

令和元年6月3日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00888

研究課題名(和文) FABP5によるクロマチン構造制御を介した遺伝子発現調節機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of gene expression mechanism via regulation of chromatin structure by fatty acid binding protein 5 (FABP5)

研究代表者

安達 泰弘 (Yasuhiro, Adachi)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：10346546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪酸結合タンパク質(FABP)は、細胞内で脂肪酸に結合し可溶化することで代謝やシグナル伝達など多様な細胞内プロセスに関与している。FABP5の有無で発現量が変動する脂肪酸シグナル伝達の標的遺伝子候補として見出したクロマチン構造制御に関わるHmgn1について、転写調節機構の解析を行った。その結果、Hmgn1遺伝子上流2000塩基の範囲に、5箇所の脂質をリガンドする転写調節因子の結合配列を見出した。このうち3か所のPPAR結合配列と1か所のRAR結合配列を改変し、Hmgn1遺伝子の転写活性を比較したところ、2箇所のPPARとRAR結合配列が転写に大きくかかわっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪酸結合タンパク(FABP)分子群は、エネルギー産生、膜脂質・生理活性脂質の合成、シグナル伝達等多様な細胞内プロセスに関与することが知られている。FABPが関わる脂肪酸シグナル伝達経路の標的遺伝子は、脂肪酸代謝酵素や増殖・分化関連遺伝子群であるといわれているが、その全貌は明らかではない。本研究結果は、染色体構造を部分的に変化させることで遺伝子の転写を調節するHMGN1の遺伝子が、脂肪酸シグナル伝達系の調節を受けている可能性を示すものである。

今後、FABP分子群と染色体構造制御及び脂肪酸分子種の関係が明らかになれば、栄養素と遺伝子転写調節機構の基礎的理解に貢献できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Fatty acid binding protein (FABP) is involved in various intracellular processes such as metabolism and fatty acid signal transduction by solubilizing fatty acids in cells. The gene transcription regulatory mechanism was analyzed for Hmgn1 involved in chromatin structure control found as a target gene candidate for fatty acid signaling whose expression level fluctuates depending on the presence or absence of FABP5. As a result, we detected five binding sequences for lipid-liganded transcription regulatory factors in the range of 2000 bases upstream of the Hmgn1 gene. When three PPAR binding sequences and one RAR binding sequence were modified and the transcriptional activity of the Hmgn1 gene was compared, it was suggested that the two PPAR and RAR binding sequences may be largely involved in transcription of Hmgn1 gene.

研究分野：解剖学、細胞生物学

キーワード：脂肪酸結合タンパク 遺伝子発現制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸を含む脂質は、エネルギー物質であると同時に生体膜の構成材料や臓器・細胞間において情報担体としても機能する重要な物質であり、中でもドコサヘキサエン酸 (DHA) などの n-3 系長鎖不飽和脂肪酸と、アラキドン酸などの n-6 系長鎖不飽和脂肪酸が注目されている。これらは直接的に免疫担当細胞に作用して末梢免疫応答を制御し、またこれらの摂取バランスが炎症性皮膚疾患や自己免疫疾患、さらには一部の精神疾患や生活習慣病の病態形成・制御に重要であることは、免疫学的、栄養学的に広く知られているところである。加えて近年では、糖質や脂質などの栄養分子がクロマチン構造制御を介して、いわゆるエピジェネティックな遺伝子発現制御を行っていることが多数報告されている。

一方、脂肪酸を含む脂質は水に不溶であるため、細胞内では脂肪酸結合タンパク質 (FABP) 分子に結合して可溶化され、脂肪酸の細胞内局在が決定されていると考えられている。FABP は分子ファミリーを形成し、組織・細胞特異的に単一または複数種の分子サブタイプを発現することが知られている。また、発現する各 FABP サブタイプには脂肪酸との結合特異性が存在すること、脂肪酸代謝、生理活性脂質 (エイコサノイド) 産生など多様な細胞内プロセスに関与していることが明らかにされつつある。さらに、FABP は結合した脂肪酸を脂質リガンドとして核内受容体に受け渡し、種々の遺伝子発現を誘導・制御する脂肪酸シグナル伝達系を構成している。その標的遺伝子は細胞増殖、脂肪酸代謝酵素であると言われているが、その全貌は明らかではない。

