

論文の内容の要旨

論文題目 p53 結合領域におけるヒストン修飾パターン並びに
クロマチン相互作用の網羅的解析

氏名 岡部篤史

【目的】

TP53 (以下 p53) は癌抑制遺伝子の一つとして知られる転写制御因子で、ゲノムに損傷が入るようなストレスが加わると活性化し、ゲノムに結合することで DNA 修復や細胞周期停止、アポトーシスなどの機構に関わる遺伝子を制御し、ゲノムを損傷から守っている。近年の次世代シーケンサーを用いた解析から、p53 は遺伝子から離れた領域にも多く結合することが知られているが、このような p53 結合領域の役割については十分には明らかになっていない。

本研究の目的は、癌抑制因子として知られる p53 を用いて、転写因子の結合によるダイナミクスと転写制御との関係を理解することである。特にゲノム上に結合している p53 結合領域が全て転写制御に関与しているのか明らかにすると共に、遺伝子から離れた領域に存在する結合領域がどのように転写制御に関わっているのかを明らかにすることを目的とした。そのために、p53 正常株である HCT116 細胞において抗悪性腫瘍剤 5-フルオロウラシル (5-FU) を 375 μ M、9 時間添加することで p53 を活性化させ、ChIP-seq 法により p53 の結合領域を全ゲノムで同定すると共に、活性化ポリメラーゼであるリン酸化 RNA ポリメラーゼ II (ph RNAPII) の結合領域と、H3K4me3、H3K4me1、H3K27ac の修飾領域を全ゲノムに亘り検出し、転写制御に関わる p53 結合領域を同定した。また、RNA-seq 法による近傍遺伝子の発現解析から標的遺伝子を明らかにした。クロマチン相互作用から、遺伝子から離れたエンハンサー領域におけるクロマチンダイナミクスを明らかにするため、全ゲノムでのクロマチン相互作用解析を検出する手法である ChIA-PET (chromatin interaction analysis using paired-end tag sequence) 法を行い、相互作用領域におけるヒストン修飾変化を解析した。

【結果と考察】

p53 の ChIP-seq 解析により、10002 か所の p53 結合領域を検出することができた。トリメチル化 H3K4 (H3K4me3) は遺伝子のプロモーター領域に、モノメチル化 H3K4 (H3K4me1) はエンハンサー領域に多く局在していることが報告されていることから、これらのヒストン修飾との共局在を見ることにより、p53 結合領域の分類を行った。H3K4me3 が入っている p53 結合領域 (以後、K4me3 タイプ p53 と呼ぶ) は、1625 か所あり、H3K4me1 のみが入っている p53 結合領域 (以後、K4me1 タイプ p53 と呼ぶ) は 3779 か所存在した。これらの p53 結合領域の遺伝子からの距離の分布を解析すると、K4me3 タイプ p53 は転写開始点から 1 kb 以内の領域に 67%が存在しており、それに対して K4me1 タイプ p53 は 84%が転写開始点から

1 kb 以上離れた領域に存在していた。K4me3 タイプ、K4me1 タイプの p53 結合領域が実際に遺伝子発現を制御しているのかを確認するため、U133 plus2 expression array により 5FU 刺激後の遺伝子発現を調べた。遺伝子の発現変化と各タイプの p53 結合領域の有無を調べることで、発現が上昇している遺伝子の転写開始点の 1 kb 以内には K4me3 タイプ p53 の結合が有意に高頻度に出現していることがわかった。また、発現上昇遺伝子から 10 kb 以内の領域において K4me1 タイプの p53 結合が有意に高頻度に出現していることが確認された。

各タイプの p53 結合領域の中で、5-FU 刺激によって活性化する領域を同定するため、K4me3 タイプ p53 結合領域を H3K27ac の変化によって 4 つに分類を行った。H3K27ac の ChIP signal が 1.5 倍以上に上昇し、5-FU 刺激後に 20 以上になる領域を class I プロモーター領域、H3K27ac の値が 1.5 倍以上に上昇するものの、5-FU 刺激後でも 20 以下である領域を class II プロモーター領域、5-FU 刺激前から H3K27ac シグナルが高い状態で変化していない領域を class III プロモーター領域、H3K27ac が刺激前より低い状態であり、変化していない領域を class IV プロモーター領域とした。また、K4me1 タイプ p53 結合領域も同様の方法で 4 つに分類を行い、それぞれ class V エンハンサー領域、class VI エンハンサー領域、class VII エンハンサー領域、class VIII エンハンサー領域とした。

K4me3 タイプ p53 結合領域について詳細に解析を行うと、class I、class II 領域における H3K27ac の上昇は p53 依存的なものであることが示された。更に、これらの領域には p53 依存的に ph RNAPII の誘導されていることがわかった。近傍の遺伝子の発現との関連を見ると、class I、class II 領域は他のクラスと比較して、5-FU 刺激により発現上昇する遺伝子の近傍に、有意に高い頻度で存在することがわかった。このことから、H3K27ac が上昇する K4me3 タイプ p53 結合領域はプロモーターとして転写を活性化していることが示唆された。

