

分子生命科学

Shinpei Kawaoka (Charlie)

Group leader, Contextual Biology Group,
JST ERATO SATO Live Bio-forecasting project

Senior Researcher, Disease Dynamics group
The Thomas N. Sato BioMEC-X Laboratories

Advanced Telecommunication Research International (ATR)

講義の目的

- 複製、転写、翻訳、代謝、シグナル伝達などの基礎知識
- ゲノム以外のオミクスデータの基礎知識
- ゲノムデータを扱う上での遺伝学、進化学の基礎知識

を理解する

(修正)以下の流れを説明するための基礎知識解説を盛り込みました

- ・ 比較的最新の創薬の流れの一部を理解する、というモチベーションで講義をすすめます
- ・ そういういった現場の研究に、今回の実習で習ったNGS解析がどのように使われているかを理解することも目指します

疾患とエピジェネティクス

- せっかくなので、ChIP-seqを使った実験がどんなふうに役立ったか、役に立ちつつあるか、ということを、河岡自身の体験談などに基づいて説明
- 上記を説明する、という文脈で、基本的な知識を解説
- 仲野徹先生の「エピジェネティクス」おすすめです

ジェネティクス、エピジェネティクス

- ・ ジェネティックな変異—DNA配列そのものの変異
- ・ エピジェネティックな変異—DNA配列の変化を伴わない、DNA周辺環境の変化 (DNAのメチル化とか、ヒストンの修飾とか)

用語解説: DNA/ジェネティクス

- 生命の設計図配列そのものを構成するATGCの組み合わせ。DNAからRNAが読み取られてRNAがRNAとして働いたり、RNAがタンパク質に翻訳されて働いたりする。
- ジェネティクス(Genetics)というのは、DNA配列そのものを改変してその効果(表現型)を見ることで、元の配列の機能をしろう、という枠組み

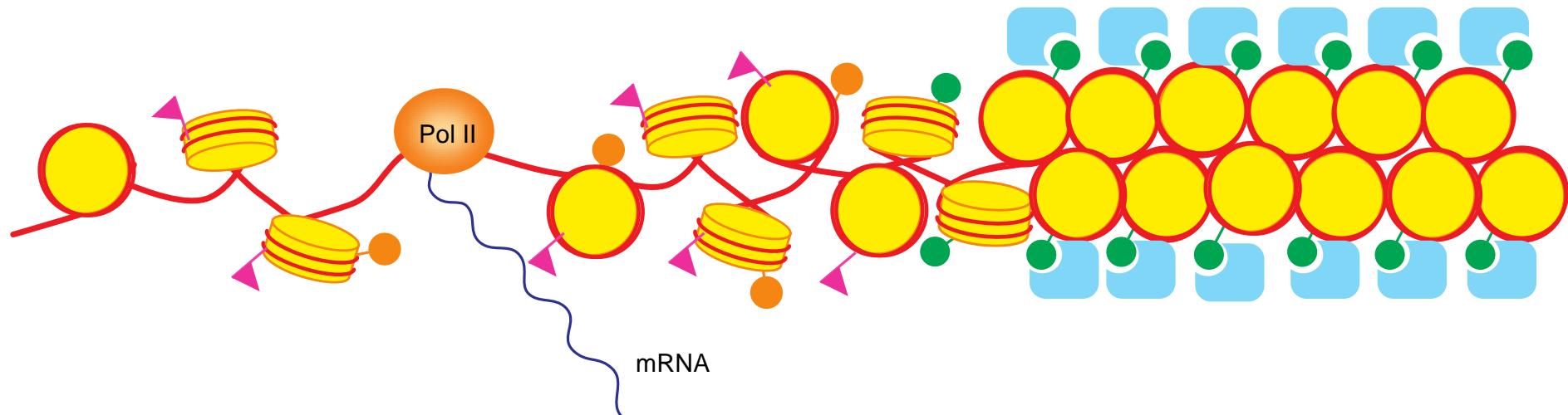
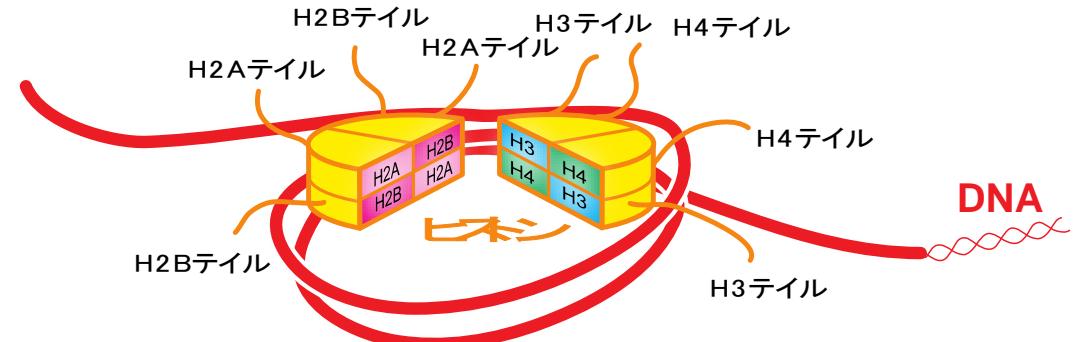
用語解説: エピジェネティクス

- 組み換えの起こる免疫細胞などをのぞき、基本的には、私たちのからだに含まれる細胞が持っているDNA配列は同じもの。同じDNA配列をもつた細胞が、皮膚になったり髪になったりする。
- それは、DNAの読み取り方が細胞によって違うから。その基盤になっているのが、DNAがまきついているタンパク質群やDNAそのものの修飾状況の違い

用語解説: エピジェネティクス

- DNAはヒストンタンパク質に巻き付いているし、DNAそのものが転写因子に結合したり、ヒストンが別のタンパク質に結合することで、「DNAの周りの状況」が決まる。例えばヒストンのあるアミノ酸がアセチル化されていると、Brd4等の転写活性化タンパク質が結合できるが、メチル化されているとそれが起こらない、といったしくみ。
- 以上のように、DNA配列そのものは同じでも、ヒストンの状態などのいろんなコンテクストで、DNAの読み取られ方が変わる。そういうことを扱うのがエピジェネティクス。

ざっくり説明すると



分かりやすい例として、がん

- がん(悪性腫瘍)の発生には、染色体転座などによる新たながん遺伝子の登場(BCR-ABLなど)、ポテンシャルながん遺伝子の制御異常(例えばMycの過剰発現)、がん抑制遺伝子の変異、不活性化(例えばp53など)が伴うことが知られている。基本的に、このようなgeneticな変異は、巻き戻すことができない。

疾患に特異的なエピジェネティックな変化

- DNAメチル化プロフィールの変化 (DNAメチル化は基本的に当該領域の転写を負に制御すると考えられている)
- エンハンサーのレパートリーの変化 (疾患特異的なエンハンサー)
- エピジェネティックな制御を行う遺伝子の変化 (そもそも白血病などでは、エピジェネティックな制御を行う遺伝子のジェネティックな変異がその原因になっているケースが多い)

用語解説: DNAメチル化

- DNAのシトシン(C)がメチル化されると、転写を負に制御するタンパク質群が結合するようになる。ほ乳類の場合、CpG islandといって、シトシンの隣にグアニンがくるようなシトシンがメチル化されることが多い。
- アデニンもメチル化されるが、CpGのCのメチル化がメジャー。がんの場合、がんを殺してしまうような遺伝子がメチル化されてsilenceされる、というようなことがよくある。

Genetic=(基本的には)irreversible

Epigenetic=reversible

- 上記のような考えが、「エピジェネティックな変化」をターゲットにして疾患を治療したらいいんじゃないいか、という考えを産んでいる（もののひとつである）

用語解説: Genetic=irreversible?

- エピジェネティクスの研究者と話すとだいたいこの話が出てくるが、最近の「ゲノム編集技術」の発達によって、「がん化につながる変異を修正する」ようなことが可能になりつつある。ゲノム編集技術(TALENやZinc finger、最新版でノーベル賞確実なCRISPR)の発達は今、生物学の枠組みを大きく変えようとしているので、研究者を目指す方はフォローしておくと良いと思います。

エピジェネティクスと創薬の (ポテンシャルな)成功例について紹 介

- キーワード: RNAi、RNAiスクリーニング、クロマチン制御タンパク質、Brd4、JQ1/iBET、エンハンサー、エンハンサーセラピー

薬のターゲットはどうやって探すのか？

- RNAiスクリーニング
- 仮説ベース
- 化合物ライブラリー

RNAiスクリーニング

- ビデオ
(<https://www.youtube.com/watch?v=QMoeqCBoljQ>)を見る

そもそもRNAiの仕組み

- エフェクタータンパク質Argonaute (イメージ:はさみ)
- Agoをガイドすることのできる小さなRNA

そもそもRNAiの仕組み

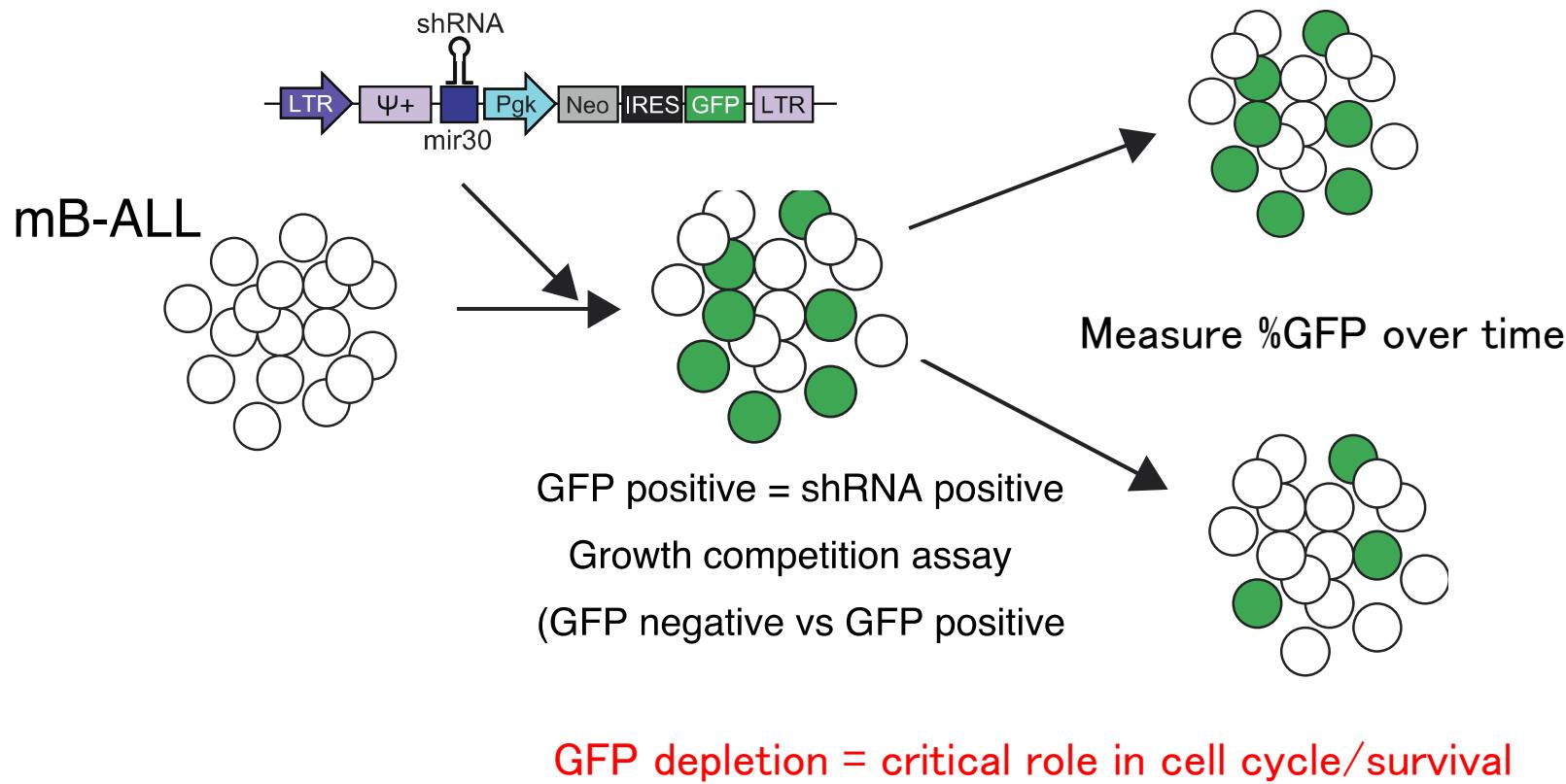
- ガイドの小さなRNAの配列をこちらでデザインしてやれば、自分の好きな配列をターゲットすることができる

用語解説: RNA interference (RNAi)

- RNAi経路では、小さな20塩基程度のRNAがヌクレアーゼ(核酸切断酵素)であるArgonauteに結合し、自分に似た配列のRNAを切断させる
- この特徴を活かして、Argonauteタンパク質に自分が切斷したい小さなRNAを結合させ、標的のRNAを切斷させることによって、遺伝子発現を人為的に操ることができます
- RNAi自体は2006年ノーベル賞受賞で、RNAiを利用した実験技術は生物学を変えました

How RNAi screen works

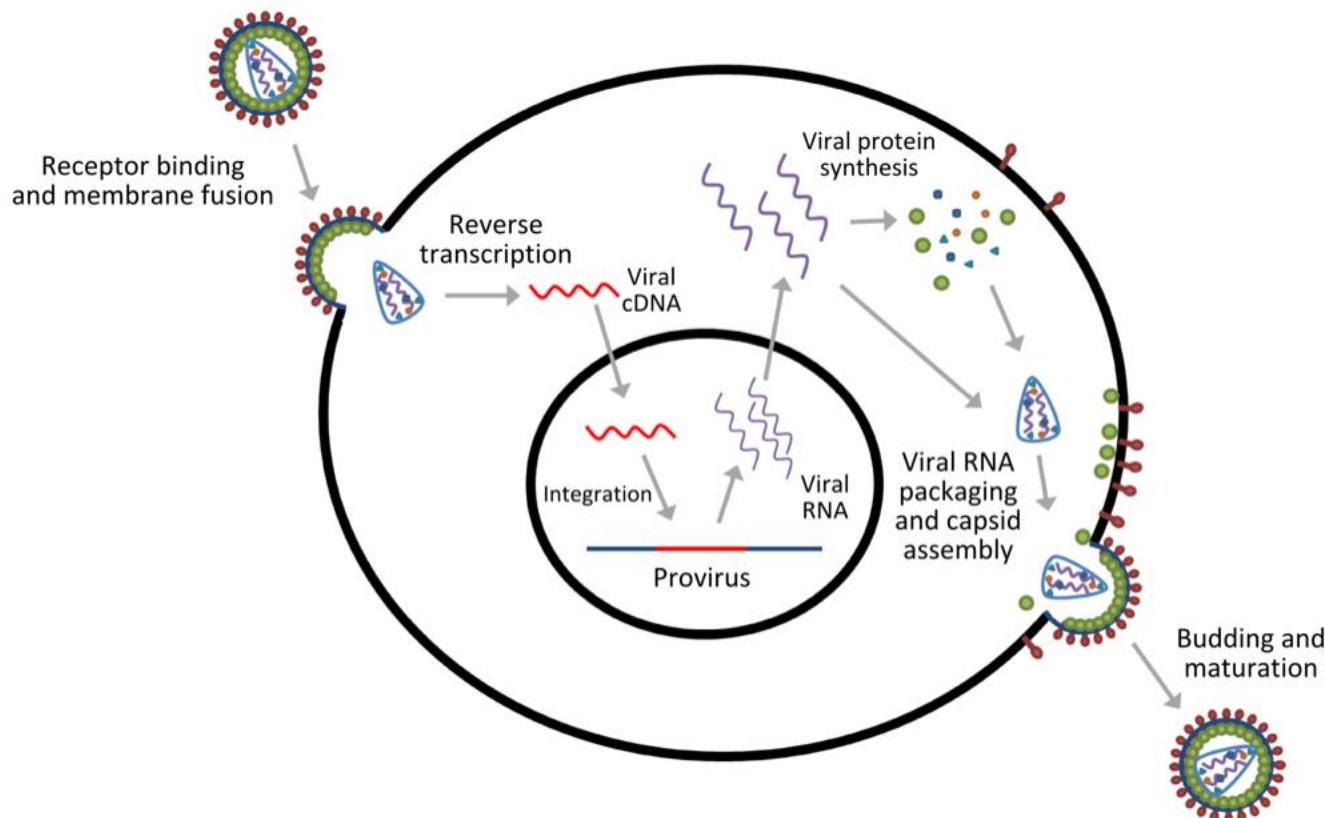
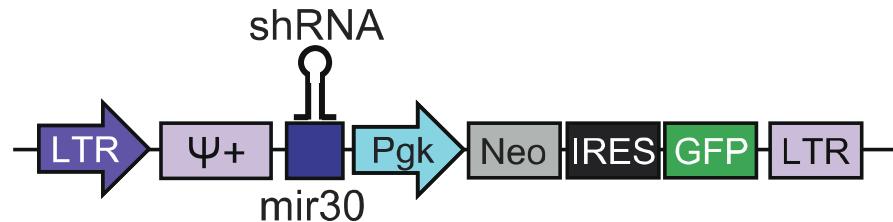
Retroviral vector harboring a shRNA and GFP



1. Measure %GFP on day2 and day12 by flow cytometry
2. Score “GFP fold depletion” by day2/day12

レトロウイルスベクター

Retrovial vector harboring a shRNA and GFP



<http://www.labome.com/method/Nucleic-Acid-Delivery-Lentiviral-and-Retroviral-Vectors.html>

用語解説: ベクター

- ・ベクター=運び屋。培養細胞なり個体になりに自分が発現させたいものを人為的に運んでもらうときを使うもの。講義で登場したのは「レトロウイルス」ベクターで、細胞に感染すると自身を宿主のゲノムに組み込む性質のあるレトロウイルスを利用して、細胞にRNAiに必要な小さなRNAのひな形をGFP(緑色)とともに組み込んでいる。小さなRNA(この場合short hairpin RNA (shRNA))がたたく遺伝子が細胞の生存に必須なら、GFPで光る細胞が死ぬ。

がん細胞のサバイバルに必須な 遺伝子を探す

- 同じことをいろいろな細胞種に対して行うこと
で、がん細胞は殺すけれども正常細胞は殺さ
ない、というようなファクターを探すことが可能

化合物ライブラリー 「かたち」が分かっていることの重要性

The SGC logo (SGC) is displayed next to the University of Toronto and University of Oxford logos. A search bar and navigation links (News, Careers, Publications, Contact) are visible. Below the header, a large banner features a 3D molecular model with various colored regions (orange, red, blue, green, yellow) representing different chemical groups or binding sites. To the left of the banner, a sidebar contains the heading "About" and the text: "The SGC is a public-private partnership that supports the discovery of new medicines through open access research."