我々はこれまでに、免疫系で発現する表皮型 FABP (epidermal type, E-FABP, FABP5) に着目し、FABP5 が液性因子産生を調節すること (Kitanaka et al., 2006, Yamamoto et al., 2008)、更に一部の胸腺上皮細胞では 2 種類の FABP (FABP4, FABP5) が発現し、モデル細胞系で液性因子産生を調節し得ること (Adachi et al., 2012) などを見出してきた。しかしながら、免疫機能における脂肪酸の影響や、FABP の器官特異的な機能、そして FABP の標的遺伝子の種類については、未だ理解が不十分である。

そこで、野生型と FABP5-KO マウス免疫系臓器の上皮細胞で発現する遺伝子の発現量の比較を行ったところ、FABP5-KO 上皮細胞では非ヒストン性のクロマチン構造制御タンパクである Hmgn1 の遺伝子発現量に変動していることを見出した。HMGN1 (HMG14)、は DNA とヒストンの複合体 (ヌクレオソーム) に特異的に結合する分子であり、クロマチン構造を部分的に変化させ、DNA 修復の促進や転写調節に働くこと等が報告されている (Bustin et al., 2013)。

2. 研究の目的

本研究計画では、表皮型 FABP (FABP5) がクロマチン構造制御タンパクである HMGN1 の遺伝子転写制御を介し、標的遺伝子の発現を支配・制御している可能性を検討することを目的とする。特に FABP5 が Hmgn1 遺伝子の転写に関わる分子メカニズムの解明と、FABP5 と HMGN1 が細胞機能調節にどのように関わっているのかについて重点的に検討する。

3. 研究の方法

(1) Hmgn1 遺伝子発現の確認と再解析

先に行った DNA アレイ実験で見出された、FABP5-KO マウスにおける Hmgn1 遺伝子の発現変動 (発現低下) は FABP5 遺伝子の KO によるものなのかを確認するため、RT-PCR による発現チェックを行った。

(2) Hmgn1 遺伝子の転写調節領域の推定

野生型マウスの上皮細胞株 IT-76MHC から高純度のゲノム DNA を調整し、Hmgn1 遺伝子の exon1 を含む転写開始点から上流 2000 塩基までを PCR で増幅し pUC19 ベクターにクローニングした。これを鋳型に、遺伝子上流領域を段階的に削除した DNA 配列を作製し、ルシフェラーゼレポーターベクター (pGL4.10[luc2], Promega) にクローニングすることにより、種々の deletion clone を作製した。遺伝子導入試薬 (Fugene HD, E2311, Promega) を用いて個々の deletion clone とルシフェラーゼコントロールベクター (pGL4.74[hRuc/TK], E6921, Promega) とともに IT-76MHC 細胞に導入した。24 時間後に細胞溶解液を調整し、ルシフェラーゼ発光測定キット (Dual Luciferase Reporter Assay System, E1910, Promega) を用いて本学・共同利用研究センターに既設の発光検出装置 (VarioSkan LUX, ThermoScientific) で発光量を測定した。

(3) Hmgn1 遺伝子の転写調節領域における転写調節因子の推定

推定した遺伝子転写調節領域の DNA 配列中に、既知の転写調節因子の結合配列の有無とその種類を推定するため、オープンソースの解析プログラム (FIMO version 4.12.0, Grant C.E. et al., 2011, <http://meme-suite.org/tools/fimo>) とデータベース (JASPAR, 7th release, <http://jaspar.genereg.net>) を使用し検索を行った。

(4) 転写調節因子の結合配列への変異導入

推定した転写調節因子の結合配列が Hmgn1 遺伝子転写において機能しているか否かを確認するため、部位特異的に変異を導入するプライマーを作製し、Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit,

E0554S, NEB) を用いて deletion clone に変異を導入した。これらをルシフェラーゼコントロールベクターと共に IT-76MHC 細胞に導入し、ルシフェラーゼ発光量の変化を測定した。