次に K4me1 タイプについて詳細に解析を行うと、class V、class VI 領域における H3K27ac の上昇は p53 依存的なものであることがわかった。また、この領域では p53 依存的な ph RNAPII の誘導が観察されると共に、活性化エンハンサー領域で転写が確認されるエンハンサーRNA の転写が確認された。また、近傍の遺伝子の発現との関連を見ると、class V、class VI 領域は他のクラスと比較して、5-FU 刺激により発現上昇する遺伝子の近傍に、有意に高い頻度で存在することがわかった。このことから、H3K27ac が上昇する K4me1 タイプ p53 結合領域はエンハンサーとして転写を活性化していることが示唆された。

これまでの結果から、転写制御に関与している、H3K27ac が上昇する p53 結合領域について、標的遺伝子の探索を行った。H3K27ac が 1.5 倍以上上昇する K4me3 タイプ p53 結合領域 (class I、class II) から 3 kb 以内に存在し、発現が RPKM で 2 倍以上上昇する遺伝子を K4me3 タイプ p53 結合領域の標的とした。また、H3K27ac が 1.5 倍以上上昇する K4me1 タイプ p53 結合領域 (class V、class VI) から 100 kb 以内に存在し、発現が RPKM で 2 倍以上上昇する遺伝子を K4me1 タイプ p53 結合領域の標的とした。近傍に K4me3 タイプの p53 結

合領域のみが確認される活性化遺伝子は 51 個同定され、K4me3 タイプ、K4me1 タイプ共に確認される活性化遺伝子は 29 個同定された。プロモーター領域に K4me3 タイプの結合が確認できる 80 個の標的候補遺伝子のうち、46 個は既知の p53 標的遺伝子であった。K4me1 タイプの p53 結合領域のみが確認される活性化遺伝子は 129 個同定された。これらの K4me1 タイプの p53 結合領域が近傍に見られる標的遺伝子では、発現解析から p53 依存的な発現変化が報告されている遺伝子も含まれていたが、その多くは p53 標的として未報告の遺伝子であった。今回の解析により同定された標的候補遺伝子の機能を明らかにするため、DAVID を用いて Gene Ontology 解析を行った。標的候補全体ではアポトーシスや細胞周期制御、DNA 損傷応答の遺伝子群が有意に濃縮していた。K4me1 タイプの p53 結合のみによって制御されていると考えられる標的候補についても同様の傾向を示していた。

今回エンハンサー領域として同定を行った K4me1 タイプ p53 結合領域が標的遺伝子に直接作用していることを証明するため、ChIA-PET 法を行い、全ゲノムでクロマチン相互作用を検出した。今回の解析により、K4me1 タイプ p53 結合領域と H3K4me3 領域（転写プロモーター領域）との相互作用を 93 個検出することができた。相互作用が確認された K4me1 タイプ p53 結合領域においては、p53+/+の細胞でのみ H3K27 のアセチル化と ph RNAPII の結合が確認された。また、eRNA の転写が認められた。p53-/-細胞では H3K27 のアセチル化も ph RNAPII の結合も認められなかった。一方、K4me1 タイプ p53 結合領域との相互作用が確認された H3K4me3 領域では、p53 が結合している領域では p53+/+細胞のみで H3K27 のアセチル化と ph RNAPII の結合上昇が認められたが、p53 が結合していない場合、ph RNAPII のシグナル上昇は確認できるものの、H3K27 のアセチル化は p53-/-細胞でより強い傾向が認められた。

93 個の K4me1 タイプ p53 結合領域と H3K4me3 領域間の相互作用から、p53 結合エンハンサー領域と相互作用している遺伝子を同定した。TSS に p53 の結合が認められる相互作用遺伝子を 20 個、TSS に p53 の結合がない相互作用遺伝子を 22 個同定した。発現が 2 倍以上上昇している遺伝子は 10 個認められ、このうち 8 個は 3 章において ChIP-seq 解析から同定された p53 標的遺伝子であった。各クラスに分類を行った p53 結合領域が、どの程度相互作用と関連しているのか明らかにするため、ChIA-PET で検出された相互作用領域との重なる割合を調べた。特に、class V、class VII が相互作用領域と重なる割合が 20 %以上と他のクラスと比較して高いことがわかった。このことから、エンハンサー領域における相互作用と H3K27ac は相関していることが示唆された。

今回 ChIA-PET 法によって検出されたクロマチン相互作用領域について、3C (chromosome conformation capture) 法によって相互作用の確認を行った。CDKN1A、PTPRE 遺伝子領域において、5-FU 刺激後に相互作用が強くなっていることが確認された。さらに、ChIA-PET による相互作用のうち 19 領域において 3C 法による確認を行い、14 か所において相互作用を確認した。以上の結果から、今回 ChIA-PET 法により検出できた p53 による相互作用は、得られた数は少なかったものの、有意な結果であったと考えられる。今後、

クロマチン相互作用を検出することにより、ChIP-seq 解析だけでは見つからない p53 の標的を探索するだけでなく、転写機構を明らかにすることができると期待される。

【結論】

本研究により、H3K27 アセチル化の変化によって転写制御に関わる p53 結合領域を同定することができ、H3K4 のメチル化状態と組み合わせることで、p53 結合プロモーター領域を 700 か所、p53 結合エンハンサー領域を 3029 か所同定することができた。また、p53 の標的遺伝子として 209 個を同定し、そのうち 158 個は p53 結合エンハンサー領域の標的遺伝子として同定した。さらに、その中から新規の p53 標的遺伝子を 141 個同定した。さらに、p53 結合エンハンサー領域が標的遺伝子の転写開始点とループ構造をとることで標的の転写を制御していることが明らかとなった。