

平成 22 年 4 月 27 日現在

研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2004～2008
 課題番号： 16084201
 研究課題名（和文）細胞核内部アーキテクチャーの分子構築とクロマチン機能制御メカニズム
 研究課題名（英文）Researches on intra-nuclear architecture and regulation of chromatin function
 研究代表者
 原田 昌彦 (HARATA MASAHIKO)
 東北大学・大学院農学研究科・准教授
 研究者番号：70218642

研究成果の概要：

真核生物ゲノムの機能制御には、クロマチンと細胞核が中心的な役割を果たしている。本研究では、細胞核に局在するアクチンファミリーであるアクチン関連タンパク質(Actin-related protein; Arp)に主に焦点を当て、細胞核の内部構造の分子構築がどのようにクロマチンやゲノムの機能に関与しているかを明らかにすることを目的として研究を進めた。その結果、クロマチンや細胞核の構築において、Arp が様々な分子機構で関与することを明らかにすることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	28,700,000	0	28,700,000
2005 年度	22,900,000	0	22,900,000
2006 年度	22,900,000	0	22,900,000
2007 年度	22,900,000	0	22,900,000
2008 年度	22,900,000	0	22,900,000
総計	120,300,000	0	120,300,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：細胞核、クロマチン、アクチン関連タンパク質、ゲノム機能、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

核内では、遺伝子の転写や複製、修復、組換え、RNA プロセッシング、リボソームの会合など、生命機能発現にとって重要な必須機能が営まれており、これらの個々の素反応・素過程については、生化学的、分子生物学的、遺伝学的研究により、その分子基盤、分子メカニズムが精力的に解析され、多くの情報が得られてきた。しかし、これら個別に解析されてきた素過程は、互いに独立した事象ではなく、「細胞核」という複雑で巨大な構造的

枠組みの中で統合的に進行する。核という場の中で、個々の反応が、時間的、空間的にどのように協調して機能しているのかは、その重要性に反してほとんど理解されていなかった。例えば、核のアーキテクチャーが、遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのかといった基本的とも思える知見すら、未だほとんど得られていない。クロマチンと相互作用する核内骨格（核マトリックス、クロマチン間領域）についても、その構造や構成因子などはほとんど未解明である。さらに、核内に

は、核小体を代表として、スペックル（スプライシング因子コンパートメント）、カハールボディ、PML (promyelocytic leukemia oncoprotein) ボディなどの、その動態がダイナミックに変動する構造体が存在することがわかっているが、それらの具体的な生理機能については、核小体以外ほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

真核生物のゲノム DNA は細胞核にクロマチンとして収納されており、転写・複製・修復などのゲノムの機能はクロマチンの構造による制御を受けている。クロマチンの構造変換の機構については長い間不明であったが、最近になり、クロマチンリモデリング複合体やヒストンアセチル化(HAT)複合体などがクロマチン構造変換に関与することが報告され、その構成タンパク質の解析が急速に進展している。一方で、クロマチンがその機能に応じた構造を形成するためには、細胞核内の骨格（核マトリックス、クロマチン間領域）との相互作用が必要であることが以前より報告されていた。しかし、その分子基盤については未だ不明な点が多い。細胞核内のアクチン関連タンパク質(Actin-related protein: 以下 Arp)およびトポイソメラーゼ II (トポII) は、クロマチン構造変換に関与する複合体の構成因子となり得る一方で、細胞核から単離された核マトリックス画分にも含まれることが示されている。本研究では、これらの核タンパク質に注目し、核内骨格の分子構築を解析すると共に、核内骨格がクロマチン機能構造形成にどのように関わるかを明らかにすることを目指した。

本研究において、細胞核の様々な構造（核膜、核膜孔複合体、核内ドメイン、染色体・クロマチン）を解析する研究者との連携により、核内骨格が細胞核機能発現において担う役割を解明するための新規な実験系を確立することができる。また、可視化に基づいて細胞核機能の解析を行う研究者との連携により、これまでにほとんど解析が行われていない、核内骨格のダイナミクスの観察が可能となり、細胞核機能の新規な機能発現メカニズムの探索が可能となる。