(5) クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイによる確認

一連のルシフェラーゼ発光アッセイ結果から推定した転写調節因子 (タンパク分子) が、実際に Hmgn1 遺伝子の転写調節領域の結合配列に結合しているか否かを確認するため、ChIP アッセイを行った。比較対象としては、Lipofectamine 3000 (L3000008, Invitrogen) を用いて E-FABP siRNA (sc-41238, SantaCruz) を導入することで Fabp5 遺伝子発現をノックダウンした IT-76MHC 細胞を使用した。高純度ヌクレオソームの調整と物理的せん断には、本助成にて導入した超音波破碎システム (SFX250, BRANSON)、または ChIP-IT Express Enzymatic (53009, ActiveMotif) を使用した。

4. 研究成果

(1) Hmgn1 遺伝子発現の確認と再解析

先に得られているデータの確認を行った結果、これまでに FABP5 の発現が報告されている臓器においては、KO により Hmgn1 の遺伝子発現が消失していた。この結果から、Hmgn1 遺伝子発現は FABP5 が関与する情報伝達系の下流に位置し、促進的に制御されている可能性が示唆された。

従って、FABP5 を発現していない細胞系では、HMGN1 は構成的に発現していると考えられたため、コントロール実験として FABP5 を発現していない単離肝細胞でタンパク質レベルの比較実験を行ったところ、予想に反し FABP5-KO 肝細胞でも HMGN1 発現は消失していた。文献では肝細胞での Hmgn1 発現が報告されていることから、全身性に Hmgn1 発現が消失している、即ち遺伝子変異による結果である可能性が示唆された (図 1)。(我々の未発表データでは肝細胞で FABP5 は発現していない。図 1 の野生型 (WT) 肝細胞において FABP5 発現が検出されなかったことから、単離肝細胞の精製度は非常に高かったと考えられた。) このため、野生型マウスと FABP5-KO マウスの交配により新たにヘテロ個体を作成し、これらの交配により得た各仔個体で Hmgn1 発現を比較したところ、正常な Hmgn1 遺伝子発現が検出されたこと (図 2)、そして大まかにではあるが、FABP5-KO マウスの Hmgn1 遺伝子座の変異解析を行ったところ、5' 及び 3' 側に異常がある可能性が示唆されたこと (data not shown) から、现阶段では、この Hmgn1 発現消失は遺伝子変異によるものであると結論づけた。

では、再選別した FABP5-KO 個体において Hmgn1 遺伝子発現は変動しているのか否かについて検討した結果、当初の結果とは逆に野生型個体に比して約 2 倍に増加していることが判明した (図 3)。この結果は、Hmgn1 遺伝子転写は FABP5 が関与する情報伝達系の下流に位置し、(当初は促進的と考えていたが) 抑制的に制御されている可能性を示唆するものであり、加えてこれまでに報告されている FABP5 が関与する情報伝達系の標的遺伝子の転写は、染色体の立体構造を制御する HMGN1 により調節されている可能性をも示唆するものである。

