

論文内容の要旨

論文題目

Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α)の結合部位の網羅的同定および解析

氏名 谷本 幸介

目的および手法

HIF-1 α は細胞の低酸素応答において重要な役割を担う転写因子である。本研究ではHIF-1 α 抗体により免疫沈降(ChIP)を行ったDNAを次世代型シーケンサーIllumina GAを用いてシーケンスを行い(以下 ChIP-Seq と称する)、HIF-1 α 結合部位の網羅的に同定することを試みた。Illumina GAによるシーケンスを行うことでマイクロアレイ解析よりも高分解能、高感度な解析結果が得られることを期待した。また、当研究室で開発されたオリゴキャップ法とIllumina GAによるシーケンスを組み合わせたTSS-Seq法(TSS: Transcription Start Site、転写開始点)による発現量変化解析を行い、この結果とChIP-Seq解析による結果を組み合わせることでHIF-1 α により発現制御を受ける遺伝子を特定することを試みた。オリゴキャップ法はmRNAの5'端配列を含む完全長cDNAを取得する方法であり、オリゴキャップ法によって得られたcDNAをIllumina GAによりシーケンスすることにより、各転写産物の転写開始点位置および発現量に関する情報を得ることが可能である。さらに、HIF-1 α の結合部位とエピジェネティックな制御の関連性を評価するため、リンカーDNA部分をマイクロコッカルスクレアーゼにより分解したゲノムDNAをIllumina GAでシーケンスし、ゲノムワイドにクロマチン構造解析を行った(以下 Nucleosome-Seq と称する)。本研究ではChIP-Seq、TSS-Seq、Nucleosome-Seqの融合が、HIF-1 α 結合部位のゲノムワイドな同定と解析において従来法では得られなかった知見を得るための強力な手法となりうることを示す。

材料および実験条件

細胞は、ヒト大腸由来腺がん細胞株DLD-1と、ヒト胎児肺由来正常細胞株TIG-3を使用した。培養条件は、1%O₂で24時間培養した細胞を低酸素状態、21%O₂で培養した細胞を通常酸素状態とした。

結果および考察

ChIP-Seqにより得られたシーケンス結果を元に HIF-1 α 結合部位を同定したところ、DLD-1 細胞で 531 ヶ所、TIG-3 細胞で 616 ヶ所の結合部位が得られた (表 1)。このうち、HIF-1 α の結合配列である HRE (Hypoxia Response Element)を含む結合部位は DLD-1 細胞で 441 ヶ所 (83%)、TIG-3 細胞で 413 ヶ所 (67%)であった。

表 1 HIF-1 α 結合部位数

	結合部位数	HREを含む結合部位数
DLD-1	531	441 (83%)
TIG-3	616	413 (67%)

HIF-1 α 標的遺伝子として、RefSeq 遺伝子の転写開始点の上流 10 kb から下流 1 kb に HIF-1 α 結合部位が存在する遺伝子数を集計したところ、DLD-1 細胞では 220 遺伝子、TIG-3 細胞では 185 遺伝子が得られた。DLD-1 細胞と TIG-3 細胞で重複している遺伝子は 67 種類であった (図 1A)。これらの遺伝子のうち、TSS-Seq 解析の結果を元に、低酸素状態における発現量が通常酸素状態に比べて 2 倍以上に上昇している遺伝子を集計したところ、DLD-1 細胞では 121 遺伝子、TIG-3 細胞では 48 遺伝子が該当した。このうち、DLD-1 細胞と TIG-3 細胞で重複しているものは 18 遺伝子であった (図 1B)。

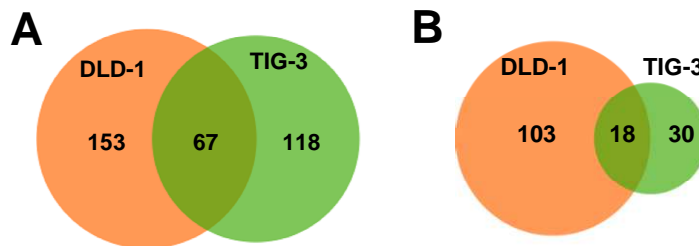


図 1 HIF-1 α 標的遺伝子数

- (A) 転写開始点の上流 10 kb から下流 1 kb に HIF-1 α 結合部位が存在した遺伝子数
(B) (A)のうち、低酸素刺激により発現量が 2 倍以上に上昇した遺伝子数

特定した HIF-1 α 標的遺伝子について、低酸素状態におかれることで引き起こされる発現量変化を TSS-Seq 解析結果を元に計算し、その分布を箱ひげ図にまとめた (図 2)。その結果、標的遺伝子の低酸素刺激による発現量変化には有意に差があり、TIG-3 細胞は DLD-1 細胞に比べて低酸素に対する応答が少ないことが示された。加えて、この結果は HIF-1 α の結合の有無と発現の活性化は必ずしも連動しないということを示唆していると考えられる。

