

平成21年 5月14日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790201  
 研究課題名（和文） プロテオミクス解析による転写因子MafK制御ネットワークの解明  
 研究課題名（英文） Purification and functional analysis of MafK complex  
 研究代表者  
 加藤 恭丈（KATOH YASUTAKE）  
 東北大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：40397914

## 研究成果の概要：

本研究の主題は、転写因子 MafK による標的遺伝子の転写抑制化から活性化への制御機構を理解することにある。そこで、MafK による転写制御に関与する因子の同定を目指して、MafK 複合体を精製し、メチオニンアデノシル基転移酵素（MATII）を同定した。本研究は、核内に局在する MATII が MafK 標的遺伝子であるヘムオキシゲナーゼ 1（HO-1）の転写を抑制的に制御することや、ゲノム全体の DNA やヒストン H3K4 ないし H3K9 のメチル化修飾を包括的に制御していることを明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体生命情報学・タンパク質・発現制御・プロテオーム・転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 形質細胞分化と Blimp-1 の発現制御

B 細胞が形質細胞まで分化する間には、抗体遺伝子の組み換え、自己反応抗体の除去、そして抗体の大量分泌が厳密に制御されている。その中で、Blimp-1 は成熟 B 細胞から形質細胞への分化を誘導する上で重要な役割を果たす。Blimp-1 遺伝子の転写は、幼若 B から成熟 B 細胞まで抑制されており、形質細胞への分化とともに強く誘導される。この厳密な制御は、形質細胞分化を抗原刺激と共役させる機構の一つであり、抗体遺伝子再編

とともに液性免疫応答の根幹を成す。私達は、Blimp-1 遺伝子の転写が転写抑制因子 Bach2 によって抑制されていることを明らかにした。Bach2 は、B 細胞特異的に発現しており、幼若 B から成熟 B 細胞までの各分化段階を着実に進行させ、抗体クラススイッチなどを制御している。ところが、Bach2 の発現は成熟 B 細胞から形質細胞への分化に伴って消失する。そのため、Blimp-1 遺伝子の転写は、Bach2 による抑制化から解消される。しかしながら、形質細胞への分化に伴って、Blimp-1 遺伝子の転写を活性化する分子機構は不明である。

## (2) MafK による Blimp-1 遺伝子の転写制御

Bach2 が Blimp-1 遺伝子の転写を抑制するためには、転写因子 MafK を必要とする。MafK は塩基性領域ロイシンジッパー構造 (bZIP) を介して Bach2 とヘテロ二量体を形成する。そして、MafK と Bach2 とのヘテロ二量体が、Blimp-1 遺伝子の制御領域に存在する特異的 DNA 配列 (Maf 認識配列; MARE) に結合して、転写を抑制する。興味深いことに、私達は、Blimp-1 遺伝子の転写が活性化されても、MafK が MARE に結合していることを明らかにしている。このことから、MafK は形質細胞における Blimp-1 遺伝子の転写活性化にも何らかの形で寄与することが予想される。例えば、 $\beta$  グロビン遺伝子の転写は、未熟細胞では MafK と Bach1 とのヘテロ二量体によって抑制される。そして、赤血球への分化誘導に伴って、MafK と NF-E2 p45 とのヘテロ二量体によって活性化される。すなわち、MafK は標的遺伝子の転写を抑制化にも活性化にも制御することができると考えられる。しかしながら、Blimp-1 遺伝子の転写を活性化させる MafK のヘテロ二量体パートナーはまだ同定されていない。また、Blimp-1 遺伝子の転写制御が  $\beta$  グロビン遺伝子とは異なっていること、すなわち、MafK がヘテロ二量体パートナーには依存しない、今までに知られていない機構で転写を活性化する可能性も十分に考えられる。

## 2. 研究の目的

形質細胞における MafK を中心とした転写制御複合体を解析することにより、MafK の転写制御機構を詳細に理解し、MafK 複合体を通じて Blimp-1 の発現制御機構と形質細胞分化機構の一端を理解することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 蛋白質複合体の精製と同定

FLAG および HA エピトープ、HIS タグを融合した MafK 蛋白質 (eMafK) が発現する細胞をマウス形質細胞由来の X63/0 細胞株を使用した。この樹立細胞の大量培養をおこなった。大量培養によって得られた細胞を回収し、Dignam 法によって、核と細胞質、クロマチン分画のそれぞれを調製した。調製した核分画を用いて、FLAG 抗体とニックレルレジによるアフィニティー精製をおこなった。そして、eMafK とともに精製された蛋白質を SDS-PAGE によって確認した。次に、質量分析装置を用いて eMafK とともに精製された蛋白質を同定した。この質量分析から同定した一群の蛋白質が MafK を中心とした転写制御複合体の構成因子候補である。

### (2) 複合体の構成因子の解析

MafK 複合体の構成因子の機能を探るため

に、以下の実験をおこなった。

①免疫細胞染色法：複合体の構成因子に特異的な抗体を用いて、X63/0 細胞だけでなく、赤白血病細胞 (MEL 細胞) やヒト繊維芽細胞 (GMO2063 細胞) における構成因子の局在を検出した。

②クロマチン免疫沈降法：MafK 標的遺伝子の制御領域 (MARE) に対して、構成因子が MafK 複合体として動員されるかどうかを調べた。

③RNA 干渉法：複合体の構成因子の発現を減弱させて、MafK 標的遺伝子への影響を探る。具体的には、標的遺伝子の発現を検出し、その遺伝子制御領域のヒストン H3 の化学修飾や DNA のメチル化を調べた。

### (3) MafK 複合体のクロマチン構造への影響

MEL 細胞を用いた実験から、次の2つのことが明らかにされている。まず、赤血球への分化誘導に伴って、MafK の局在がヘテロクロマチンからユークロマチンへ変化する。そして、MafK 標的遺伝子の  $\beta$  グロビン遺伝子の局在も同様に変化する。第二に、MafK を中心とした転写制御複合体にクロマチン構造制御の関連因子が含まれている。これらことから、MafK 複合体が、標的遺伝子周辺のヒストン・クロマチン蛋白質の修飾や構成に影響を与えている可能性が示唆される。そこで、上述 (2) の実験②及び③を駆使して、MafK 標的遺伝子ならびにゲノム全体のヒストン H3 の化学修飾や DNA メチル化の挙動を検出した。

## 4. 研究成果

### (1) MafK 複合体の精製と同定

X63/0 細胞から MafK 複合体の精製に成功し、質量分析機によって各構成因子を同定することができた。その中でも、MafK だけでなく Bach1 複合体の構成因子であるメチオニンアデノシル基転移酵素 (MATII) に注目した。(図 1)

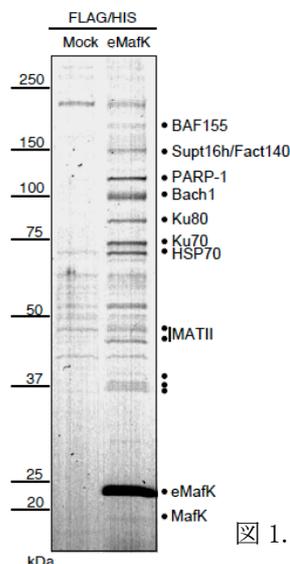
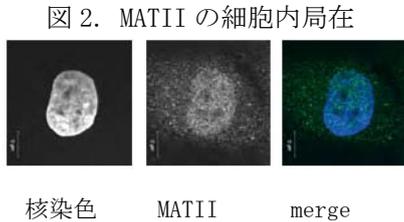


図 1. MafK 複合体の同定

(2) MATII の細胞内局在

これまでに MATII の細胞内局在は報告されていなかった。そこで、GM02031 細胞における MATII の局在を調べてみたところ、MATII は細胞核に優位に局在することがわかった。(図 2)



(3) MATII の MARE への動員

MATII が転写制御に関与する報告はこれまでになく、本研究により、初めて MafK 標的遺伝子の制御領域に MATII が動員されることが明らかにされた。図 3 の A-C は  $\beta$  グロビン遺伝子、D はヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子の制御領域に動員される MATII をクロマチン免疫沈降法から証明した。

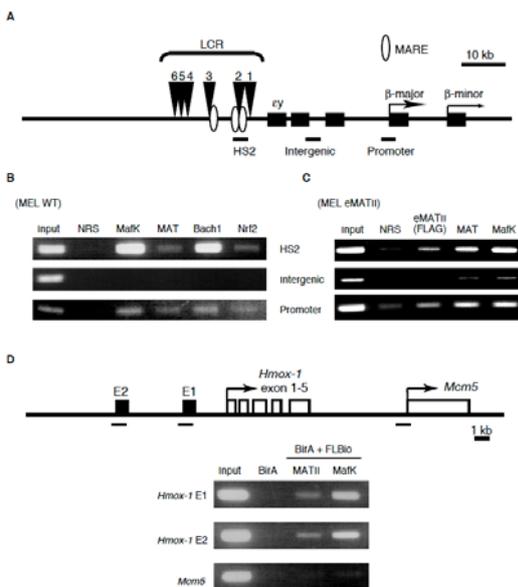


図 3. MATII は MafK 標的遺伝子の MARE に動員される。

(4) MATII ノックダウン細胞による影響

① HO-1 の脱抑制効果

RNA 干渉法を用いて、Hep1 細胞に発現している MATII を減弱させた (siMAT2A)。その結果、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の転写が活性化した。(図 4)

② 酸化ストレス応答と HO-1 の発現増強

siMAT2A の細胞に酸化ストレス誘導剤のジエチルマレイン酸により処理をおこなったところ、コントロール細胞と比較して、HO-1 の発現増強がみられた。(図 5)

