

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250041

研究課題名(和文)炎症性刺激によるクロマチン構造の動的制御メカニズムの解析

研究課題名(英文)Chromatin dynamics induced by inflammatory stimulation

研究代表者

和田 洋一郎(Wada, Youichiro)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：10322033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化は、虚血性心疾患や脳血管障害を引き起こす重大な病態であり、新たな治療薬開発には、初期病変形成に關与する遺伝子の持続的な発現メカニズムの解明が必要である。特に細胞接着因子の誘導・発現を解析するため、内皮細胞を炎症性メディエーターで刺激したところ、複数の遺伝子群を同時に転写する転写複合体の存在が示唆された。本研究では、(1)クロマチン相互作用解析に相互作用変動領域の同定、(2)相互作用点に結合する転写複合体の同定、(3)構造因子に介入することによるクロマチン構造変化の制御、を実施し、染色体を越えて必要な遺伝子群の活性を制御する転写ファクトリーの存在を支持する結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Among vascular diseases, atherosclerosis is one of the most important factors of ischemic heart diseases and cerebrovascular diseases, and elucidation of the mechanism in consistent gene expression regulation of atherogenic proteins. To dissect the adhesion molecule gene regulation, we adopted a model using endothelial cells stimulated inflammatory stimulator, and presence of transcription complexes, which regulate multiple genes at the same time, was suggested. In this research, we performed (i) comprehensive chromatin interaction analysis, (ii) identification of interaction associated protein complex, (iii) intervention of chromatin structure, and it was observed that transcription factories regulated both induced and reduced genes from different chromosomes.

研究分野：内科循環病学

キーワード：転写 RNAポリメラーゼII 炎症 内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

血管疾患、とりわけ動脈硬化は、虚血性心疾患や脳血管障害を引き起こす重大な病態である。申請者は血管壁が肥厚して脂質の蓄積が進行する動脈硬化のメカニズムを解明する為、内皮細胞、マクロファージ、平滑筋を混合培養して血管壁の局所環境を再現し、慢性の炎症性刺激による内皮細胞における接着因子 VCAM1 の持続的な発現の重要性を見出した。代表的炎症性刺激である TNF alpha (TNF α) で処理したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における網羅的な遺伝子発現解析では、TNF α が 500 以上の遺伝子を系統的に活性化して白血球を動員した後、経時的に終息させた。一過性の遺伝子発現誘導の一部始終を明らかにするため、内皮細胞特異的遺伝子群のプローブをのせたマイクロアレイによって、刺激開始から 180 分まで 7.5 分おきに RNA 産生の様子を詳細に観察したところ、刺激開始数時間後の mRNA 産生に先立ち、TNF α 添加直後に始まる未熟 RNA 産生現象を見出し、そのとき RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の波が約 3.1 kb/min の速度でゲノム配列上を移動することを明らかにした。加えて、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すること、転写の進行時にはヒストン修飾やコヒーシン等のエピゲノム修飾が密接に関与していること、TNF α によって転写される複数の遺伝子が刺激によって空間的に近接することを明らかにした。これは大腸菌の転写で起こっている“活性化 Pol II が遺伝子上を個別に進む”という線型モデルと異なり、ヒト細胞では転写、スプライシング、及びヒストン修飾を同時に行う転写複合体が存在して、転写の進展に合わせてクロマチン構造がダイナミックに変動する機構が存在することを強く示唆している。また、申請者らは転写促進型のファクトリーに加え、miRNA ホスト遺伝子群が近接関係を保ちながら転写と遺伝子発現の制御が起こる、転写“抑制”ファクトリーの存在を最近報告した。上記のように、炎症刺激なら NF κ B1、また後述するように低酸素刺激なら HIF1 α 、PPAR リガンド刺激なら PPAR / 、等のように刺激に応じて特異的な転写因子を中心に構成され、関連して誘導されるべき遺伝子群を同時に転写する“スペシャライズド転写ファクトリー”の存在が明らかになり、その機能解明と治療薬開発のターゲットとしての検討が残された課題となっている。