アクチンと進化的・構造的に関連性を有する Arp は、当初は細胞質で機能すると考えられていたが、申請者らは、アクチンファミリーが細胞質のみならず細胞核の機能にも深く関与していることを明らかにした。これまでに、Arp がクロマチンリモデリング複合体、HAT 複合体に最も広く含まれる構成因子の一つであることが示されている。哺乳類の細胞核に局在する Arp については、これまで申請者らにより報告されたものが 2 種あるが、申請者らはこの他にも細胞核に存在する新

規な Arp を 3 種見だし、既に解析を始めている。クロマチンと核構造の両者の分子構築とダイナミクスをこれらの Arp 分子に注目して解析する点で独創的であり、本研究により細胞核構造の構築とダイナミクスにおける新たな分子メカニズムが明らかになると期待した。一方、細胞分化の過程で起こる遺伝子の発現誘導にトポIIβが必須であることを明らかにした。当該遺伝子領域のクロマチンがトポIIβに依存して脱凝縮することを見つけており、本研究は転写開始に先立つクロマチン高次構造の変換による転写誘導という、新しい遺伝子調節機構の存在を確実なものとするのが期待された。

3. 研究の方法

(1) 細胞核に局在するアクチン関連タンパク質(Arp)の挙動の解析

ヒトの細胞核に存在するアクチン関連タンパク質、hArpN⁺, hArpN⁻, hArp5, hArp6, hArp8 のそれぞれ、およびトポIIについて、細胞核内での詳細な局在やダイナミクスを解析した。この観察には蛍光顕微鏡を用いる他、竹安班と連携して、原子間力顕微鏡による観察も行った。Arp と核内ドメイン、核膜、染色体との関係については、田代班、原口班、高橋班とそれぞれ連携して解析した。

(2) Arp と核骨格との相互作用の解析
³²P-標識した GST-Arp をプローブとして、核マトリックス画分を用いた Far western blot を行い、これらの Arp に結合するタンパク質を検出した。また、Arp にタグを付加して、複合体を部分精製した。Arp の結合が観察されたバンド、あるいは部分精製画分の質量分析をおこなうことにより、Arp と相互作用するタンパク質を同定した。免疫沈降法やなどにより、両者の相互作用を確認した。

さらに、核マトリックスや染色体を構築する主要タンパク質である NuMA (nuclear/mitotic apparatus protein) と Arp の相互作用の解析を行なった。NuMA のアミノ末端に CH-ドメインが存在することが報告されているが、NuMA の CH-ドメインと細胞核内の Arp との相互作用はまだ解析されていなかったため、この相互作用を免疫沈降法や局在性の観察などにより解析した。

(3) MAR/SAR ドメインにおける Arp の機能の解析

MAR (matrix-attachment region)/SAR (scaffold-attachment region) と呼ばれる DNA 領域は、DNA と核マトリックスが結合する部位であると共に、クロマチンリモデリング複合体などが機能する場であると考えられている。クロマチン免疫沈降法により、Arp の MAR/SAR 領域への結合を解析すると共に、RNAi による Arp の発現の低下や Arp の過発現による MAR/SAR の機能の変化を解析した。

MAR/SAR に結合することが既に知られているトポ II についても同様の解析を行い、Arp との相互作用の有無を免疫沈降-ウェウタンブロット法で解析した。また、免疫沈降/DNA チップ (ChIP/Chip) の手法によりゲノムワイドに Arp とトポ II β の結合部位をマッピングした。

(4) 転写、修復、細胞分化への Arp の関与の解析

出芽酵母の Arp の変異株は、遺伝子発現・DNA 修復・核の分離などに異常を示す。また、脳・神経特異的に発現する hArpNalpha は、神経細胞分化への関与が予想されている。神経細胞に分化可能な P19 EC 細胞を用い、RNAi による発現の低下や過発現により、転写・修復・神経細胞分化にどのような影響が観察されるかを調べると共に、その際の核構造や核内ドメイン・クロマチンの変化を検出することにより、核・クロマチン構造とこれらの細胞機能との相関を解析した。

4. 研究成果

真核生物ゲノムのエピジェネティック制御では、クロマチンと細胞核がその分子基盤となっている。最近になり、クロマチン構造に基づいたエピジェネティック制御の機構が次々に明らかにされているが、細胞核によるエピジェネティック制御については、その分子機構はほとんどが不明のままである。本研究課題では、細胞核に局在するアクチンファミリーであるアクチン関連タンパク質 (actin-related protein; Arp) に主に焦点を当て、細胞核の内部構造の分子構築がどのようにクロマチンやゲノムの機能に関与しているかを明らかにすることを目的として研究を進めた。実験系としては、出芽酵母と脊椎動物培養細胞を用いた。細胞核に局在する Arp の一つである Arp4 は、複数のクロマチンリモデリング複合体、ヒストンアセチル化複合体の構成因子である。我々は、Arp4 が ATP 結合能を有し、それによって細胞核内複合体のダイナミクスを制御することを、本特定領域の須賀則之博士と共同で明らかにした (Sunada et al., 2005)。また、IN080 クロマチンリモデリング複合体に含まれる Arp5, Arp8 が停止した複製フォークの進行再開に必要であることを明らかにした (Shimada et al., 2008)。脊椎動物においても、Arp5 が DNA 切断修復に関与することを、本特定領域の田代聡博士、大山隆博士との共同研究で見出し (Kitayama et al., 2009)、さらにアクチン結合タンパク質との機能的相互作用を、本特定領域の竹安邦夫博士との共同研究で明らかにした (Kumeta et al., in press)。興味深いことに、脊椎動物 Arp8 は IN080 複合体に非依存的に分裂期染色体上に局在して染色体分配に関与することを、本特定領域

の胡桃坂仁志博士と共同で報告した (Aoyama et al., 2008)。この結果は、細胞核内で Arp が、クロマチンリモデリング複合体やヒストンアセチル化複合体に依存しない機能を有していることを示唆するものであった。これについてさらに検証を行なうため、Arp6 の解析を行なった。Arp6 は SWR1 クロマチンリモデリング複合体の機能に必要な構成因子であり、SWR1 複合体はヒストンバリエント H2A.Z をクロマチンに導入することで機能する。遺伝学的・生化学的解析から出芽酵母 Arp6 が SWR1/H2A.Z 依存的な機能と、非依存的な機能を有することが示された。リボソームタンパク質遺伝子は、SWR1/H2A.Z 非依存的に Arp6 による発現制御を受けていた。その分子機構を解析したところ、Arp6 がクロマチンの核内配置に関わっており、リボソームタンパク質遺伝子を核膜孔複合体と相互作用させることで、この発現制御に関与することを見出した (Yoshida et al., in press)。脊椎動物細胞においては、H2A.Z の二つのアイソフォームが存在しているが、本特定領域の深川竜郎博士との共同研究でノックアウト細胞を作成し、この H2A.Z アイソフォームの機能を区別して解析することに成功した (Matsuda et al., in press)。これらのノックアウト細胞の表現形は Arp6 ノックアウト細胞の表現系とは異なることから、脊椎動物細胞の細胞核構築においても、Arp6 が SWR1/H2A.Z に非依存的な機能を有していることが予想される。これらの研究により、クロマチン構造制御と細胞核構築に対し、Arp が異なった分子機構で関与することを提唱することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

原著論文

1. Yoshida, T., Shimada, K., Oma, Y., Kalck, V., Akimura, K., Taddei, A., Iwahashi, H., Kugou, K., Ohta, K., Gasser, S.M. and Harata, M. Actin-related protein Arp6 influences H2AZ-dependent and -independent gene expression and links ribosomal protein genes to nuclear pores. *PLoS Genet.*, (2010) (in press) (査読有)
2. Matsuda, R., Hori, T., Kitamura, H., Takeuchi, K., Fukagawa, T. and Harata, M. Identification and characterization of two isoforms of the vertebrate H2A.Z histone variant. *Nucleic Acids Res.*, (2010) (in press) (査読有)
3. Kumeta, M., Yoshimura, S.H., Harata, M. and Takeyasu, K. Molecular

mechanisms underlying nucleocytoplasmic shuttling of actinin-4. *J. Cell Sci.*, (2010) (in press) (査読有)

