

## 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7日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22681027

研究課題名（和文）次世代シーケンサーを用いた癌細胞低酸素応答の多角的トランスクリプトーム解析

研究課題名（英文） Integrated transcriptome analysis of cancer cells in response to hypoxic shock using next generation sequencer

研究代表者

鈴木 穰（SUZUKI YUTAKA）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：40323646

研究成果の概要（和文）：

大腸がん細胞における低酸素刺激時の転写応答に着目して、次世代シーケンサーを共通の検出器として用いた様々な角度からの ChIP Seq データ、RNA Seq データを収集、解析した。その結果、低酸素刺激により実際の HIF-1 の結合が誘導される以前から、多くの場合、クロマチンがオープン構造を示していることを見出し、細胞の系譜あるいは変遷を反映する形で、速やかな転写応答に必要な環境は、クロマチン構造として整備されている可能性を示唆することができた。

研究成果の概要（英文）：

I conducted integrated transcriptome analysis of a colon cancer cell line, DLD-1, in response to hypoxic shock using next generation sequencer. I generated 100 million TSS tags and associated a wide variety of epigenomic and transcriptomic information. Namely, this dataset include ChIP Seq data of HIF1, which is a pivotal transcription factor in response to hypoxic shock, representative active and repressive histone markers and RNA polymerase II. This data was further associated with RNA Seq data of nucleus, cytoplasm and polysome fractions. Integrative analysis of the data revealed that chromatin forms open structure in prior to actual hypoxic shock. We also demonstrate that gene expression regulations are exerted at various levels of transcriptome layers, such as epigenomic regulations, transcriptional initiation, elongations and finally degradations. This is the first report shed light on comprehensive views on the transcriptome regulations in cancer cells in hypoxic conditions, thus, should give useful clues for the future analysis how cancers survive in hypoxic environments in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2012年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：ゲノム生物学

科研費の分科・細目：

 キーワード：次世代シーケンサー・低酸素応答・トランスクリプトーム・転写開始転  
 クロマチン・Chip Seq 解析

## 1. 研究開始当初の背景

### 2.

申請者らは、昨年、TSS Seq 解析の生物学的解析の応用例として、低酸素状態下におけるガン細胞における転写開始点データの網羅的収集と解析を行った(Tsuchihara et al NAR 2009)。1%あるいは21%の酸素濃度化で培養した2種類のヒトガン細胞(大腸がん由来細胞株 DLD1、乳がん由来細胞株 MCF7)と2種類の非ガン細胞(繊維芽細胞 TIG3、胎児腎由来細胞株 HEK293)について、それぞれから約1000万、合計1億本のTSSタグの解析から、低酸素刺激に依存的に発現上昇が認められる遺伝子を120個、遺伝子中のある選択的プロモーターのみが低酸素刺激により誘導されるものを191個見出している。また、十分な転写量(細胞あたり5コピー以上と見積もられる量)を持ちつつも、既知のタンパク質コード領域の外部に位置し、non-coding RNAを転写すると思われるプロモーターを220個見出している。しかし、実際にこれらのプロモーターがどのような転写因子により発現誘導が制御され、どのような転写産物を生成しているのか、さらにそれが実際にタンパク質として翻訳されている、あるいはnon-coding RNAとして機能しているのか、といった部分については依然として未知の部分が多く残されている。実際に申請者が行った予備実験からも選択的プロモーター由来の転写産物をランダムに解析しても、実際に対応する新規タンパク質が検出される割合は低い。

一方で、次世代シーケンサーの導入により、ゲノムDNAのヌクレオソーム構造、転写因子の結合、転写の開始、転写産物の細胞質への輸送、ポリソームでのタンパク質への翻訳、といった遺伝子発現制御の各段階で、個人の研究者レベルでは従来考えられなかった規模と精度で網羅的解析を行うことが可能となっている。本研究課題では、これら最新の技術を集約的に駆使し、得られる網羅的データ群の高次の統合的解析から、ガン細胞の低酸素刺激におけるトランスクリプトームの変化について、その生物学的意義にまで踏み込んだ網羅的解析を行う。また、この系をモデルケースに、“次世代型”トランスクリプトーム解析の方法論の確立を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究においては、1%、21%酸素濃度下で培養された前述の4種類の細胞を用いて、転写因子 HIF-1/2 および RNA polymerase II の DNA 結合部位の同定 (ChIP Seq 法)、核画分、細胞質画分より抽出された RNA のショットガン解析 (RNA Seq 法)、ショ糖密度勾配法により生成されたポリソーム画分より抽出された

