

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 25 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23710224
 研究課題名（和文）
 心発生における転写因子-エピジェネティック因子による転写制御機構の解明
 研究課題名（英文）
 Transcription regulation by Transcription factors and Epigenetic factors
 研究代表者
 二村 圭祐（NIMURA KEISUKE）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：00462713

研究成果の概要（和文）：ゲノムにはおよそ 20,000 個の遺伝子が存在している。転写因子やエピジェネティック因子は遺伝子の選択を行う重要な因子である。これらの因子の異常によって先天性心疾患がおこる。しかし、これらの因子が心発生中にどの遺伝子を選択・制御しているか全く不明であった。今回、先天性心疾患の原因となる転写因子のゲノム上の存在領域を次世代シーケンサーによって同定し、これらの転写因子が制御している遺伝子群を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Human genome has over 20,000 genes. Transcription factors and epigenetic factors including histone modifiers, are pivotal factors for gene expression. Mutation in these genes causes congenital heart diseases. But it was still unclear which genes are regulated by these transcription factors. Here, we identified these transcription factors-binding genomic regions using next-generation sequencer, and the target genes that are regulated by these factors.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：疾患エピゲノミクス

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は全出生児の約 1% に発症する最も発症率の高い先天性疾患の 1 つである。Nkx2-5、Tbx5、GATA4 の 3 つの転写因子の変異はヒトにおいてもマウスにおいても先天性心疾患の原因となることが明らかになっているが、これらの転写因子の変異による先天性心疾患発症メカニズムはほとんど明らかになっていない。この理由として、これら 3 つの転写因子はそれぞれ相互作用して機能していることは明らかになっているが、ゲノムワイドな標的遺伝子座は不明なままであり、どのような因子と共に転写を調節しているかについても不明であることがあげられる。

先天性心疾患の発症メカニズムを理解し、新たな治療法開発の基盤を確立するためには、これらの転写因子の機能を明らかにする必要がある。そのためには、ゲノムワイドな標的遺伝子とその領域におけるヒストン修飾パターンを同定し、どのようなエピジェネティック因子と協調的に転写制御を行っているのか明らかにすることが必須である。

2. 研究の目的

先天性心疾患は新生児の約 1% に発症する頻度の高い疾患であり、転写因子やエピジェネティック因子の異常変異が発症原因の 1 つである。しかし、転写因子やエピジェネティック因子の変異が先天性心疾患を引き起

このメカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究によって先天性心疾患発症メカニズムが明らかになれば、先天性心疾患に対する新たな治療法を開発する基盤となる。

そこで、心臓発生の基盤として機能する転写因子がどのようなエピジェネティック因子と相互作用し、どこのゲノム領域の転写制御をどのように行うのか明らかにする。研究期間内には以下のことを明らかにする。

A. マウス胚の心臓における転写因子 Nkx2-5、Tbx5、GATA4 のゲノムワイドな結合領域を ChIP-Seq 法によって同定する。

B. マウス胚の心臓で転写因子 Nkx2-5、Tbx5、GATA4 と相互作用する因子、特にエピジェネティックな転写調節に関わる因子を免疫沈降法によって同定する。

C. 転写因子や関連するエピジェネティック因子による転写調節メカニズムを明らかにするため、siRNA を用いてそれぞれをノックダウンし、標的遺伝子に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

転写因子 Nkx2-5、Tbx5、GATA4 のゲノムワイドな標的領域の ChIP-Seq 法による同定。

これまでに心発生に関与する転写因子のゲノムワイドな標的領域の解析はされていない。Nkx2-5、Tbx5、GATA4 はそれぞれ相互作用し心発生を協調的に制御しており、ヒトにおける先天性心疾患の原因遺伝子であることが明らかになっている。まず、これらの先天性心疾患関連転写因子のゲノムワイドな標的領域を同定する。