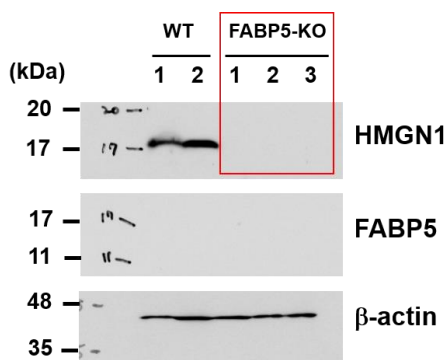


図 1 単離肝細胞から抽出した総タンパク質によるウェスタンブロット

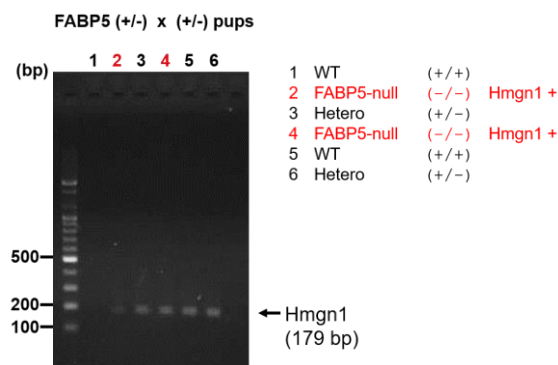


図 2 FABP5 +/- 個体同士の交配で得た各仔個体の Hmgn1 遺伝子発現

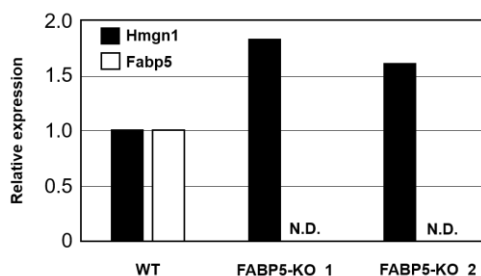


図 3 再選別した FABP5-KO マウスにおける Hmgn1 遺伝子発現量の比較

(2) Hmgn1 遺伝子の転写調節領域の推定

上記の再解析によって、FABP5-KO マウスにおける Hmgn1 遺伝子発現の変動が確認できたことから、転写制御の分子メカニズムの解明のため Hmgn1 遺伝子の exon 1 を含む転写開始点から上流 2000 塩基までについて、順次削除した配列をルシフェラーゼレポーターベクター pGL4.10[luc2]ベクターにクローニングし、deletion clone を作製した。これらをコントロールベクターと共に IT-76MHC 細胞に導入し、ルシフェラーゼ発光量を定量・比較したところ、Hmgn1 遺伝子の転写制御に関わるとされる領域を見出した (図4、Region 1, 2 および3)。

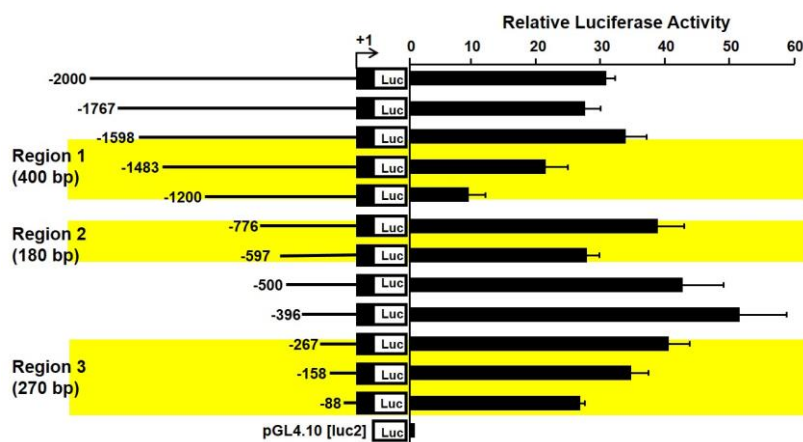


図4 ルシフェラーゼ発光定量による転写制御領域の推定

(3) Hmgn1 遺伝子の転写調節領域における転写調節因子の推定

ルシフェラーゼ発光定量から推定した転写調節に関わると考えられる3領域について、既知の転写調節因子が結合しうる配列を検索したところ、多くの結合配列候補が出力された。

脂肪酸シグナル伝達系において、FABP5 は Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) や Retinoic acid receptor (RAR) 等に 脂肪酸リガンドを受け渡すことが知られていることから、ここでは脂肪酸を含む脂質をリガンドとする転写調節因子の結合可能配列に焦点を絞って解析を進めたところ、上記 Region 1 に2箇所 (RARb: -1530~-1514, PPARg/RXRa: -1447~-1433)、Region 1 に3箇所 (SREBF1: -306~-297, PPARg/RXRa: -180~-65 および -41~-27) 転写調節因子候補とその結合可能配列を見出した。また、Hmgn1 遺伝子は CAAT box と多数の GC-box を有するが、TATA box が無い housekeeping gene の一種であることが推察された。

Region 1 (400 bp)

```
ACATGTGAGTGTGACAGGGCAGGACAGGGCAGAGCTCTTTCTCTGTAGTCTTGCTCAG
GCCATGTCAGGTTTAACTAGAATTTGATCTCCTTGATGGAGAATCCTGTAGAAAACCTGCC
Rarb
CAACTCTATTCCAGGACCAGAGCCCAAGACGCCCCAGCTAACCCTTAGCTGCTCTT
Pparg/Rxra
TAACGTCTTGCTTCTGCAAACTCCCTGCGAGCTACAGAGGGAGACAACAGGATATAACT
TTTGCTCTAAAAGCCCTTGGCTAATGCTCCAGGCTACACTTAAACCTGAATACCT
GAGAATAGCCGCTGGAATAGACTTTGTCATTGAGACATTTTCTCTATGTGCCCTGGCT
ATCTGGGAAGAAGACTTCCAATTGGCTATAAAGTGT
```