RNA のショットガン解析 (RNA Seq 法) を行う。また、SDS-PAGE によりサイズ分画された 20-30bp の small RNA のシーケンズ解析 (miRNA Seq 法) も同時に行う。ヒト大腸がん細胞 DLD1 における低酸素応答について、転写開始からタンパク質翻訳にいたる各制御段階での多角的な実験データを統合的、相互補完的に解析することにより、ヒトトランスクリプトームの低酸素応答の全体像をその生物学的合目的性的の見地から、統合的に解析する。

本研究では、特に転写因子 HIF-1/2 の標的遺伝子となっているものに焦点をあてる。HIF-1/2 は低酸素応答に中心的な役割を果たす転写因子であり、ガン細胞が低酸素環境下において示す血管新生作用あるいはアポトーシス耐性を示す際、そこに関わる一群の遺伝子の発現を誘導することが知られている。本研究では、ChIP Seq 法により同定された HIF-1/2 の低酸素依存的な結合領域のうち、2) ChIP Seq 法により RNA polymerase II の結合が亢進するもの、1) TSS Seq 法により近傍に明確な転写開始誘導が認められるもの、3) RNA Seq 法により該当する転写産物が、核外へと輸送され、ポリソーム画分に取り込まれてタンパク質翻訳の鋳型として利用されているもの、を選別する。これにより、選択的プロモーターごと、あるいは各転写ユニットごとに、ゲノム上で転写因子が制御する転写開始反応が、結果的にタンパク質合成すなわちプロテオームにおけるどのような変化を引き起こすのか、その関係性を網羅的かつ体系的に解析することが可能である。

さらに、細胞株のモデル系から得られた知見が、実際のヒトガン細胞においてどの程度、観察されるのかを検証する。HIF-1/2 の結合によって、最終的にタンパク質翻訳誘導が誘起された選択的プロモーターあるいは新規転写産物について、低酸素部位あるいは比較的酸素濃度の高い部位から分離された臨床検体のガン組織を 20 検体程度を用いて、Western 法によるタンパク質量変動を解析する。

## 3. 研究の方法

本研究においては、1%、21%酸素濃度下で培養された前述の4種類の細胞を用いて、転写因子 HIF-1/2 および RNA polymerase II の DNA 結合部位の同定 (ChIP Seq 法)、核画分、細胞質画分より抽出された RNA のショットガン解析 (RNA Seq 法)、ショ糖密度勾配法により生成されたポリソーム画分より抽出された RNA のショットガン解析 (RNA Seq 法) を行う。また、SDS-PAGE によりサイズ分画された 20-30bp の small RNA のシーケンズ解析 (miRNA Seq 法) も同時に行う。ヒト大腸がん

細胞 DLD1 における低酸素応答について、転写開始からタンパク質翻訳にいたる各制御段階での多角的な実験データを統合的、相互補完的に解析することにより、ヒトトランスクリプトームの低酸素応答の全体像をその生物学的合目的性的の見地から、統合的に解析する。

本研究では、特に転写因子 HIF-1/2 の標的遺伝子となっているものに焦点をあてる。

HIF-1/2 は低酸素応答に中心的な役割を果たす転写因子であり、ガン細胞が低酸素環境下において示す血管新生作用あるいはアポトーシス耐性を示す際、そこに関わる一群の遺伝子の発現を誘導することが知られている。本研究では、ChIP Seq 法により同定された HIF-1/2 の低酸素依存的な結合領域のうち、2)ChIP Seq 法により RNA polymerase II の結合が亢進するもの、1)TSS Seq 法により近傍に明確な転写開始誘導が認められるもの、3)RNA Seq 法により該当する転写産物が、核外へと輸送され、ポリソーム画分に取り込まれてタンパク質翻訳の鋳型として利用されているもの、を選別する。これにより、選択的プロモーターごと、あるいは各転写ユニットごとに、ゲノム上で転写因子が制御する転写開始反応が、結果的にタンパク質合成すなわちプロテオームにおけるどのような変化を引き起こすのか、その関係性を網羅的かつ体系的に解析することが可能である。