<http://www.thesgc.org>

用語解説: ライブラリー

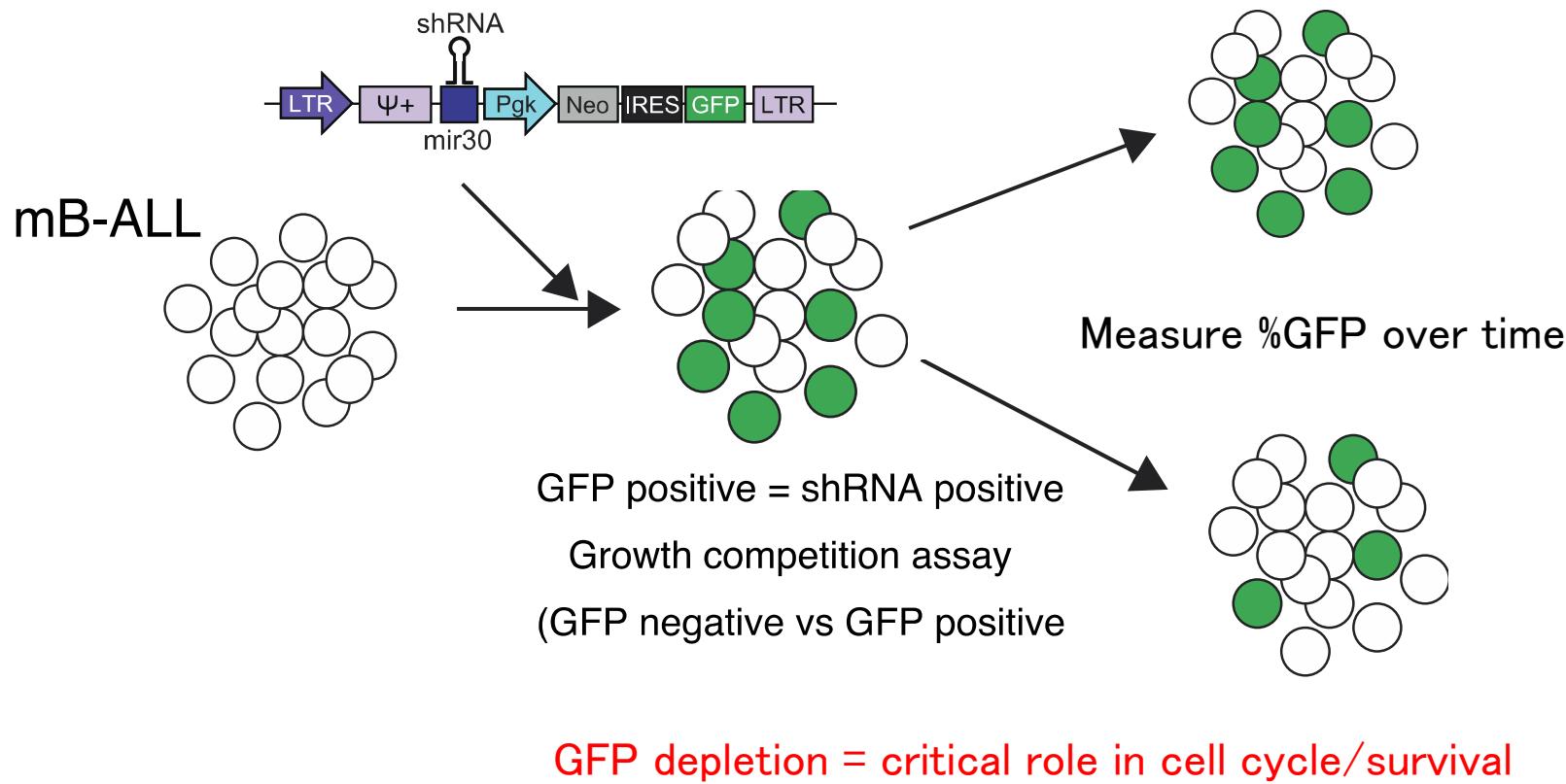
- 生物で良く出てくる言葉。RNA-seqライブラリー、ChIP-seqライブラリー、化合物ライブラリー、RNAiライブラリー...要は何かのものの集合をさしていると思えばいいです。化合物ライブラリーは、たくさんの化合物の集まりです。ただそれだけです。

仮説ベースの考え方

- これをたたけばいいんじゃないか、という仮説に基づいてとりあえずやってみる
- (主観)誰かがこれを見つけた、という情報を得て後だしでやっているように見えるときもある。。。。

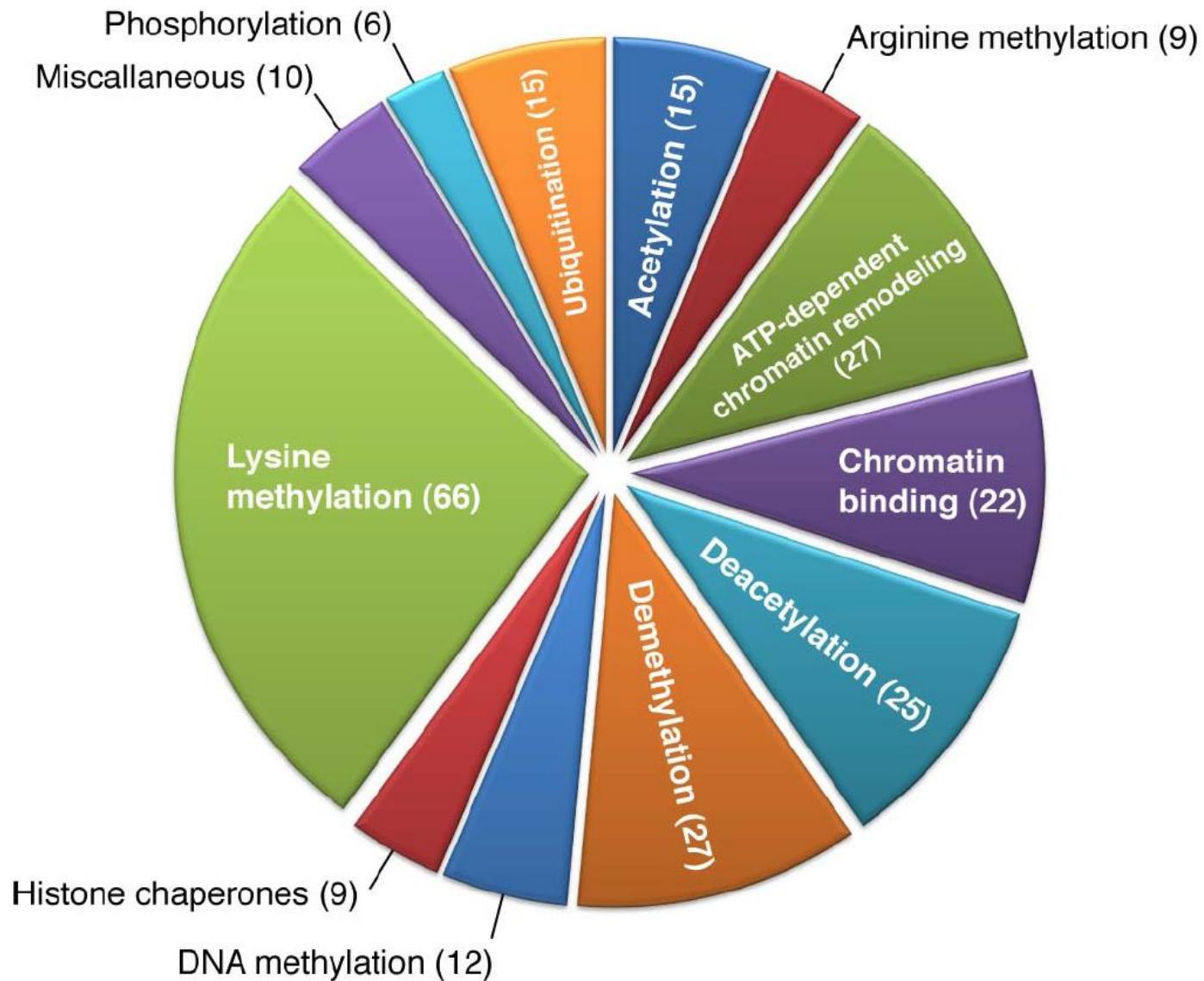
How RNAi screen works

Retroviral vector harboring a shRNA and GFP



1. Measure %GFP on day2 and day12 by flow cytometry
2. Score “GFP fold depletion” by day2/day12

クロマチン制御因子

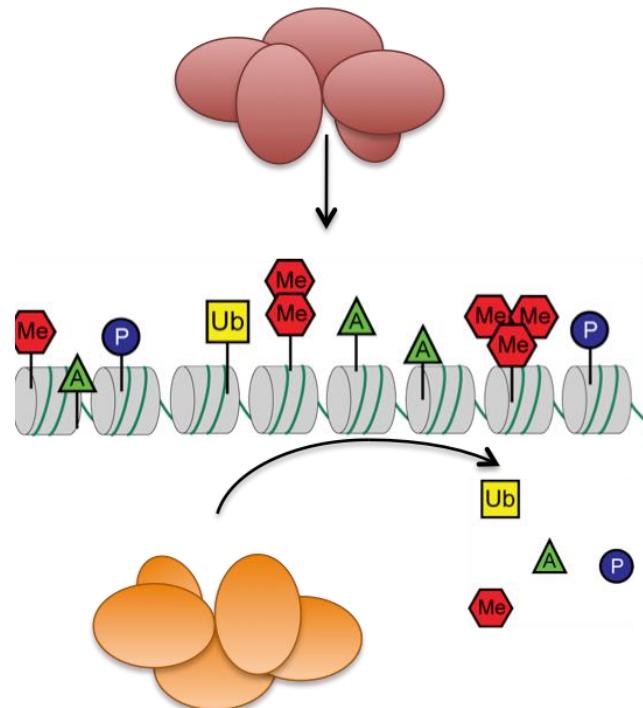


用語解説: クロマチン

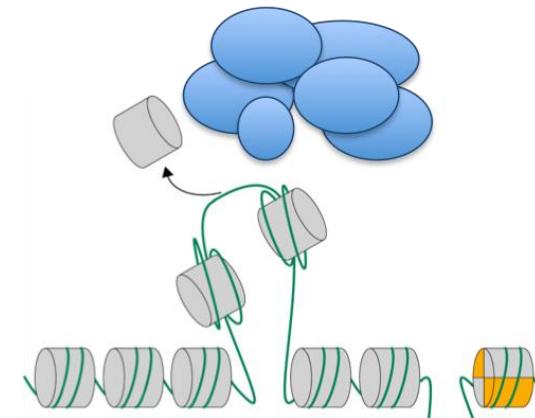
- DNAとタンパク質の複合体全般をさします。Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)は、クロマチンに含まれるタンパク質をimmuno(免疫)precipitation(沈降/沈殿)させ、結合しているDNAの配列を読む方法論のことでした。DNAがたくさん落ちてきた場所にはタンパク質がいたはずだ、っていう理屈です。

クロマチン制御因子

‘Writers’

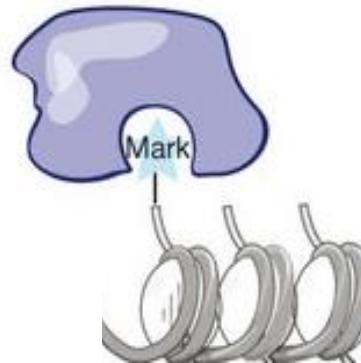


‘Remodelers’



‘Erasers’

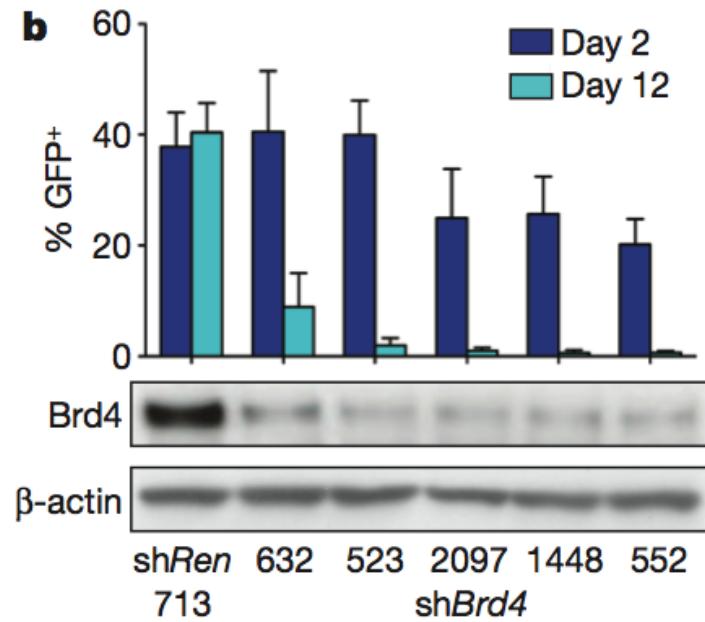
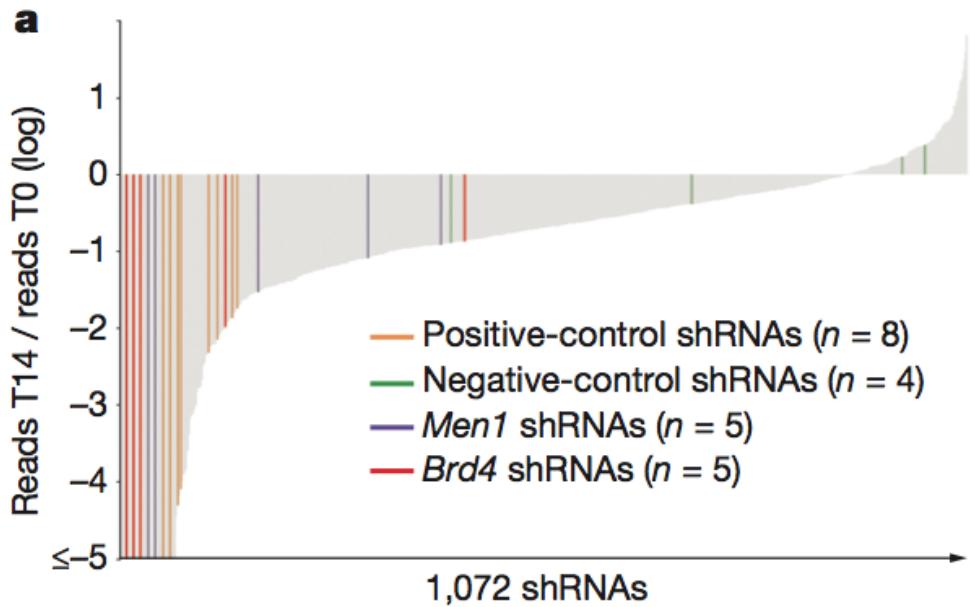
‘Readers’



用語解説: クロマチン制御因子

- Writer: クロマチンタンパク質(例えばヒストン)に修飾を施して、DNAの周辺環境を変化させるタンパク質のこと
- Remodeler: (多くの場合)ATP依存的にクロマチンの構造を変化させるタンパク質。ATPはアデノシン三リン酸、エネルギー通貨、と学校で習いますよね。
- Eraser: Writerの逆をいくやつで、クロマチンタンパク質の修飾を解除するタンパク質のこと
- Reader: 上記3タイプのクロマチン制御因子がセットアップしたクロマチンの状態を「読む」ものたち。要は結合タンパク質です。Brd4はアセチル化されたヒストンに結合するReader。この場合のWriterはp300というヒストンアセチルトランスフェラーゼ。Eraserはデアセチラーゼです。デ、ってついたら、「どる」ってことです。

RNAiスクリーニングの実際 (Zuber et al., 2011 Nature)