Region 2 (180 bp)

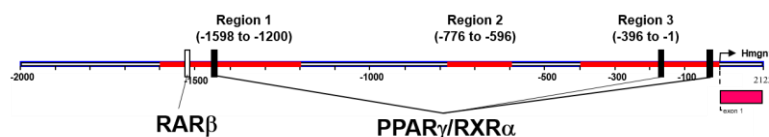
```
ATTGAGCAGCAGTAATACGGCTCGGGTGGGACTCTTGTACCCAGCCCGCTATCTGCATT
CTTGAGGTATACTCAATAATTAAGTGCCTTCATAAACAAGGTCGAATCTGGAAGTCGG
Myb Foxj3 Foxj2
AGCTAGACCACGCGGCTGCGCGAAGGACTGGGCTGTAAAGGGCCGATGTGATTCTT
```

Region 3 (270 bp)

```
AATCACGCCTAGGCACTGCTGAACCCGAGGGGTCCGCGGTGGACTCCGCGGGGGGGCGC
CTGGGGTCCGGACATTTGTGGAAAGCGATGCTGAGGCCACGTGACACGCCCCCACTTAT
Srebf1
CAGCGCGCAGGCGCACTTTTGTCTGCGGCTCAACAACTACCTAGCGGGTCCGGGCGC
ACTCCGCGCCGCCCTCGCGGGGGTCCGCGCCCGAGGGGTGCGGGCCAGGGGCGGGG
Pparg/Rxra
CGATCGGGCGGAGTGCAGCTGCGCGGTGCCTATTCCGGAGCAAGGGCTGGGGCGCTGGCG
CGCGCGGTGGGCTTCCAGGCCAATGAGGCTGGGGGGCGCCCGCTGCGGGGAGGGCG
CAAT-Box
GGGGGAGAGGGGGCGGGCTCCAATCCGGTTCCATCCGGT
Pparg/Rxra
GC-Box
```

図5 推定された転写調節領域における転写調節因子の結合配列 (部位) 予測

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor
 SREBF1: Sterol regulatory element-binding transcription factor 1
 RARb: Retinoic acid receptor beta
 RXRa: Retinoid X receptor alpha



(4) 転写調節因子の結合配列への変異導入

予測された脂肪酸を含む脂質をリガンドとする転写調節因子の結合可能配列が Hmgn1 遺伝子の転写において機能しているか否かを確認するため、ここでは FABP の結合パートナーである PPAR と RAR に焦点を絞り、3 箇所の PPAR 応答配列 (PPRE: PPAR response element) とレチノイン酸応答配列 (RARE: Retinoic acid response element) に変異を導入し (図 6 A および B)、ルシフェラーゼ発光定量を行った。尚、3 箇所の PPRE は Hmgn1 遺伝子の転写開始点に近いものから PPRE 1、2 および 3 とした。

その結果、PPRE 1 のルシフェラーゼ活性は変異導入前の deletion clone である Fw2 と変わらなかったのに対し、PPRE 2 および 3 のルシフェラーゼ活性は最大 3 倍程度に増加した。また、RARE に変異を導入した場合でも同様にルシフェラーゼ活性が増加したことから、これら 2 種 3 箇所の応答配列が Hmgn1 遺伝子の抑制的な転写調節に関与している可能性が示唆された。

