

平成 31 年 5 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08248

研究課題名(和文)ゲノムワイド解析による哺乳類M/G1移行期における転写再活性化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of transcriptional reactivation at the M/G1 transition by a genome-wide analysis

研究代表者

村上 康文(Murakami, Yasufumi)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・教授

研究者番号：90200279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の細胞分裂ではM期で大規模な転写抑制が生じ、G1期で転写再活性化が起こる。この機構には Bookmarking 因子と呼ばれる転写因子が関与しているが、未だ不明な部分が多い。本研究では、早期G1期に転写が再活性化する遺伝子を網羅的に解析し、これら遺伝子の upstream 領域に存在するモチーフに着目することで、新規の Bookmarking 因子を探索した。本研究では、転写因子 GABPA が新規の Bookmarking 因子として、M/G1移行期を通してクロマチンに結合し、細胞分裂後の転写再活性化に寄与することを新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規 Bookmarking 因子として GABPA を新たに同定した。生物の発生過程において、一つの受精卵が増殖し、また、それぞれの組織で特異的な機能を持った細胞へと分化するためには、細胞周期のM/G1移行期において転写の再活性化が規則正しく行われる必要がある。また、その不備は細胞のがん化へも繋がることから、本研究結果は、細胞の分化を理解する上で重要な発見であるとともに、新たな発がん機構の解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In mammalian cells, transcription is globally suppressed at M phase and is reactivated at G1 phase. Bookmarking factors are involved in this mechanism, but the detail of the mechanism is still unknown. In this study, We widely analyzed the genes which are reactivated at early G1 phase, and analyzed the motifs of transcription factor binding sites at the upstream region of these genes to find new bookmarking factors. We identified a transcription factor GABPA as a new bookmarking factor which binds to chromatin through M phase and regulates transcriptional reactivation at G1 phase.

研究分野：ゲノム生物学 分子生物学 細胞生物学

キーワード：転写制御 Mitotic bookmarking ゲノムワイド解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内では、高次に折りたたまれたゲノムから必要な遺伝子群が転写される。M期にはクロマチンの凝縮とともに、転写因子の大部分がゲノムから解離し、グローバルな転写の抑制が起こる。その後、G1期に転写を再活性化させる制御により、細胞ごとの固有の転写のパターンは細胞分裂を超えて保存される。また、早期G1期に優先して転写が再活性化する遺伝子群が存在する(この遺伝子群を便宜的に早期G1期遺伝子群と呼ぶ)。c-Fos, Hsp といった報告されたわずかな遺伝子の機能から推測すると、早期G1期遺伝子群は細胞の増殖・維持において重要であるものと考えられている。このM/G1移行期の転写には未解決の大きな問いが存在する。それはG1期においてどのような機構で固有の転写パターンを回復するか、という問題である。これに関しては、現在までにMitotic bookmarkingというモデルが提唱されている。メカニズムとしては(1)ヒストンのエピジェネティックな修飾が目印となっていること、(2)転写因子や基本転写因子がM期にもゲノムに結合し、転写パターンのしおりの役割を担うこと、が考えられている。しかしながら、各制御が早期G1期遺伝子の転写にどれだけ普遍的に適用できるかは明らかではなく、さらに未知の制御の存在も考えられる。

M/G1移行期における正確な転写パターンの回復は、一つの受精卵から細胞が分裂を繰り返しながら、それぞれの組織において適切な機能を持つ細胞へと分化するために重要であり、その破綻は、細胞のがん化の引き金にもなりうる。従って、その機構を明らかにすることは学術的にも医学的にも重要であると考えた。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、独自に開発した新生RNAの網羅的解析法を用いて早期G1期遺伝子を包括的に同定し、遺伝子群に共通する上流配列・ゲノムレベルの規則性を見いだした。この成果を足がかりとして、本研究ではM/G1移行期における転写再活性化の機構を目指し、特に、Mitotic bookmarkingに関わる新規因子を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

我々が早期G1期遺伝子として同定した遺伝子のの上流領域を対象として、転写因子の結合モチーフを解析し、そこに共通して結合する可能性のある転写因子を探索した。次に、これら候補因子が実際にBookmarking因子としての機能を持つかどうか、M期におけるクロマチンとの結合を解析し、結合する因子を新規Bookmarking候補因子として選出した。このうち1つについては、発現抑制時の下流遺伝子のM/G1移行期における転写への影響、周辺のヒストン修飾レベルとの関連性について解析した。

