性化を受けたタンパク質によるヒストン修飾、クロマチンリモデリングが必要である。また初期応答遺伝子、二次的応答遺伝子の発現調節にはそれぞれプロモーターのみだけでなくエンハンサー領域が重要であり、様々な転写因子などにより遺伝子発現が調節されていると考えられている。特に多くのサイトカインが Nuclear Factor-kappa-B (NF-κB)による制御を受けていることが明らかとなっているが、一つのタンパク質が複数のサイトカイン

を制御する詳細な分子メカニズムは十分に明らかにされておらず、各サイトカイン特有の転写因子群の存在が想定されている。

これまでに一般的な転写因子の同定にはタンパク質-核酸相互作用解析法による DNA 結合タンパク質の同定およびその DNA 結合タンパク質に結合するタンパク質のプロテオソーム解析やルシフェラーゼなどを用いたレポーターアッセイが主に行われている。しかしこれら手法を用いた解析では時間とコストが掛る一方、一つ解析から得られる情報は多くはない。これら問題点を含め、私は目的遺伝子の発現調節因子を網羅的に解析できる手法を開発し、これを用いて炎症応答性サイトカイン遺伝子の転写調節因子の同定を試みることを目的し、研究を進めた。

3. 研究の方法

私は目的遺伝子の発現調節因子群を網羅的にプロテオソーム解析する技術として Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)の技術が応用できると考えた。TALEN は Xanthomonas 属の植物病原性バクテリアから単離・同定された Transcription Activator-Like Effector (TALE) にヌクレアーゼ活性を持つ FokI を融合させた人工ヌクレアーゼの一種である。TALEN は、DNA に特異的に結合するドメインと、制限酵素 FokI の DNA 切断ドメインを連結されており、2つの TALEN が近接する標的配列に結合すると DNA 切断ドメインが2量体となり DNA を切断する。現在この TALEN は標的配列の選択が可能であることから、ES 細胞を用いることなく目的の遺伝子を改変できる次世代のロックアウト技術として注目され、様々な動物、植物、哺乳類培養細胞 (iPS 細胞を含む)において遺伝子改変の成功例が報告され、世界中で汎用的に使用されている。

しかし TALEN において最も突出した特徴は TALEN 自身の遺伝子改変を行うことにより「システムティックに任意の DNA 配列に特異的に結合するドメインを作製することができる」という点である。TALEN の DNA 結合ドメインはアミノ酸 34~35 からなる Repeat ドメインの繰り返し配列になっている。そして Repeat ドメイン中の Repeat Variable Di-residue (RVD)と呼ばれる 12-13 番目のアミノ酸配列がヌクレオチドの認識に寄与している。例えば RVD をアスパラギン (N) イソロイシン (I)に遺伝子改変することによってアラニン (A)を認識することができる。このようにアラニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)それぞれに結合する Repeat ドメインを任意に並べることで、およそ 15~30 残基の標的配列を特異的に認識する TALEN を作製することができる。

そこで私はこの TALEN の特徴を生かし、
「 Targeted Chromatin

Immunoprecipitation (T-ChIP)」という技術を確認し、この技術を用いて炎症応答性サイトカイン遺伝子の転写調節因子の同定を目指した。

まずこの手法の確立を目指し、TALEN の Nuclease 活性ドメインを排除し、N 末と C 末に HA タグを付加した Transcription Activator-Like protein (TAL)ベクターを作製し、目的の炎症応答性サイトカイン遺伝子の上流あるいはイントロン配列に結合するように DNA 結合ドメインを組み込んだ。さらに作製した TAL ベクターを培養細胞に遺伝子導入し、Chromatin IP と同様な手法を用いて DNA-タンパク質の架橋を行い、細胞の破碎し、染色体の断片化を行った。その後、染色体断片サンプルから、タグ抗体を用いて TAL と TAL が結合している DNA 配列近隣のゲノムと転写因子群を回収、マス・ペクトル解析を用いて転写因子群の同定を行っていく計画で研究を進めた(図1)。

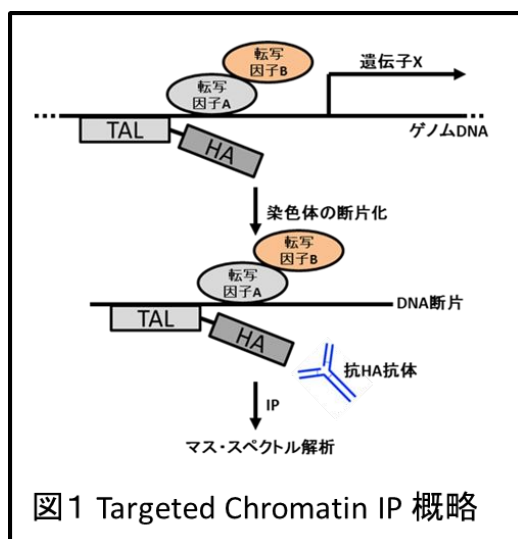


図1 Targeted Chromatin IP 概略

4. 研究成果

(1) TAL ベクターの作製

平成 24 年度においてはまず骨格となる HA-TAL-HA のベクターを作成した。さらに作成したベクターに IL-12 のサブユニットである p40 のプロモーター領域の遺伝子配列に結合する DNA 結合ドメインを組み込んだ。また TAL ベクターはヒト単球系培養細胞 THP-1 にレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、安定発現株の作製を行った。しかしながら、安定発現株を作製・解析した結果、全長 TAL タンパク質以外にも無数の TAL タンパク質由来と思われる断片が確認された。この現象は培養細胞に一過的に TAL を発現させた場合には認められなかったことから TAL タンパク質の分解によるものではなくウイルスベクターによって TAL 配列がゲノムに組み込まれる過程で生じている可能性が考えられた。TAL の DNA 結合ドメインはアラニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)それぞれに結合する Repeate ドメイ