4. Kitayama, K., Kamo, M., Oma, Y., Matsuda, R., Uchida, T., Ikura, T., Tashiro, S., Ohyama, T., Winsor, B. and Harata, M. The human actin-related protein hArp5: nucleocytoplasmic shuttling and involvement in DNA repair. *Exp. Cell Res.*, 315: 206-217 (2009) (査読有)

5. Shimada, K., Ohta, Y., Schleker, T., Kugou, K., Ohta, K., Harata, M. and Gasser SM. Ino80 Chromatin Remodeling Complex Promotes Recovery of Stalled Replication Forks. *Curr. Biol.*, 18: 566-575 (2008) (査読有)

6. Aoyama, N., Oka, A., Kitayama, K., Kurumizaka, H. and Harata, M. The actin-related protein hArp8 accumulates on the mitotic chromosomes and functions in chromosome alignment. *Exp. Cell Res.*, 314: 859-868 (2008) (査読有)

7. Miloshev, J., Harata, M. and Georgieva, M. The nuclear actin-related protein Act3p/Arp4 influences yeast cell shape and bulk chromatin organization. *J. Cell Biochem.*, 104: 59-67 (2008) (査読有)

8. Sano, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Tsutsui, KM., and Tsutsui, K. Topoisomerase IIb activates a subset of neuronal genes that are repressed in AT-rich genomic environment. *PLoS ONE*, 3(12), e4103(1-13), (2008) (査読有)

9. Ogiwara, H., Ui, A., Kawashima, S., Kugou, K., Onoda, F., Iwahashi, H., Harata, M., Ohta, K., Enomoto, T. and Seki M. Actin-related protein Arp4 functions in kinetochore assembly. *Nucleic Acids Res.*, 35: 3109-3117 (2007) (査読有)

10. Kawashima, S., Ogiwara, H., Tada, S., Harata, M., Wintersberger, U., Enomoto, T. and Seki, M. The INO80 complex is required for damage-induced recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355: 835-841 (2007) (査読有)

11. Ohfuchi, E., Kato, M., Sasaki, M., Sugimoto, K., Oma, Y. and Harata, M. Vertebrate Arp6, a novel nuclear actin-related protein, interacts with heterochromatin protein 1. *Eur. J. Cell Biol.*, 85: 411-421 (2006) (査読有)

12. Nishiyama, A., Kaneko, J., Harata, M. and Kamio, Y. Assembly of staphylococcal leukocidin into a pore-forming oligomer on detergent-resistant membrane microdomains, lipid rafts, in human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci.*

Biotechnol. Biochem., 70: 1300-1307 (2006) (査読有)

13. Bode, J., Winkelmann, S., Gotze, S., Spiker, S., Tsutsui, K., Bi, C., Prashanth, A.K., and Benham, C. Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *J. Mol. Biol.*, 358: 597-613 (2006) (査読有)

14. Tsutsui, KM., Sano, K., Hosoya, O., and Tsutsui, K. Expression dynamics and functional implications of DNA topoisomerase IIb in the brain. (Review) *Anat. Sci. Int.*, 81: 156-163 (2006) (査読有)

15. Sunada, R., Goerzer, I., Oma, Y., Yoshida, T., Suka, N., Wintersberger, U. and Harata, M. The nuclear actin-related protein Act3p/Arp4p is involved in the dynamics of chromatin modulating complexes. *Yeast*, 22: 753-768 (2005) (査読有)

