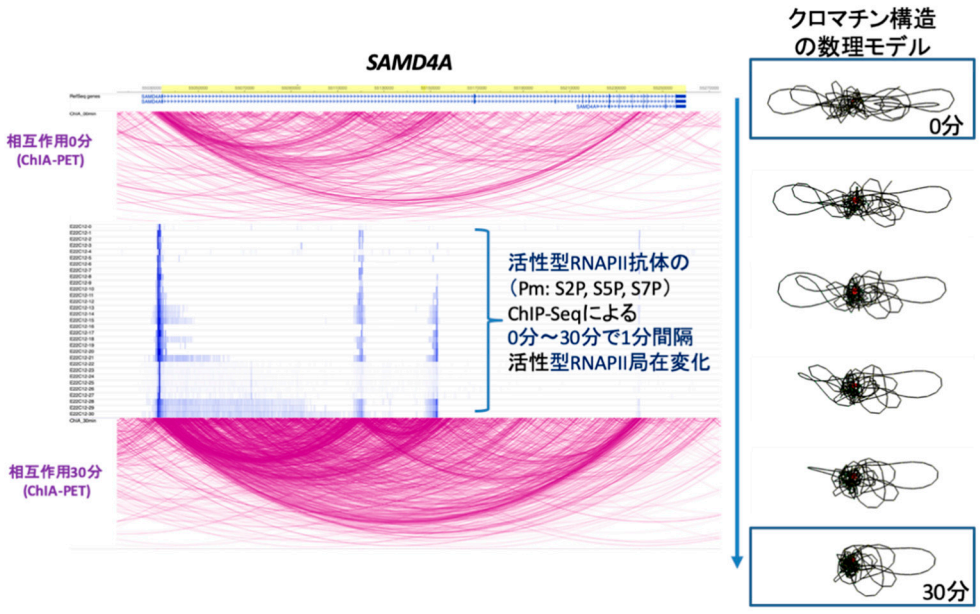
73　PolⅡを再配分して炎症刺激応答を担う転写複合体	和田　洋一郎

【目的】血管内皮細胞への炎症刺激により、RNAポリメレースⅡ（PolⅡ）を抑制される遺伝子から誘導される遺伝子へ再配分する転写複合体仮説を検証する。そのため、本研究では、1. PolⅡのChIP-Seqを1分間隔で実施し、近接する遺伝子間でのPolⅡの動員を比較し、2. captureHi-C法により経時的クロマチン構造との一貫性を確認し、3. enChIP法によりこの転写複合体の蛋白成分を同定する。

【方法】1. TNFα刺激後1分間隔でPolⅡ抗体によるChIP-Seqのための検体調製：1分時間解像度で転写を再現性良く観察するため、ChIP 検体調整自動化装置を開発し、ChIP-Seq に適した各種活性型 PolⅡ抗体を樹立する。**2. captureHi-C による時系列相互作用解析：**全 3C 産物に対して、エンハンサーやプロモーター等観察すべき相互作用領域に設計された修飾 RNA プローブをハイブリさせることによって検体を濃縮し、十分な経時的変化のデータを取得することを目指した。**3. enChIP 法による転写複合体精製：**enChIP 法を用いて転写複合体を精製・濃縮する。蛋白成分は、ショットガンプロテオミクスによって同定する。

【結果】1. TNFα刺激後1分間隔でPolⅡ抗体によるChIP-Seqのための検体調製：TNFα刺激によって誘導されるSAMD4A遺伝子領域に於いて刺激後10分頃からPolⅡの波が出現した。また、刺激23分から27分の間CTDの3カ所がリン酸化されている活性型PolⅡの結合シグナルが一旦消失し、その後28分から再度出現した。**2. captureHi-C による時系列相互作用解析：**新たなシーケンス方法（Nova-Seq）の普及により大量のシーケンスを効率的に実施し、capture を行わずとも当初目指したデータを取得することが可能となった。**3. enChIP 法による転写複合体精製：**SAMD4A 上第一イントロンにあるエンハンサー領域に設計したガイド RNA 領域から精製された DNA の配列を決定したところ、ケモカイン、接着因子など TNFα に応答して発現量が変動する遺伝子領域の配列が検出された。本報告書作成段階ではこの蛋白成分の同定を行っている。