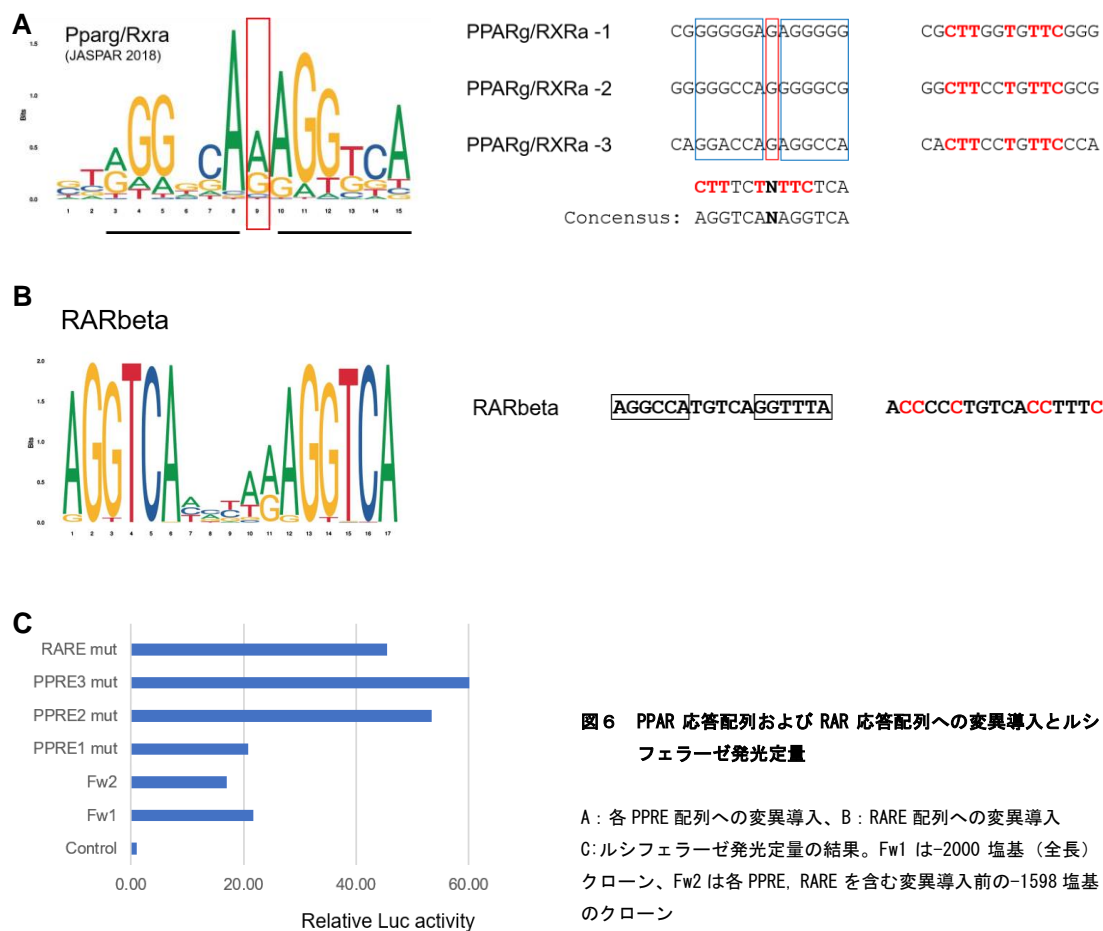


図6 PPAR 応答配列および RAR 応答配列への変異導入とルシフェラーゼ発光定量

A: 各 PPRE 配列への変異導入、B: RARE 配列への変異導入
C: ルシフェラーゼ発光定量の結果。Fw1 は-2000 塩基 (全長) クローン、Fw2 は各 PPRE, RARE を含む変異導入前の-1598 塩基のクローン

(5) クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイによる確認

一連のルシフェラーゼ発光定量実験から 2 箇所の PPRE と 1 箇所の RARE が Hmgn1 遺伝子の転写を調節している可能性が示されたことから、次は実際に PPAR と RAR という転写調節タンパク分子が推定された DNA 配列に結合しているのか否かを確認するため、ChIP アッセイを行う必要がある。この実験については諸般の事情により遅れており、本報告書作成時点で実施中である。

この他、FABP5 は PPARβ と相互作用することが数多く報告されていることから、今回見出した推定 DNA 配列に結合する PPAR 分子種 (α, β or γ) を特定する必要がある。更に今回得られた結果の様に、PPAR が遺伝子発現に関して抑制的に働く場合は NCoR 等の巨大分子と転写抑制複合体をつくる例が報告されているため、ChIP アッセイではこれらの抗体を使用して実施中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.uoeh-u.ac.jp/University/dept/medicine/1kaibou.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：林 春樹

ローマ字氏名：HAYASHI, Haruki

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：60208626

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。