16. Purbowasito, W., Suda, C., Yokomine, T., Zuair, M., Sado, T., Tsutsui, K., and Sasaki, H. Large-scale identification and mapping of nuclear matrix-attachment regions in the distal imprinted domain of mouse chromosome 7. *DNA Res.*, 11: 391-407 (2004) (査読有)

英文総説 :

17. Ohfuchi Maruyama, E. and Harata, M. Involvement of actin-related protein Arp6 in organization of chromosomes. *Adv Chromosome Sci.* (2010) (in press) (査読無)

18. Harata, M., Ohfuchi, E. and Oma, Y. Nuclear actin-related proteins involved in the organization of euchromatin and heterochromatin. *DNA structure, chromatin, and gene expression* (eds. Shimizu, M. and Kiyama, R.) Transworld Research Network Inc., pp. 181-112 (2006) (査読無)

19. Harata, M. Actin-related proteins involved in nuclear and chromatin dynamics. *Nuclear Dynamics: Approaches from Biochemistry, Molecular Cell Biology, and Visual Biology* (eds. Nagata, S. and Takeyasu, K.) Springer-Verlag Tokyo, Inc., pp. 239-248 (2006) (査読無)

和文総説 :

20. 原田昌彦、北山久美子、尾間由佳子、核の構造とその分子基盤 *蛋白質核酸酵素* 51, 591-599 (2006) (査読無)

21. 原田昌彦、クロマチン *蛋白質核酸酵素* 51, 1943-1949 (2006) (査読無)

[学会発表] (計 19 件)