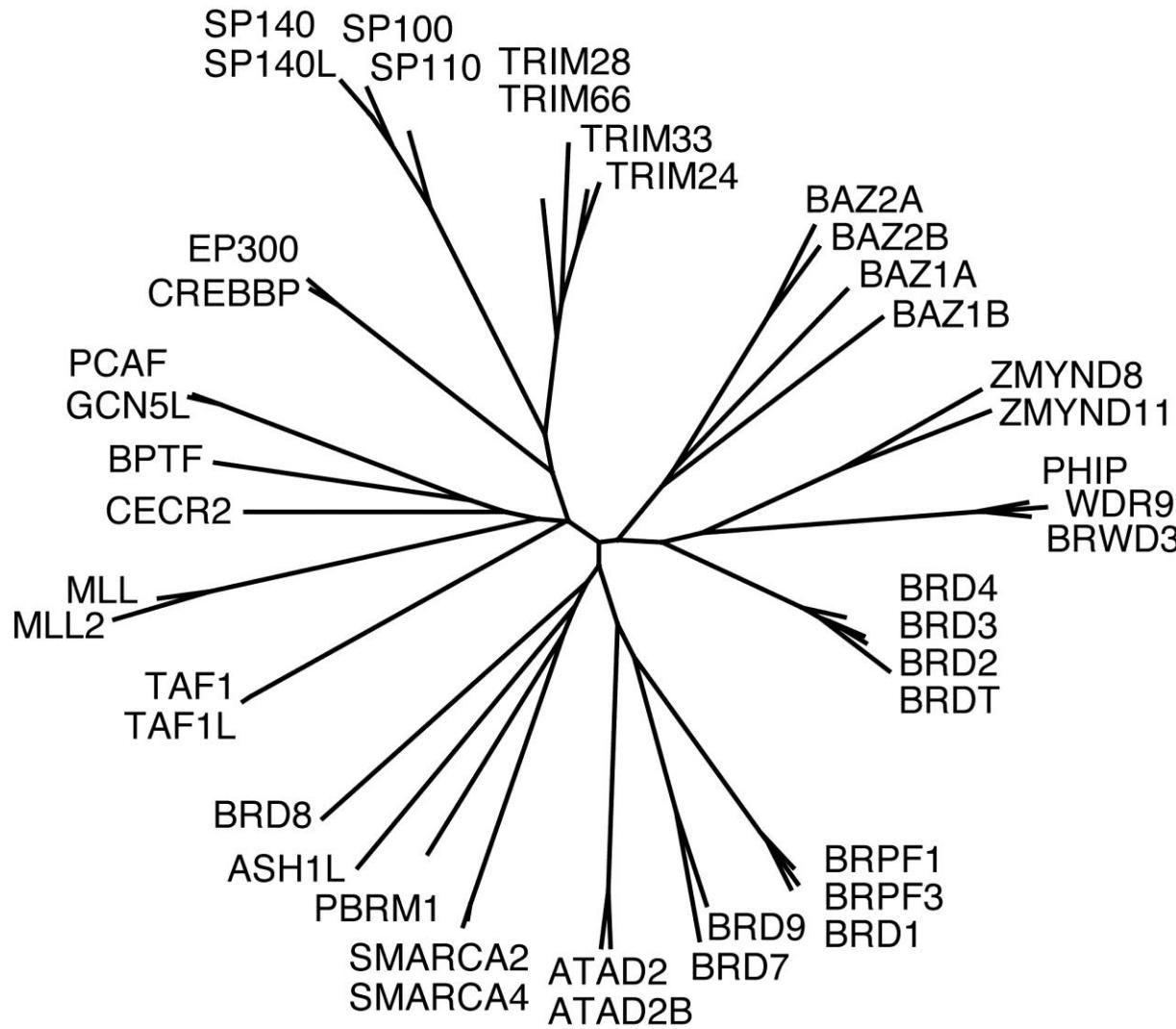


Zuber et al., 2011 Nature

用語解説: スクリーニング

- ライブラリの中から「探し出す」ということ。スクリーニングで何か面白いものを探せたときに、「釣った」なんていいます。英語でも、fishing、というひとがいますね。

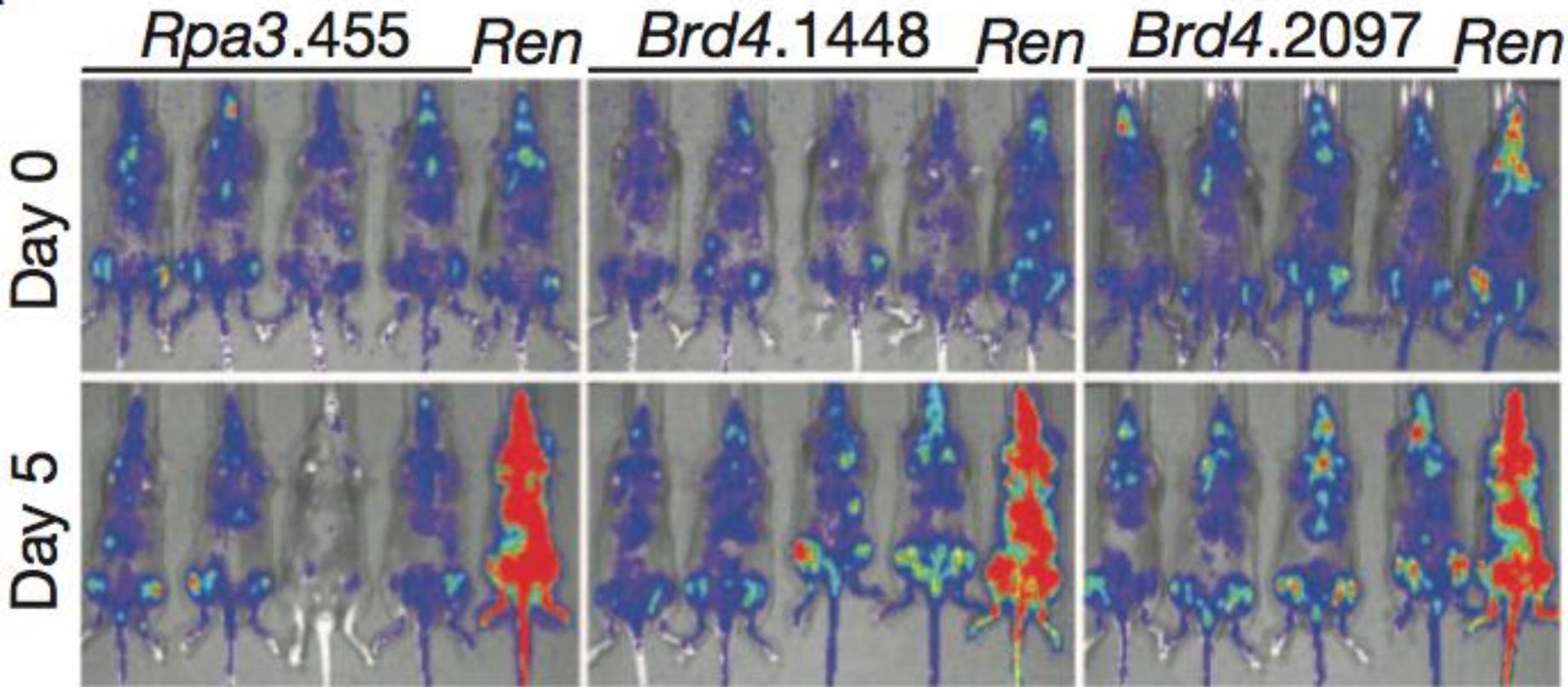
ブロモドメインタンパク質



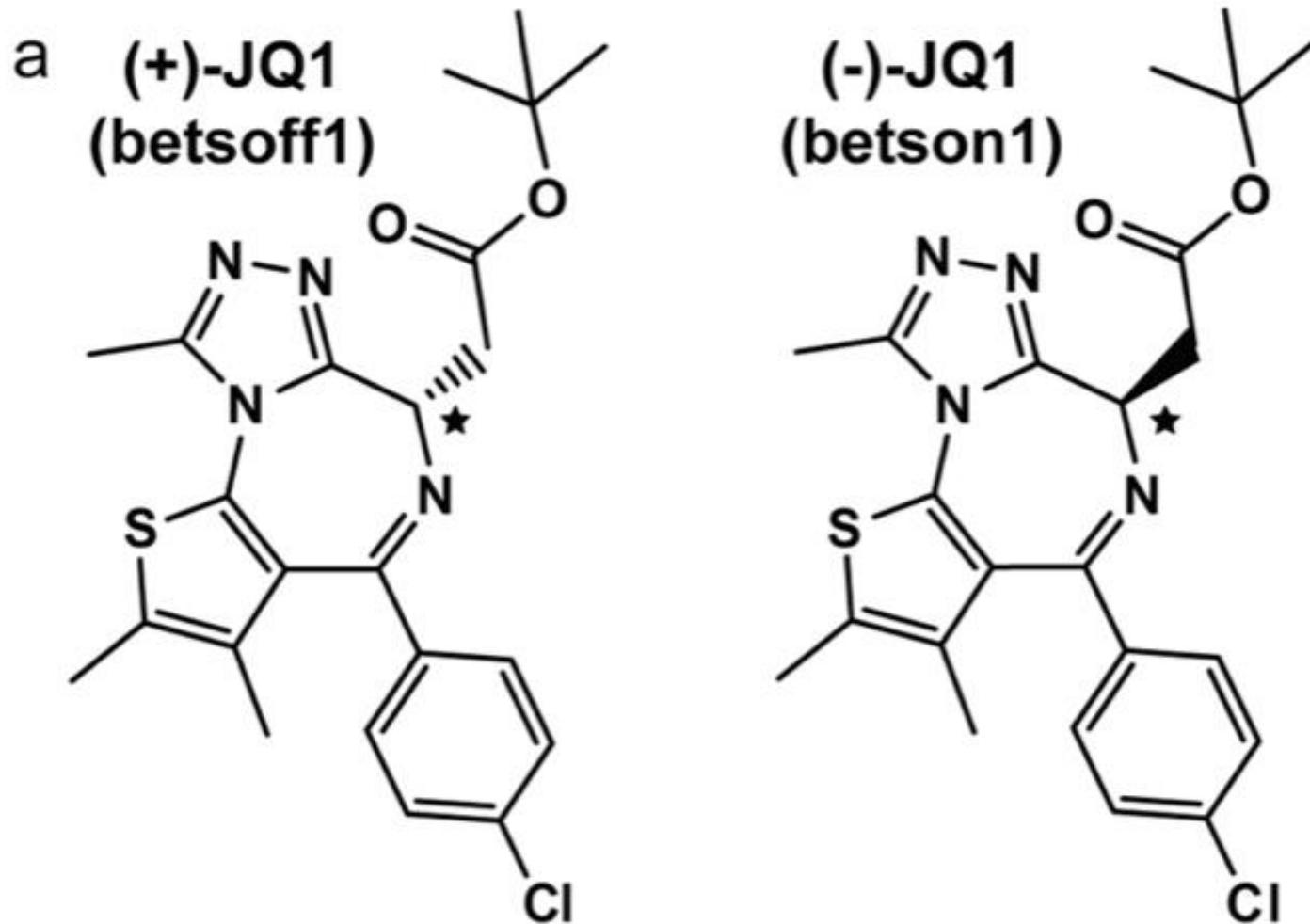
Brd4 (Bromo-domain containing4)

- ・ ブロモドメイン→アセチル化ヒストン結合ドメイン
- ・ アセチル化ヒストン→多くが「転写活性○」マーク

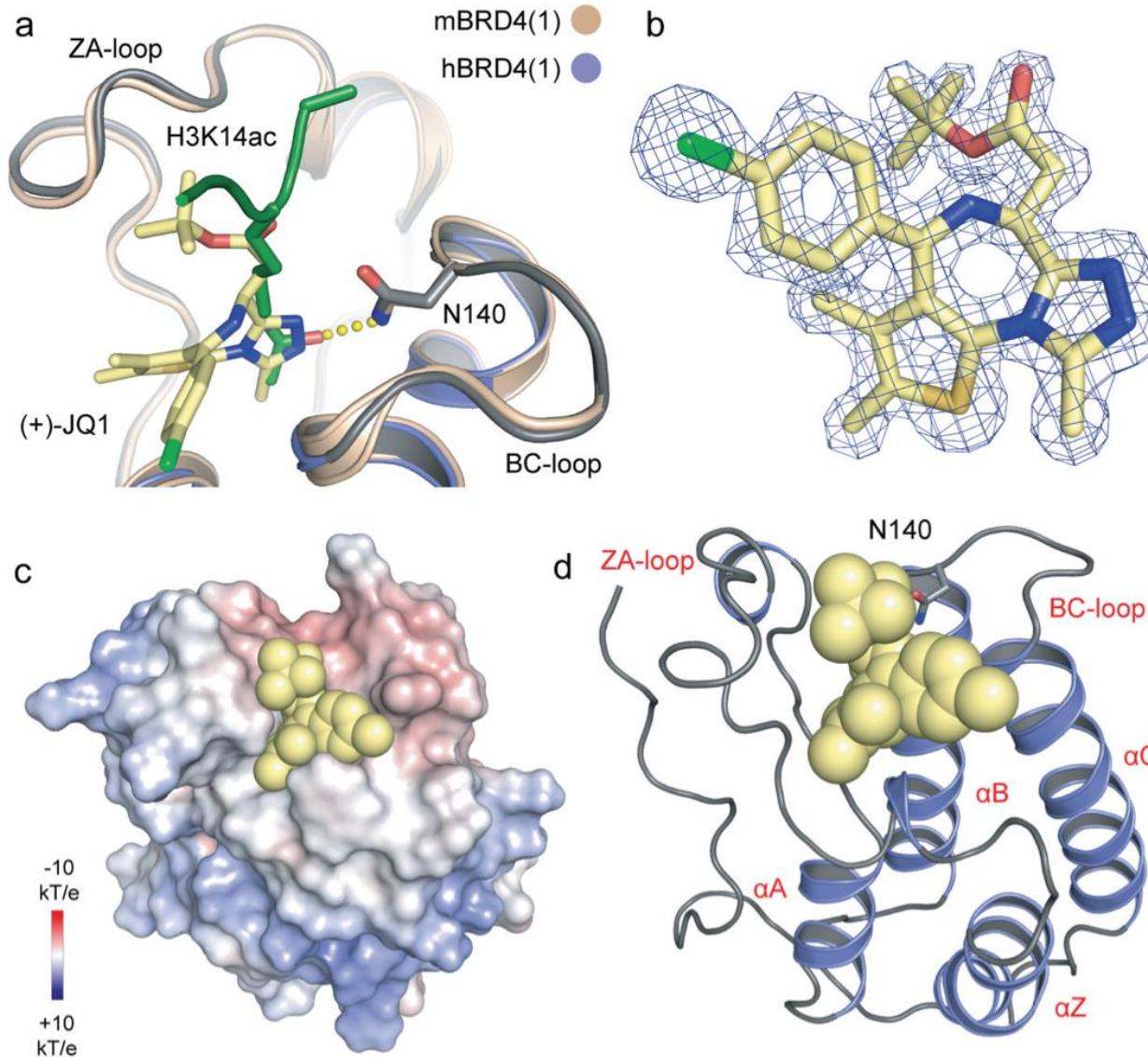
マウス個体における実験でも、Brd4 ノックダウンによる白血病細胞の死が 確認された



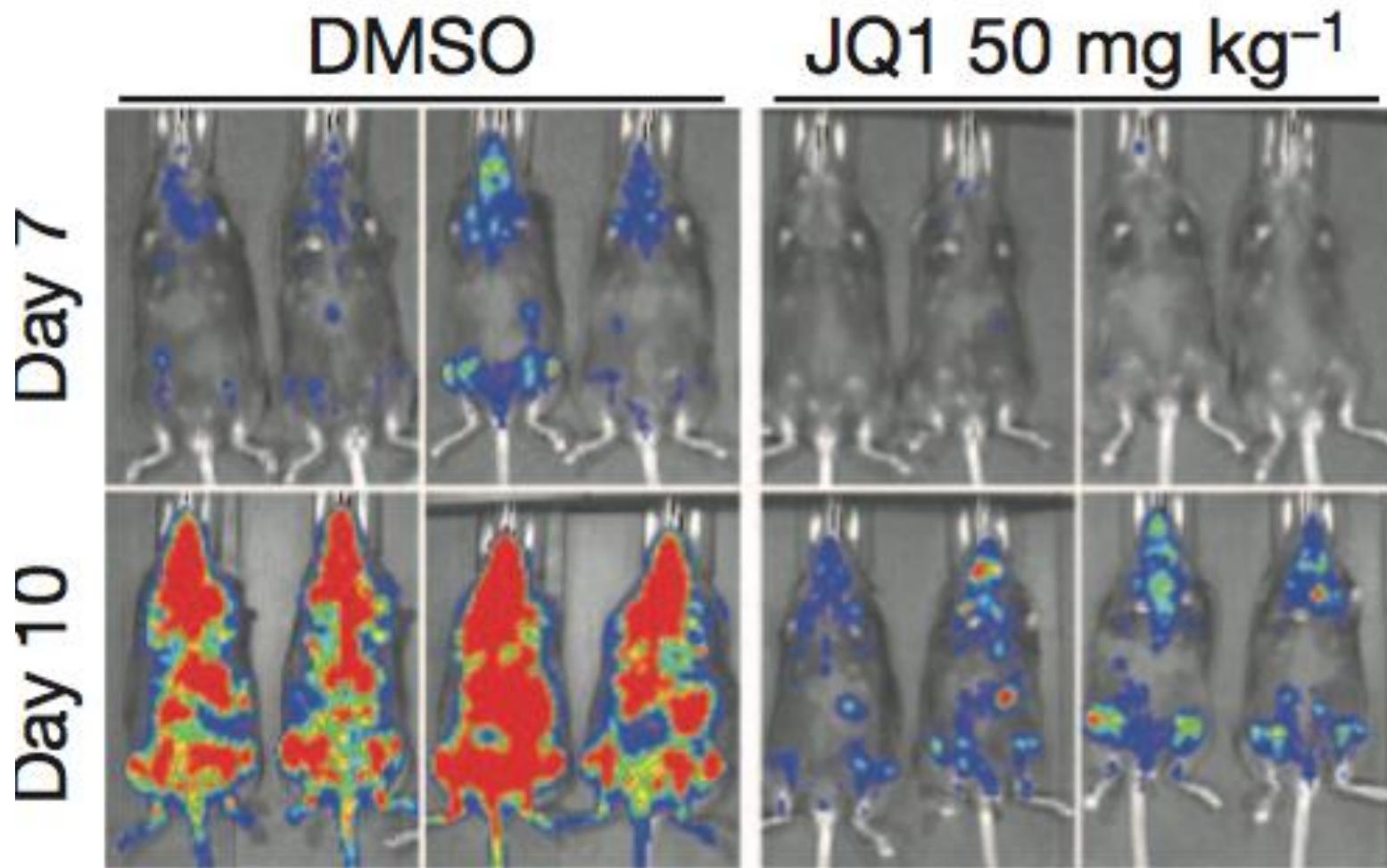
RNAiスクリーニングと化合物合成が かみあつた！



JQ1はBrd4(とBrd1-3, そしてBrd-T)の ブロモドメインに結合する



JQ1によるanti-leukemic effect

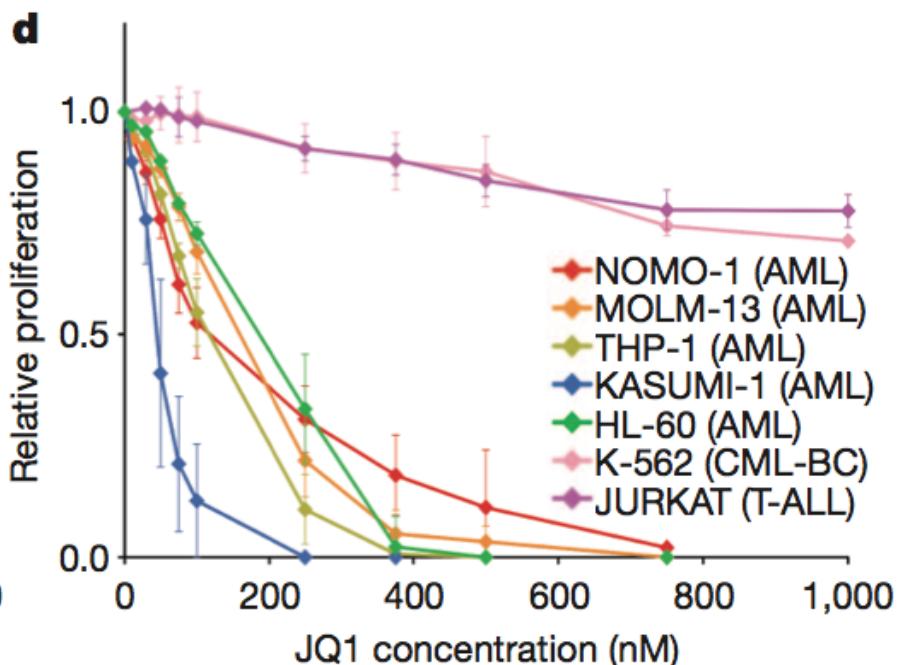
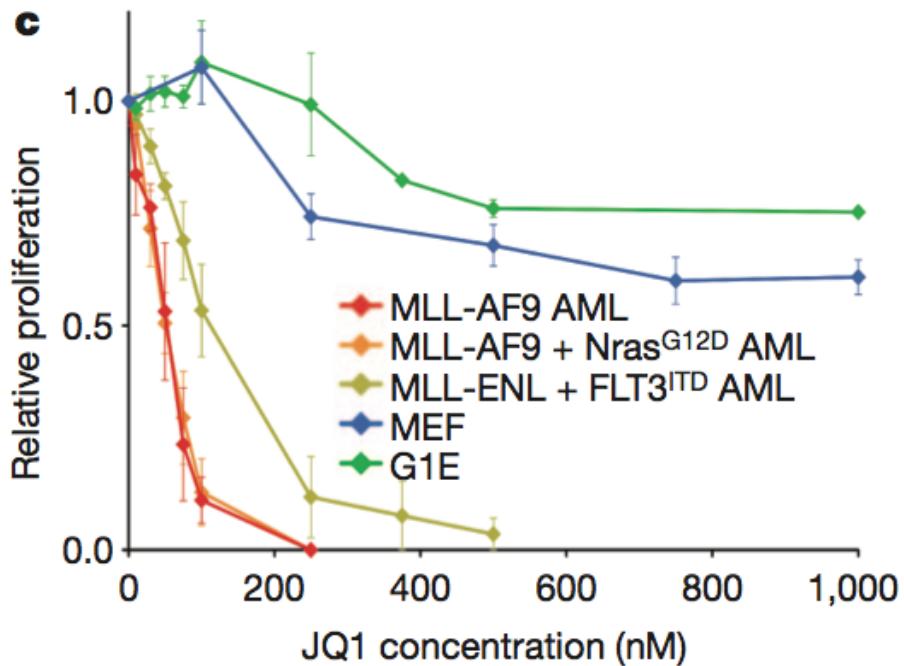


Zuber et al., 2011 Nature

Brd4をターゲットにする合理性

- Brd4がなくても大丈夫な細胞がたくさんある
- Brd4の発現自体は特異的ではない。。。

なのに、Brd4がなくても死なない 細胞がある



BioGPS

The screenshot shows the BioGPS homepage. At the top, there's a search bar with fields for 'username' and 'password', followed by links for 'Google', 'Yahoo!', and 'more'. Below the header is the BioGPS logo (a blue circular icon with a DNA helix and a location pin) and the text: 'A free extensible and customizable gene annotation portal, a complete resource for learning about gene and protein function.' Navigation links 'Plugins »' and 'Datasets »' are visible. To the right, a preview window shows a complex biological report with various tabs and data tables.

Simple to use

- 1 Search for your gene of interest
- 2 View the gene annotation report
- 3 Browse the gene report layouts
- 4 Build your own gene report

[Details »](#)

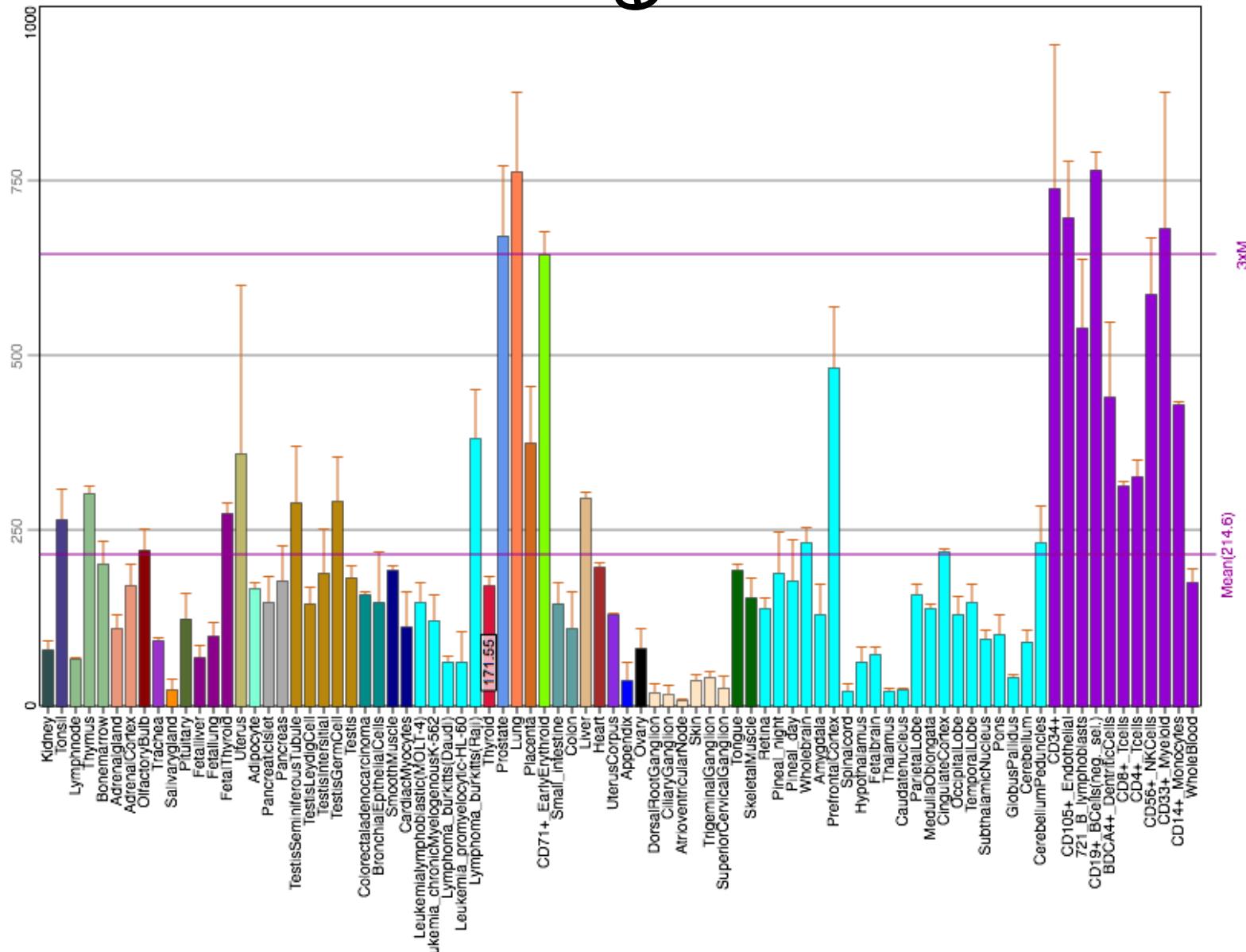
Search genes here:

Press Ctrl-Enter or click

Example Searches
(click to try these samples)

[Gene Symbol\(s\)](#)
[Wildcard queries](#)
[Gene Ontology](#)
[Affymetrix IDs](#)
[Interpro](#)
[Genomic interval](#)

Brd4はいろんな組織で発現している

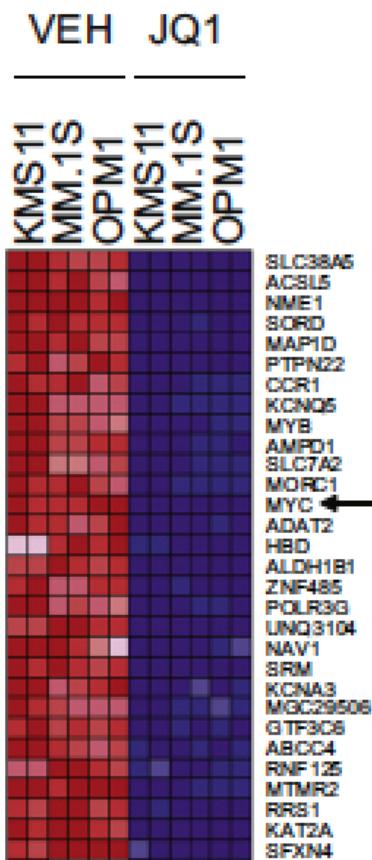


一体なんのせいで死ぬのか？

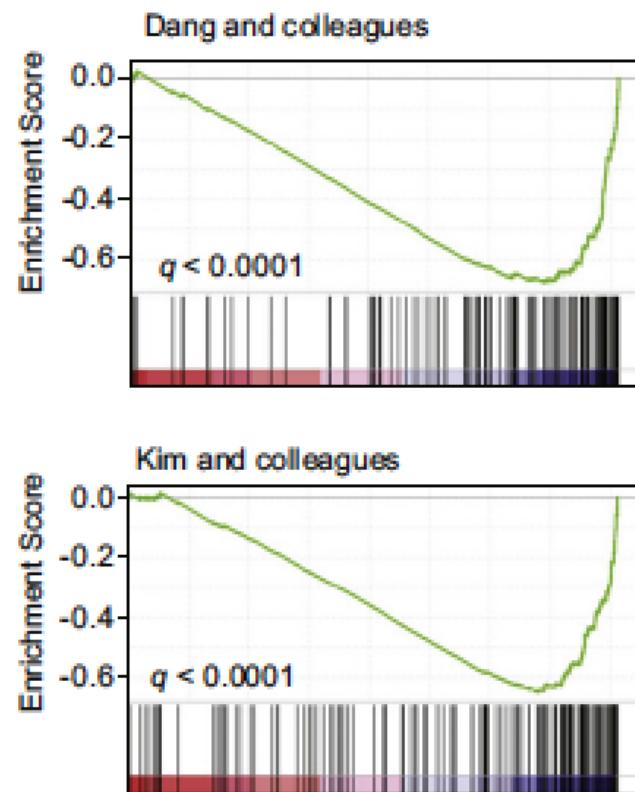
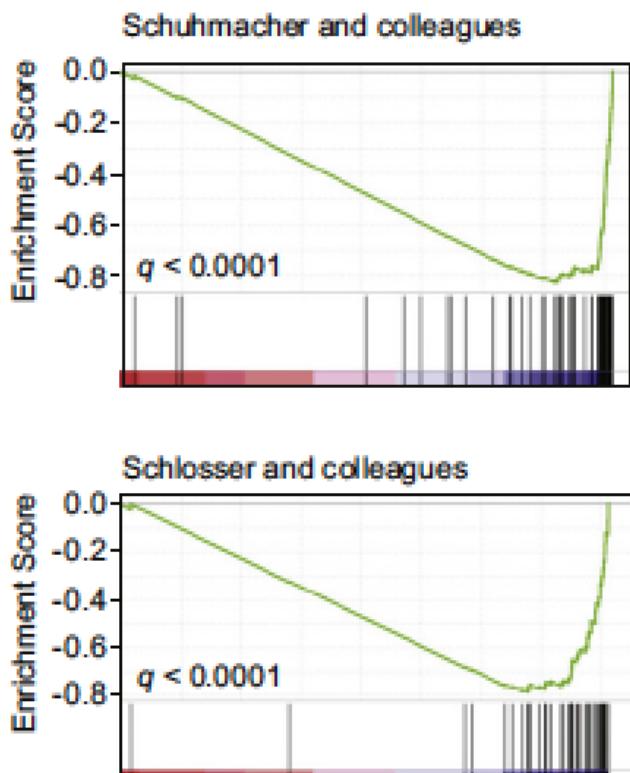
- ・ どういうふうにしたら理解できるか？

Brd4 RNAi/JQ1 处理 → NGS

A



B



Delmore et al., 2011 Cell

前スライドについて

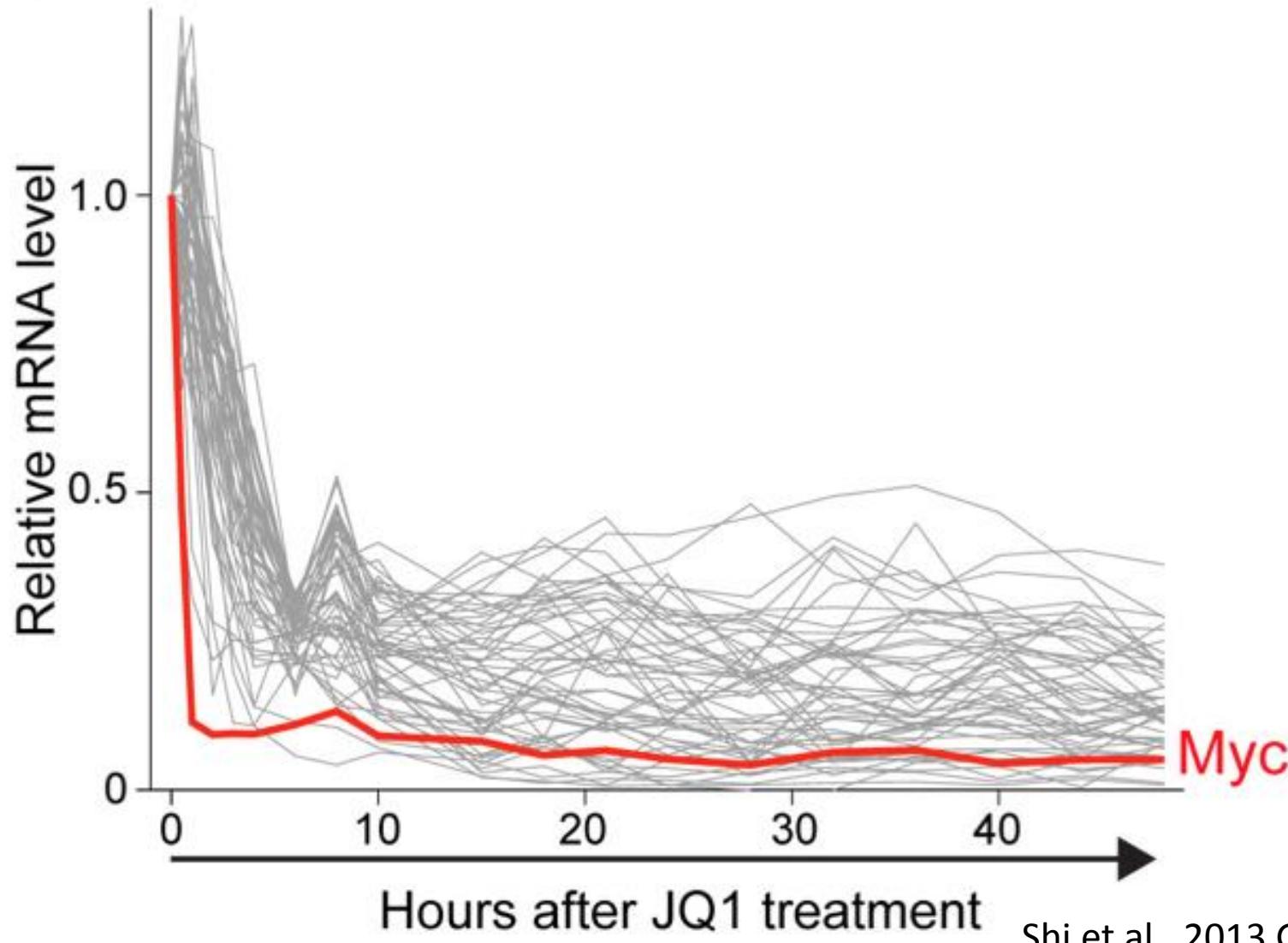
- Gene set enrichment analysis。よく使われています。刺激Xで発現があがった(X-Up)、あるいは下がった(X-down)遺伝子のリストがあるとします。自分で刺激Yをやって、発現があがったやつ(Y-up)と下がったやつ(Y-down)を得ます。これらを比べることのできる方法です。X-UpがY-Upと似ていたら、どういうことが言えるでしょうか。XとYは同じ経路に作用している、と想像できますよね。

変化≠大事

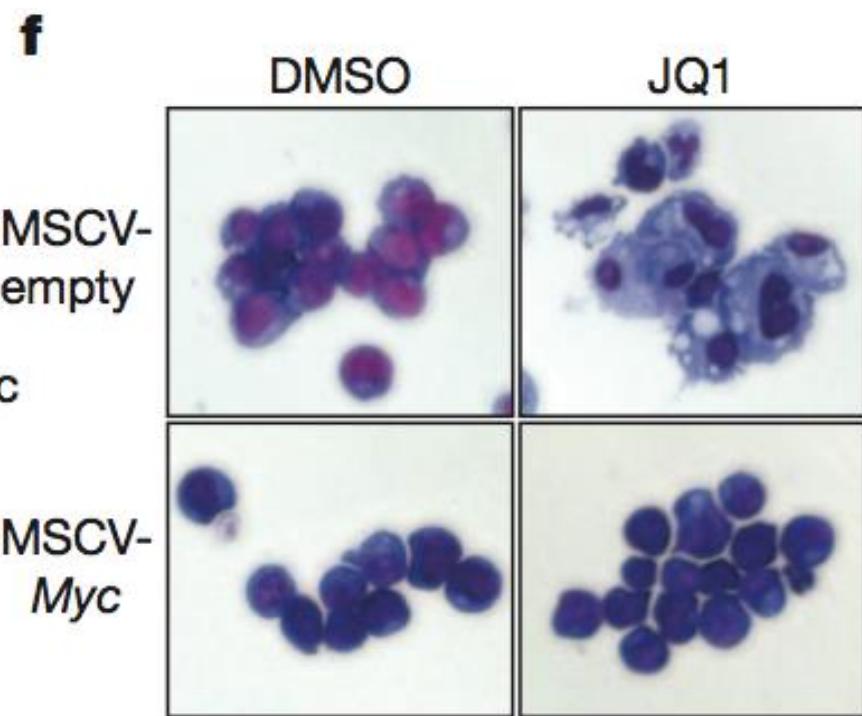
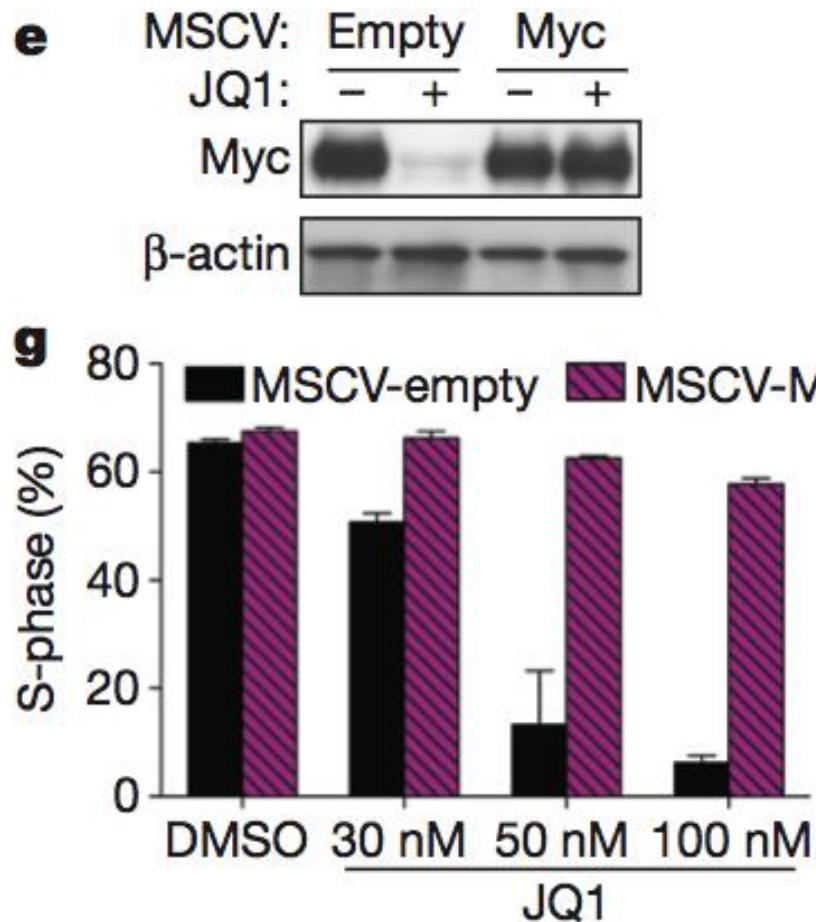
- ・ どういうふうにしたら大事な変化を見つけられるか？
- ・ 変化≠大事、というのは、解析をする上でも意識しておくと良い事実のひとつだと思います

タイムコース(それでも間接的)

A

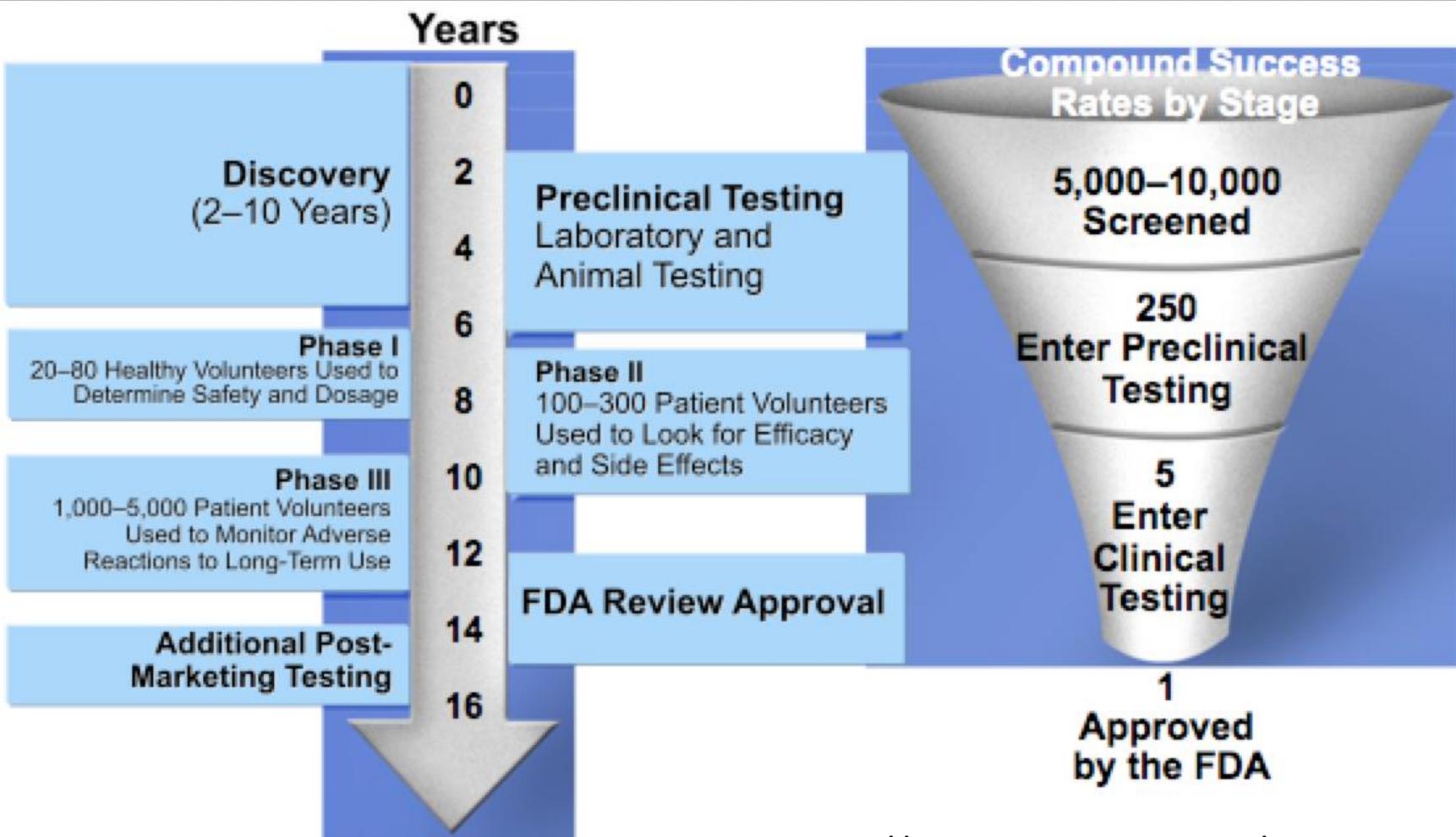


遺伝学的レスキュー実験

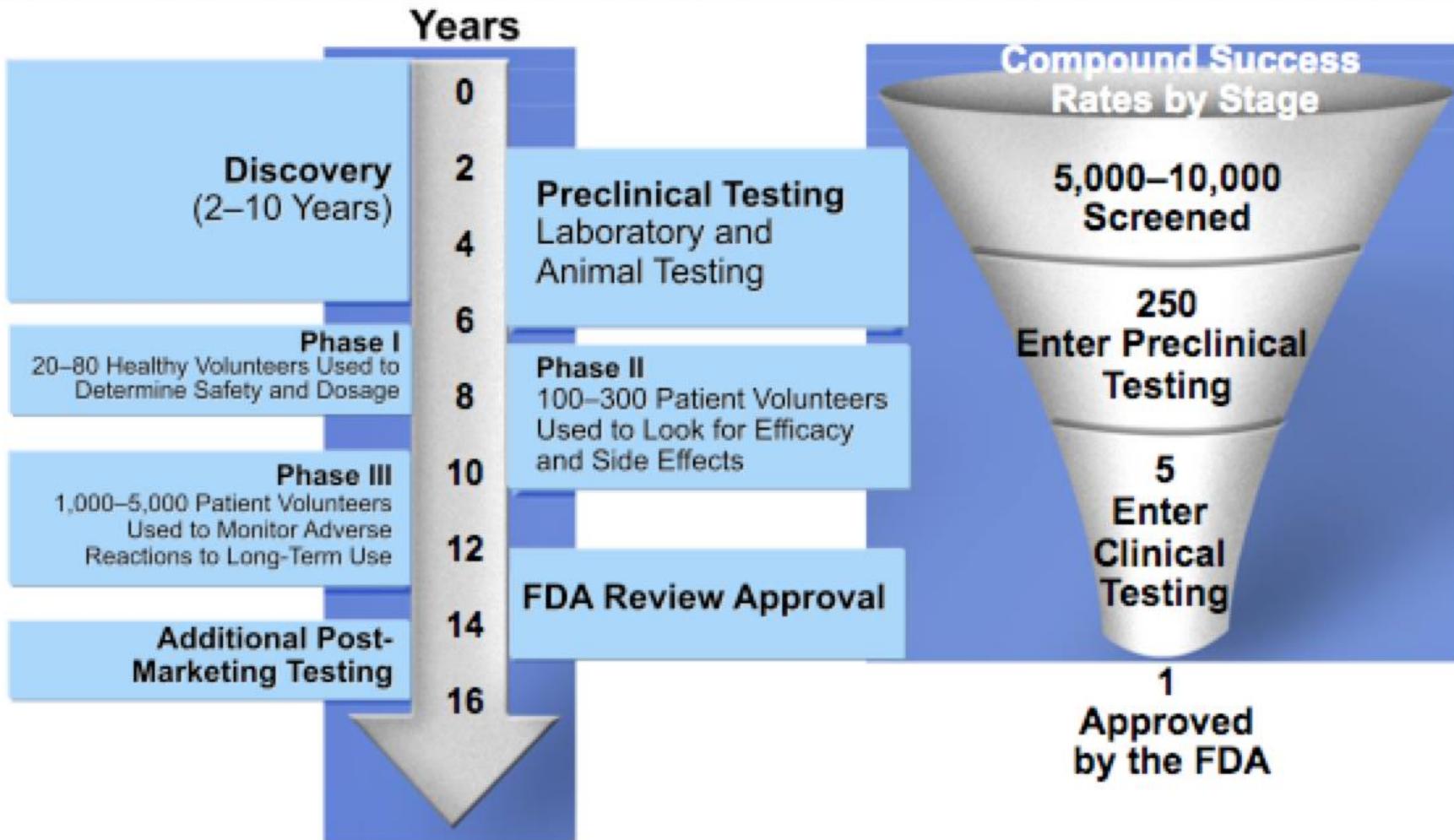


薬の開発の実際

Validation validation validation



時間がかかるし、失敗率も高い



どんどん作ってどんどん使う!?

Structural Genomics Consortium

The image shows the homepage of the Structural Genomics Consortium (SGC). At the top left is the SGC logo, which includes a stylized orange and yellow 'G' icon followed by the letters 'SGC'. To its right are logos for the University of Toronto and the University of Oxford. To the right of the logos is a search bar with a 'Search' button. Below the search bar are links for 'News', 'Careers', 'Publications', and 'Contact'. A horizontal menu bar follows, with dropdown menus for 'About', 'Science', 'Reagents & Resources', 'People', and 'News & Outreach'. The main content area features a large, colorful 3D molecular model composed of various colored spheres (orange, red, blue, green, yellow, grey) representing atoms. A small inset box on the left side under the 'About' heading contains text about the SGC's mission.

About

The SGC is a public-private partnership that supports the discovery of new medicines through open access research.

なんだかんだで素早いアメリカ

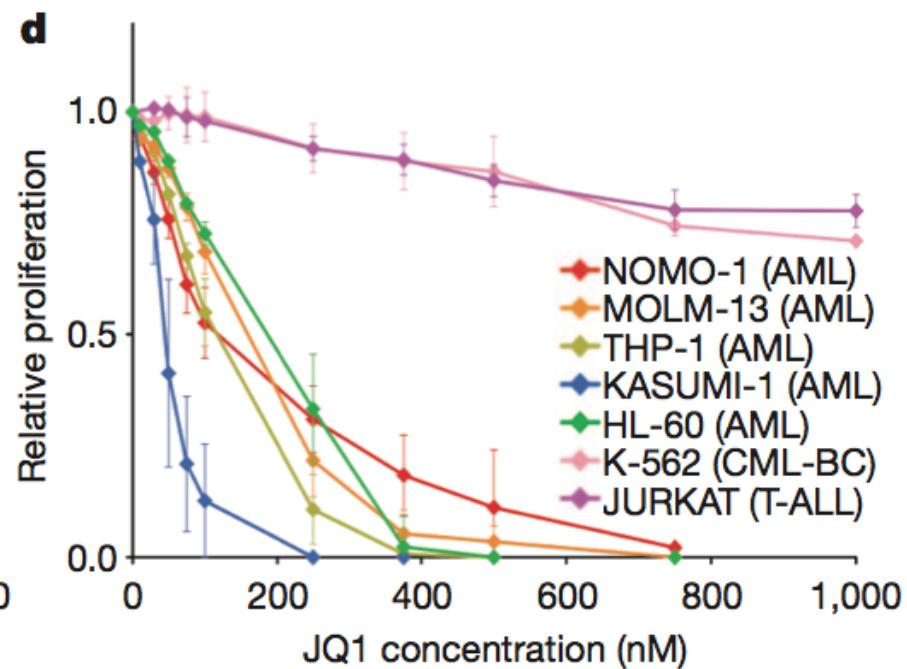
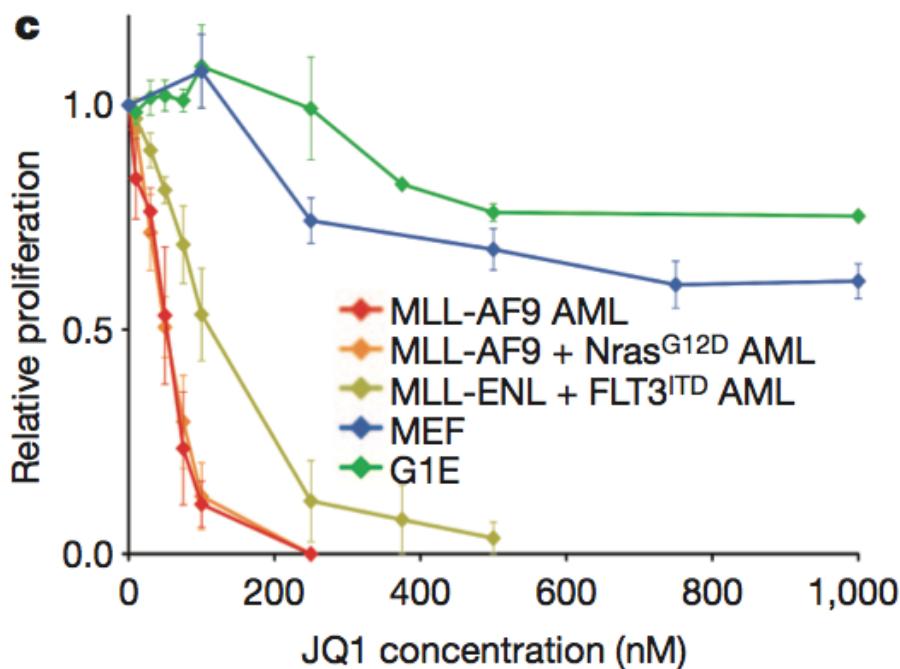
- 既にいくつかのiBETがclinical phaseに突入している(参照: ClinicalTrials.gov)
- iBETは男性経口避妊薬として使われる可能性も!? Brd-Tのお話

The screenshot shows the ClinicalTrials.gov homepage. At the top, there is a search bar with the placeholder "Example: 'Heart attack' AND 'Los Angeles'" and a "Search" button. Below the search bar are links for "Advanced Search", "Help", "Studies by Topic", and "Glossary". A navigation menu at the top includes "Find Studies", "About Clinical Studies", "Submit Studies", "Resources", and "About This Site". The main content area displays a search result for "Brd4". The message says "1 study found for: Brd4" and provides links to "Modify this search" and "How to Use Search Results". Below this, there are buttons for "List", "By Topic", "On a Map", and "Search Details". There is also a "+ Show Display Options" link and download links for "Download" and "Subscribe to RSS". At the bottom, there are checkboxes for "Include only open studies" and "Exclude studies with unknown status". A table lists a single study entry:

Rank	Status	Study
1	Recruiting	A Study to Investigate the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Clinical Activity of GSK525762 in Subjects With NUT Midline Carcinoma (NMC) and Other Cancers

Under the study title, it says "Condition: Carcinoma, Midline" and "Intervention: Drug: GSK525762".

どうして白血病細胞ばっかり死ぬのか？



Zuber et al., 2011 Nature

おさらい

- Brd4はいわゆるgeneral co-activatorとして理解されていた
- 全てのエンハンサー、全てのプロモーターに局在している、とされてきた
- しかし、Brd4の機能を阻害して死ぬのは、一部の細胞だけであった

用語解説: プロモーター

- 遺伝子の発現を制御するDNA配列のうち、遺伝子が実際に転写されている場所のすぐ上流にあるものの総称。一般的にH3K4me3(ヒストンH3の4番目のリジン(K)のトリメチル化)によってマークされる。具体的には、RNAポリメラーゼや転写因子が結合するサイトである。

用語解説: 転写

- DNAからRNAを写し取る反応。ゲノムの中にはここから転写しなさい、という印があり、それがプロモーター。RNAポリメラーゼのとても大きな複合体がこれを認識して、DNAからRNAを写し取る。分子生物学の黎明期から研究されている反応であるが、まだ分かっていないことがたくさんあって、面白い。RNAポリメラーゼが動くのかDNAがすべるのか、とか。

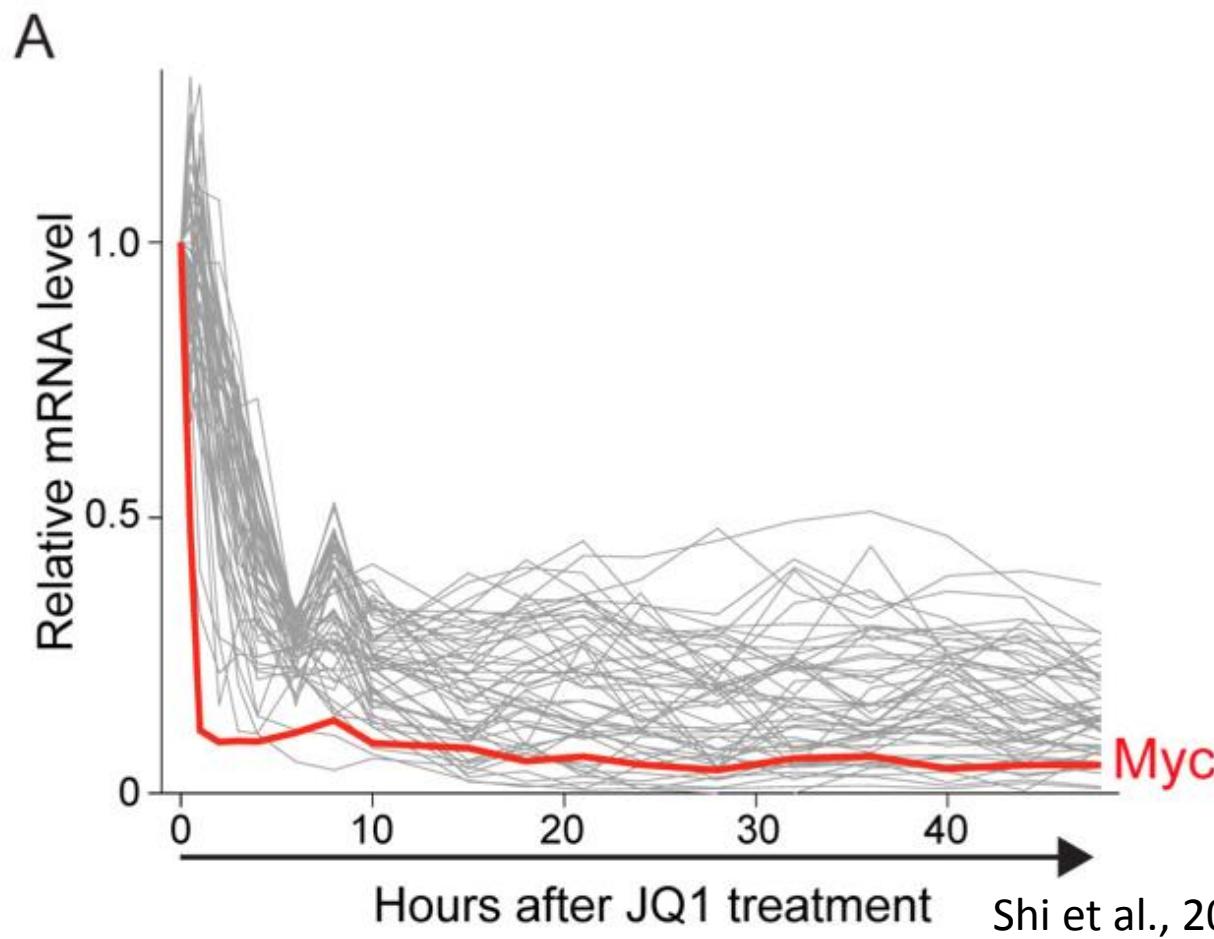
どうしてgeneral そうなタンパク質がある特定の細胞の生存に大事なのか？

どうして全てのプロモーター や エンハンサーで検出されるようなタンパク質の機能阻害で、遺伝子特異的な効果があらわれるのか？

大規模なChIP-seq解析がもたらした 進展

- ・さまざまがん細胞やES細胞におけるChIP-seq解析によって、「どうしてgeneralなco-activatorsの機能阻害で遺伝子特異的な効果があらわれやすいのか」という問題の解決への糸口が見つかった
- ・複数のグループが同時に報告をしたが、河岡が最も身近で見ていた、Vakocラボベースのストーリーを紹介します

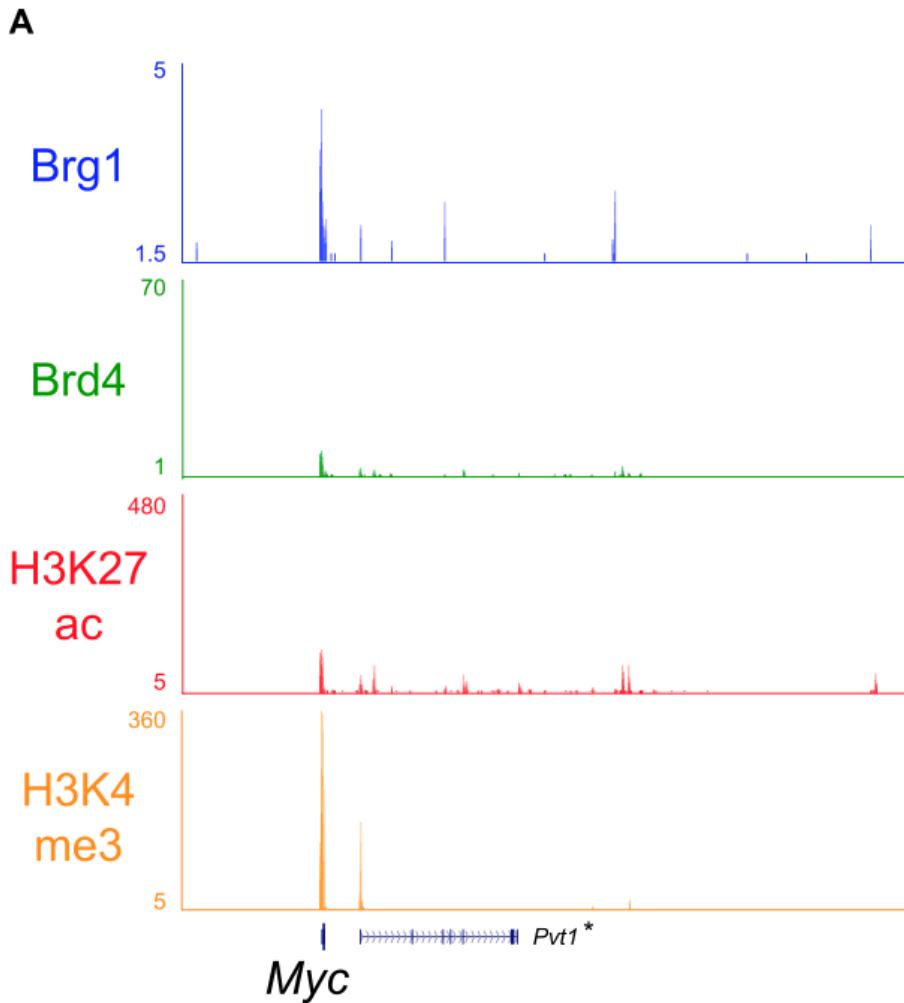
白血病細胞におけるJQ1処理でMycの発現が急激に落ちてくる(そしてそれは他の多くの細胞では観察されない)



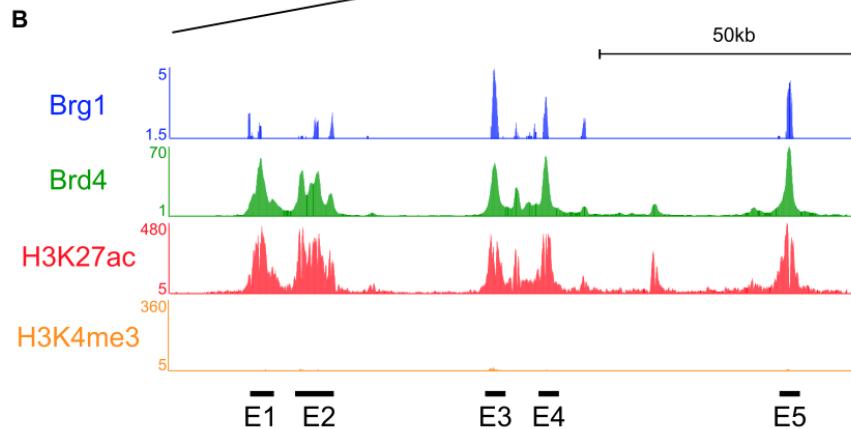
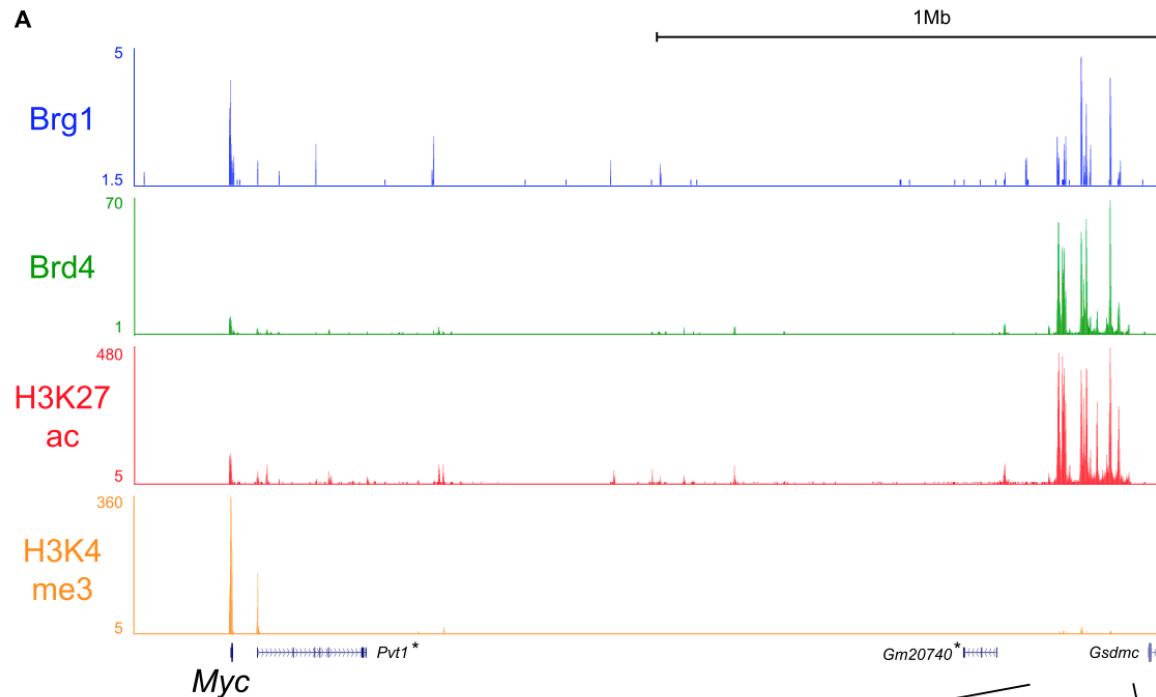
用語解説: Myc

転写因子。転写因子というのはDNAに結合してその他転写に必要なタンパク質を呼び込むもの。いろいろなタイプがある。MycはiPS化に必要なことで有名だが、最も有名ながん遺伝子のひとつでもある。

白血病細胞でChIP-seqをして、Mycの locusを観察してみた



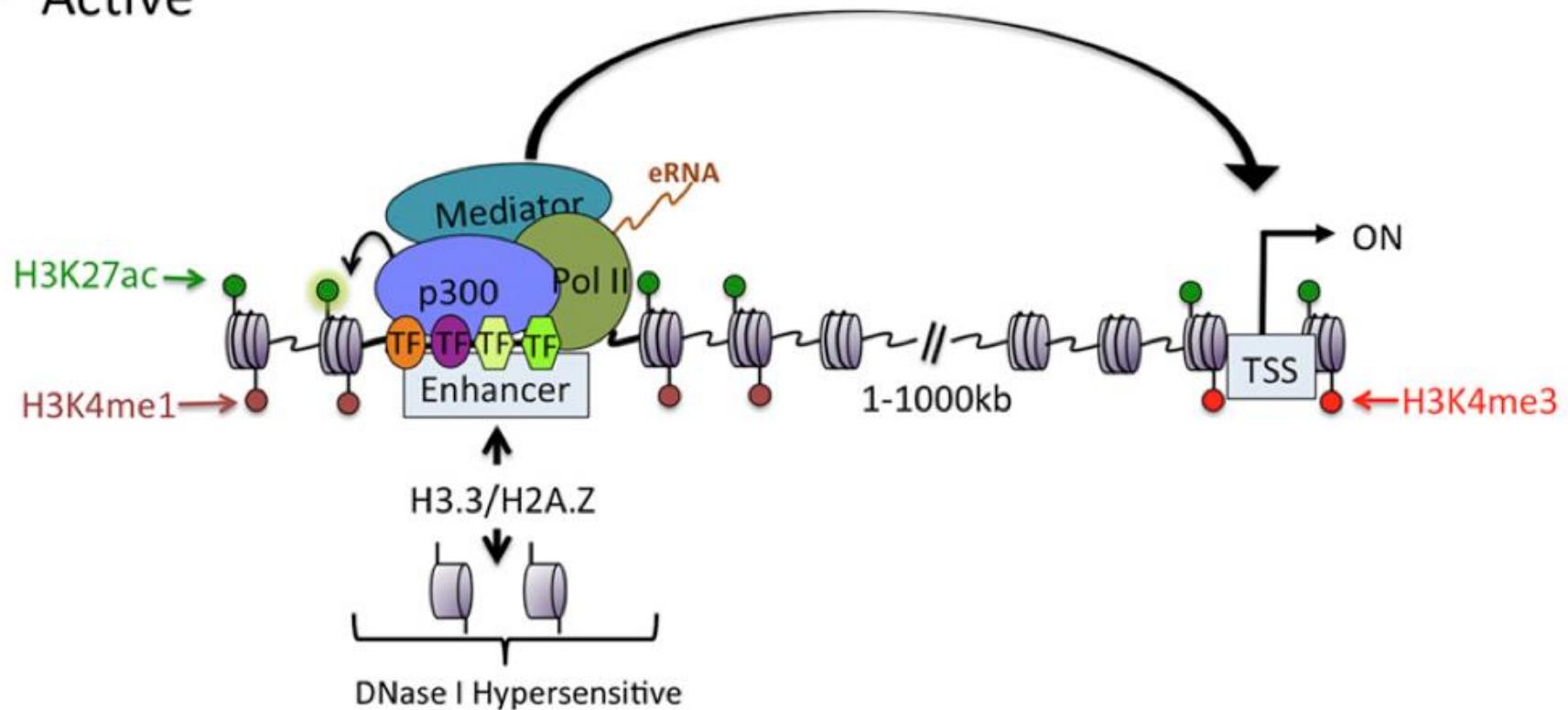
すごく大きなエンハンサーが！



Shi et al., 2013 G&D

エンハンサーって？

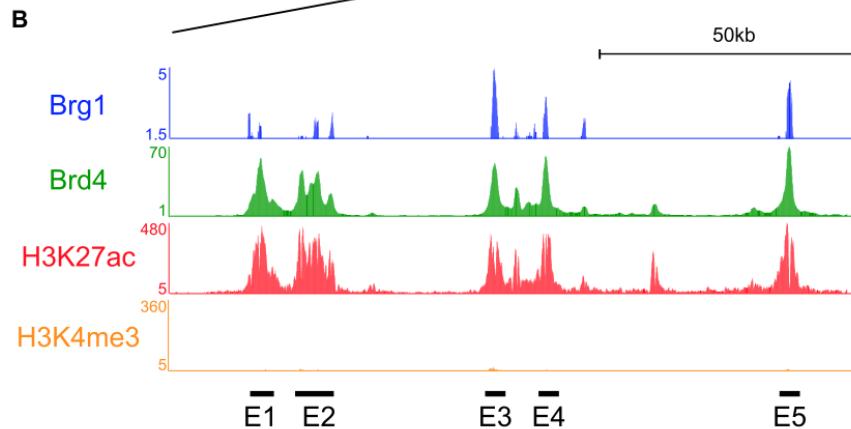
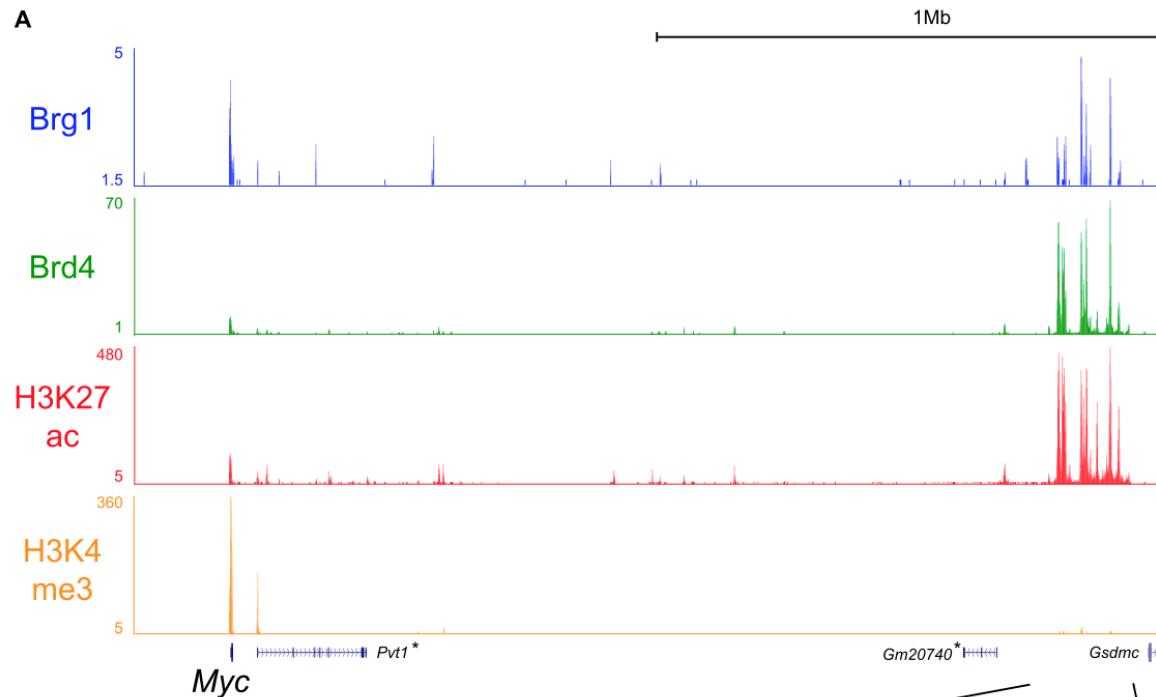
A Active



用語解説: エンハンサー

遺伝子/プロモーターから離れたところにある制御領域。転写因子が結合している。ヒストン修飾としては、H3K27ac/H3K4me1に富み、H3K4me3が少なく、先ほど出てきたp300が結合しているような領域を指す。エンハンサーは組織特異的であるものが多く、遺伝子がいつどこで発現するかを決める大事な要素である。

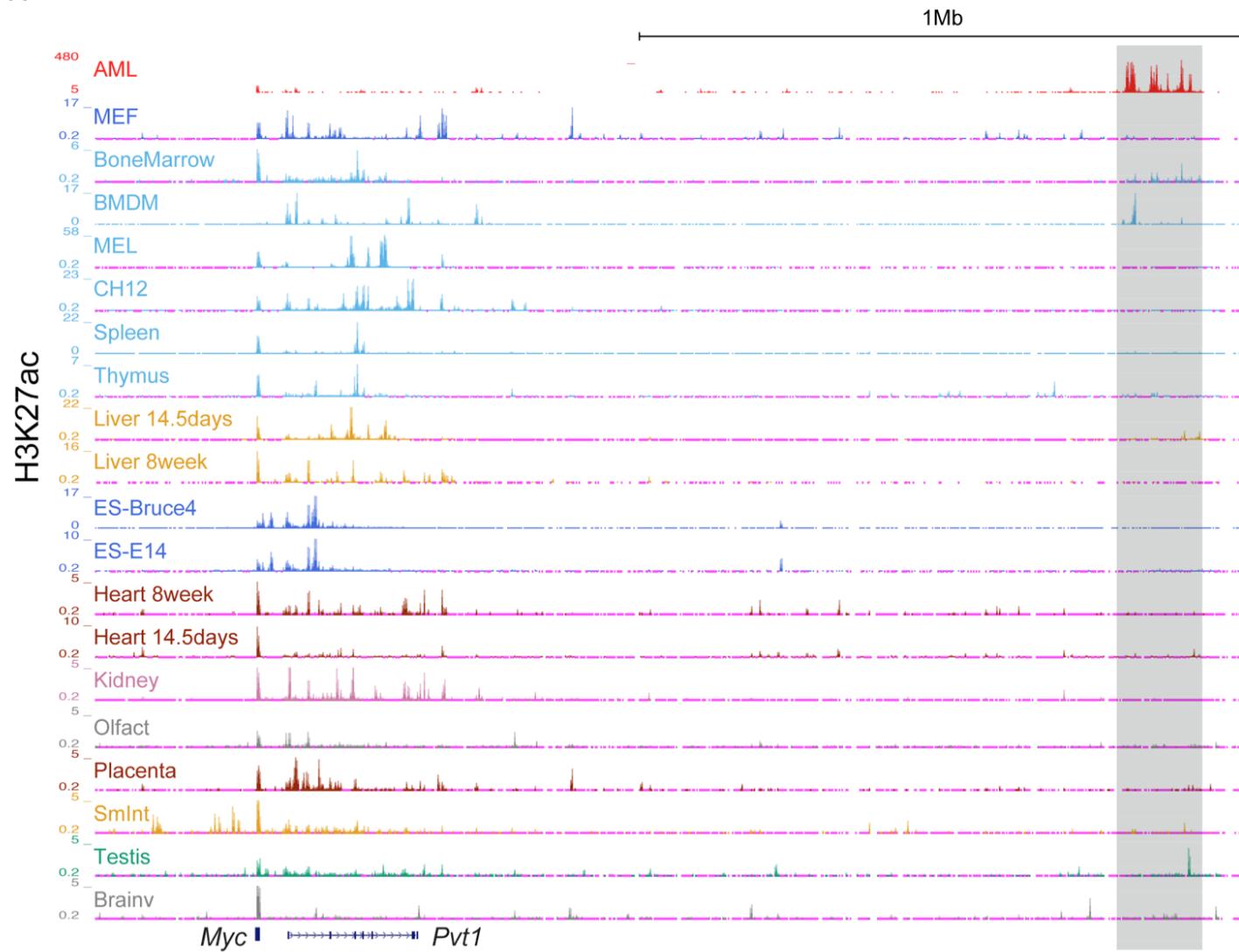
すごく大きなエンハンサーが！



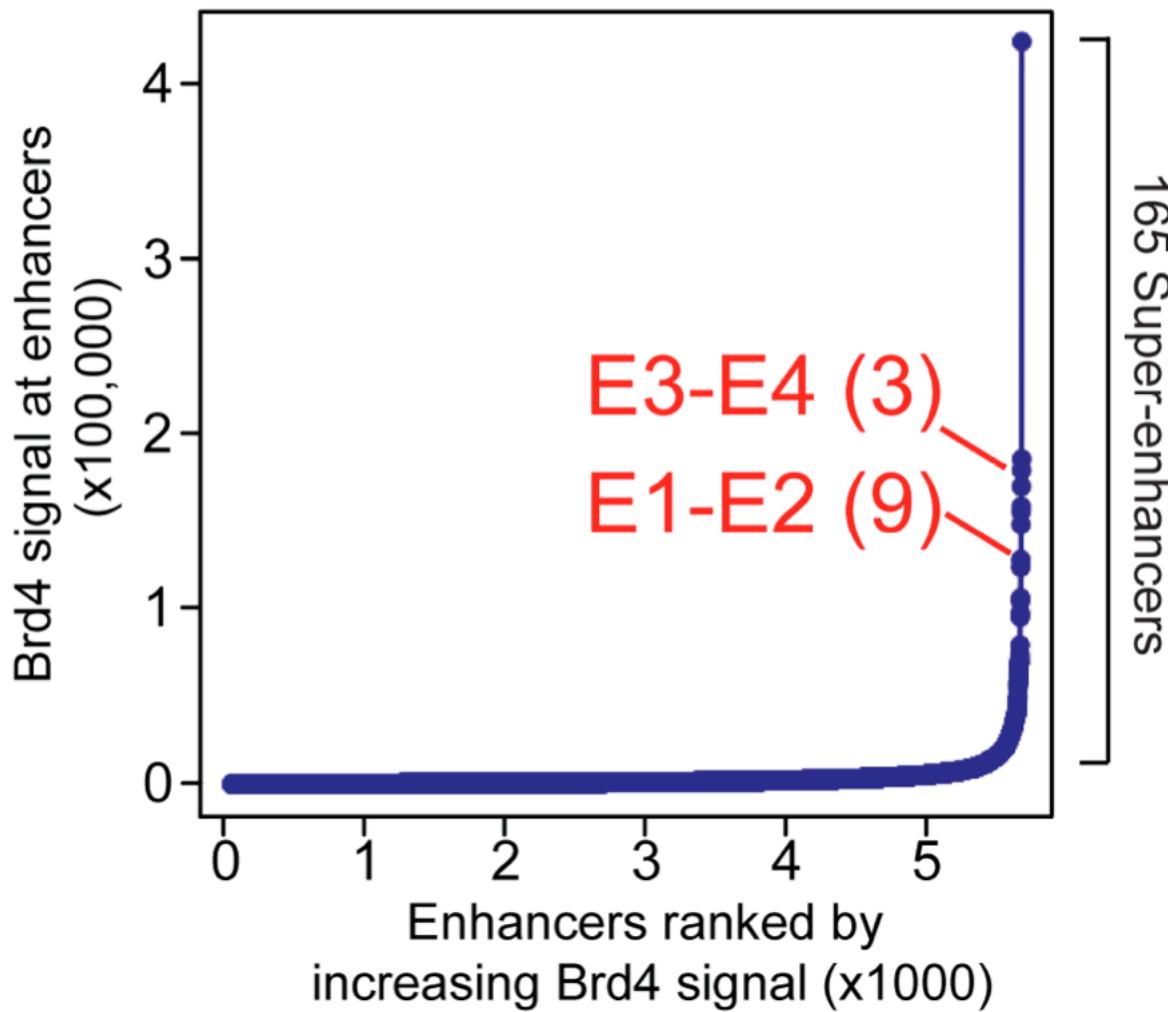
Shi et al., 2013 G&D

しかも組織特異的！

A



スーパーエンハンサー



ピークコールの結果からこれを作れますか？

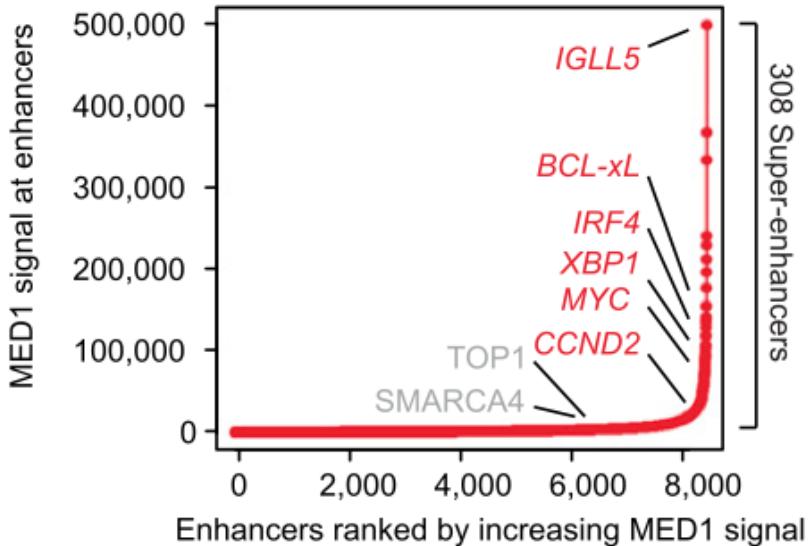
RNA-seqとの融合 Super enhancerは脆弱？

- MITのRichard Youngのグループによるより網羅的な解析によって、スーパーエンハンサーは、
 - とても大きくて
 - 大事な遺伝子の近くにあって
 - General co-activatorsの阻害に弱いらしい

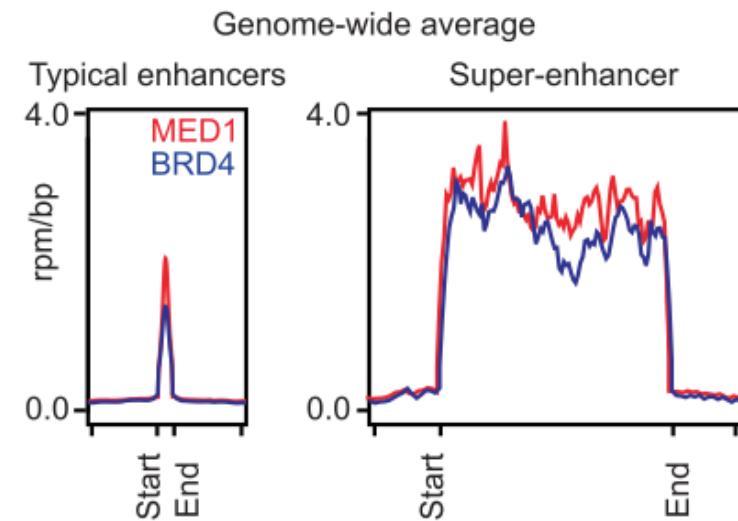
ということが明らかにされた

1. 大きい

A



B



Number: 7,985
Median size: 1,330 bp

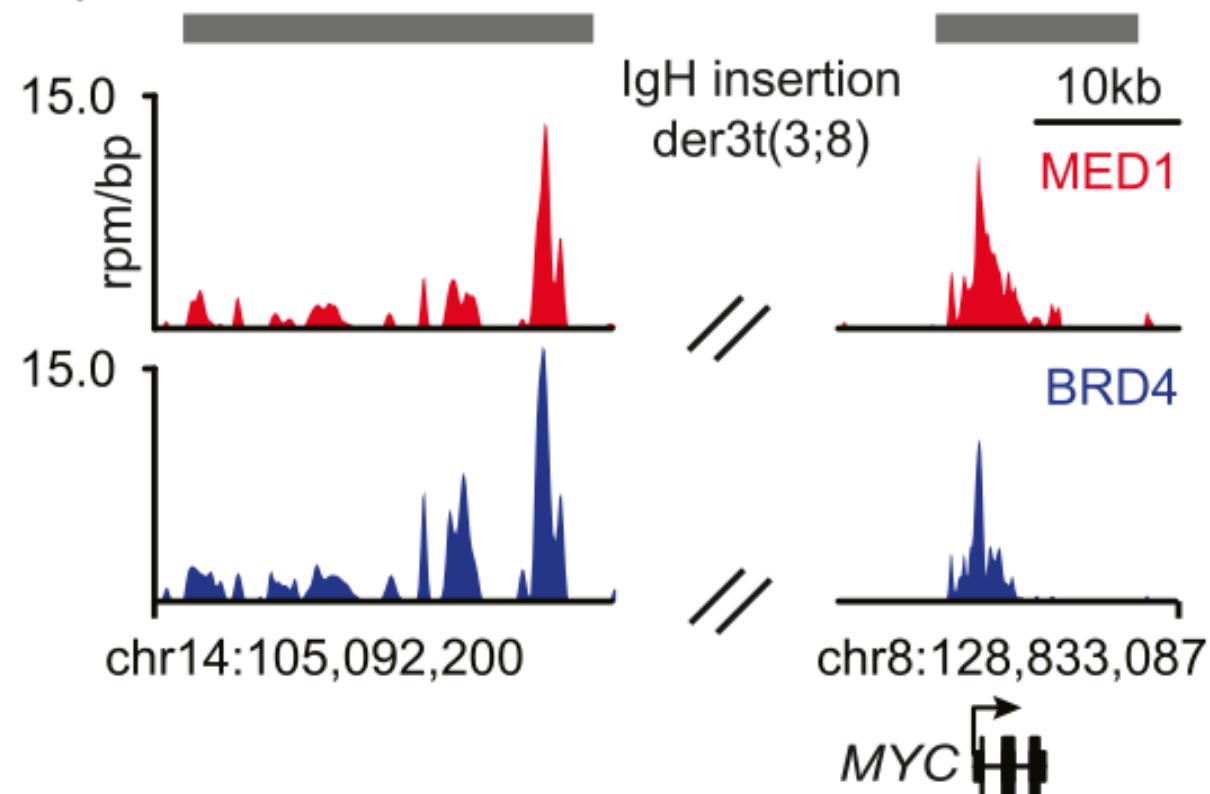
308
19,400 bp

	Total	Density at signal constituents	Total	Density at signal constituents
MED1:	1 unit	1 unit	18 unit	3.4 unit
BRD4:	1 unit	1 unit	16 unit	3.7 unit
H3K27Ac:	1 unit	1 unit	10 unit	1.9 unit

2. 大事な遺伝子のそばにある

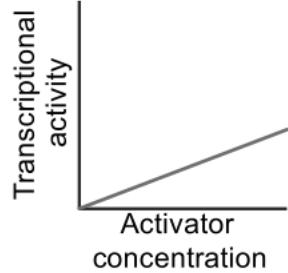
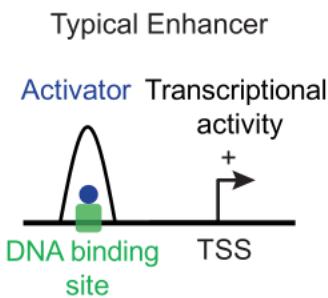
A

Super-enhancers:

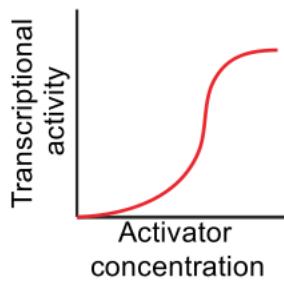
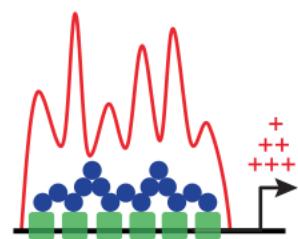


3. 阻害に弱い

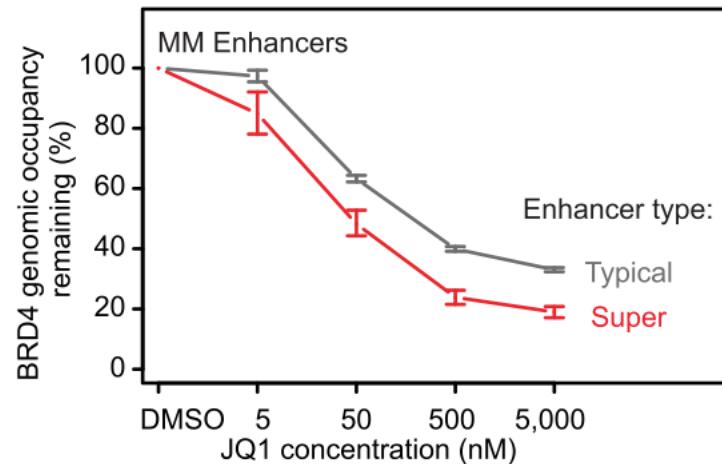
A



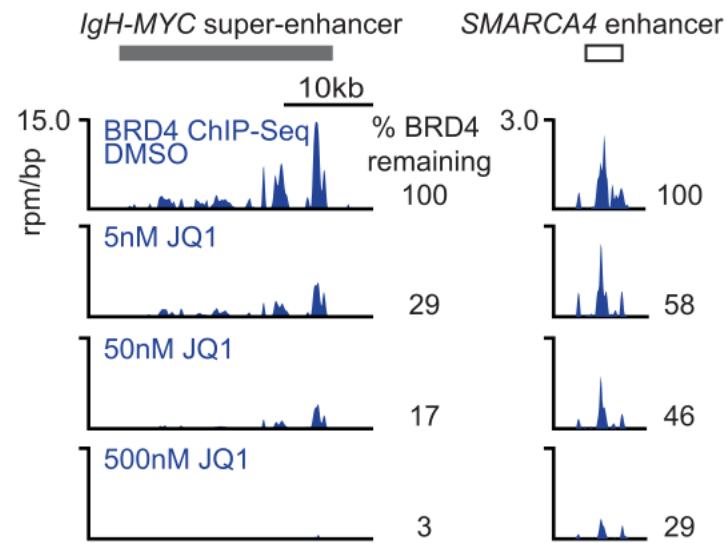
Super-enhancer



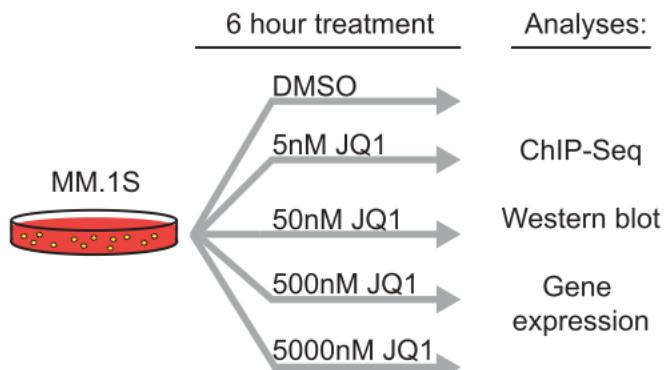
F



G



B

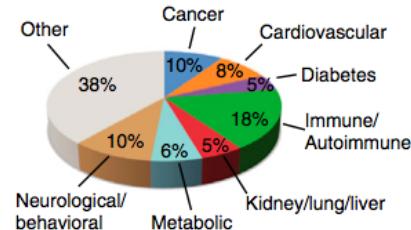


もしかしてエンハンサーがおかしくなっている病気があるのかも？

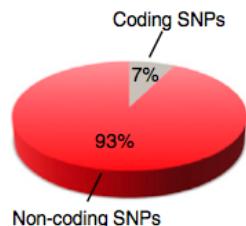
- GWAS (Genome-Wide Association Study)
- 例えばSNP (Single Nucleotide Polymorphism:
一塩基多型)

A

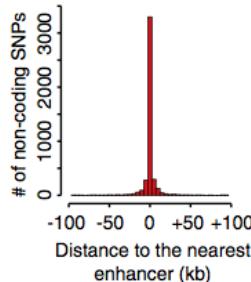
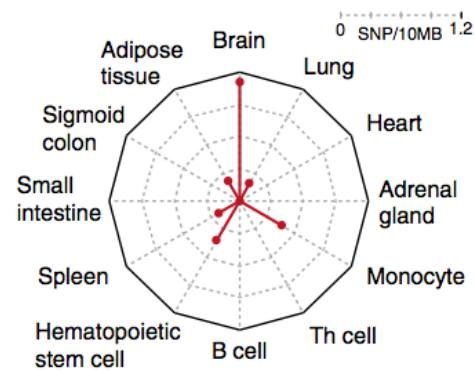
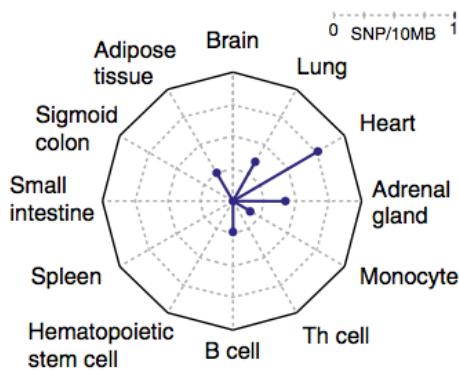
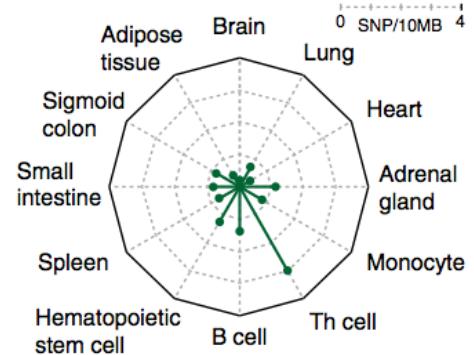
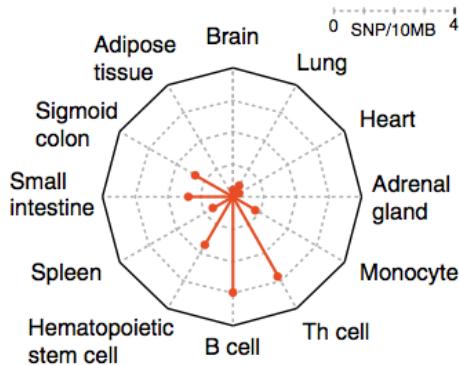
5,303 SNPs from 1,675 GWAS studies

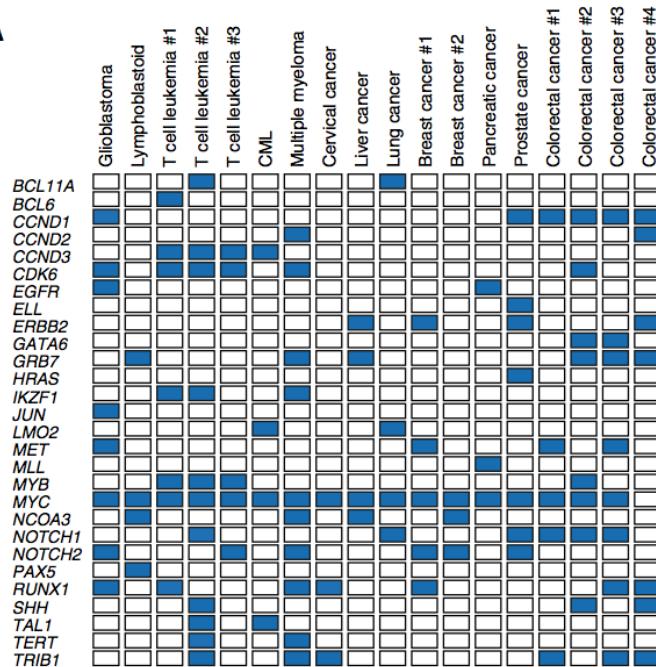
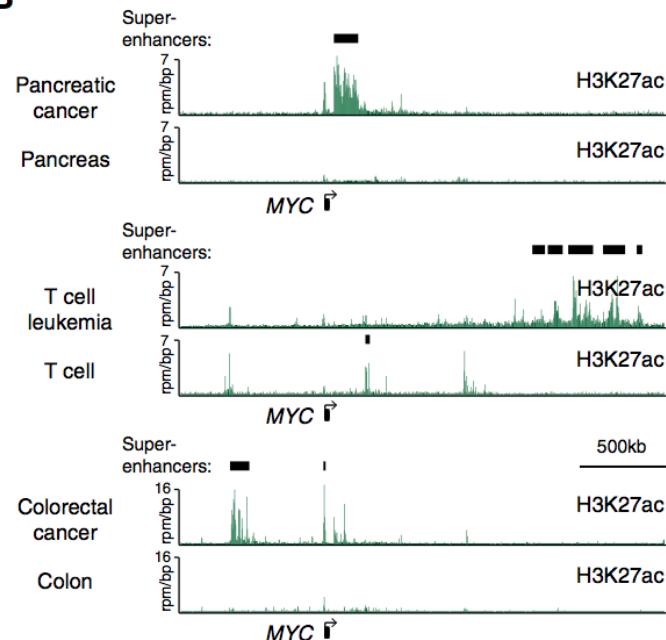
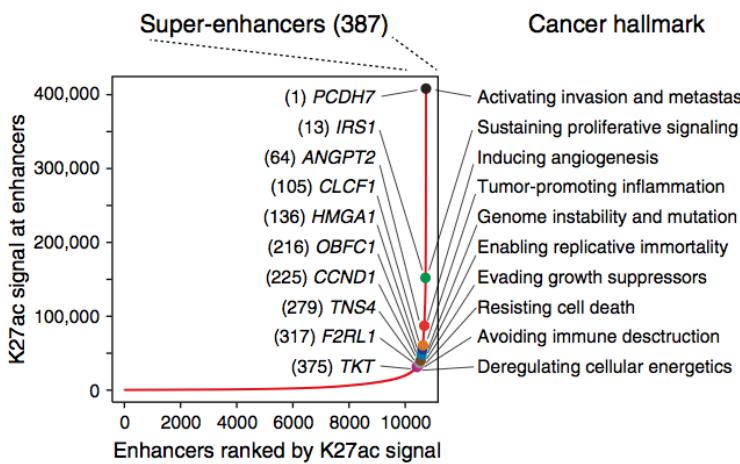
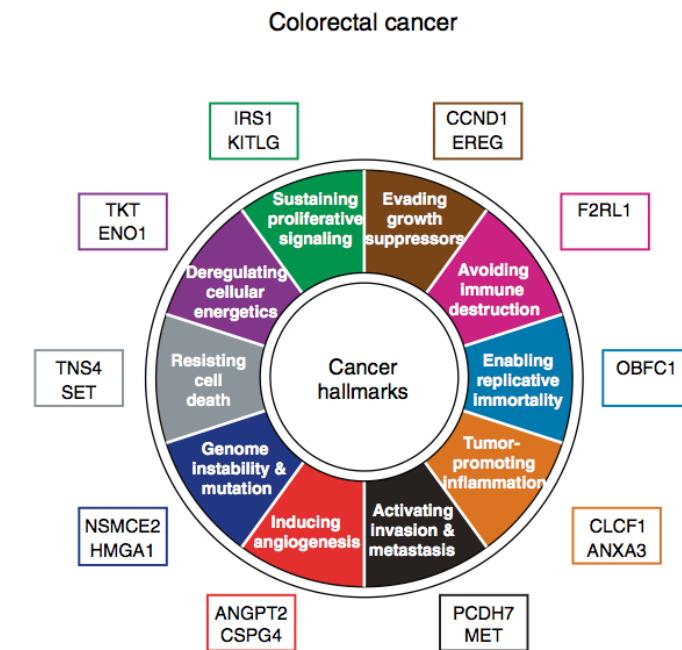


Coding vs. non-coding SNPs



Proximity to enhancers

**B**Alzheimer's disease
(27 non-coding SNP)Electrocardiographic traits
(15 non-coding SNP)Type 1 diabetes
(67 non-coding SNP)Rheumatoid arthritis
(77 non-coding SNP)

A**B****D**

エンハンサーセラピー？

- 結局、遺伝子の機能というのは、細胞によつてさまざま(文脈特異的)
- なので、ある遺伝子を全身でノックアウトしたら、いろんなことが起こってしまう
- 細胞系譜特異的、という特徴を活かして、エンハンサーをターゲットにしたセラピーがあり得るのではないか？

大規模シーケンスとインフォマティクス

- ・ どんどん簡便になっていることもあり、その「当たり前さ」はますます大きくなっている
- ・ 何ができる、何ができないか、ということをしっかり認識しつつ、大規模シーケンステータを上手に料理できるようになれば楽しい！