### 4. 研究成果

我々が早期G1期遺伝子として同定した遺伝子のうち48遺伝子を対象として、その上流領域を解析したところ、複数の遺伝子の上流に結合することが予測された転写因子が20種同定された。この中には既にbookmarking因子として報告のあるFOX11やSRF等が含まれていた。また、これまでBookmarking因子としての報告が無かったGABPAについては、48遺伝子全ての上流領域に結合することが予想された。

次に、これら20種類の転写因子のうち、我々が解析で使用したtsFT210細胞における発現を解析し、発現が認められた因子について、M期に同調した細胞のクロマチンに結合するかどうかを、ウェスタンブロット、及びライブセルイメージングにより解析し、新規Bookmarking因子の候補として選出した。

このうち、GABPAについてはクロマチン免疫沈降(ChIP)により、M期において、実際にいくつかの早期G1期遺伝子上流に結合することを確認し、更に解析を進めたところ、GABPAが結合する早期G1期遺伝子の上流では、M/G1移行期において、H3K9/14、H3K27、H4K5のヒストンのアセチル化レベルが低下することがわかった。一方、GABPAを発現抑制すると、M/G1移行期におけるこれらヒストンアセチル化レベル(特にH4K5)は上昇する傾向にあった。

一般的に、ヒストンのアセチル化レベルの上昇は下流の遺伝子の転写を促進する。従って、この結果は、GABPAの結合が下流遺伝子の転写を抑制することを示唆した。そこで、GABPAを発現抑制し、下流の遺伝子のM/G1移行期における転写を解析したところ、やはり、転写が促進されたことから、GABPAはBookmarking因子として、下流の遺伝子の発現を抑制的に制御することが示唆された。

GABPAの結合する領域については、ChIP-Seqによるゲノムワイドな解析を行うことも目指した。この際、非特異的結合の影響を排除するため、FLAGタグを付加したGABPAを発現する細胞を作出し、抗FLAG抗体を用いたChIPを行った。ところが、非同調細胞からは十分なDNAが回収されたものの、M期に同調した細胞からは十分な量のDNAが回収できず、ChIP-Seq解析を実施することはできなかった。これは、細胞内GABPAの一部のみがM期クロマチン上にBookmarking因子として結合することを意味し、実際にM期に同調した細胞を分画してウェスタンブロットを行った際にも、同様の結果が得られている。我々が新規Bookmarking因子の候補として選出した転写因子の中には、細胞内のタンパク質の多くがM期のクロマチンに結合するものも存在するため、これら因子については、ChIP-Seqによるゲノムワイドな結合解析も可能であると考えられ、今後解析することを予定している。

以上のように、本研究では M/G1 移行期において、下流遺伝子の転写を負に制御する新規 Bookmarking 因子として GABPA を同定した。また、本研究では他にも M 期クロマチンに結合する新規 Bookmarking 候補因子を複数同定した。これら因子の解析を進めることで、M/G1 移行期における転写再活性化の分子機構の理解に貢献できると考えている。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 6 件)

Yusuke Minakawa, Atsumi Yuko, Shinohara Akira, Murakami Yasufumi, Yoshioka Ken-ichi  
Gamma irradiated quiescent cells repair directly induced double strand breaks but accumulate persistent double strand breaks during subsequent DNA replication  
Genes to Cells (2016) 21(7): 789-797

Sasaki Yuka, Hozumi Miyuki, Fujimori Hiroaki, Murakami Yasufumi, Koizumi Fumiaki, Inoue, Kengo, Masutani Mitsuko

PARG Inhibitors and Functional PARG Inhibition Models  
Current Protein & Peptide Science (2016) 17(7): 641-653

Yokomori Maasa, Gotoh Osamu, Murakami Yasufumi, Fujimoto Kenzo, Suyama Akira  
A multiplex RNA quantification method to determine the absolute amounts of mRNA without reverse transcription

Analytical Biochemistry (2017) 539: 96-103

Takashina Rikako, Nakajima Tadaaki, Umezu Tomohiro, Komatsu Kiyohiko, Banba Tatsuro, Asada Taichi, Ohse Kensuke, Murakami Yasufumi, Tomooka Yasuhiro  
Stratification of mouse vaginal epithelium 2. Identification of factors inducing stratification

Biology of Reproduction (2018) 99(4): 727-734

Shimizu Atsuhiko, Fujimori Haruka, Minakawa Yusuke, Matsuno Yusuke, Hyodo Mai, Murakami Yasufumi, Yoshioka Ken-ichi

