

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19592147

研究課題名 (和文) 心筋および神経分化における bHLH 型転写因子 DEC2 の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analyses of the bHLH transcription factor DEC2 in cardiac and neural differentiations.

研究代表者

藤本 勝巳 (FUJIMOTO KATSUMI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40294566

研究成果の概要 (和文)：組織分化における DEC2 の機能について解析した。DEC2 はクラス B の E-box 配列 (CACGTG) に直接結合し、標的遺伝子の発現を抑制した (HDAC 依存的)。また、MyoD などの転写因子と結合し、その作用を阻害することでクラス A の E-box を介する転写活性を抑制した (HDAC 非依存的)。このように、DEC2 は 2 つの異なるメカニズムにより標的遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We studied about the molecular mechanisms by which Dec2 regulates gene expression. Gel retardation and luciferase assays showed that Dec2 preferentially binds to class B E-box elements (CACGTG) as a homodimer and represses the transcription of target genes in a histone deacetylase (HDAC)-dependent manner. In contrast, Dec2 repressed a MyoD-activated promoter activity of muscle creatine kinase gene through class A E-box in an HDAC1-independent manner. These findings indicate that Dec2 employs multiple mechanisms - including DNA-binding and protein-protein interactions - to achieve E-box-dependent transcriptional repressions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、新規 bHLH (塩基性ドメイン - ヘリックス - ループ - ヘリックス構造) 型転写因子として DEC1, DEC2 のクローニングに成功した。両者は bHLH 領域以外に orange 領

域を有しており、HES や HEY と構造的に近縁の bHLH-Orange 蛋白である。HES および HEY は神経、筋肉、骨等の分化に関連することが報告されており、DEC も組織分化との関連が予想された。実際、DEC1 は軟骨分化に対して

は促進的に、脂肪分化に対しては抑制的に働くことが示された。しかし、DEC2 の機能については、まだ解明されていない。

ノザンプロット解析により、ヒトおよびマウス組織の DEC2 mRNA 発現レベルを調べた結果、ヒト、マウス共に、骨格筋・心臓・脳において DEC2 mRNA の発現レベルが高く、胎生期では胚芽に多く発現していた。また、多くの組織において DEC2 mRNA の発現は概日リズムを示すことが明らかになった。このように DEC2 の発現は組織特異的な因子と概日時計により調節されていると考えられる。

2. 研究の目的

近年、幹細胞の持つ多分化能が注目され、その再生医療分野への利用が期待されている。幹細胞を用いた効果的な治療法の開発には、未分化状態の維持・増殖および細胞の分化方向を制御する分子機構の解明が重要な課題となる。

細胞分化・発生の過程は転写因子をはじめ多くの因子により調節されており、特に、bHLH 型転写因子はグループ間あるいは他のグループの転写因子との相互作用によりネットワークを形成することで、様々な組織分化を制御している。本研究では、bHLH 型転写因子の一つである DEC2 に注目し、組織および細胞分化における DEC2 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DEC2 の DNA 結合活性の解析

各種 E-box (CACCTG, CAGCTG, CATGTG, CACGTG, CACGCG) および N-box (CACGAG) 配列を含む 2 本鎖の DNA プローブを [³²P]dCTP でラベルし、in vitro で合成した DEC2 蛋白との結合を Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で解析した。また、DEC2 変異蛋白を用いて、DNA 結合に関係する蛋白領域を同定した。

(2) DEC2 と相互作用する蛋白の探索

酵母ツーハイブリッド法により DEC2 と相互作用する蛋白をスクリーニングし、免疫沈降法により、候補蛋白と DEC2 蛋白の細胞内における結合の有無を確認した。さらに、GST-pull down 法により、候補蛋白と DEC2 が直接結合しているか調べた。また、DEC2 変異蛋白を用いて、蛋白相互作用に関係する蛋白領域を同定した。