1 分間隔 ChIP-Seq と 30 分間隔 ChIA-PET を統合して時間解像度 1 分でクロマチン構造の変化を推定する数理モデル



73. PolⅡを再配分して炎症刺激応答を担う転写複合体

和田　洋一郎

東京大学 アイソトープ総合センター／先端科学技術研究センター

Keywords：転写，RNA ポリメレースⅡ，クロマチン相互作用，数理モデル，自動化

緒　言

血管生物学、特に動脈硬化発症機序の研究において、種々のアテローム誘発因子のうち炎症刺激が引き起こす VCAM1 接着因子の持続的発現が重要であることを見いだした[1, 2]。そこで、代表的な炎症刺激因子である TNFalpha（TNFα）を用いて血管内皮細胞における網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、一過性に 500 以上の遺伝子が誘導され、その後収束する現象が観察された。これと異なる病理的な VCAM1 の持続的発現機序を解明するには、遺伝子発現プロセスを直接観察する必要があると考え、内皮細胞刺激応答性遺伝子群における RNA 産生を 7.5 分間隔で 3 時間観察した。その結果、炎症刺激開始までには転写開始点から 4 kb 下流にチェックポイントが存在し転写が途中で無効になっていること、そして mRNA 産生に先立って TNFα添加直後から始まる未熟 RNA 産生の波を見出した。RNA ポリメレースⅡ（PolⅡ）の波は巨大遺伝子上で約 3.1 kb/min の速度で移動していた［3］(Science、Editor'schoice、2009、vol.326、p917)。

観察された"転写の波"は、従来から存在が予測されていた転写複合体（図 1 上段球状構造）の存在によって良く説明され、実際に TNFαによって転写される遺伝子同士［4］、あるいは miRNA のホスト遺伝子とターゲット遺伝子［5］が空間的に近接することを確認した。炎症刺激における NFkB にとどまらず、低酸素刺激では HIF1αが［6, 7］、PPAR リガンド刺激では PPARβ/δが［7］、さらにスタチン刺激では MEF2C が［8］中心となる転写複合体によって、クロマチン構造が迅速に変動していた。

その後、ChromatinInteractionAnalysisusingPaired-EndTagsequencing（ChIA-PET）を用いて、0、30、60 分の 3 つのタイムポイントで網羅的なクロマチン相互作用解析を実施したところ、30 分迄に TNFαによって誘導されるケモカインや接着因子などの遺伝子群と、逆に 30 分までに抑制される、抗凝固作用やネットワーク構造形成、血管拡張機能に関する遺伝子群が互いに近接していることが見出された。これは従来の転写複合体仮説では説明出来ない知見であり、定常状態で使われている活性型 PolⅡが炎症性刺激に応答するための遺伝子群へと再配分される制御様式を示唆している。そこで本研究における目的の第一は、0 分から 30 分間に近接する遺伝子間で、PolⅡの集積変動を経時的に比較することによって、PolⅡが TNFαで抑制される遺伝子群から誘導される遺伝子群へ移動するモデルが妥当であることを検証することであり、そのために PolⅡの Chromatinimmunoprecipitation（ChIP）を 1 分間隔で実施する。

そして目的の第二は、このモデルが、0 分と 30 分の間で観測されるクロマチン構造を矛盾無く説明可能であることを検証することであり、そのために図 2 に示す網羅的な ChromatinConformationCapture（3C）である captureHi-C を行う。

目的の第三は、この作業仮説の基盤となる転写複合体の蛋白成分の同定であり、そのために図 3 に示す engineeredDNA-bindingmolecule-mediatedchromatin（enChIP）法によって、DNA 成分と蛋白成分を同時に精製・同定する

方法および結果

1. TNFα刺激後1分間隔でPolⅡ抗体によるChIP-Seqのための検体調製

炎症刺激による転写の波が、1分間で3 kbpのスピードで進行することから、1分の時間解像度で転写を再現性良く観察するため、ChIP検体調整自動化装置を開発した。また、ChIP-Seqに適した各種活性型PolⅡに対する抗体を樹立した。まず、PolⅡのC-terminaldomainの3カ所がリン酸化されている抗体（Pm：S2P、S5P、S7P）を用いたChIP-Seqを0分から30分にかけて行った。本実験を6回反復したが、そのうち代表的な結果を図左に示す。TNFα刺激によって誘導されることが知られているSAMD4A遺伝子領域に於いて刺激後10分頃から転写領域より始まり遺伝子下流に向けて移動するPolⅡの波が出現していることが明らかになった。また、第一イントロン内にある二つのエンハンサー領域について、上流エンハンサーでは刺激1分後から活性型PolⅡの集積が認められたが、下流のエンハンサーにおいては刺激9分頃から活性型PolⅡの結合が観察された。また、刺激23分から27分の間CTDの3カ所がリン酸化されている活性型PolⅡの結合シグナルが一旦消失し、その後28分から再度出現した。これらのデータに基づいて、1 kbpを一つのユニットとする粗視化処理と、これら粒子の間に反発力、結合力、角度ポテンシャルを仮定したうえで全てのポテンシャルを最小とする数理科学モデル作成を行った。その結果図右に示す様に従来可視化されていなかった0分から30分の間の立体構造変化を連続的に描出することができた。