Onset of deaminase APOBEC3B induction in response to DNA double-strand breaks  
Biochemistry and Biophysics Reports (2018) 16: 115-121

Goto Shunya, Takahashi Masashi, Yasutsune Narumi, Inayama Sumiki, Kato Dai, Fukuoka Masashi, Kashiwaba Shu-ichiro, Murakami Yasufumi

Identification of GA-Binding Protein Transcription Factor Alpha Subunit (GABPA) as a Novel Bookmarking Factor

International Journal of Molecular Sciences (2019) 20(5),1093

### [学会発表](計 15 件)

皆川 祐輔、熱海 悠子、篠原 彰、村上 康文、吉岡 研一

Gamma-irradiated quiescent cells repair directly induced DSBs but accumulated persistent DSBs during subsequent DNA replication

第 89 回日本生化学会大会 2016 年 仙台

後藤 峻也、中里 浩章、高橋 将史、安恒 徳美、藪崎 名保恵、柏葉 脩一郎、村上 康文  
GABPA は早期 G1 期における転写の再活性化を促進する

中里 浩章、後藤 峻也、高橋 将史、安恒 徳美、加藤 大、柏葉 脩一郎、村上 康文

SP1 は GABPA と協調的に早期 G1 期における転 再活性化を促進し、分裂期における細胞周期進行に関与している

第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 横浜

高橋 将史、後藤 峻也、中里 浩章、安恒 徳美、藪崎 名保恵、柏葉 脩一郎、村上 康文

早期 G1 期遺伝子上流領域に存在するユニークな DNA 配列の機能解析

第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 横浜

皆川祐輔、熱海悠子、篠原彰、村上康文、吉岡研一

静止状態の細胞は、ガンマ線で直接生じた二重鎖切断 DNA は修復するが、次の DNA 複製の間に修復し難い二重鎖切断 DNA を蓄積する

第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 横浜

高橋賢太、酒井宏晃、佐藤愛、大畑広和、塩川大介、村上康文、岡本康司

Stra6 は大腸がんの肝転移を抑制する

第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 横浜

後藤 峻也、高橋 将史、安恒 徳美、稲山 純生、柏葉 脩一郎、村上 康文

GABPA とヒストンアセチル化は早期 G1 期遺伝子に対して Bookmarking 因子として機能する  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸

高橋 将史、後藤 峻也、安恒 徳美、稲山 純生、柏葉 脩一郎、村上 康文

Bookmarking 候補転写因子の分裂期クロマチンへの結合能の評価

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸

浅尾 麻由、遠山 一文、木戸 まい子、助乗 崇紘、加藤 大、柏葉 脩一郎、村上 康文

損傷乗り越え複製における hINO80 および UCH37 の機能解析

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸  
小林 真子、古矢 裕梨、山崎 萌香、山根 小幸、加藤 大、柏葉 脩一郎、村上 康文  
大腸がんで高発現する膜タンパク質 S3 の機能解析  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸  
佐々木 由香、藤森 浩彰、穂積 美幸、村上 康文、小泉 史明、井上 謙吾、益谷 美都子  
誘導型 PARG K.D.システムを用いた PARG 機能阻害条件下における合成致死性遺伝子の  
同定  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸  
小野寺 貴恵、菊原 颯太、藤森 浩彰、佐々木 由香、今道 祥二、村上 康文、益谷 美都子  
APOBEC3G の発現抑制による放射線増感検証と作用機序の解析  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸  
石井 沙耶香、柏葉 脩一郎、村上 康文  
マウス温度感受性変異株 tsFT50 細胞の温度感受性を示す原因遺伝子の同定  
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 横浜  
清水 敦弘、藤森 遥、皆川 祐輔、松野 悠介、兵頭 舞、村上 康文、吉岡 研一  
DNA 二重鎖切断に伴うデアミナーゼ APOBEC3B の安定化  
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 横浜  
兵頭 舞、松野 悠介、村上 康文、鳥越 秀峰、吉岡 研一  
放射線によって生じる複製ストレスはゲノム不安定性と ARF/p53 依存的な機能の欠損を  
もたらす  
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 横浜

## 6 . 研究組織

研究分担者

研究分担者氏名：柏葉 脩一郎

ローマ字氏名：Kashiwaba Shu-ichiro

所属研究機関名：東京理科大学

部局名：基礎工学部生物工学科

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 40735461