2. 研究の目的

複数の遺伝子群を同時に転写し、発現調節領域をプロモーターに近接させる、Pol II を含んだ転写複合体の機能は、結果としてダイナミックなクロマチン構造の変化を引き起

こす。動脈硬化病変発症にあたって、慢性的な低酸素や炎症刺激によって転写装置の駆動様式が変化することで、VCAM1 等特定の遺伝子構造構造の変化が生じていることを、血管内皮細胞を用いた実験系によって報告してきた。同様の実験系において、炎症刺激にとどまらず、低酸素刺激、PPAR リガンド刺激、さらにスタチン刺激によって、即座にクロマチン構造が変動すること、この背景にも転写複合体が大きく寄与していること、を報告してきた。

転写複合体について酵母では Mediator complex という巨大な複合装置が発見されている一方、哺乳動物では申請者らのグループも含め、転写活性に基づいた転写複合体の部分同定に成功したばかりであり、ヒト細胞における転写複合体については、機能的構成要素について情報が蓄積されつつある。しかしながら、転写複合体の形成プロセス、作用時の局在、作用終了後の分解、そして本質的に介入すべきターゲット蛋白はまだ完全に解明されていない。

そこで、疾患治療ターゲットの開発を目指す本研究において、申請者らが従来からあつかってきた、血管内皮細胞の刺激誘導系を用いて、

(1) 第一に、網羅的かつ経時的なクロマチン相互作用解析によって Pol II を介した相互作用が変動する領域を同定する。

(2) 次いで、この領域に結合する転写複合体を新規解析法である iChIP・enChIP によって分離、その後プロテオーム解析によって同定する。

(3) 最終的に、複合体解析結果に基づいた介入実験によってクロマチン構造変化を制御するためのターゲットを決定する、ことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 種々のクロマチン相互作用解析による炎症刺激応答性クロマチンダイナミクスの観測

(1-1) Chromatin Interaction Analysis using Paired-End Tag sequencing (ChIA-PET)による全ゲノムクロマチン相互作用解析

転写複合体の重要な構成要素である Pol II や、コヒーシンに対する抗体を用いて、空間的に隣接した DNA 配列を含みビオチン標識したタグを挿入された Chromatin Conformation Capture (3C)産物を免疫沈降し、DNA を精製する。ビオチン標識リンカーを挿入して環状化した後、リンカーに含まれる MmeI 認識部位を用いて 20 bp 離れた部位を切断し、リンカーの両側 20 塩基の配列を含むライブラリーを調製する。外両側に高速シーケンサー用のリンカーを結合した後、

Paired End Tag (PET) sequencing によって塩基配列を同定する。

(1-2) インフォマティクスによる大量データからの解析対象領域の抽出

人為的な産物を除外した後、ゲノム上への割り付けを行い、両側の配列が 4 kb 以内の場合 self ligation 産物と見なすが、両側の配列の距離が 4 kb を越える場合、遠隔クロマチン相互作用を示すデータと考える。このように ChIA-PET を実施して刺激応答性の転写誘導開始に伴って生じるクロマチン立体構造変化を網羅的に解析し、巨大遺伝子においては一回目の転写によってクロマチン構造が刺激特異的なファクトリーの中で刻々と変化することを明らかにする。また、ファクトリーが複数の遺伝子を同時に転写することを明らかにするために、空間的に隣接関係を持つ遺伝子群を同定することによって、転写における染色体側の動態を明らかにすることが可能となる。実際 TNF α 添加後 0, 30, 60 min において Pol II を介したクロマチン相互作用は、TNF 応答性遺伝子である *ALCAM* において経時的に変化することが観察される。連携研究者の堤グループでは、この PET 配列が異なる染色体上に分かれて位置する場合について解析を進め、染色体間相互作用の候補を抽出している。

(1-3) リアルタイム PCR を用いた定量的 3C

特に重要な相互作用については、近年安定的に実施可能となった定量的な Chromatin Conformation Capture (3C) を行って経時的变化を定量的に評価する。

