

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2007 ~2008

課題番号： 19770155

研究課題名 (和文) SUMO 化依存的なクロマチン構造変換機構の解析

研究課題名 (英文) Regulation of sumoylation dependent chromatin remodeling

研究代表者

小川 英知 (OGAWA Hidesato)

情報通信研究機構 未来 ICT 研究センター バイオ ICT 研究グループ 専攻研究員

研究者番号： 20370132

研究成果の概要：

膨大な情報量をもち、クロマチンと呼ばれる構造を持つゲノムから正確に情報を取り出すのが転写制御システムである。この機構には適切なゲノム領域から情報を読みとるためのクロマチン構造の変換が必須である。我々はこの構造変換を行う因子を同定し、この因子クロマチン構造変換の機構について解析を行った。本成果はゲノム上で行われる多くの細胞内の生命現象を明らかにする為の重要な知見となると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,800,000	0	1,800,000
平成 20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード： 転写因子、核内レセプター、クロマチン、SUMO 化修飾、転写制御
核内構造

1. 研究開始当初の背景

膨大な情報量を記録しているゲノムからの確にかつ厳密に情報を取り出す転写システムは、生体内で最も高度に制御された機構の一つである。近年注目されている人工多能性細胞 (iPS 細胞) の研究においても、細胞腫特異的な遺伝子発現機構すなわちエピジェネティック制御はクロマチンレベルでの転写制御の主要な過程である。エピジェネティック制御としては一般にヒストン修飾と

DNA のメチル化が考えられるが、ゲノム上の転写制御領域が活性化状態になるか、抑制状態になるかは、いずれもその初段階にその領域クロマチンの構造変換活性が必須であり、このクロマチン構造変換の分子機構を理解することは、エピジェネティック制御の初段階の過程を理解することのみならず、細胞分化の過程、また逆に iPS 細胞をはじめ脱分化を誘導し細胞が多能性を回復するために必要な分子機構を理解する上で必須である。この

ような現状からもクロマチン構造変換機構の解明は細胞レベルでの多くの生命現象に理解に大変重要であると考えられた。

2. 研究の目的

ゲノム中に存在する数万におよぶ遺伝子は細胞内外のシグナルを受け、核内の環境変化、ならびに構造変化を伴う調節を受けながら活性化状態と抑制状態を作り出すことで、精緻な発現を可能としている。生体を構成する様々な細胞の分化過程およびその維持においては、このようなゲノムレベルでのダイナミックな発現調節が働いていると推測される。我々は生殖腺の性分化過程において機能する各種転写因子を解析してきたが、その過程でこれらの因子がSUMO化修飾を受けること、更にこの修飾を通じて転写因子間の相乗的転写活性が調節されることを明らかにした。このSUMO化修飾による相乗的転写活性化の制御機構の解明を目的にSUMO化修飾を受けた転写因子Ad4BPと相互作用する因子を精製したところ、クロマチンリモデリング活性を有すると推測される因子ARIP4およびその核内複合体の精製に成功した。その構成因子の解析から、ARIP4複合体が細胞外シグナルによって活性化されることが示唆された。この結果はSUMO化修飾による転写制御が高次クロマチン構造を介した制御機構であると同時に、複合体自身が細胞外シグナルによって制御されていることを意味する。本研究ではSUMO化修飾依存的にリクルートされる新規制御システムの解明を通じて、未だその生物学的意義が不明である転写因子のSUMO化修飾の機能と細胞外シグナルのクロストークを明らかにする。

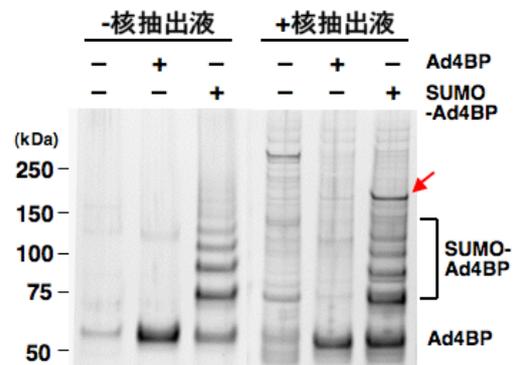
3. 研究の方法

従来の確立された転写、またはクロマチン構造変換複合体の精製方法と異なり、本研究ではSUMO化修飾特異的な複合体の精製のため、2つの手法を段階的に試行した。はじめにSUMO化特異的に直接転写因子に結合する因子を精製によって同定する(図1)。さらにこの因子が細胞内でどのような複合体を形成しているかを明らかにするために、生化学的にこの複合体を精製することで(図2)、SUMO化依存的に転写因子に結合する複合体の同定を可能とした。本研究のように転写因子の

翻訳後修飾特異的な複合体の精製はほとんど前例がなく、方法論的にもユニークである。

図1

SUMO化Ad4BPカラムを用いた結合因子の精製

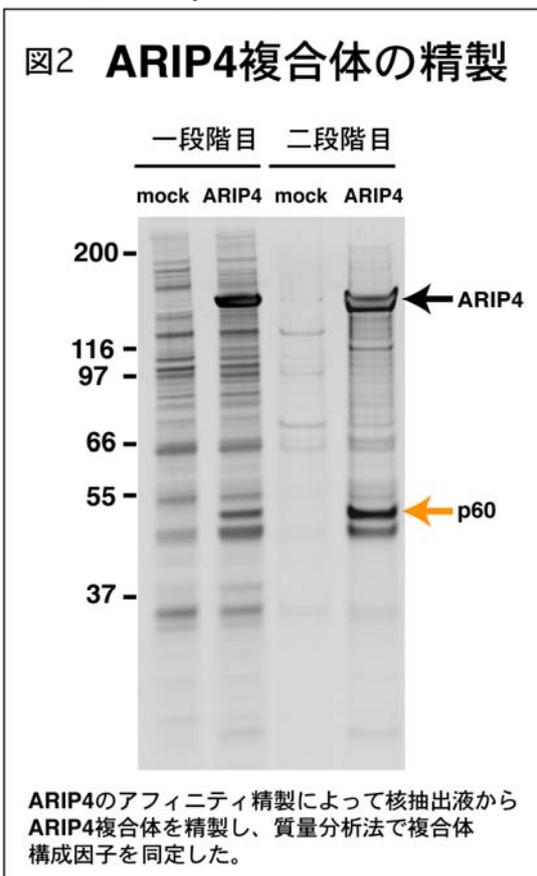


▲がSUMO-Ad4BP特異的に精製された結合因子: ARIP4

4. 研究成果

私は生殖腺の分化に不可欠な転写因子Ad4BPのSUMO化修飾特異的に相互作用する因子としてクロマチンリモデリング活性を有すると推測される因子ARIP4の単離に成功し(図1)、クロマチンリモデリングや核内構造のダイナミックな変換反応との関連において、転写因子のSUMO化修飾の機能を明らかにしてきた。本研究課題では、ARIP4の転写制御機構を明らかにするために、ARIP4の過剰発現およびsiRNAによるノックダウンを行った細胞を用いレポーターアッセイを行った。Ad4BPの標的であるStARのプロモーター領域をもつレポータープラスミドを用いて転写活性化能を調べた結果、ARIP4の過剰発現によってAd4BPの転写活性化能は抑制され、siRNAによって内在のARIP4をノックダウンした場合には促進が見られた。これらの結果から、ARIP4はAd4BPの転写活性化能において抑制的に機能するコファクターであると考えられた。またARIP4はATPase活性を有するSNF2ドメインをもつ。このことから、ATPase活性が転写の抑制機能に関与しているかどうかを明らかにするため、ATPaseの活性中心に変異を導入したATPase変異体ARIP4を導入した。その結果、このATPase変異体は明らかにAd4BP標的遺伝子に対する抑制活性が減弱していた。この結果はARIP4の転写抑制能がATPase活性を介していることを強く示唆し、おそらくAd4BPはARIP4によるATP依存的なクロマチンの高次構造の変化によ

って転写抑制を行っていると考えられる。さらにこの ARIP4 のクロマチン上での機能を明らかにするためには複合体の精製が必須であったため、申請者は ARIP4 に 2 つのタグをつけたタンパク質が低濃度で安定に発現する細胞株を作製し、2 段階のアフィニティカラムによる ARIP4 複合体の精製を行った。その結果 ARIP4 は核内で複合体を形成していることが明らかとなり、その構成因子として p60 という因子を同定した(図 2)。この複合体が核内ドメインに共局在すること、p60 が ARIP4 の ATPase 活性を上昇させ、転写抑制能を促進させることから機能的にも複合体としての働きをもつことを明らかにしてきている。



本研究成果は、機能の不明であった転写因子 SUMO 化修飾の意義を明らかにするために重要な知見である。このシステムの機構が解明できればゲノムのような膨大なデータを高度に折りたたみ収納したのち、さらにその内容を効率よく読み取る情報処理機構の新規概念となると考えられる。

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 2 件)

1. Yokoyama C, Komatsu T, Ogawa H, Morohashi K, Azuma A, and Tachibana T. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for Ad4BPSF-1 Hybridoma. April 2009: 113-119. (査読有)
2. Ishimaru Y, Komatsu T, Kasahara M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Toyama Y, Maekawa M, Toshimori K, Chandraratna R. AS, Morohashi K, and Yoshioka H. Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. Development 135(4):677-85, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 小川英知 1 名
“HMG box 型転写因子 SOX9 の新規制御機能の解析”
遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ (転写研究会共催) (2009 年 1 月 20 日)
湯沢グランドホテル、新潟県
2. 小川英知 2 名
“クロマチン構造変換を介した SUMO 化依存的な転写制御システムの解析”
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (2008 年 12 月 9 日) 神戸ポートアイランド、兵庫県 (BMB2008 講演要旨集 p74)
3. 土屋恵 3 名
“転写因子 Sox9 に結合する因子の精製と機能解析”
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (2008 年 12 月 11 日) 神戸ポートアイランド、兵庫県
4. Ogawa H 他 2 名
Purification and analysis of a factor interacting with Sumoylated Ad4BP/SF-1
The 21st NAITO CONFERENCE on Nuclear

Dynamics and RNA[I] (2008 年 6 月 25 日)
Yamanashi, Japan

5. Ogawa H他 2 名

“Purification and analysis of a factor
interacting with Sumoylated
Ad4BP/SF-1”

Keystone Symposia, Nuclear Receptors:
Orphan Brothers (Z1) (2008 年 4 月 1 日)
Whistler, British Columbia CANADA

6. 小川英知他 2 名

“SUMO 化依存的なクロマチン構造変換を
介した転写制御システムの解析”

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回
日本生化学会大会合同大会 (2007 年 12 月
14 日) パシフィコ横浜、ヨコハマグラ
ンドインターコンチネンタルホテル、神
奈川県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 英知 (OGAWA Hidesato)

独立行政法人 情報通信研究機構・未来 ICT
研究センター バイオ ICT グループ・専攻研
究員

研究者番号： 20370132

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：