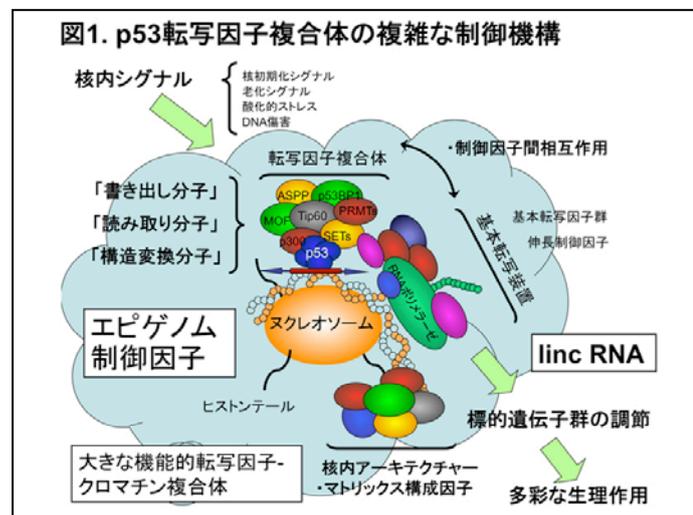


p53 転写因子複合体によるエピゲノム制御機構の解明

千葉大学大学院 医学研究院 細胞治療内科学
田中 知明

1. はじめに

「ゲノムの守護神」と称される癌抑制遺伝子p53の新たな側面として、ROS・エネルギー代謝調節以外にも、幹細胞や核初期化に関わるエピゲノム制御機能など実に多彩な生理作用をもつことがわかってきた。それに加え、転写因子p53が様々な下流遺伝子群を時間的・空間的に支配するためには、ヒストンコード仮説を支える遺伝子発現制御の分子基盤と共通のメカニズムが機能している。そこには、p53の複雑な化学修飾状態いわゆる「タンパクコード」や、リン酸化・メチル化などを引き起す修飾酵素:「書き出し分子」、コードを特異的に認識する「読み取り分子」、多くの転写共役因子、そして non-coding RNAなど、クロマチンの構造・機能調節と遺伝子発現制御に関わる複雑な分子機構が介在するが(図1)、実体はまだ多くの謎に包まれている。本研究では、p53を中心に核の初期化と細胞老化のシグナルの共通分子基盤に着目して、最先端の分子間架橋技術を応用し、巨大なp53クロマチン複合体を構成する因子群の同定を試みる。更に、次世代型シーケンサーによるゲノムスケールでの転写産物解析を有機的に結びつけ、最近注目を集めている老化ないしiPS/ES特異的非翻訳性長鎖RNA(linc RNA)の発掘とp53による多彩な生理機能発現の根底で作用する核内コードとエピゲノム制御メカニズムの本質に迫り、新たなシーズの創出を目指す。



更に、次世代型シーケンサーを用いたゲノムワイドのChIP-seq・トランスクリプトー

2. 方法

本提案では、過去に我々が確立してきた生化学的方法論と知見を更に押し進め、iPS細胞やがん幹細胞の細胞培養技術を応用し、がん幹細胞におけるp53とそのクロマチン制御の核内シグナルや、多能性獲得に必須の転写因子(Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc)における機能的クロマチン会合分子群を網羅的に同定することで、幹細胞制御の根底で作用している共通の分子群を探索し、それらの本質的分子メカニズムに迫る。更に、次世代型シーケンサーを用いたゲノムワイドのChIP-seq・トランスクリプトー

ム解析を通じて、転写因子複合体における生化学的手法とepigenetics解析を直接的にクロストークさせることで、転写因子によるクロマチン機能調節の中心的な分子群を明らかにする。

3. 結果 研究成果

まず初めに、次世代型シーケンサーによるES/iPSに特異的に発現するp53依存的なnon-coding RNAを含めた転写産物のエピジェネティクス・トランスクリプトーム制御の解析結果を示す。最近になって高速シーケンサーなどを用いた大規模なトランスクリプトーム解析が行われるようになり、たんぱく質をコードしない長鎖の