(1-4) 3D-FISH 法によるクロマチンダイナミクスの観測

申請者は、特定の遺伝子の promoter と enhancer に結合するプローブを設計し、それぞれ異なる蛍光で標識し、核内において FISH を行ったところ、その相互作用変化を可視化することに成功した。本研究においても、同様の手法によって、数百万個の細胞から得られたデータが示す相互作用を細胞内で確認する。

(2) 転写ファクトリーの分子基盤の解明

(2-1) iChIP・enChIP 法による複合体の単離

転写ファクトリー実体を解明するため、刺激で誘導され、他の刺激誘導性遺伝子と相互作用する発現制御領域を、近年開発された iChIP や enChIP 法を用いて単離する。特に enChIP 法ではまず、zinc-finger 蛋白質や transcription activator-like (TAL) effector 蛋白質、不活性型 Cas9 蛋白質 (dCas9) とガイド RNA (gRNA) の複合体を用いた CRISPR システムからなるタグ付き標的 DNA 配列結合分子の

解析対象細胞への発現、ホルムアルデヒド等でクロスリンク後、超音波処理または制限酵素処理等によりゲノム DNA を断片化、上記タグを認識する抗体による免疫沈降により、DNA-蛋白質複合体を単離、(4) クロスリンクをはずし、複合体中の蛋白質・DNA・RNA を濃縮する。得られた核酸はシーケンスによって同定する。

(2-2) プロテオーム解析による転写複合体の構成成分の同定

enChIP 法で単離したゲノム領域は、シーケンシングによってその相互作用の妥当性を検証する。一方蛋白質成分は、プロテオーム解析によって同定し、クロマチン構造の変動を担う転写複合体の実体を明らかにする。

4. 研究成果

網羅的クロマチン相互作用解析を 0, 30, 60 分のタイムポイントにおいて実施したところ、従来確認されていた *SAMD4A* 遺伝子領域と *TNFAIP3* との相互作用が炎症刺激によって誘導されることが確認された。また、同遺伝子領域内においても、TSS とイントロン内エンハンサーの相互作用が 30 分後には形成されており、60 分経過後も持続していた。他に炎症刺激誘導遺伝子群においても 30 分後に TSS と新たな相互作用が形成されており、その行く先はエンハンサー、隣接する遺伝子のプロモーターであり、領域依存性の遺伝子誘導メカニズムを示唆する所見であった。一方、内皮細胞の機能維持に関わる遺伝子群においては、Pol II を介した相互作用の消退が 30 分後に認められ、転写リソースの迅速な移転現象が確認された。

特に *SAMD4A* イントロン内エンハンサーに gRNA を設計し、enChIP を行い、DNA、蛋白質複合体を調製した。DNA 成分をシーケンスしたところ、*SAMD4A* が位置する染色体に留まらず、その他の接着因子やケモカインなどの炎症刺激誘導遺伝子群の TSS 領域が同定され、従来示唆されていた染色体間での相互作用が強く示唆された。

蛋白質成分の同定については、計画の途中で一度プロテオーム解析の手法を変更したことによって、計画終了時に明らかな結果を得ていないが、報告書作成時点において実験を継続しデータ取得を行っている。

以上の成果については、プロテオミクス解析が終了後転写複合体の同定として報告予定である。

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9件)

1. Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro J, Osawa T, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita J, Minami T.

- Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation, *NAR*, 2017, in press (査読有)
2. Liu Q, Niu N, Wada Y, Liu J. The Role of Cdkn1A-Interacting Zinc Finger Protein 1 (CIZ1) in DNA Replication and Pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2016 Feb 5;17(2). pii: E212. doi: 10.3390/ijms17020212. (査読有)
 3. Katsura M, Cyou-Nakamine H, Zen Q, Zen Y, Nansai H, Amagasa S, Kanki Y, Inoue T, Kaneki K, Taguchi A, Kobayashi M, Kaji T, Kodama T, Miyagawa K, Wada Y, Akimitsu N, Sone H. Effects of Chronic Low-Dose Radiation on Human Neural Progenitor Cells. *Sci Rep*. 2016 Jan 22;6:20027. doi: 10.1038/srep20027. (査読有)
 4. Liu F, Wang B, Li L, Dong F, Chen X, Li Y, Dong X, Wada Y, Kapron CM, Liu J. Low-Dose Cadmium Upregulates VEGF Expression in Lung Adenocarcinoma Cells. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Aug 28;12(9):10508-21. doi: 10.3390/ijerph120910508. (査読有)
 5. Kitazawa T, Fujisawa K, Narboux-Nême N, Arima Y, Kawamura Y, Inoue T, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Kodama T, Kim KS, Sato T, Uchijima Y, Maeda K, Miyagawa-Tomita S, Minoux M, Rijli FM, Levi G, Kurihara Y, Kurihara H. Distinct effects of Hoxa2 overexpression in cranial neural crest populations reveal that the mammalian hyomandibular-ceratohyal boundary maps within the styloid process. *Dev Biol*. 2015 Jun 15;402(2):162-74. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.04.007. Epub 2015 Apr 16. (査読有)
 6. Tanaka T, Tahara-Hanaoka S, Nabekura T, Ikeda K, Jiang S, Tsutsumi S, Inagaki T, Magoori K, Higurashi T, Takahashi H, Tachibana K, Tsurutani Y, Raza S, Anai M, Minami T, Wada Y, Yokote K, Doi T, Hamakubo T, Auwerx J, Gonzalez FJ, Nakajima A, Aburatani H, Naito M, Shibuya A, Kodama T, and Sakai J. Pparbeta/Delta Activation of Cd300a Controls Intestinal Immunity, *Scientific Reports*, 2014, vol. 4.p.5412 (査読有)
 7. Tsuchida R, Osawa T, Wang F, Nishii R, Das B, Tsuchida S, Muramatsu M, Takahashi T, Inoue T, Wada Y, Minami T, Yuasa Y, Shibuya M. BMP4/Thrombospondin-1 loop paracrinically inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors. *Oncogene*. 2014 Jul 17;33(29):3803-11. doi: 10.1038/onc.2013.358. Epub 2013 Sep 9. (査読有)
 8. Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Li G, Poh HM, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro JI, Sugiyama A, Kaneki K, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Ruan X, Aburatani H, Nangaku M, Ruan Y, Kodama T, Wada Y. Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two response elements. *Genome Biol*. 2014 Apr 10;15(4):R63. doi: 10.1186/gb-2014-15-4-r63 (査読有)
 9. Maejima T, Inoue T, Kanki Y, Kohro T, Li G, Ohta Y, Kimura H, Kobayashi K, Taguchi A, Tsutsumi S, Iwanari H, Yamamoto S, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Poh HM, Yamamoto K, Kawamura T, Mimura I, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Shibata H, Yoshinaka Y, Doi T, Asanuma A, Tanabe T, Tanaka T, Minami T, Hamakubo T, Sakai J, Nozaki N, Aburatani H, Nangaku M, Ruan X, Tanabe H, Ruan T, Ihara S, Endo A, Kodama T, Wada Y. Direct Evidence for Pitavastatin Induced Chromatin Structure Change in the *KLF4* Gene in Endothelial Cells, *PLoS One*, 2014 May 5;9(5):e96005. doi: 10.1371/journal.pone.0096005. eCollection 2014. (査読有)
- 【学会発表】(計14件)
1. 高時間分解能を達成する検体調整自動化装置、ポスター、和田洋一郎、生命動態システム科学四拠点・CREST・PRESTO・QBiC 合同シンポジウム 2017 “生命動態の分子メカニズムと数理”、理化学研究所 生命システム研究センター、(大阪府吹田市) 2017年3月17日
 2. Dynamic chromatin movement in stimulated endothelial cells suggested by interactome analysis、口演、和田洋一郎、生命動態システム科学四拠点・CREST・PRESTO・QBiC 合同シンポジウム 2017 “生命動態の分子メカニズムと数理”、理化学研究所 生命システム研究センター、(大阪府吹田市) 2017年3月17日
 3. Dynamic chromatin movement in stimulated endothelial cells suggested by interactome analysis、口演、和田洋一郎、研究会「生命動態とその数理」CREST 研究課題「細胞動態の多様性・不均一性に基づく組織構築原理の解明」、松江エクセルホテル東急(島根県松江市)、2017年2月20日
 4. Active enhancer elements in a variety of human vascular endothelial cells、ポスター、Ryuichiro Nakato, Youichiro Wada,

