

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22310117
 研究課題名(和文) 炎症刺激で駆動する転写の波における転写ファクトリーとエピゲノム修飾相互作用の解析
 研究課題名(英文) Analysis of transcription factory and epigenomic modification in inflammatory stimulation driven transcription wave
 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)：本研究において、我々は動脈硬化初期病変のモデルである炎症性刺激によって刺激した内皮細胞における遺伝子発現の誘導と収束のメカニズムを研究した。誘導された転写におけるRNA産生を詳細に観察し、RNAポリメラーゼII(Pol II)の局在変化を経時的に観測したところ、刺激が加わるとmRNA産生に先立って、組織化されたPol IIによる転写が転写開始点から遺伝子終末まで進行していた。この時転写誘導される代表的遺伝子群において、遠隔相互作用が引き起こされていた。ヒストン修飾や主要転写因子の結合部位情報と、全ゲノムクロマチン相互作用解析によってクロマチン構造変化を検討したところ、刺激開始直後から遺伝子間、制御領域間での相互作用がダイナミックに変動している様子が明らかになり、炎症刺激以外でも普遍的な原理であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation of endothelial cell is the first stage of atherogenesis. We applied an experimental model using endothelial cells with representative inflammatory stimulant, tumor necrosis factor-alpha (TNF α), and to dissect detailed mechanism of induction and reduction of more than 500 genes. To obtain a comprehensive view of a single transcription cycle caused by TNF α in time course manner, we switched on five long (>100 kbp) genes with TNF α and monitored genomic localization of nascent RNA, RNA Pol II, insulators, and histone modifications. Activation triggers a wave of transcription that sweeps along the genes, and Pol II tends to stall at cohesin/CTCF binding sites. Chromatin conformation capture (3C), both conventional and quantitative data, revealed co-localization of actively transcribed genes. These results suggested that fine-tuning of TNF α responsive genes is achieved by selected number of transcription complexes, which provide platform for both transcription and splicing. By virtue of whole genome chromatin interaction analysis with paired end tag sequencing (ChIA-PET) detailed chromatin structure analysis was made possible, and time course data on stimulated endothelium sheds light on dynamic chromatin structure change within half an hour.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	15,800,000	4,740,000	20,540,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学、ゲノム生物学

キーワード：RNAポリメラーゼ、TNF α 、ヒストン修飾、内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

従来申請者らは、循環器領域におけるインターベンション治療の経験を通じて、動脈硬化発症機序を明らかにしたいと考え、血管生物学の領域において、血管壁に脂質の蓄積が進行するメカニズム解明することを目的として研究を行っていた。生体内の複雑な血管局所環境を再現するために、血管壁の内皮細胞だけでなく、単球・マクロファージ、平滑筋細胞が共存する混合培養系を用いて検討し、慢性の炎症性刺激が内皮細胞に及ぼす影響こそが病変形成初期において最も重要であることを明らかにした。そこで、TNF α によって刺激されたヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた実験系で、炎症性刺激に応答する内皮細胞の挙動を、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を手がかりにして調べてきた。その結果 TNF α は単一刺激によって500以上の遺伝子を系統的に活性化し、白血球の遊走、ローリング、接着、潜り込みを正しい時系列で導き、その後遺伝子群の発現を適切な時系列で終息させることを見出した。

2. 研究の目的

つまり、代表的炎症刺激である TNF α (TNF α) を添加し血管内皮細胞で数時間後に始まる mRNA 産生に先立ち、刺激開始直後から未熟 RNA 産生と RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の波が約 3.1 kb/min の速度で移動することを見出した (*PNAS*, 2009, Previewed in Editor's Choice in *Science*, 2009)。ここでは組織化された多くの Pol II による転写とスプライシングが同期していた。又、Pol II の動員、転写の進行時にはヒストン修飾やインスレーター等のエピゲノム修飾が密接に関与していた。

そこで、転写の第一波が転写同時に遺伝子のエピゲノム修飾等クロマチン構造変化を促し、その後の mRNA 産生を効率的に行う役割を果たしていると考え、次の3点を明らかにすることを目的とした。(イ) 刺激誘導性の転写直後には 100 kb 以下の短い遺伝子でも転写の波が走ること。(ロ) この転写が刺激特異的なファクトリーの中で同時に起こること。(ハ) ファクトリーに遺伝子が動員転写されるにはエピゲノム修飾が重要であること。