i) マウス胎仔心臓を用いて Nkx2-5、Tbx5、GATA4 の抗体によってクロマチン免疫沈降を行い高速シーケンサー (SOLiD) によって結合領域を同定する。同定できた領域はさらに Real-time PCR によって確認する。抗体の特異性は胎仔心臓を用いた免疫沈降、またリコンビナントタンパク質を用いて検証する。

ii) 高速シーケンサーによって同定された転写因子の結合領域の特徴をコンピューターを用いて解析する。具体的にはまず有意な結合領域を MACS や Findpeaks などのツールによって同定し、その領域と転写開始点 (TSS) とが関連するか検討する。またプロモーターや遺伝子領域内など、どのようなゲノム領域に転写因子の結合領域があるか検討する。次に結合領域に含まれる特異的な DNA 配列を同定し、既知の転写因子の DNA 結合モチーフや新規な DNA 結合モチーフが含まれる結合領域の割合を求める。次にそれぞれの標的遺伝子がどの転写因子の組み合わせによって制御されているか明らかにするため、Nkx2-5、Tbx5、GATA4 の結合領域の重なりあわせを検討する。

iii) マウス胎仔心臓の RNA を高速シーケンサーで解析し、遺伝子の発現パターンを同定し、ChIP-seq によって得られた結合領域との相関関係を検証する。具体的には、遺伝子の発現強度と転写因子の結合している遺伝子との間で相関関係があるのか検討する。

B. 転写因子 Nkx2-5、Tbx5、GATA4 と相互作用するエピジェネティック因子の免疫沈降法による同定。

i) マウス胎仔心臓を用いて Nkx2-5、Tbx5、GATA4 の抗体によって免疫沈降を行いウエスタンブロット法によって結合因子の同定を行う。結合因子の候補として、ヒストン修飾酵素や RNA 結合性タンパク質、クロマチンリモデリング因子があげられる。また、共免疫沈降するヒストン修飾の検討も行い、結合するヒストン修飾因子とヒストン修飾パターンが関連するか検討する。

ii) 同定された結合因子が同じ複合体に含まれるのか、異なる複合体に含まれるのか検証するために心臓核抽出液を密度勾配遠心により分画し、ウエスタンブロット法によって検討する。

C. 初代培養心筋細胞の siRNA ノックダウンのシステムによる転写因子-エピジェネティック因子転写調節メカニズムの解明。

i) マウス胎仔心筋細胞において 転写因子や相互作用するエピジェネティック因子が標的遺伝子をどのように発現調節しているか明らかにするために、転写因子やエピジェネティック因子を siRNA によってノックダウンし、RNA-seq によって遺伝子の発現変動を検出する。発現変動する遺伝子と転写因子の結合領域が関連するか検討する。

ii) B で同定されたエピジェネティック因子が転写因子の標的ゲノム領域への結合自体に影響を与えているか検討するために、エピジェネティック因子をノックダウンし、転写因子の ChIP-seq を行い、結合領域が変化するか検討する。

4. 研究成果

心臓発生の基盤として機能する転写因子とエピジェネティック因子による転写制御メカニズムを明らかにすることにより、先天性心疾患の発症機構を理解し、新たな治療法開発の基盤を確立することを目的とし、A. 転写因子 Nkx2-5、Tbx5、GATA4 のゲノムワイドな標的領域の ChIP-Seq 法による同定。B. 転写因子 Nkx2-5、Tbx5、GATA4 と相互作用するエピジェネティック因子の免疫沈降法による同定。C. 初代培養心筋細胞の siRNA ノックダウンのシステムによる転写因子-エピジェネティック因子転写調節メカニズムの解明。の3点について、研究を行った。