(3) DEC2 の転写抑制活性の測定

各種 E-box および N-box 配列をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入したレポータープラスミドを作製した。DEC2 を単独もしくは他の転写制御因子と共に強制発現させ、レポーター活性の変化を調べた。また、DEC2 変異蛋白

を用いて、転写抑制活性に関係する蛋白領域を同定した。

(4) DEC2 発現メカニズムの解析

ルシフェラーゼ アッセイにより、時計遺伝子および分化制御因子の DEC2 遺伝子プロモーター活性に対する作用について解析した。また、Clock-mutant マウスの各臓器における DEC2 発現パターンを野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) DEC2 はクラス B の E-box 配列 (CACGTG) に直接結合し、標的遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。この転写抑制作用はヒストン脱アセチル化酵素阻害薬により阻害されることからクロマチンのヒストン脱アセチル化の関与が示唆された。また、DEC2 が E-box に結合するためにはホモダイマーの形成が必須で、DEC2 の塩基性領域が DNA 結合、HLH 領域がホモダイマー形成に重要であることを証明した。

(2) DEC2 は筋肉分化のマスター分子である MyoD の作用を阻害することを明らかにした。MyoD は E12/E47 と二量体を形成後、E-box (クラス A の E-box: CACCTG) に結合し、筋肉クレアチンキナーゼなどの筋肉特異的遺伝子の発現調節に関与している。DEC2 が MyoD に結合すると、MyoD の E-box への結合が阻害され MyoD の転写活性化作用を抑制した。また、DEC2 を C2C12 細胞に過剰発現させると、筋肉クレアチンキナーゼの発現が顕著に減少した。

このように DEC2 は MyoD の働きを阻害したことから、筋肉分化において DEC2 は分化抑制因子として働いていると考えられる。さらに、MyoD 以外にも組織分化に関わるいくつかの転写因子が DEC1, DEC2 と相互作用していることを明らかにした。

(3) DEC2 と相互作用する蛋白を探索したところ、老化関連蛋白である SIRT1 が DEC2 の bHLH ドメインを介して結合することを見つけた。SIRT1 は脱アセチル化酵素であることから、DEC2 の転写抑制活性における SIRT1 の関与、もしくは SIRT1 による DEC2 の脱アセチル化を介した活性制御が示唆された。

また、同じくヒストン脱アセチル化酵素である HDAC1 が DEC2 蛋白の C 末端に結合することを証明した。

(4) 多くの組織において DEC2 mRNA の発現は概日リズムを示す。そこで DEC2 発現のメカニズムについて解析したところ、DEC2 の発現は

マスター時計遺伝子であるClock, Bmal1により正の調節を、Cry, Perにより負の調節を受けることで24時間の発現リズムを示すことが明らかになった。また、DEC2 mRNAの組織発現は骨格筋、心筋、脳で特に高いが、これらの組織ではClock-mutantマウスにおいてもDEC2 mRNAの発現は消失せず、概日リズムとは別にDEC2の組織特異的な発現調節および組織分化における役割が示唆された。

(5) DEC2遺伝子のプロモーターについて解析したところ、DEC2遺伝子の5'上流領域には複数のE-box配列(CACGTG)が存在しており、Clock, Bmal1はこの中の少なくとも2つのE-boxに結合してDEC2の転写を促進し、DEC2も同じE-boxに結合することで自身の転写を抑制した(negative feedback regulation)。また、MyoD/E47のヘテロダイマーはDEC2遺伝子のプロモーター活性を上昇させた。

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 11 件)