- Ryo Nakaki, Genta Nagae, Yuki Katou, Shuichi Tsutsumi, Takahide Kohro, Mika Kobayashi, Akashi Izumi-Taguchi, Hiromi Wada, Yasuharu Kanki, Naoki Osato, Kenji Tatsuno, Asuka Kamio, Yoko Hayashi-Takanaka, Guoliang Li, Xiaoran Ruan, Yijun Ruan, Shinzo Ohta, Masanori Aikawa, Rebecca C. McGee, Kyle W. Heppner, Tatsuo Kawakatsu, Michiru Genno, Hiroshi Yanase, Yutaka Saito, Toutai Mitsuyama, Hiroyuki Aburatani, Hiroshi Kimura, and Katsuhiko Shirahige, 国際ヒトエピゲノムコンソーシアム領域会議、CIVI 研修センター秋葉原(東京都千代田区) 2017年2月4日
5. Dynamics of chromatin structure in stimulated vascular endothelial cells、口演、和田洋一郎、第54回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場(茨城県つくば市) 2016年11月25日
 6. Dynamic chromatin movement in stimulated endothelial cells suggested by interactome analysis、口演、和田洋一郎、3D nucleome workshop(武漢)、Huazhong Agricultural University, Wuhan, China、2016年9月25日
 7. 炎症刺激におけるクロマチン構造変化を介した遺伝子発現の制御機構、和田洋一郎、口演、第17回日本分子脳神経外科学会、帝京大学板橋キャンパス本部棟(東京都板橋区)、2016年8月26日
 8. 経時的に転写プロセスを観察する4D-ヌクレオーム研究から見通す”転写・クロマチン創薬“への展望、和田洋一郎、口演、生命動態システム科学四拠点シンポジウム、東京大学大学院数理科学研究科 大講義室(東京都目黒区) 2015年12月11日
 9. Dynamic chromatin movement in stimulated endothelial cells suggested by interactome analysis、口演、和田洋一郎、日本分子生物学会ワークショップ、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、2015年12月3日
 10. A wave of nascent transcription on activated big genes in human endothelial cells、ポスター、和田洋一郎、ICRR2015、京都国際会議場(京都府京都市)、2015年5月27日
 11. エピゲノム解析の国際標準化に向けた新技術の創出、口演、和田洋一郎、応用物理学会放射線分科会医療放射線技術研究会、武田ホール(東京都文京区)、2014年12月9日
 12. 高精度クロマチン相互作用解析による転写メカニズムの解明、口演、和田洋一郎、生命ダイナミクスの数理とその応用：異分野とのさらなる融合、東京大学

- 大学院数理科学研究科大講義室(東京都目黒区) 2014年12月4日
13. ゲノム・エピゲノム解析手法による放射線影響の探索、口演、和田洋一郎、第57回日本放射線影響学会、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市) 2014年10月1日
 14. ヒト細胞に由来するエピゲノム情報の網羅的取得とその意義、口演、和田洋一郎、第57回日本腎臓学会学術集会(神奈川県横浜市) 2014年7月4日
- 〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：検体処理システム
 発明者：井原茂男、和田洋一郎
 権利者：本島和幸、加藤太輔、小野隆嗣、井原茂男、和田洋一郎
 種類：特願
 番号：2015-095034
 出願年月日：2016年5月7日
 国内外の別：国際

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.ric.u-tokyo.ac.jp/intro.html#resTop>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田洋一郎 (Wada, Youichiro)
 東京大学・アイソトープ総合センター・教授
 研究者番号：10322033

(2) 研究分担者

藤井穂高 (Fujii, Hodaka)
 大阪大学・微生物病研究所・准教授
 研究者番号：30302665

(3) 研究分担者

神吉康晴 (Kanki, Ysuharu)

東京大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号： 00535869

(4)研究分担者

興梠貴英 (Kohro, Takahide)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号： 40401046