さらに、細胞株のモデル系から得られた知見が、実際のヒトガン細胞においてどの程度、観察されるのかを検証する。HIF-1/2 の結合によって、最終的にタンパク質翻訳誘導が誘起された選択的プロモーターあるいは新規転写産物について、低酸素部位あるいは比較的酸素濃度の高い部位から分離された臨床検体のガン組織を 20 検体程度を用いて、Western 法によるタンパク質量変動を解析する。

#### 4. 研究成果

大腸がん細胞における低酸素刺激時の転写応答に着目して収集された 1 億の転写開始点タグデータに対し、次世代シーケンサーを共通の検出器として用いた様々な角度からの ChIP Seq データ、RNA Seq データを収集、解析した。1%あるいは 21%の酸素濃度下で培養した DLD1 細胞を用いて 1) 低酸素応答のマスター転写因子の一つである転写因子 HIF-1 結合領域の同定 (ChIP Seq 法) ; 2) RNA polymerase II 結合部位および計 8 種類の代表的活性性、抑制性のヒストン修飾部位の同定 (ChIP Seq 法) ; 3) total RNA (核、細胞質、ポリソーム画分) および miRNA のショットガン解析 (RNA Seq 法) ; 4) RNA 半減期の網羅的同定 (BRIC Seq) ; 5) Ago1 および Ago2 に結合

する miRNA、mRNA の同定 (RIP Seq 法) について、データ収集と解析を行い、低酸素刺激におけるトランスクリプトーム像の変化を網羅的、定量的に記述、解明した。各試料について、次世代シーケンサー・イルミナ HiSeq を用いて、各試料につき 1000 万ずつ、合計 10 億程度の 36bp のタグ配列を収集した。その結果、HIF-1 の標的遺伝子のうちタンパク質をコードすると考えられるもの 120 種類、また選択的プロモーターを制御すると考えられるものを 15 種類、non-coding RNA を制御すると考えられるものを 261 種類同定することができた。また興味深いことに、低酸素刺激により実際の HIF-1 の結合が誘導される以前から、多くの場合、クロマチンがオープン構造を示していることを見出し、細胞の系譜あるいは変遷を反映する形で、速やかな転写応答に必要な環境は、クロマチン構造として整備されている可能性を示唆することができた。また、クロマチン状態と RNA の局在状態の推移または RNA の分解効率を比較することにより低酸素刺激における遺伝子の発現制御が転写後制御により行われている例を見出した。本研究が遺伝子発現制御を汎トランスクリプトームレベルで解析した初めての研究成果であると考えている。

#### 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 3 件)

- ① Okuda T, Wakaguri H, Suzuki Y, Sugano S. Monitoring endoplasmic reticulum stress responsive mRNAs by RNA sequencing. Gene. 査読有、500 巻 2012、63-72  
DOI : 10.1016
- ② Tanimoto K, Tsuchihara K, Kanai A, Arauchi T, Esumi H, Suzuki Y, Sugano S. Genome-wide identification and annotation of HIF-1 $\alpha$  binding sites in two cell lines using massively parallel sequencing. Hugo J. 査読有、4 巻 2010、35-48  
DOI: 10.1007/s11568-011-9150-9.
- ③ Sathira N, Yamashita R, Tanimoto K, Kanai A, Arauchi T, Kanematsu S, Nakai K, Suzuki Y, Sugano S. Characterization of transcription start sites of putative non-coding RNAs by multifaceted use of massively paralleled sequencer. DNA Res. 査読有 17 巻 2010、169-83.  
DOI: 10.1093/dnares/dsq007.

- ④ Osada N, Suzuki Y. Evolution of Gene Expression in Human and Chimpanzee Brains, Encyclopedia of Life Science、査読有、印刷中、2013  
DOI : 10.1002.

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① Suzuki Y. Transcriptome Analysis. Poznan Summer School of Bioinformatics, 2011, Poznan, Poland. 2012.7.6.  
② Suzuki Y. Integrative Transcriptome Analysis” FIRST symposium, 2012. 3.5, Osaka, Japan.  
③ 鈴木 穰. イルミナ GA を用いたトランスクリプトーム解析、分子生物学会 2010.12.7  
神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 穰 (SUZUKI YUTAKA)  
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・  
准教授  
研究者番号 : 40323646

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :