

平成30年6月15日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14676

研究課題名(和文)核外輸送因子Crm1が形成するHoxクラスタープラットフォームの機能解析

研究課題名(英文)Studies on Crm1 that binds to Hox clusters

研究代表者

岡 正啓 (OKA, Masahiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：40432504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：核外輸送因子として知られるCrm1(Chromosomal Region Maintenance 1)がHoxクラスターをはじめとする特定のゲノム領域に結合しており、その結合様式が細胞分化と共にダイナミックに変化していることが分かった。さらにCrm1が核内でクロマチン制御因子を含む様々なタンパク質と結合していること、そして、それらの相互作用を介してエピゲノム制御に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our research revealed that the genome-wide binding pattern of Crm1, a nuclear export factor, dynamically changes during cell differentiation. Our work also suggests that the chromatin-bound Crm1 could interact with various proteins, including chromatin regulatory factors, and is possibly involved in the epigenetic regulation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Crm1 Hoxクラスター 核外輸送因子 細胞分化 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

ホメオボックス (*Hox*) 遺伝子は体の位置情報の決定や細胞分化に重要な働きを持つ遺伝子であり、その緻密な発現制御は発生に不可欠である。マウスやヒトでは、39 個の *Hox* 遺伝子が、別々の染色体上に存在する 4 つのクラスター (*Hox-A, B, C, D*) に収納されているが、その発現制御メカニズムは依然として不明な部分が多い。多能性を持つ未分化胚性幹 (ES) 細胞では *Hox* 遺伝子群の発現は抑制されている一方で、細胞分化と共にすみやかに活性化できる状態に保たれていると考えられる。申請者は、近年、ES 細胞の 4 つの *Hox* クラスター領域に核外輸送因子 Crm1 が集積しており、さらに人為的に発現させた白血病病因因子 Nup98-*HoxA9* (核膜孔構成因子 Nup98 とホメオボックス転写因子 *HoxA9* の融合遺伝子産物) がゲノム上の Crm1 集積部位 “プラットフォーム” にリクルートされることで広範囲な *Hox* 遺伝子の発現を活性化することを見出した (Oka et al., *eLife*, 2016)。Crm1 は核外輸送シグナル (NES: Nuclear Export Signal) を持つタンパク質を核から細胞質へと輸送する “核外輸送因子” として様々な機能分子を核から細胞質へ輸送していることが証明され、今日に至るまでその機能が精力的に研究されてきた。一方、通常ほぼ核内に存在する Crm1 は主に基質の核外輸送に備えていると考えられており、その核内における機能はほとんど見出されていなかった。

2. 研究の目的

本申請では *Hox* 遺伝子群の発現がダイナミックな制御を受けることが知られている ES 細胞の分化過程や、*Hox* 遺伝子の発現異常が見られるがん細胞における Crm1 と *Hox* クラスター領域との相互作用を明らかにする。さらにそのメカニズムおよび生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞分化過程や各種がん細胞株における Crm1 - クロマチン相互作用の解析

Hox 遺伝子群の発現が大きく変動する ES 細胞の分化誘導時、あるいは *Hox* 遺伝子を発現する細胞株を含む様々ながん細胞株における *Hox* クラスター領域への Crm1 の結合を解析する。遺伝子発現との相関にも着目し検証を進める。

(2) Crm1 結合因子の単離、および機能解析

Crm1 が核内でどのような因子と結合して存在しているか、免疫沈降と質量分析によって解析を行う。得られた候補因子については、機能解析を進める。また、Crm1 とポリコム構成因子の結合部位に相関が認められたことから、両者間の相互作用、ならびにクロマチン結合への関連について解析する。

(3) Crm1 の結合とクロマチン構造の関連

Crm1 阻害剤レプトマイシン B の作用によって、Crm1 の *Hox* クラスターへの結合が抑制されることが分かっている。そこで、レプトマイシン B 処理が *Hox* クラスター領域のヒストン修飾にどのような影響を及ぼすかについて経時的に解析する。

4. 研究成果

(1) 細胞分化過程やがん細胞株における Crm1 - クロマチン相互作用の解析

レチノイン酸添加による ES 細胞分化誘導時における Crm1 とゲノム DNA の相互作用の経時的变化を解析した結果、細胞分化に伴って *Hox* クラスター領域と Crm1 の相互作用が大きく変化することが明らかとなった。したがって Crm1 が常に一定のパターンでクロマチンと相互作用しているのではなく、遺伝子発現変化を伴う細胞分化時にはそのパターンがダイナミックに変化していることが明らかとなった。*Hox* クラスター領域全体をみると、細胞分化と共に Crm1 の結合が低下する傾向にあったが、Crm1 の結合が分化と共に明らかに増加する部位も存在することが分かった。また、遺伝子発現が誘導される 3'*Hox* 遺伝子領域のほうが、5'*Hox* 遺伝子に比べて結合の変

動が少ない傾向が見られた。さらに Hox クラスタ領域以外にも細胞分化に伴って Crm1 との結合が大きく変化するゲノム領域が存在することが明らかとなった。さらに、各種がん細胞株においては、それぞれ異なる Crm1 - クロマチン相互作用の様式を持つことが明らかとなった。

(2)Crm1 結合因子の単離、および機能解析
核内で Crm1 に結合する因子の探索を行うため、抗 Crm1 抗体を用いた免疫沈降産物の質量分析によって多くの結合候補因子を同定することが出来た。その中には核膜孔構成因子、核輸送因子、クロマチン制御因子が含まれていた。現在、両者間の相互作用について確認を進めると共に、その生理的意義の解析を進めている。また、ポリコム構成因子と Crm1 の相互作用については、これまでの免疫沈降実験からは明確なタンパク質間相互作用は認められていないが、両者の機能的な連携について引き続き検証を進めている。

(3)Crm1 の結合とクロマチン構造の関連
未分化 ES 細胞において Hox クラスタ領域は H3K4me3 (活性化型ヒストン修飾) と H3K27me3 (不活化型ヒストン修飾) の双方が存在する bivalent な状態であることが分かっている。Crm1 阻害剤レプトマイシン B の添加によって Crm1 のクロマチンへの結合が抑制された条件下では、H3K4me3、および H3K27me3 のパターンが大きく変化することが分かった。興味深いことに、Hox クラスタ領域については、領域全体が均一に変化を示すのではなく、領域内の部位特異的なヒストン修飾の変動が観察された。現在、上記 Crm1 結合性クロマチン制御因子との関連について解析を進めている。

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4件)

Higa M, Oka M, Fujihara Y, Masuda K, Yoneda Y, Kishimoto T. Regulation of

inflammatory responses by dynamic subcellular localization of RNA-binding protein Arid5a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115:E1214-E1220. (2018) 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1719921115.

Moriyama T, Tanaka S, Nakayama Y, Fukumoto M, Tsujimura K, Yamada K, Bamba T, Yoneda Y, Fukusaki E, Oka M. Two isoforms of TALDO1 generated by alternative translational initiation show differential nucleocytoplasmic distribution to regulate the global metabolic network. *Sci Rep*. 6:34648. (2016) 査読有 DOI: 10.1038/srep34648.

Fujiwara K, Hasegawa K, Oka M, Yoneda Y, Yoshikawa K. Terminal differentiation of cortical neurons rapidly remodels RanGAP-mediated nuclear transport system. *Genes Cells*. 21(11):1176-1194. (2016) 査読有 DOI: 10.1111/gtc.12434.

Miyamoto Y, Oka M. Data on dimer formation between importin subtypes. *Data Brief*. 7:1248-53. (2016) 査読有 DOI: 10.1016/j.dib.2016.03.080.

[学会発表](計2件)

岡正啓、村苑子、野上順平、前原一満、大川泰行、木村宏、米田悦啓：Nup98 融合遺伝子産物による Hox 遺伝子活性化のメカニズム

ConBio2017 2017年12月6日

岡正啓、村苑子、山田幸司、Percival Sangel, 大川泰行、木村宏、米田悦啓：ヌクレオポリン融合タンパク質 Nup98-HoxA9 の機能解析、第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日

〔図書〕(計2件)

Miyamoto Y, Yoneda Y, Oka M. Protein Transport Between the Nucleus and Cytoplasm, Nuclear Architecture and Dynamics, (2018) 387-403 (Elsevier)

山田幸司、米田悦啓、岡正啓 核輸送因子インポータイン 1 の新たな機能 次世代がん治療 - 発症・転移メカニズムからがん免疫療法・ウイルス、診断法まで - NTS (2017) pp.285-294

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.oka-lab.info/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡 正啓 (OKA, Masahiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト プロジェクトリーダー

研究者番号：40432504

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

大川恭行 (OHKAWA, Yasuyuki)

九州大学 生体防御医学研究所 トランスオミクス医学研究センター 教授

研究者番号：80448430

(4)研究協力者

()