2. captureHi-Cによる時系列相互作用解析

通常のHi-C実験では十分なデータを得るために数十億リードのシーケンスと大量の細胞検体が必要である。そこで、ChIA-PET データを活用し、相互作用に関わる領域だけを濃縮することによって、効率的なシーケンスであるcaptureHi-Cを計画した。精製される全3C産物に対して、エンハンサーやプロモーター等観察すべき相互作用領域に設計された修飾RNAプローブをハイブリさせることによって、検体を濃縮し、これによって数億リード（Hi-Seq2500で数レーン相当）のシーケンスで十分な経時的変化のデータを取得することを目指した。しかし本研究の開始と同時に、新たなシーケンス方法（Nova-Seq）の普及により大量のシーケンスを効率的に実施し、captureを行わずとも当初目指したデータを取得することが可能となった。そこで、本報告書作成段階では計画を変更し、新規手法による相互作用解析を行っているところである。

3. enChIP法による転写複合体精製

大阪大学の藤井らによって開発されたenChIP法を用いて転写複合体を精製・濃縮する。まず、炎症刺激応答性に相互作用が増加する領域を決定し、そこに結合するガイドRNA（gRNA）を設計、合成して細胞に導入する。次いで、二本鎖に結合したgRNAを認識する不活性型Cas9蛋白質（dCas9）とFLAGタグの複合体をターゲット領域に特異的に集積させる。任意の時点で検体を回収、DNAを断片化後、FLAGタグ抗体により免沈、濃縮する。脱クロスリンク後の DNA 配列は、ゲノム上相互作用領域を示す。蛋白成分は、ショットガンプロテオミクスによって同定する。SAMD4A上第一イントロンの下流にあるエンハンサー領域に設計したガイドRNA領域から精製されたDNAの配列を決定したところ、SAMD4A上のもう一つのエンハンサー領域の配列に加え、ケモカイン、接着因子などTNFαに応答して発現量が変動する遺伝子領域の配列が検出された。本報告書作成段階ではこの蛋白成分の同定を行っているところである。