- 1, Masahiko Harata, Roles of actin-related proteins in nuclear architecture and genome function, 第 32 回日本分子生物学会年会シンポジウム「細胞核アーキテクチャーに基づくゲノム機能制御: そのコンセプトの最新像」、平成 21 年 12 月 10 日、横浜
- 2, 原田昌彦、クロマチンリモデリングおよびヒストンバリエーションによるゲノム機能制御、平成 21 年度国立遺伝学研究所研究会-クロマチン・染色体の分子構築と機能制御、平成 21 年 11 月 12-13 日、三島
- 3, 原田昌彦、脊椎動物のアクチン関連タンパク質による染色体・細胞核機能構造の形成、日本遺伝学会第 81 回大会ワークショップ「核ダイナミクス研究の新展開」平成 21 年 9 月 17 日、松本
- 4、吉田貴人、島田健士、尾間由佳子、秋村和美、岩橋均、久郷和人、太田邦史、Susan Gasser、原田昌彦、アクチン関連タンパク質 Arp6 の核膜との機能的相互作用およびクロマチン核内配置への関与、第 61 回日本細胞生物学会大会ミニシンポジウム-細胞骨格、核膜と核機能の連係、平成 21 年 6 月 3 日、名古屋
- 5, Yoshida T, Shimada K, Oma Y, Kugou K, Ohta K, Hori T, Fukagawa T, Gasser S, Harata M. Actin-related proteins functional organization of chromatin, Switzerland-Japan Joint Meeting on the Molecular Mechanisms regulating “Chromosome Dynamics and Genome Stability”, May 14-16, 2009, Villars, Switzerland
- 6, Harata M. Involvement of the actin-related protein Arp6 in spatial organization of radial chromosome territories. The 3rd Asian Chromosome Colloquium, December 1-4, 2008, Osaka, Japan
- 7, 原田昌彦、ゲノム機能制御におけるクロマチンリモデリング複合体の多様な機能、国立遺伝学研究所研究会 クロマチン研究会 -細胞核・染色体・クロマチンの機能構造構築と動態-、平成 20 年 10 月 22 日、三島
- 8, Harata M. Multiple functions of actin-related proteins in chromatin and nuclear organization. Nuclear Signaling Network -Epigenetics and Development-, December 12, 2008, Sendai, Japan
- 9, 原田昌彦、コンフォーカルレーザー顕微鏡などによるバイオイメージングに基づく細胞機能解析、第 62 回日本栄養・食糧学会大会 (女子栄養大学) イブニングセミナー「若手研究者のための栄養・食糧学技術セミナー」平成 20 年 5 月 3 日、板戸
- 10, 原田昌彦、アクチンファミリーと細胞核・クロマチンの機能構造文部科学省科学研究費助成金「特定領域研究」2 領域合同 公開シンポジウム「クロマチンシグナリングの分子機構」平成 20 年 1 月 8 日、東京
- 11, Harata M. Actin-related proteins involved in dynamics organization of chromatin and cell nucleus. International Symposium -Functional Organization of the nucleus- January 9, 2007, Awaji, Hyogo, Japan
- 12, 吉田貴人、島田健士、秋村和美、久郷和人、太田邦史、岩橋均、Susan Gasser、原田昌彦、クロマチンの核内配置とアクチン関連タンパク質: クロマチン工学への応用 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会ワークショップ「クロマチン工学の開拓」平成 19 年 12 月 11-15 日、横浜
- 13, 原田昌彦、アクチン関連タンパク質による核構築とゲノム機能制御、平成 19 年度 国立遺伝学研究所研究会「クロマチン研究会 -ゲノム・細胞核から個体発生まで-」平成 19 年 10 月 25-26 日、三島
- 14, Yoshida T, Shimada K, Kugo K, Ohta K, Gasser S, Harata M, Actin-related proteins involved in chromatin and nuclear organization, 第 59 回日本細胞生物学会シンポジウム「細胞核構造構築のダイナミクス」平成 19 年 5 月 28 日、博多
- 15, 原田昌彦、吉田貴人、大淵恵理、尾間由佳子、久郷和人、太田邦史、Susan Gasser、島田健士細胞核のアクチンファミリーによるゲノムダイナミクス制御、日本農芸化学会シンポジウム「ゲノムダイナミクスの理解とその応用展開」平成 19 年 3 月 27 日、東京
- 16, 原田昌彦、細胞核・クロマチンのダイナミクスとアクチン関連タンパク質 Arp6、国立遺伝学研究所研究会「クロマチンダイナミクスとゲノム機能制御」平成 18 年 10 月 15 日、三島
- 17, 北山久美子、松田涼、原田昌彦、ヒト hArp5 と hIno80 の細胞核・ゲノム機能への関与、遺伝研研究会「クロマチンダイナミクスとゲノム機能制御」平成 17 年 10 月 7 日、三島
- 18, 原田昌彦、細胞核内構造-クロマチン相互作用とゲノム機能制御、日本農芸化学会東北支部シンポジウム「クロマチンの化学 -ゲノム機能の鍵を握るタンパク質複合体の驚異-」平成 17 年 7 月 2 日、仙台
- 19, 原田昌彦、細胞核・染色体・クロマチンの機能構造とアクチン関連タンパク質、国立遺伝学研究所研究会「DNA の高次構造とクロマチンに印された情報の理解に向けて」平成

16年9月10日、三島

〔図書〕(計 5件)

1. 平岡泰、原田昌彦、木村宏、田代聡：編、**実験医学増刊号「細胞核-遺伝情報制御と疾患」**、羊土社、233頁(1-233)(2009)
2. 尾間由佳子、松田涼、北村大志、原田昌彦、クロマチン細胞核の機能ドメイン形成、**実験医学増刊号「細胞核-遺伝情報制御と疾患」**(平岡泰、原田昌彦、木村宏、田代聡：編) 2752-2758(2009)
3. 原田昌彦、大山隆、DNA複製と遺伝子発現 **ベーシックマスター生化学** (大山隆：監修) オーム社、289-324(2008)
4. 原田昌彦、翻訳の調節、**ベーシックマスター分子生物学** (東中川徹、大山隆、清水光弘：編)、オーム社、196-219(2006)
5. 原田昌彦、クロマチンレベルの転写制御機構 **細胞核の分子生物学** (水野重樹：編) 原田昌彦、朝倉書店、34-58(2005)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 昌彦 (HARATA MASAHIKO)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：70218642

(2) 研究分担者

筒井 研 (TSUTSUI KEN)
岡山大学・自然生命科学研究支援
センター・教授
研究者番号：70108158