RNA(linc RNA)の同定とその解析が進んでいる。これらのlinc RNAがクロマチン制御や核内構造体の構成を介して、癌の転移や悪性化に関係しているばかりでなく、幹細胞性の機能維持や核リプログラミングにおけるiPS樹立効率や性質に重要な役割を果たすことが示唆されている(図2)。そのような背景の中、転写因子p53によって制御されるlinc RNAの報告がなされているが、その発現制御や機能など十分に明らかにされていない。正常のヒト線維芽細胞と比較して、iPS細胞(253G1)とES細胞(khES1)において2倍以上の発現(RPKM)を示すlinc RNAを解析した。その結果、iPSとESに共通するlinc RNA候補が1292遺伝子検出された(図3)。Chr5から読み出されるlinc RNAに関して、ChIP-seqを施行して、その詳細な発現プロファイル解析とepigeneticパターンを解析した。TSS解析にて転写開始点の明らかなピークを認め、RNA-seqから約102,4kbに渡る転写産物が確認された。興味深いことに転写開始点領域近傍にNanogの結合が観察され、また読み出し領域に一致して、activeヒストンコードであるAcK9-H3、3meK4-H3と同時に、repressiveヒストンコードである3meK27-H3のピークが認められた(図4)。これらの結果は、bivalentなepigenetic regulationを受けるlinc RNAの存在を示唆している。また、p53依存的にDNA傷害にて転写誘導を受けるlinc RNA候補を72遺伝子同定した。

これらの一部は、ES/iPSの pluripotency 制御に関わるものがshRNAによる機能的スクリーニング解析から確認された。

次に、生化学的な解析として、がん幹細胞・iPS細胞におけるp53クロマチン複合体に含まれる機能的分子群の網羅的同定したので、その結果を示す。従来の解析方法では、各パラメータの個別解析のため複合体としての情報

図2. LincRNA

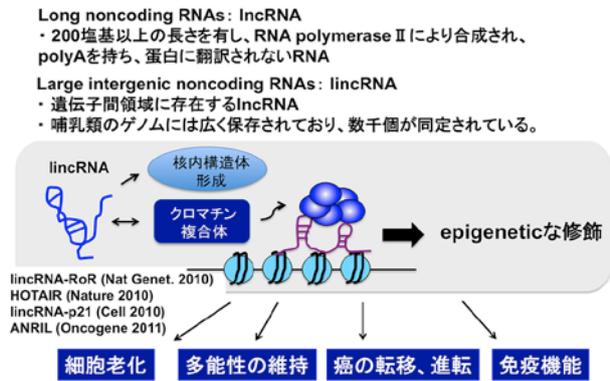
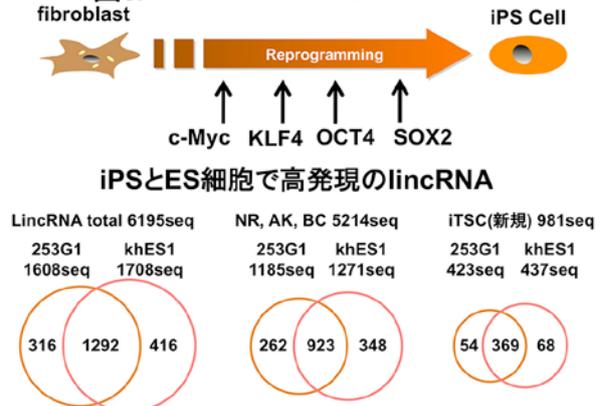
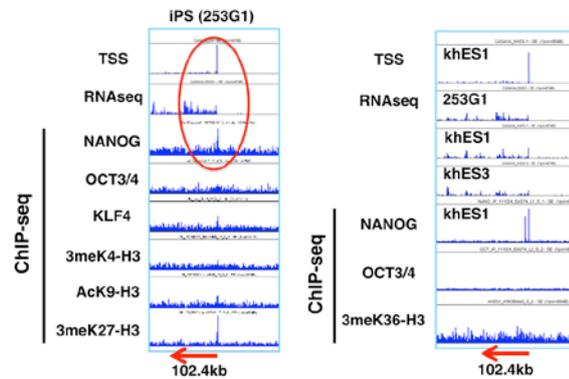


図3. Induction of iPS Cells



が失われるので、ChIPアッセイの分子間架橋技術を応用し、Sucrose Gradientによるサイズ分画を組み合わせて、p53転写因子複合体の精製を試みた。架橋剤にはformaldehydeを用いたが、この利点としてモノアーム型のためresolutionが(約2Å)非常に高いこと、リバースクロスリンクが効率良く容易に可能(酸性・60°C以上の条件下)であることが挙げられる。H1299細胞にp53WTアデノを感染させ24時間後に、細胞を回収した。細胞回収に先んじて、

図4. ChIP-seq Analysis of Nanog, OCT4, KLF4 and Epigenetics for iPS/ES-specific linc RNA Chr5 in iPS/ES Cells



in vivoでの機能的クロマチン複合体を回収するために1%のformaldehyde処理した細胞としない細胞を用意した。粗核分画を調整し、超音波処理にてDNAを平均約600bpの長さにsharingした核抽出液を、10-40%のSucrose Gradientにおいて分離を行った。20Fr.に分画し、各分画中に含まれるp53をWestern blot法にて検出した。FormaldehydeでCross-link(-)には、p53のほとんどは比較的軽い分画に認められた。一方、Cross-link(+)-には、p53複合体がSucrose Gradientを通して広く分画された。このことは、細胞内においてp53が、DNAも含め様々なmultiple cross-linkable complexesを形成していることを示している。つぎに生理的なp53発現量にコントロール可能なTet-off p53 inducible cell lineを用いて同様の実験を行った。Cross-link(+)-と(-)-を比較すると、p53のサイズ分画パターンは大きく変化しておりアデノの系と同じ結果であった。一方、アクチンの分画パターンを検討すると、Cross-link(+)-と(-)-においてほとんど差を認めなかった。このことは、cross-linkによって生じるp53複合体のサイズの変化は、過剰発現によるアーチファクトではなく、in vivoでの複合体形成を反映していることを示している。そこで、これらのサイズの異なるp53複合体がどのような標的遺伝子のプロモーターと結合しているのかを調べるため、各分画におけるp53のChIPアッセイを施行した。興味深いことに、p21WAF1やHDM2などのnon-proapoptotic gene promoterへの結合は、Sucrose Gradient全体を通して広範に検出されたのに対して、p53AIP1やPIG3などのproapoptotic gene promoterへの結合は、比較的High-sedimentingな分画にのみ検出された。これらの結果は、proapoptotic gene promoterに結合しているp53転写複合体中に特異的に含まれる分子を同定できる可能性を示している。

4. 考察 まとめ

本研究の成果として、ChIPアッセイのプロトコルを応用し生化学的手法と組み合わせることで、細胞内で生きたままクロスリンクされた転写因子のクロマチン複合体を精製し、そこに含まれる機能的な分子群を同定できることが明らかとなった。がん幹細胞やiPS細胞のクロマチンレベルでの分子制御メカニズムはほとんどわかっておらず、この方法論を応用して発見される分子や新知見は、がん幹細胞制御やiPS細胞効率化の創薬分子基盤となることが期待される。今後、網羅的分子基盤の基礎的情報やエピジ

エネティクスの統合理解を更に発展させ、エピゲノム創薬分子基盤の構築と具体的なシーズの探索、そしてトランスレーショナルリサーチへと推進する必要性がある。

5. 発表論文、参考文献

雑誌論文] (計5 件)

1. Hosokawa H*, Tanaka T*(Co-first author), Suzuki Y, Iwamura C, Ohkubo S, Endoh K, Kato M, Endo Y, Onodera A, Tumes J D, Kanai A, Sugano S, Nakayama T. Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish Th2 cell identity. Proc Natl Acad Sci USA. 12, 4691-4696 (2013) (査読有)
2. Tatsuno I, Terano T, Nakamura M, Suzuki K, Kubota K, Yamaguchi J, Yoshida T, Suzuki S, Tanaka T, Shozu M. Lifestyle and osteoporosis in middle-aged and elderly women: Chiba bone survey. Endocr J. (2013)
3. Utsumi T, Kawamura K, Imamoto T, Kamiya N, Komiya A, Suzuki S, Nagano H, Tanaka T, Nihei N, Naya Y, Suzuki H, Tatsuno I, Ichikawa T. High predictive accuracy of Aldosteronoma Resolution Score in Japanese patients with aldosterone-producing adenoma. Surgery (2012) (査読有)
4. Terano T, Suzuki S, Yoshida T, Nagano H, Hashimoto N, Mayama T, Koide H, Suyama K, Tanaka T, Yamamoto K, Tatsuno I. Glycemic control and bone metabolism in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. Diabetology International, (2012)(査読有)
5. 田中知明 p53による細胞内代謝調節機構, Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌, (2012)(査読無)