

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07092

研究課題名(和文) F-box/WD40リピート蛋白質によるクロマチン制御機構

研究課題名(英文) Chromatin regulation by F-box/WD40 repeat protein

研究代表者

津田 玲生 (TSUDA, Leo)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・創薬モデル動物開発室・室長

研究者番号：30333355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞の分化・増殖の制御にはダイナミックな遺伝子発現調節が関わっている。このうちクロマチン制御を担うポリコム因子群(PcG)が重要な役割を持っていることが示唆されているが、PcG自身の機能調節機構はあまり解っていない。本研究ではショウジョウバエF-box/WD40リピート蛋白質であるEbiの機能解析を中心にしてPcGとの関係解明を通してクロマチンの制御がダイナミックな転写調節にどのようにかわるのかを明らかにすることを目的としている。詳しい解析からEbiはPcGと物理的な相互作用を通して転写抑制活性の維持およびPcG自身の安定性の制御をしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that dynamic changes of expressions of many types of genes have an important role for the regulation of cellular differentiation and proliferation. Especially, Polycomb group complex protein (PcG), which is evolutionally conserved molecular complex, regulates many types of genes expression through chromatin organization. However, the precise molecular mechanism about the regulation of PcG is remained to be clarified. In this study, we have been analyzing the function of Drosophila F-box/WD-repeat protein, Ebi in the regulatory networks of PcG. We found that Ebi physically interacts with PcG, and regulates repressor activity and the protein stability of PcG.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：転写抑制 周期 エピジェネティック ポリコム複合体 Ebi TBL1 ショウジョウバエ クロマチン 細胞

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から細胞分化と増殖の相関において、細胞周期関連遺伝子発現は抑制される傾向がある一方で、分化制御因子は亢進する傾向があることが観察されている。このように、細胞分化と増殖の相関におけるダイナミックな遺伝子発現の調節にはクロマチンの制御を介した核内蛋白質の関与が考えられている。我々は先行研究からショウジョウバエ転写コリプレッサー複合体である F-box/WD40 リポート蛋白質 Ebi が神経前駆細胞の分化と増殖の相関に働いていることを明らかにしてきた（文献 1、2）。Ebi は進化的に保存された分子で、Ebi のヒトホモログである TBL1 は自閉症や Pierpont 症候群といった精神疾患の原因因子として知られている。従って、Ebi の機能を知る事は、ヒト遺伝子疾患を理解することにもつながることが期待されている。

細胞分化の調節におけるダイナミックな遺伝子発現の制御には、ポリコム因子群 (PcG) が重要な役割を果たしていることが示されている。PcG はショウジョウバエからヒトに至るまで進化的に保存された因子で、H3 ヒストンの修飾を通してクロマチン制御に働いていることが明らかになっている。PcG には PRC1 と PRC2 と呼ばれる機能の異なる複合体が 2 種類存在し、それぞれが遺伝子発現調節に関わっていることが予想されているが、それぞれの複合体がどのように機能調節されているのかは、不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は Ebi の機能調節のメカニズムを明らかにすることにより、細胞分化と増殖の相関におけるダイナミックなクロマチン制御機構の解明を目指した。先行研究から、ebi の機能低下した細胞では、細胞周期関連遺伝子の発現が減少していることが明らかになっていた（文献 3）。このメカニズムに関しては PcG の機能調節が関わっていることが遺伝学的な解析から示唆されていた（文献 3）。従って、Ebi と PcG との関係性を明らかにすることにより ebi による細胞分化・増殖の相関制御が理解できるばかりではなく、PcG の機能調節に関わるメカニズムにも迫る事ができると期待される。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ ebi は機能欠損により細胞周期関連遺伝子の一部の発現が低下することが解っていたことから、この表現型を指標として ebi の機能を検討した（文献 3）。具体的には ebi の機能低下により発現低下する遺伝子を網羅的な解析から明らかにした。

(2) さらに、これら細胞周期関連遺伝子のプロモーターにおける PcG 蛋白質のリクルートメントに関してクロマチン免疫沈降法 (ChIP) による解析を行い、PcG のプロモーター上へのリクルートに ebi が関与しているのかを検討した。具体的にはショウジョウバエ培養細胞である S2 細胞を用いて dsRNA を導入することにより ebi の発現量を低下させ、PcG の構成因子である Pc あるいは Psc に対する抗体で

PRC1 がプロモーター領域にリクルートされるかどうかを検討した。プライマーとして G1 期で働く細胞周期関連遺伝子 (Rbf1, E2f1, Dp) を使い、コントロールとして AbdA を調べた。

(3)PcG の機能解析を行っている研究グループから PRC1 複合体と Ebi が相互作用することを示唆するデータが報告されていた (文献4)。そこで本研究では PRC1 の細胞内局在変化に関して細胞分画して検討した。Ebi の発現低下による PRC1 の細胞内局在変化を観察した。

