

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006～2009  
 課題番号：18790766  
 研究課題名 (和文) ダウン症発症における SIM 遺伝子発現機構と SIM 蛋白質相互作用ネットワークの解明  
 研究課題名 (英文) Analysis of SIM gene expression and SIM protein interaction in Down Syndrome  
 研究代表者  
 八巻 明子 (YAMAKI AKIKO)  
 杏林大学・保健学部・講師  
 研究者番号：40296546

## 研究成果の概要 (和文)：

SIM2 遺伝子は、ダウン症候群 chromosome 領域と呼ばれるヒト 21 番染色体 q22.2 に座位する遺伝子で、SIM2 タンパク質は、bHLH-PAS ファミリーに属する転写調節因子である。SIM2 タンパク質は、転写因子である ARNT および ARNT2 と二量体を形成し機能する。SIM2 タンパク質内における ARNT タンパク質との二量体化ドメインについての解析が為されていなかった。我々は SIM2 タンパク質内の各機能ドメイン配列を欠失した変異体を用いて、SIM2-ARNT と SIM2-ARNT2 二量体結合ドメインの検討を行った。結果、パートナータンパク質ごとに SIM2 タンパク質内で必要な二量体化ドメインが異なっていた。SIM2 タンパク質は、スプライシングの違いから 2 種類 (SIM21 と SIM2s) が存在することから、それぞれの SIM2 遺伝子発現調節機構について解析した。プロモータアッセイとゲルシフトアッセイの結果から、SIM21 と SIM2s は異なる転写調節因子により発現調節される可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：The human SIM2 gene is a gene that is located in chromosome 21q22.2 in Down syndrome chromosome region and the SIM2 protein is a transcription factor which belong to bHLH-PAS family. SIM2 protein act when generate dimer with transcription factors which are ARNT and ARNT2. Dimerization domain of SIM2 protein with ARNT protein has not been done in detail, so we had analyzed the SIM2-ARNT and SIM2-ARNT2 dimerization domain using deletion mutants for each functional domain in the SIM2 protein. After all, there are different dimerization domain in SIM2 protein required by partner proteins. Since there are two SIM2 protein that is differentiated by splicing, we have conducted analysis to identify how the function of SIM2 gene expression is different. Promoter assay and gel retardation assay showd that SIM21 and SIM2s seems to be regulated by different transcription factors.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	0	0	0
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：ダウン症候群、SIM2、プロモーター、転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群関連遺伝子の一つとして21q22.2に座位するSIM2遺伝子を単離した。SIM2遺伝子・タンパク質の機能を明らかにするため、遺伝子発現調節メカニズムおよび転写調節因子であるタンパク質局在に關しての結果を得ていた。

### 2. 研究の目的

(1) bHLH-PASファミリーに属するSIMタンパクは転写調節因子としての機能がアミノ酸配列から推定され、相互作用するタンパク質は酵母ツーハイブリッド実験からARNTが候補として以前から知られていたが、その分子レベルでの結合部位についての解析はなされていなかった。これらについて解析する事を目的とし、さらにSIMタンパク二対する新規のパートナー分子の同定を行うことも目的とした。

(2) トランスジェニックマウスを用いたヒトSIM2およびマウス*Sim2*遺伝子の発現調節機構を解析するため、従来の培養細胞での*in vitro*実験ではなく、マウス胎仔を用いた*in vivo*における発現機構を解析する事を目的とした。

(3) SIM2遺伝子はエキソン11個からなる遺伝子(SIM21)であるが、エキソン10と11の間で、スプライシングバリエーションであるSIM2sの存在が報告された。現在、SIM2sは乳癌、大腸癌、前立腺癌などの固形腫瘍の腫瘍マーカーとしての可能性が見込まれている。また、女性のダウン症患者における乳癌発症率が高いとの報告もあり、SIM2sとダウン症発症機構への関連性を検討するため、①SIM2s遺伝子発現パターンの検討を解析する事 ②SIM2s遺伝子発現パターンに差がある細胞株を用いて転写調節領域に関する検討を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトSIM2遺伝子プロモーター領域2.2kbを $\beta$ -gal発現ベクターに組み込み、マイクロインジェクション法にて受精卵へDNAを導入後、発生初期マウス胎仔のwhole-mountでのX-gal染色およびパラフィン組織での染色を行った。

(2) SIM2、ARNTおよびARNT2の完全長あるいは種々の機能ドメインを欠失したタンパク質をそれぞれFLAG-tag、Myc-tag、HA-tagとの融合タンパク質としてHEK293細胞へcotransfectionして一過性発現し、tag抗体およびSIM2ペプチド抗体を用いた免疫沈降法にて共沈したタンパク質をさらにウエスタンブロットにて確認した。またSIMやARNTとおなじbHLH-PASファミリーに属する、体内時計調節を司るBMAL1に対しても同様の実験を行った。

(3) 種々の細胞株から抽出したRNAを用いRT-PCR法によりSIM21とSIM2sの発現に差を示した細胞株を選択し、SIM2s遺伝子上流のプロモーター解析をデュアルルシフェラーゼ法にて行った。

### 4. 研究成果

(1) ヒトSIM2遺伝子プロモーターによる $\beta$ -gal発現は、9.5日胚において前肢芽先端、原始腸管付近に発現がみられ始め、10.5日胚ではこれら以外の耳原基、後肢芽先端に発現が広がったが、従来みられていたSIM2遺伝子発現は、発生期では間脳原基、生後では腎臓、骨格筋等であり、これらの組織への発現はなかった。近年、マウス*Sim*遺伝子が四肢の発生に關与することが示唆されたことから、これらマウス胎仔を用いたヒトSIM2遺伝子*in vivo*プロモーターの発現結果の有用性が示された。



図1 マウス10.5日胚におけるヒトSIM2遺伝子プロモーター活性

(2) 完全長タンパクSIM2とARNTおよびSIM2とARNT2を組合せ、免疫沈降にて共沈するか

を確認した。結果、使用した融合 tag 化タンパクはどの組み合わせ同士でも共沈した。種々の機能ドメインを欠失した SIM2 タンパクと完全長 ARNT と ARNT2 の組合せにおいて、SIM2 の PAS2 ドメイン欠失タンパク質 ( $\Delta$ PAS2) と完全長 ARNT と ARNT2 は共沈しなかった。このことは、PAS2 ドメインの二量体化尾ドメインとしての重要性を示している。

一方、SIM2 の PAS1 ドメイン欠失タンパク質 ( $\Delta$ PAS1) および、SIM2 の bHLH から PAS1 ドメイン欠失タンパク質 ( $\Delta$ bHLH and  $\Delta$ PAS1) では ARNT2 は検出バンドに差がみられないが、ARNT は  $\Delta$ bHLH で少し薄くなり始め、N 末の  $\Delta$ bHLH and  $\Delta$ PAS1 両ドメインを欠失すると、ARNT のバンドが非常に薄くなっている。これは、二量体化ドメインとしての PAS1 ドメインの機能がパートナー分子により異なる事が示していると考えられ、従来いわれていた、PAS ドメインの機能の複雑性を示唆する。

さらに、bHLH-PAS ファミリーに属する BMAL1 と SIM2 の相互作用を確認した。SIM2 タンパク欠失体と BMAL1 の結合領域は PAS ドメインではなく、SIM2 タンパク質内の核移行シグナルドメインが、SIM2-BMAL1 二量体形成に関わることが示された。

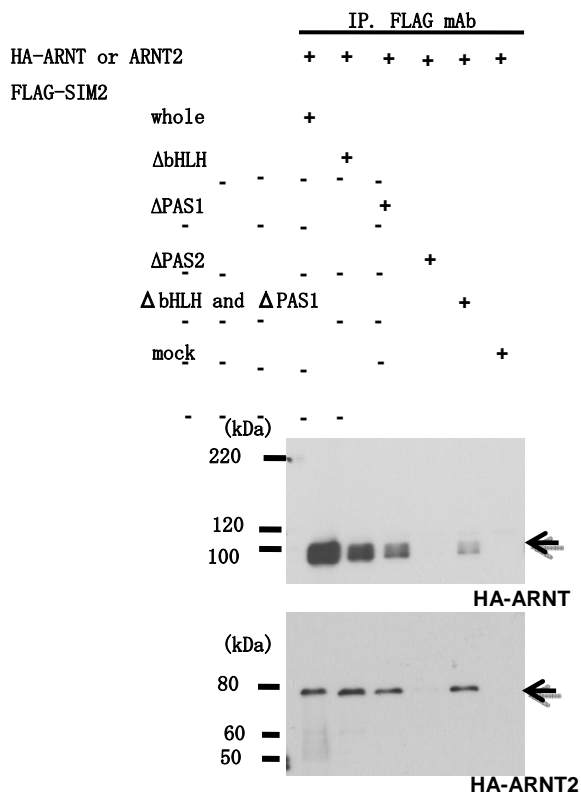


図2 SIM2-ARNT および SIM2-ARNT2 の二量体化ドメインの検討

(3) SIM21 と SIM2s に対し特異的な配列のプ

ライマーを設計し、発現パターン之差をみるために RT-PCR 法を行い比較した。この実験から、SIM21 を発現せず SIM2s のみを発現する細胞株 MCF7 (乳ガン由来)、ASPC1 (膵臓ガン由来)、KG1c (乏突起神経膠腫由来) を見いだした。さらに、SIM2s において、従来報告されていたエクソン 10 と 11 のスプライシングバリエーション以外に、エクソン 3 とエクソン 8 がそれぞれ欠失したクローンを検出する事が出来た。SIM2s のみを発現する 3 種類の細胞株は、エクソン 3 とエクソン 8 の有無がそれぞれ異なっていた。現在、論文等で報告されている SIM2s は、エクソン 3 およびエクソン 8 の有無がどうなっているかは不明で、大腸ガン、膵臓ガン、前立腺ガンおよび乳ガンの腫瘍マーカーとして用いられているのは、どのエクソンを持つ SIM2s に相当するのかに関しては検討をしていない。

このように、SIM2 は様々な状況で大きさの違うタンパク質を作り出す事から、それぞれの SIM2 遺伝子発現調節機構が異なる事が予想される。このことから SIM2s 特異的な発現を持つ細胞株と SIM21 特異的な発現をする細胞株では、SIM2 遺伝子プロモーター領域とそこに関与する転写調節因子が異なる事が考えられたため、上記 3 種類の細胞株を用いてデュアルルシフェラーゼ法にてプロモーター活性の測定を行った。プロモーター領域を組み込んだ長さの異なる 13 種類のプラスミドを用い測定した結果、SIM21 では活性が検出されなかった領域 nt. -1263~-500 に強い活性が認められた。この領域内から転写因子のシスエレメントを予測後、転写因子結合配列のコンセンサス配列を変異したプラスミドを作製し、プロモーター活性測定を行った。nt. -700~-184 に存在する転写因子 HIF (Hypoxia inducible factor) と NF1 のシスエレメント活性値が細胞株ごとに異なっていた。これらの転写因子のコンセンサス配列をプローブにゲルシフトアッセイを行ったところ、HIF プローブを用いた際 MCF7 細胞抽出液中にのみシフトバンドが検出された。現在、HIF 抗体を用いたスーパーシフト実験による解析を行っている。

近年、SIM21/ARNT の標的遺伝子として筋肉転写因子である myomesin2 が報告された。今回のプロモーター活性で測定しなかった領域 nt. -1794~-1386 において、筋肉系発現に関わる転写因子 MyoD コンセンサス配列が 2 か所予測された。MyoD プローブを用い、SIM21<sub>L</sub> を発現している細胞株 IMR-32 (神経芽細胞腫由来) と MCF7 においてに差がみられるかゲルシフトアッセイを行った。結果、MCF7 に MyoD プローブのシフトバンドが強く認められた。これらのことから、SIM2s の遺伝子発現に筋肉系発現転写因子 MyoD の関与が示唆されたが、HIF と同様、スーパーシフト実験

やクロマチン沈降法などにより、DNA-タンパク質結合配列等の確認を行う。

今後は、SIM2s と bHLH-PAS ファミリータンパク質複合体が発現制御する標的遺伝子の探索を、myomesin2 の可能性も含め検討していきたい。

#### 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 1 件)

Satoko Asai, Akiko Yamaki, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Yoshiko Shimizu  
Analysis of the promoter region of human placenta-specific DSCR4 gene. Biochimica et Biophysica Acta. 査読有、1779、2008、40-50

[学会発表] (計 6 件)

① 清水淑子、八巻明子ら、 bHLH-PAS ファミリー転写因子の SIM2 は体内時計タンパク質 BMAL1 と相互作用する  
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会合同大会 平成 19 年 12 月 11-15 日 横浜

② 清水淑子、八巻明子ら、 ダウン症関連遺伝子タンパク質 SIM2 と体内時計タンパク質 BMAL1 との相互作用  
第 14 回日本遺伝子診療学会大会 平成 19 年 7 月 27、28 日 愛媛

③ Y. Shimizu, A. Yamaki et al.  
Hyaluronan synthetase 2 is a target gene of human SIM2 transcription factor  
56<sup>th</sup> Annual Meeting ASHG October 9-13, 2006 New Orleans, USA

④ 清水淑子、八巻明子ら、 ヒト SIM2 転写調節遺伝子は HAS2 遺伝子の発現を調節する。  
第 13 回日本遺伝子診療学会大会 平成 18 年 7 月 28、29 日 東京

⑤ Y. Shimizu, A. Yamaki et al.  
Hyaluronan synthetase 2 as a target gene of human SIM2  
20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress June 18- 23, 2006 Kyoto, Japan

⑥ Akiko Yamaki, et al. Molecular interaction of single-minded (SIM) proteins with Aryl hydrocarbon receptor translocator (ARNT) proteins.  
20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of

Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress June 18- 23, 2006 Kyoto, Japan

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

八巻 明子 (YAMAKI AKIKO)

杏林大学・保健学部・講師

研究者番号：40296546