3. 研究の方法

炎症刺激によって活性化された遺伝子が組織化された RNA ポリメラーゼ II (Pol II) を含む転写ファクトリーに動員されて転写と同時にスプライシングを受けるという作業仮説を検証するため次の手法を用いた。(1) 100 kb

以下の短い遺伝子の転写の波を観測する為、1分間隔という高い時間分解能をもって ChIP-Chip/Seq 実験を実施する。(2) 刺激特異的なファクトリーの存在を、Chromatin Conformation Capture (3C) によって空間的に隣接する遺伝子群を同定する。(3) 3C産物に含まれる蛋白成分をプロテオミクス解析して構成要素を同定する。そして(4) ファクトリーに遺伝子が動員転写されるにはエピゲノム修飾が重要であることを示す為、ヒストン修飾酵素及びインスレーターをノックダウンした細胞において ChIP-Chip/Seq によって経時的な Pol II の動きを追跡する。

4. 研究成果

炎症刺激で活性化された遺伝子が、組織化された RNA ポリメラーゼ II (Pol II) を含む転写ファクトリーに動員されて転写されるといふ仮説を検証するために実施した本研究において、下記の成果を得た。(1) 100 kb 以下の短い遺伝子の転写の波の観測：カスタムアレイによる未熟 RNA 産生観察や、活性型、非活性型 Pol II に対する抗体を用いた ChIP-Seq によって、100 kb 以下の遺伝子群においても転写の波が繰り返し生じていることが観察された。(2) Chromatin Conformation Capture (3C) によるクロマチン構造変化の観察：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) を内皮細胞の刺激誘導系を用いて実施したところ、遠隔転写制御領域の近接関係が観察され、これを媒介する刺激特異的な転写複合体の存在を示唆していた。(3) RNA ポリメラーゼ II 複合体に含まれる蛋白成分の同定：内皮細胞から Pol II 抗体による免疫沈降産物を調整してプロテオミクス解析を実施し、刺激が加わると同時に、無刺激状態に含まれていた酵素が脱落し逆にヒストンバリエーションなどが加わり転写複合体の構成が変化していた。(4) 転写におけるエピゲノム修飾の役割：コヒーシンをノックダウンした細胞では誘導されるべき遺伝子での転写の波が消失し、転写複合体を動員するためのクロマチン構造にはコヒーシスが必須であること、また本来と異なる遺伝子領域に転写複合体が導かれ、誤った転写が起きていた。

本研究においては、炎症刺激に加えて、上記知見および手法に基づいて、低酸素刺激、PPAR リガンド刺激、スタチン刺激による内皮細胞におけるクロマチン構造変化を観察し、それぞれ異なる転写複合体が関与していることを見だし、随時報告している。

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 15 件)

1. Papantonis, A., Kohro, T., Baboo, S., Larkin, J. D., Deng, B., Short, P., Tsutsumi, S., Taylor, S., Kanki, Y., Kobayashi, M., Li, G., Poh, H., Ruan, X., Aburatani, H., Ruan, Y., Kodama, T., *Wada, Y. (共同責任著者), and *Cook, P. R. (2012) TNF alpha signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed. *The EMBO journal*, 31: 4404-4414, .

DOI: 10.1038/emboj.2012.288.

2. Pandya, K., Kohro, T., Mimura, I., Kobayashi, M., *Wada, Y. (共同責任著者), Kodama, T., and *Smithies, O. (2012) Distribution of histone3 lysine 4 trimethylation at T3-responsive loci in the heart during reversible changes in gene expression. *Gene Expr* 15, 183-198.

3. Ohta, Y., Nishiyama, A., Wada, Y., Ruan, Y., Kodama, T., Tsuboi, T., Tokihiro, T., and *Ihara, S. (2012) Path-preference cellular-automaton model for traffic flow through transit points and its application to the transcription process in human cells. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 86, 021918.

DOI: 10.1103/PhysRevE.86.021918

4. Mimura, I., Nangaku, M., Kanki, Y., Tsutsumi, S., Inoue, T., Kohro, T., Yamamoto, S., Fujita, T., Shimamura, T., Suehiro, J., Taguchi, A., Kobayashi, M., Tanimura, K., Inagaki, T., Tanaka, T., Hamakubo, T., Sakai, J., Aburatani, H., Kodama, T., and *Wada, Y. (2012) Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A.