ンを任意に並べることで構成されているが、各 Repeate ドメインの遺伝子配列は Repeate Variable Diresidue (RVD)と呼ばれる領域を除いてほぼ同じである。よって必然的に TAL 全長の遺伝子配列の中には複数のリピート配列が生じることになるために、安定発現細胞株を作製時に TAL 配列がゲノムに組み込まれる過程で遺伝子組み換え反応が起こり、無数の TAL 由来の断片化したタンパク質が生じたものと考えられた。

解析を進める上で発覚したこの安定発現細胞株作製時の TAL 配列の遺伝子組み換え反応は世界で汎用的に使用されている TAL を用いる場合には避けられない現象であったことから、T-ChIP システムの開発のためには TAL 自身の Repeate ドメインのコンストラクトのデザインを再考するべきであると判断した。そこで平成 24~25 年度にかけて各 Repeate ドメインにサイレンス変異を導入し、リピート配列の影響を限りなく減らした改変型 TAL の作製を進めた。実際にサイレンス変異をいれた Repeate ドメインによって作製した改変型 TAL をヒト単球系培養細胞 THP-1 にレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、安定発現株の作製・解析を行った結果、安定発現細胞株において作製した改変型 TAL は従来型の TAL よりも特異的な全長 TAL タンパク質の発現が確認された(図2)。

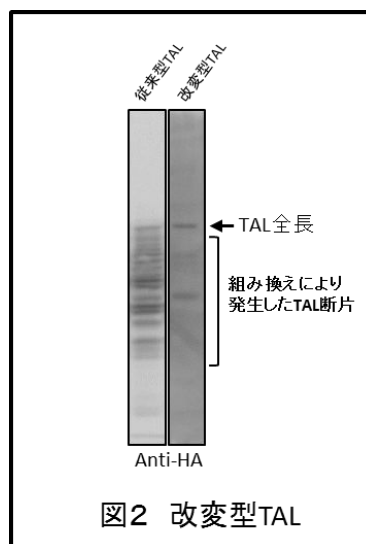


図2 改変型TAL

(2) T-ChIP システムの開発

作製した改変型 TAL を安定発現する THP-1 細胞株を用いて Chromatin IP の条件検討を進めた。

TAL 発現 THP-1 細胞を Chromatin IP と同様な手法を用いてパラフォルムアルデヒドを用いて DNA-タンパク質の架橋を行い、超音波により細胞を破碎、染色体の断片化を行った。その後、染色体断片サンプルから、タグ抗体である抗 HA 抗体を用いて TAL タンパク質と TAL が結合している染色体断片を免疫沈降法で回収し、同時に回収されてき

IL-12 のサブユニットである p40 のプロモーター領域を qPCR 法で検出・解析を行った。p40 のプロモーター領域の 5 カ所に結合する各 TAL を安定発現する THP-1 細胞を用いて解析を行った結果、うち 1 つの TAL 発現 THP-1 細胞のサンプルでコントロール THP-1 細胞と比較して 5 倍近い p40 のプロモーター領域の濃縮ができることが明らかとなった (図 3)。

現在はこの手法を基盤として、マスペクトル解析などを用いて転写因子の解析を行うために、実験系のスケールアップと免疫沈降法の精製度の向上を目指し、研究に取り組んでいる。

残念ながら T-ChIP システムとしてはいまだ TAL が結合するゲノム周辺領域の回収とゲノム配列の検出にしか至っていない。しかしながら今後、本研究により作製した改変型 TAL を利用し、様々な炎症応答性サイトカイン遺伝子の発現調節に関わる転写調節因子、non-coding RNA、エンハンサーの同定を目指すのと同時に更なる改変型 TAL を作製し、目的ゲノム周辺に高感度・高効率で結合する TAL システムの開発を目指す。また本手法はこれまでの転写因子の同定法とは異なり、全く転写因子が分かっていない遺伝子にも適用が可能である極めて独創性が高い転写因子群の網羅的プロテオソーム解析手法であり、本手法の確立はいまだ未知の部分が多くある炎症応答時におけるサイトカイン遺伝子の発現制御機構解明に繋がることを期待できる。

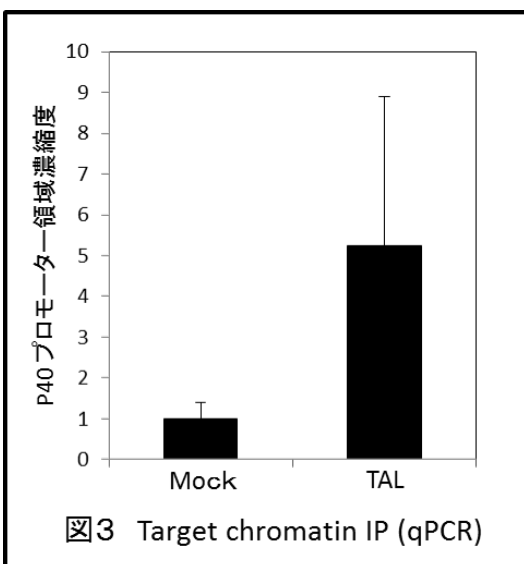


図3 Target chromatin IP (qPCR)

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

松島隆英、浅原弘嗣
“慢性炎症とマイクロ RNA”
先端医学社、炎症と免疫、2012、5

〔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
<http://www.tmd.ac.jp/grad/syst/asahsyst/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 隆英 (MATSUSHIMA, Takahide)
東京医科歯科大学
大学院医歯総合研究科・特任助教
研究者番号：40636560

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：