(4)Ebi は F-box/WD40 リピート蛋白質であることから E3 ユビキチンリガーゼとしての機能が予想されている。そこで Ebi の発現量を変化させた時の PcG の蛋白質安定性に関する解析を行った。

4. 研究成果

(1)ebi による G1 制御因子の発現制御 : ebi の機能欠損細胞における遺伝子発現プロファイリングを行った結果、ebi の機能低下により発現低下する遺伝子として細胞周期で機能する *cycA*, *cycB*, *cdc2*, RBF (Rb ホモログ), *rux*, *p53* 等の遺伝子が明らかになった。これらは、全て G1-S 期の遷移で働いている遺伝子であることから、ebi により G1 期制御に関わる遺伝子発現が調節されていることが示唆された。

(2)Ebi 依存的な PcG のクロマチン上へのリクルートメント : S2 細胞で ebi の発現量を低下させたところ、PRC1 複合体が細

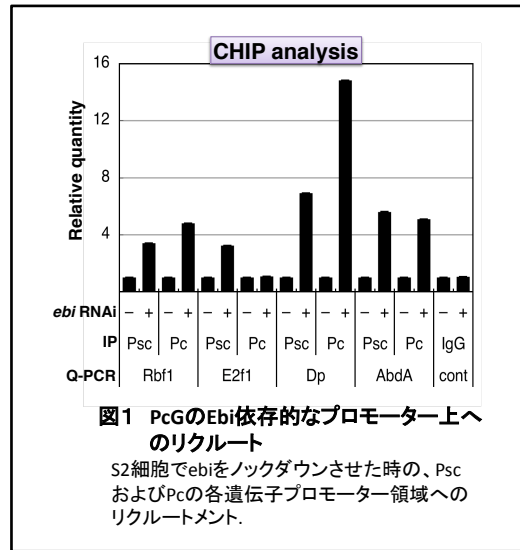


図1 PcGのEbi依存的なプロモーター上へのリクルート
S2細胞でebiをノックダウンさせた時の、PscおよびPcの各遺伝子プロモーター領域へのリクルートメント。

胞周期関連遺伝子のプロモーター領域にリクルートされてくることを確認した (図1)。さらに、メチル化ヒストン (H3K27met) に対する抗体で、検討した結果、ebi の機能低下により H3K27met が細胞周期関連遺伝子のプロモーター領域で高くなることが確認された。このとき、PcG の蛋白質の局在に関して、細胞分画してみたところ、ebi の発現低下によりクロマチン上の PRC1 が増加する一方で全体的な PRC1 の量は低下する傾向にあることが解った。

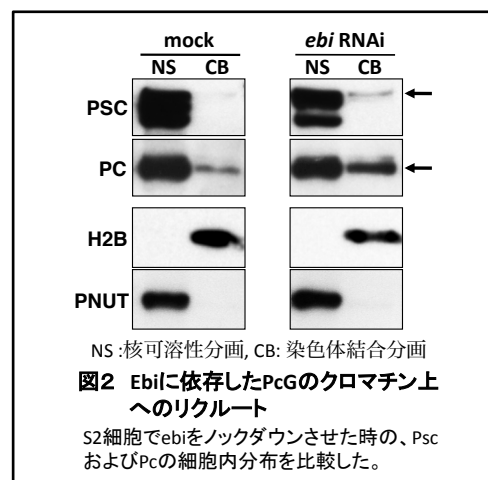
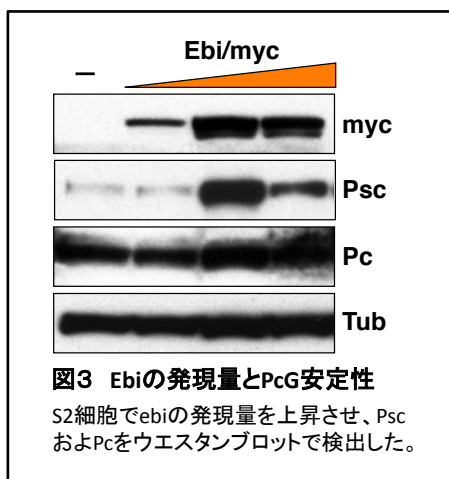


図2 Ebiに依存したPcGのクロマチン上へのリクルート

S2細胞でebiをノックダウンさせた時の、PscおよびPcの細胞内分布を比較した。

(3) PcG のクロマチン上へのリクルートと Ebi の機能との関係解明： PRC1 の構成因子である Pc と Psc について S2 細胞内の局在を見るため、細胞の抽出液を分画して検討した。その結果、RNAi による ebi の機能低下に伴い、Psc, Pc のクロマチン上へのリクルートメントが上昇することが明らかになった (図 2)。

(4)Ebi による PcG 蛋白質の安定性制御： Ebi と PRC 構成因子である Pc を同時に存在した時の Pc の安定性に関して検討したところ、Ebi の発現量に従って、Pc および Pc の安定化が生じている可能性が示唆された (図 3)。