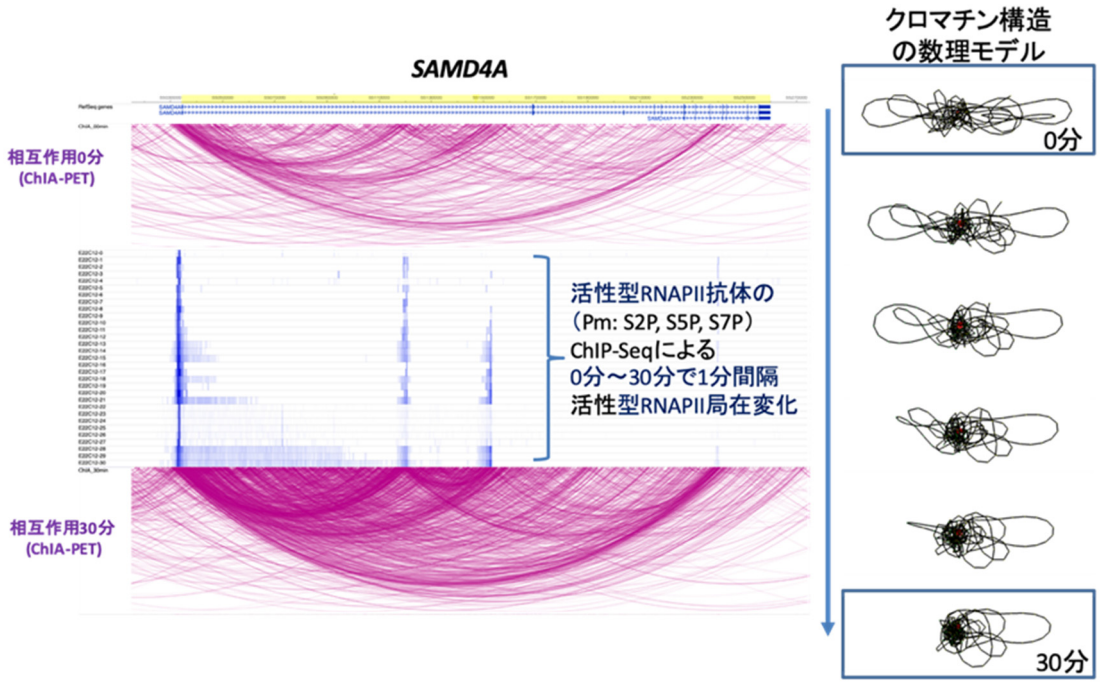


図 1. 1 分間隔 ChIP-Seq と 30 分間隔 ChIA-PET を統合して時間解像度 1 分で
クロマチン構造の変化を推定する数理モデル

考　察

内皮細胞を炎症刺激した後、1 分間隔で活性型 PolⅡ（CTD の 3 カ所がリン酸化）による ChIP-Seq を行ったところ、従来刺激 30 分以内に引き起こされるクロマチン構造変化を担う PolⅡの詳細な局在時系列変化が観察された。特に、TNFα に応答して誘導される巨大遺伝子である SAMD4A 領域において、転写開始点に由来する転写の波は刺激後 13 分頃から出現しており、今後この時間帯が時間解像度を高めた観察 window となることが示唆された。また、PolⅡの結合が検出できなくなった時間帯においては、PolⅡが空間的に近接する他の遺伝子領域で検出されている可能性と、リン酸化が同時に変化している可能性が考えられる。現在異なる CTD リン酸化パターンに対する 6 種類の抗体を作製して経時的な観察を行うと同時に、ChIA-PET によって SAMD4A と近接する可能性がある遺伝子群における PolⅡの検出パターンの解析を行っている。

PolⅡを介さない Hi-C によって、nonbias でのクロマチン相互作用の検出を試みている。今後本手法によるデータと PolⅡを介した ChIA-PET データを比較することにより、立体構造における転写装置の寄与を明らかにする事が可能となる。またこの転写装置の組成は、相互作用部位特異的な蛋白複合体解析により明らかになると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、自治医科大学の興梠貴英教授、弘前大学の藤井穂高教授、東京大学アイソトープ総合センターの中田庸一助教、川村猛准教授である。また本研究において用いた自動化装置の開発は、iBMath（代表井原茂男教授）において行われた。

文 献

1) Takaku M and Wada Y, Jinnouchi K, Takeya M, Takahashi K, Usuda H, Naito M, Kurihara H, Yazaki Y, Kumazawa Y, Okimoto Y, Umetani M, Noguchi N, Niki E, Hamakubo T, and Kodama T. (1999) An in vitro coculture model of transmigrant monocytes and foam cell formation. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 19, 2330-2339. doi:10.1161/01.atv.0000033834.57737.9b

2) Wada Y, Sugiyama A, Yamamoto T, Naito M, Noguchi N, Yokoyama S, Tsujita M, Kawabe Y, Kobayashi M, Izumi A, Kohro T, Tanaka T, Taniguchi H, Koyama H, Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y, Niki E, Hamakubo T, and Kodama T. (2002) Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 22, 1712-1719. doi:10.1161/01.atv.0000033834.57737.9b

3) Wada Y, Ohta Y, Xu M, Tsutsumi S, Minami T, Inoue K, Komura D, Kitakami J, Oshida N, Papantonis A, Izumi A, Kobayashi M, Meguro H, Kanki Y, Mimura I, Yamamoto K, Mataki C, Hamakubo T, Shirahige K, Aburatani H, Kimura H, *Kodama T, *Cook PR, Ihara S. A wave of nascent transcription on activated human genes. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 18357-18361, 2009. doi: 10.1073/pnas.0902573106

4) Papantonis A, Larkin JD, Wada Y, Ohta Y, Ihara S, Kodama T, *Cook PR. Active RNA polymerases: mobile or immobile molecular machines? PLoS Biol 8: e1000419, 2010. doi: 10.1371/journal.pbio.1000419

5) Papantonis A & Kohro T, Baboo S, Larkin JD, 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, *Cook PR. TNFα signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed. EMBO J 2012 Nov 28;31(23):4404-14. doi: 10.1038/emboj.2012.288

6) 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, *Wada Y. 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. Mol Cell Biol 32: 3018-3032, 2012. doi: 10.1128/MCB.06643-11

7) 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

8) 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.