Molecular and Cellular Biology 32, 3018-3032.

DOI: 10.1128/MCB.06643-11.

5. Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y., et al (2012) Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nature Communications*, 6;3, 883.

DOI: 10.1038/ncomms1892.

6. Wada, Y., Li, D., Merley, A., Zukauskas, A., Aird, W. C., Dvorak, H. F., and *Shih, S. C. (2011) A multi-gene transcriptional profiling approach to the discovery of cell signature markers. *Cytotechnology* 63, 25-33.

7. Mimura, I., Tanaka, T., Wada, Y., Kodama, T., and *Nangaku, M. (2011) Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: epigenetic regulation of the hypoxic response via hypoxia-inducible factor and histone modifying enzymes. *Journal of pharmacological sciences* 115, 453-458.

8. Kanki, Y., Kohro, T., Jiang, S., Tsutsumi, S., Mimura, I., Suehiro, J., Wada, Y., Ohta, Y., Ihara, S., Iwanari, H., Naito, M., Hamakubo, T., Aburatani, H., Kodama, T., and *Minami, T. (2011) Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression. *The EMBO journal* 30, 2582-2595.

DOI: 10.1038/emboj.2011.173

9. Fox, R., Kim, H. S., Reddick, R. L., Kujoth, G. C., Prolla, T. A., Tsutsumi, S., Wada, Y., Smithies, O., and *Maeda, N. (2011) Mitochondrial DNA polymerase editing mutation, PolgD257A, reduces the diabetic phenotype of Akita male mice by suppressing appetite.

Proceedings of the National Academy of

Sciences of the United States of America 108, 8779-8784.

DOI: 10.1073/pnas.1106344108

10. Morikawa M, Kanki Y et al. (2011) ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Research*, 39, 8712-27.

DOI: 10.1093/nar/gkr572

11. Kawamura T, Ohta Y, et al. (2011) Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. *The Journal of Clinical Investigation* 84, 722-732.

DOI: 10.1172/JCI58618

12. Ohta Y, et al. (2011) Cellular-automaton model of the cooperative dynamics of RNA polymerase II during transcription in human cells. *Physical Review E* 84, 041922-2-15.

DOI: 10.1103/PhysRevE.84.041922

13. Daigo, K, Kawamura T, Ohta Y, et al. (2011) Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4alpha (HNF4alpha) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 674-686.

14. Tozawa H, Kanki Y, Wada Y, et al. (2011) 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.

DOI: 10.1128/MCB.01430-10

15. Papantonis, A., Larkin, J. D., Wada, Y., Ohta, Y., Ihara, S., Kodama, T., and *Cook, P. R. (2010) Active RNA polymerases: mobile or immobile molecular machines? *PLoS biology* 8, e1000419.

[学会発表] (計 30 件)

1. 和田洋一郎、A wave of nascent transcription on activated big genes in human endothelial cells is suggestive to dynamic chromatin movement caused by transcription factories, 第90回日本生理学会大会 (招待講演)、2013年03月27日~2013年03月29日、東京

2. 和田洋一郎、心血管系エピゲノム研究を通して得られた転写メカニズムの新しい概念、第六回日本エピジェネティクス研究会年会 (招待講演)、2012年05月14日~05月15日、東京

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. 和田洋一郎、A wave of nascent transcription on activated big genes in human endothelial cells、International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities、2011年1月24~26日、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)

5. 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。

6. 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, KKRホテル、熊本市

7. 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。

8. 和田洋一郎、動脈硬化誘導刺激に応じて血管内皮細胞で複数遺伝子を同時に転写する装置の同定、第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 合同大会、2010年12月7-10日、神戸ポートアイランド

9. 神吉康晴、Three Dimensional Chromatin Architecture Correlates with Two Opposite Transcription Factors, which contributes the Cell Specificity、The 5th HOPE meeting、2013年02月25日-03月02日、グランドプリンスホテル新高輪

10. 神吉康晴、Comprehensive analyses revealed the epigenetic switch during the endothelial cell differentiation、第12回日本再生医療学会、2013年03月21日-03月23日、パシフィコ横浜

11. 神吉康晴、Comprehensive analyses revealed the epigenetic switch during the endothelial cell differentiation、第12回日本再生医療学会、2013年03月21日-03月23日、横浜

12. 神吉康晴、Epigenetically coordinated GATA2 bindings are necessary for the endothelial cell specificity、第六回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年05月14日-05月15日、東京

13. 神吉康晴、ChIP-sequence Reveals Functional Interleukin-4-Inducible STAT6 Binding to the Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Promoter、第12回東京大学生命科学シンポジウム、2012年06月30日-06月30日、東京大学

14. 神吉康晴、Regulation of the Endothelial-Mesenchymal Transition (EndMT)、第71回日本癌学会学術総会、2012年09月19日-09月21日、札幌

15. 神吉康晴、The initiation step about the changes of transcription factor bindings and histone modifications is involved in sustained gene inductions. Keystone Symposia 2013 Aging and Diseases of Aging、2012年10月22日-2012年10月27日、Sheraton Miyako Hotel Tokyo

16. 神吉康晴、Epigenetic Switch on the Differentiation of Mouse Vascular Endothelial Cells、International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting、2012年06月13日-06月16日、パシフィコ横浜

17. 神吉康晴、Molecular mechanism about sustained VCAM-1 induction by the transcriptome and epigenomic analyses. 第20回日本血管生物医学学会学術集会 (The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology)、2012年12月05日-12月07日、徳島あわぎんホール

18. 神吉康晴、Two transcription factors mediated opposite chromatin conformation correlates with endothelial cell specificity、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日-12月14日、福岡国際会議場

19. 神吉康晴、Epigenetic Regulation in Endothelial-cell Specific Genes by Transcription factor GATA2 Binding Regions、Keystone Symposia 2012 Epigenomics (J3)、January 17 - 22, 2012、

Keystone Resort, Keystone, Colorado, USA

20. 神吉康晴、Epigenetically Coordinate GATA2 Binding Regions are Necessary for the Determination of the Endothelial Cell Specificity、The Second Pacific Symposium on Vascular Biology、Oct. 30-Nov. 2, 2011、Jeju Island (Shilla Hotel), Korea

21. 神吉康晴、Functional Roles of GATA2 in Vascular Biology、第34回日本分子生物学会年会、2011/12/13-12/16、パシフィコ横浜。
22. 神吉康晴、疾患と発生を繋ぐエピゲノムー血管疾患の解明に向けてー、Genomic Sciences Research Complex (GSC) セブテンディング2011、2011/8/25、理化学研究所 横浜研究所、神奈川県
23. 神吉康晴、Epigenetic Framework in Vascular Endothelial Cells、第19回日本血管生物医学会学術集会、2011/12/8-12/10、東京ステーションカンファレンス、東京都
24. 神吉康晴、Epigenetically Coordinate GATA2 Cistrome is Necessary for the Determination of the Endothelial Cell Specificity、CDB symposium 2011、2011年3月14～15日、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター (兵庫県)
25. 神吉康晴、血管内皮細胞における転写因子GATA2の機能解析、第22回高遠シンポジウム、2010年8月19～20日、高遠さくらホテル
26. 神吉康晴、Epigenetically coordinate GATA2 bindings in endothelium is necessary for the determination of the endothelial cell specificity、2010年度がん若手ワークショップ、2010年9月1～4日、アートランドホテル蓼科 (長野県)
27. 神吉康晴、Epigenetically coordinate GATA2 occupancy is necessary for the determination of the endothelial cell specificity、第18回日本血管生物医学会学術集会、2010年12月1～3日、梅田スカイビル。
28. 神吉康晴、GATA2 occupancies differ from each cell type, which is correlated with epigenetic modifications and gene expression profiles in cell-type specific manner、第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 合同大会、20

- 10年12月7～10日、神戸ポートアイランド。
29. 大田佳宏、転写過程の超離散モデリングとシミュレーション、京都大学数理解析研究所研究集会 (招待講演)、2012年08月20日～2012年08月22日、京都大学 益川ホール。
30. 大田佳宏、Yoshihiro、High Density Spatial and Temporal Simulation Reveals Transcriptional Dynamics、The Pacific Symposium on Biocomputing (PSB) 2011、January 4-8, 2011、Kona, USA.

[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

(2) 研究分担者

神吉 康晴 (Kanki, Yasuharu)

東京大学先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号: 00534869

(3) 研究分担者

興梠 貴英 (Khoru, Takahide)

東京大学医学部附属病院・特任助教

研究者番号: 40401046

(4) 研究分担者

大田 佳宏 (Ohta, Yoshihiro)

東京大学先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号: 80436592