A. 転写因子 Nkx2-5、Tbx5、GATA4 のゲノ

ムワイドな標的領域の ChIP-Seq 法による同定。においては、マウス胎仔心臓を用いて、これらの転写因子が結合する標的ゲノム領域を同定した。B. 転写因子 Nkx2-5、Tbx5、GATA4 と相互作用するエピジェネティック因子の免疫沈降法による同定。においては、マウス胎仔心臓の核抽出液を用いて、転写因子に対する抗体で免疫沈降を行い、共免疫沈降してくるエピジェネティック因子を探索した。その結果、これまでに相互作用することが明らかになっているヒストンメチル化酵素 Whsc1 などが相互作用していることが明らかになった。C. 初代培養心筋細胞の siRNA ノックダウンのシステムによる転写因子-エピジェネティック因子転写調節メカニズムの解明。については、マウス胎仔心臓から得た初代培養心筋細胞で転写因子のノックダウンを行い、RNA-seq によって発現変動する遺伝子を同定した。以上の結果より、先天性心疾患の原因となる転写因子が、どのように転写を制御し、正常な心発生に寄与しているか明らかにするための基盤を築くことができた。

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 8 件)

Takeichi M, Nimura K, Mori M, Nakagami H, Kaneda Y. The transcription factors Tbx18 and Wt1 control the epicardial epithelial-mesenchymal transition through bi-directional regulation of Slug in murine primary epicardial cells. *PLoS One*. 2013;8(2):e57829. doi: 10.1371/journal.pone.0057829. Epub 2013 Feb 28.

Mori M, Nakagami H, Rodriguez-Araujo G, Nimura K, Kaneda Y. Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. *PLoS Biol*. 2012;10(4):e1001314. doi: 10.1371/journal.pbio.1001314. Epub 2012 Apr 24.

Hatano K, Miyamoto Y, Mori M, Nimura K, Nakai Y, Nonomura N, Kaneda Y. Androgen-regulated transcriptional control of sialyltransferases in prostate cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(2):e31234. doi: 10.1371/journal.pone.0031234. Epub 2012 Feb 8.

Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M,

Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath JA, Uitto J, Kaneda Y. PDGFRalpha-positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr 19;108(16):6609-14. doi: 10.1073/pnas.1016753108. Epub 2011 Apr 4.

Kashiwagi K, Nimura K, Ura K, Kaneda Y. DNA methyltransferase 3b preferentially associates with condensed chromatin. *Nucleic Acids Res*. 2011 Feb;39(3):874-88. doi: 10.1093/nar/gkq870. Epub 2010 Oct 4.

Matsuda M, Nimura K, Shimbo T, Hamasaki T, Yamamoto T, Matsumura A, Kaneda Y. Immunogene therapy using immunomodulating HVJ-E vector augments anti-tumor effects in murine malignant glioma. *J Neurooncol*. 2011 May;103(1):19-31. doi:10.1007/s11060-010-0355-x. Epub 2010 Aug 22.

日本語総説

二村圭祐 (責任著者)

心臓発生におけるエピジェネティックな転写制御
生化学 83, 1043-1047, 2011

二村圭祐 (責任著者)、金田安史

ヒストン修飾による心臓転写因子の機能制御
Annual Review 循環器 2011 pp.17-22, 2011年

[学会発表] (計 8 件)

二村圭祐
心臓発生における転写制御機構
大阪大学生命機能研究科コロキウム
2012年10月10日
大阪

二村圭祐
Transcription regulation in heart development
生命医薬情報学連合大会
2012年10月15日~2012年10月17日
東京

二村圭祐
心発生における転写環境の解明
転写代謝システム班会議

2012年7月2日～2012年7月4日
筑波

二村圭祐
A cardiac transcription factor links chromatin
conformation to transcription termination
EMBO Conference
2012年11月17日～2012年11月20日
ドイツ

二村圭祐
心発生における転写環境の解明
若手ワークショップ@鬼怒川
2013年1月24日～2013年1月26日
栃木

二村圭祐
Transcription regulation in heart development
日本分子生物学会
2012年12月11日～2012年12月14日
福岡

6. 研究組織
(1) 研究代表者
二村 圭祐 (Nimura Keisuke)
大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00462713