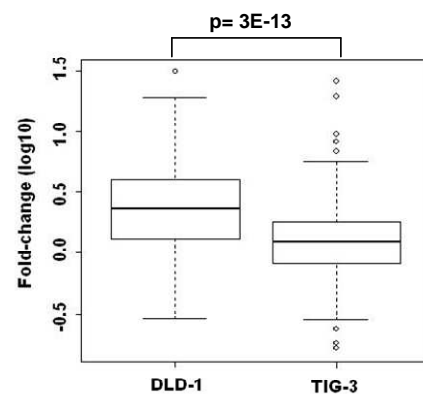


図 2 HIF-1 α 標的遺伝子の低酸素刺激による発現量変化の分布

結合部位のうち、DLD-1 細胞では 114 ヶ所がイントロン領域に、207 ヶ所が遺伝子間領域に存在した。TIG-3 細胞ではそれぞれ 155 ヶ所、289 ヶ所であった。これらの結合部位の近傍（上流 1 kb から下流 10 kb）には表 2 に示す数の転写産物が存在した。イントロンに存在する HIF-1 α 結合部位は、Alternative Promter (AP)からの転写産物の発現制御に関与する可能性が考えられる。AP から発現することでタンパク質モチーフが欠損することが予想される転写産物を InterProScan のデータから調べたところ、DLD-1 細胞において 93 の転写産物（46 遺伝子）が当てはまることが分かった。遺伝子間領域の HIF-1 α 結合部位の近傍に存在する転写産物について、FLJ または MGC の cDNA ライブラリとの重複を調べたところ、7 つの転写産物が重複していた。同様に mirBase に登録された miRNA との重複を調べたが、重複は見られなかった。このことから、HIF-1 α が制御していると考えられる遺伝子間領域の転写産物は、その多くが未知の転写産物であると考えられる。個々の機能の解明には更なる解析が必要であるが、次世代シーケンサーを用いることでイントロンや遺伝子間領域において HIF-1 α によって発現制御されると考えられる転写産物を同定することができた。

表 2 イントロンおよび遺伝子間領域に存在する HIF-1 α 結合部位とその近傍の転写産物数

		number of binding sites	hypoxia-inducible TSCs
DLD-1	intronic	114	199
	intergenic	207	262
TIG-3	intronic	155	127
	intergenic	289	105

ChIP-Seq 解析により同定された HIF-1 α 結合部位近傍のヌクレオソーム構造を Nucleosome-Seq により解析した。その結果、DLD-1 細胞、TIG-3 細胞ともに、低酸素状態において HIF-1 α が結合した部位のヌクレオソーム DNA 占有率は低下しており、結合部位は開いたヌクレオソーム構造をとっていた（図 3）。一方、通常酸素状態においても同様に HIF-1 α 結合部位のヌクレオソーム構造を調べたところ、HIF-1 α が結合していない状態にも関わらず開いた構造をとっていることが分かった。この結果は、HIF-1 α 結合部位のヌクレオソーム構造は HIF-1 α が結合することにより開いた構造に変化するわけではなく、HIF-1 α が存在しない通常酸素状態においてもすでに開いた構造を形成していることを示している。

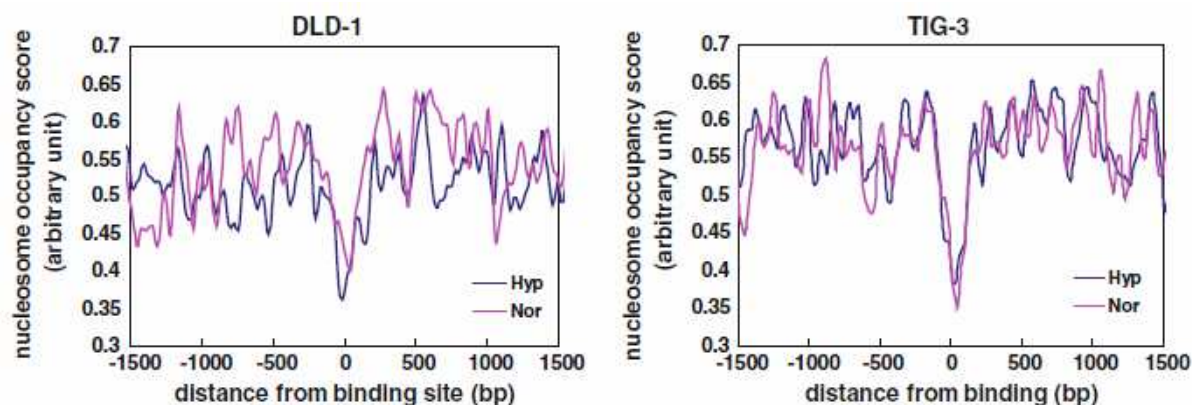


図 3 HIF-1 α 結合部位近傍のヌクレオソーム構造

赤ラインは通常酸素、青ラインは低酸素状態のヌクレオソーム占有率を示す。

結論

本研究では HIF-1 α の ChIP-Seq により HIF-1 α の結合部位を網羅的に同定することができた。得られた結合部位情報を TSS-Seq による発現量情報と組み合わせることで、HIF-1 α の結合とその遺伝子発現が必ずしも連動しているわけではなく、細胞の種類に大きく依存することを示した。さらに、HIF-1 α 結合部位のヌクレオソーム構造解析により、HIF-1 α の結合部位は低酸素状態だけでなく、通常酸素状態においても開いた構造をとっていることが判明した。これは HIF-1 α の結合選択性にエピジェネティックな制御が関与していることを示したデータである。本研究で示したように ChIP-Seq と TSS-Seq、Nucleosome-Seq を組み合わせた解析は HIF-1 α の標的遺伝子を推定するための強力なツールであり、転写制御の理解に大きく寄与出来る手法となることが期待できる。