- 1) Cho, Y., Noshiro, M., Choi, M., Morita, K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Kato, Y., Makishima, M. The Basic Helix-loop-helix Proteins DEC1 and DEC2 Function as Corepressors of Retinoid X Receptors. *Mol. Pharmacol.*, 76(6), 1360-1369, 2009. 査読有り
- 2) Noshiro, M., Usui, E., Kawamoto, T., Sato, F., Nakashima, A., Ueshima, T., Honda, K., Fujimoto, K., Honma, S., Honma, K., Makishima, M., Kato, Y. Liver X receptors(LXRalpha and LXRbeta) are potent regulators for hepatic Dec1 expression. *Genes Cells*, 14(1), 29-40, 2009. 査読有り
- 3) Suzuki, T., Sato, F., Kondo, J., Liu, Y., Kusumi, T., Fujimoto, K., Kato, Y., Sato, T., Kijima, H. Period is involved in the proliferation of human pancreatic MIA-PaCa2 cancer cells by TNF-alpha. *Biomed. Res.*, 29(2), 99-103, 2008. 査読有り
- 4) Nakashima, A., Kawamoto, T., Honda, K. K., Ueshima, T., Noshiro, M., Iwata, T., Fujimoto, K., Kubo, H., Honma, S., Yorioka, N., Kohno, N., Kato, Y. DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 28(12), 4080-4092, 2008. 査読有り
- 5) Sato, F., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Imaizumi, T., Imanaka, T., Kondo, J., Koyanagi, S., Noshiro, M., Yoshida, H., Kusumi, T., Kato, Y., Kijima, H. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression. *Genes Cells*, 13(2), 131-144, 2008. 査読有り
- 6) Miyoshi, K., Kawakami, N., Umehara, H., Fujimoto, K., Horio, S., Fukui, H. Down-regulation of histamine H1 receptors by beta2-adrenoceptor-mediated inhibition of H1 receptor gene transcription. *J. Pharm. Pharmacol.*, 60(6), 747-752, 2008. 査読有り
- 7) Noshiro, M., Usui, E., Kawamoto, T., Kubo, H., Fujimoto, K., Furukawa, M., Honma, S., Makishima, M., Honma, K., Kato, Y. Multiple mechanisms regulate circadian expression of the gene for cholesterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7a), a key enzyme in hepatic bile acid biosynthesis. *J. Biol. Rhythms*, 22(4), 299-311, 2007. 査読有り
- 8) Fujimoto, K., Hamaguchi, H., Hashiba, T., Nakamura, T., Kawamoto, T., Sato, F., Noshiro, M., Bhawal, U.K., Suardita, K., Kato, Y. Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2: multiple mechanisms through E-box elements. *Int. J. Mol. Med.*, 19(6), 925-932, 2007. 査読有り
- 9) Harada, N., Yasunaga, R., Higashimura, Y., Yamaji, R., Fujimoto, K., Moss, J., Inui, H., Nakano, Y. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 282(31), 22651-22661, 2007. 査読有り
- 10) Das, A.K., Yoshimura, S., Mishima, R., Fujimoto, K., Mizuguchi, H., Dev, S., Wakayama, Y., Kitamura, Y., Horio, S., Takeda, N., Fukui, H. Stimulation of

histamine H1 receptor up-regulates histamine H1 receptor itself through activation of receptor gene transcription. *J. Pharmacol. Sci.*, 103(4), 374-382, 2007. 査読有り

- 11) Miyoshi, K., Kawakami, N., Das, A.K., Fujimoto, K., Horio, S., Fukui, H. Heterologous up-regulation of the histamine H1 receptor by M3 muscarinic receptor-mediated activation of H1-receptor gene transcription. *J. Pharm. Pharmacol.*, 59(6), 843-848, 2007. 査読有り

[学会発表] (計 14 件)