<引用文献>

- ①Dong, X., **Tsuda, L** (筆頭著者), Zavitz, KH., Lin, M., Li, S., Carthew, RW., and Zipursky, SL*. ebi regulates epidermal growth factor receptor signaling pathways in *Drosophila*. *Genes and Development.*, 13: 954-965, 1999
- ②**Tsuda, L.**, Nagaraj, R., Zipursky, S.L., and Banerjee, U*. An EGFR/Ebi/Sno pathway promotes Delta expression by interacting

Su(H)/SMRTERrepression during inductive Notch signaling. *Cell*, 110: 625-637, 2002

③**Lim, Y.M.**, Yamasaki, Y., and **Tsuda, L*** Ebi alleviates excessive growth signaling through multiple epigenetic functions in *Drosophila*. *Genes to Cells*, 18: 909-920, 2013

④Strübbe, G., Popp C., Schmidt, A., Pauli, A., Ringrose, L., Beisel, C., Paro, R. Polycomb purification by in vivo biotinylation tagging reveals cohesin and Trithorax group proteins as interaction partners. *PNAS*, 108: 5572-5577, 2011.

5. 主な研究論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① **Tsuda, L***, Omata, Y., Yamasaki, Y., Minami R., **Lim, Y.M.** Pyroglutamate-amyloid- β peptide expression in *Drosophila* leads to caspase-dependent and endoplasmic reticulum stress-related progressive neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, 26: 4642-4656, 2017 (査読有)
- ② Sofola-Adesakin, O., Khericha, M., Snoeren, I., **Tsuda, L.**, Partridge, L* pGluA β increases accumulation of A β in vivo and exacerbates its toxicity. *Acta Neuropathologica Communications*, 4: 109, 2016 (査読有)
- ③ Omata, Y., Tharasegaran, S., **Lim, Y.M.**, Yamasaki, Y., Ishigaki, Y., Tatsuno, T., Maruyama, M., and **Tsuda, L*** Expression of amyloid- β in mouse cochlear hair cells causes an early-onset auditory defect in high-frequency sound perception. *Aging*, 8: 427-440, 2016 (査読有)
- ④ **Lim, Y.M.**, **Tsuda, L*** Ebi, a *Drosophila*

homologue of TBL1, regulates the balance between cellular defense responses and neuronal survival. *American Journal of Neurodegenerative diseases*, 5: 62-68, 2016
(査読有)

- ⑤ Lim, Y.M., Yagi, Y., Tsuda, L* Cellular Defense and Sensory Cell Survival Require Distinct Functions of *ebi* in *Drosophila*. *PLOS ONE*, 10: e0141457, 2015 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Lim Y.M., Tsuda L. Establishment of new Alzheimer's disease mouse model using auditory hair cells. Keystone Symposium, Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease (E2), May 18, Yokohama, Japan, 2017
- ② Lim Y.M., Tsuda L. $A\beta_{pE3-42}$ in *Drosophila* leads to endoplasmic reticulum stress-related neurodegeneration
第 40 回日本基礎老化学会大会、名古屋、2017
- ③ 津田玲生、Chemical genetic approaches for Alzheimer's disease using *Drosophila* and mouse model. 第 68 回日本細胞生物学会大会シンポジウム (Co-organizer)、京都、2016

[図書] (計 1 件)

津田 玲生 新規アルツハイマー病モデルマウス -加齢性感覚器障害とアルツハイマー病との関連-. 基礎老化研究 **41**, 15-23、基礎老化学会、2017.

[産業財産権] (計 3 件)

○ 出願状況 (計 1 件)

出願番号：特願 2017-099855

発明者：山崎泰豊、柳澤勝彦、津田 玲生

発明の名称：遺伝子組換え無脊椎動物アルツハイマー病モデルおよびその利用

出願人：国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター

出願日：平成 29 年 (2017 年) 5 月 19 日

○ 取得状況 (計 2 件)

① 特許第 5876664 号

出願番号：特願 2011-085642

公開番号：特開 2012-217379

発明者：津田 玲生、林 永美

発明の名称：アルツハイマー病の治療薬のスクリーニング方法、及び、トランスジェニック非ヒト動物

出願人：国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター

出願日：平成 23 年 (2011 年) 4 月 7 日

登録日：平成 28 年 (2016 年) 1 月 29 日

② 特許第 6055123 号

出願番号：特願 2016-009644

公開番号：特開 2016-052337

発明者：津田 玲生、林 永美

発明の名称：ベクターの開発

出願人：国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター

出願日：平成 23 年 (2011 年) 4 月 7 日

登録日：平成 28 年 (2016 年) 12 月 9 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/camd/department/ama/Index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 玲生 (TSUDA, Leo)
国立研究開発法人
国立長寿医療研究センター
創薬モデル動物開発室・室長
研究者番号：30333355

(2) 研究分担者

林 永美 (LIM, Young-Mi)
国立研究開発法人
国立長寿医療研究センター
創薬モデル動物開発室・
研究開発研究員
研究者番号：60421898