- 1) 笹本智子、藤本勝巳、金輪真佐美、河本健、能城光秀、道田将彦、尾崎徳継、丹根一夫、加藤幸夫、「骨髄由来間葉系幹細胞の骨、脂肪、軟骨細胞分化におけるDEC2の役割」、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 9~12 日、横浜市
- 2) 尾崎徳継、能城光秀、本田清昌、河本健、藤本勝巳、谷本幸太郎、加藤幸夫、丹根一夫、「核受容体による時計遺伝子発現調節機構の解明」、第 42 回広島大学歯学会総会、平成 21 年 6 月 20 日、広島市
- 3) 河本健、中島歩、本田清昌、上嶋太一、能城光秀、藤本勝巳、本間さと、加藤幸夫、「bHLH型転写因子DECは概日リズムの位相調節に与する」、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会合同大会、平成 20 年 12 月 9~12 日、神戸市
- 4) 長克武、能城光秀、加藤幸夫、河本健、藤本勝巳、榎島誠、「DECは核内受容体のコリプレッサーとして機能する」、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会合同大会、平成 20 年 12 月 9~12 日、神戸市
- 5) 河本健、中島歩、本田清昌、上嶋太一、藤本勝巳、加藤幸夫、「bHLH型転写因子DEC1 ノックアウトマウスにおける行動および遺伝子発現の概日リズム解析」、第 26 回日本骨代謝学会学術集会、平成 20 年 10 月 29~31 日、大阪市
- 6) 河本健、中島歩、本田清昌、上嶋太一、藤本勝巳、能城光秀、加藤幸夫、「bHLH型転写因子DEC1 は概日リズム遺伝子の位相を調節する」、第 18 回中国・四国骨代謝研究会、平成 20 年 7 月 12 日、岡山市
- 7) 尾崎徳継、能城光秀、本田清昌、林原久美子、河本健、藤本勝巳、丹根一夫、加藤幸夫、「ラット成長板軟骨における核内受容体の発現様式と機能の解析」、第 21 回日本軟骨代謝学会、平成 20 年 3 月 21-22 日、京都市
- 8) 上嶋太一、河本健、本田清昌、能城光秀、藤本勝巳、後藤修、加藤幸夫、「軟骨細胞分化の概日リズムを制御する新規時間制御配列の探索と、そこに与する転写因子の同定」、第 21 回日本軟骨代謝学会、平成 20 年 3 月 21-22 日、京都市
- 9) 本田清昌、河本健、中島歩、上嶋太一、藤本勝巳、西村正宏、能城光秀、加藤幸夫、「明暗条件は永久軟骨の成長・代謝を制御する」、第 21 回日本軟骨代謝学会、平成 20 年 3 月 21-22 日、京都市
- 10) Noshiro M., Usui E., Kawamoto T., Sato F., Nakashima A., Furukawa M., Ueshima T., Honda K., Fujimoto K., Honma S., Honma K., Kato Y., 「The liver X receptors (LXRa and LXRb) are potent regulators for hepatic Dec1 expression」、2nd World Congress of Chronobiology、平成 19 年 11 月 4-6 日、東京都
- 11) Nakashima A., Kawamoto T., Honda K., Ueshima T., Noshiro M., Fujimoto K., Kubo H., Kato Y., 「DEC1 modulates circadian phase of clock gene expression」、2nd World Congress of Chronobiology、平成 19 年 11 月 4-6 日、東京都
- 12) 河本健、本田清昌、藤本勝巳、能城光秀、加藤幸夫、「DEC1 による概日リズム調節の機構」、第 49 回歯科基礎医学会、平成 19 年 8 月 29-31 日、札幌市
- 13) 上嶋太一、河本健、能城光秀、藤本勝巳、本田清昌、中島歩、加藤幸夫、「軟骨細胞の分化の概日リズムを制御する数種類の新規制御配列の同定とそこに与する転写因子の探索」、第 25 回日本骨代謝学会学術集会、平成 19 年 7 月 19-21 日、大阪市
- 14) 上嶋太一、河本健、本田清昌、能城光秀、藤本勝巳、後藤修、加藤幸夫、「軟骨細胞

分化の概日リズムを制御する新規配列の探索とそこに関与する転写因子の同定」、中四国骨代謝研究会、平成19年7月7日岡山市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 勝巳 (FUJIMOTO KATSUMI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40294566

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：