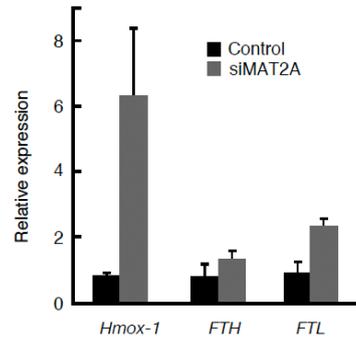


図 4. siMAT2A による HO-1 の脱抑制

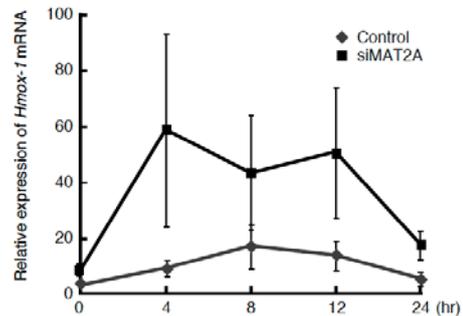


図 5. ジエチルマレイン酸による HO-1 の発現誘導

③ ゲノム全体への影響

siMAT2A の細胞では、ヒストン H3K4 および K9 のメチル化や DNA のメチル化が包括的に減弱していることが明らかになった。(図 6) このデータはクロマチン構造の可塑性やエピジェネティクス制御を考えるうえで非常に有効な情報となった。

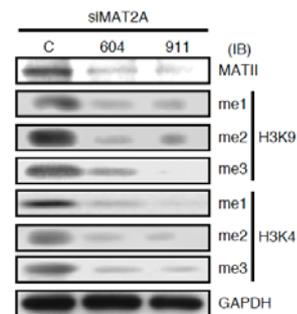


図 6. ヒストン H3K4 および K9 のメチル化

(5) MATII の酵素活性と転写制御

MATII ノックダウン細胞では、HO-1 の脱抑制や酸化ストレス誘導に伴った発現増強が検出された。(図 5, 6) このことから、MATII は HO-1 の転写を抑制していることが明らかになった。さらに、本研究では、MATII の酵素活性がこの転写抑制化に必要であることも明らかにした。(図 7)

今後の展望として、MafK 標的遺伝子の解析

だけでなく、MATII の標的遺伝子を見出し、MATII を中心として複合体を精製して同定することによる蛋白質ネットワークの解明を推進させていきたい。

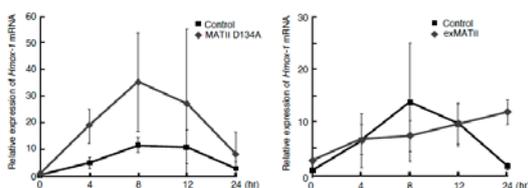


図7. MATII の酵素活性がHO-1 転写制御に関与する

## 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3件)

- ① Dohi Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Katoh Y, Ota K, Nakanome A, Muto A, Omura S, Ohta T, Ito A, Yoshida M, Noda T, Igarashi K., Bach1 inhibits oxidative stress-induced cellular senescence by impeding p53 function on chromatin., *Nature structure and molecular biology*, 12, 1246-1254, 2008, 査読有り
- ② Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, Tokunaga F, Iwai K, Igarashi K., Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1., *Molecular and cellular biology*, 27, 6962-6971, 2007, 査読有り
- ③ Hintze KJ, Katoh Y, Igarashi K, Theil EC., Bach1 repression of ferritin and thioredoxin reductase1 is heme-sensitive in cells and in vitro and coordinates expression with heme oxygenase1, b-globin and NAD(P)H quinone (oxido)reductase1., *The Journal of biological chemistry*, 282, 34365-34371, 2007, 査読有り

[学会発表] (計9件)

- ① Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ohta M, Noda T, Igarashi K., A novel function of MATII in MafK complex., *JST International Symposium: Molecular mechanism of environmental response to food and oxygen III*, February 9-11<sup>th</sup>, 2009 Gonryo-kaikan in Tohoku University, Japan.
- ② 加藤 恭丈, 井倉 毅, 星川 裕, 田代 聡, 太田 嶺人, 野田 哲生, 五十嵐 和彦, MafK複合体の精製と機能解析, 遺伝情報DECODE・冬のワークショップ2009 (口頭

発表), 越後湯沢, 2009年1月19日

- ③ 中目 亜矢子, 太田 一成, 加藤 恭丈, 井倉 毅, 志賀 清人, 小林 俊光, 五十嵐 和彦, Ras<sup>V12</sup>による形質転換における転写因子Bach1の機能解析, 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会 (ポスター発表), 神戸, 2008年12月11日
- ④ 加藤 恭丈, 井倉 毅, 星川 裕, 野田 哲生, 五十嵐 和彦, MafK蛋白質複合体に含まれるPARP-1の役割, 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会 (ポスター発表), 神戸, 2008年12月11日
- ⑤ Katoh Y, Ohta M, Ikura T, Igarashi K., Coupling of transcription repression and methionine metabolism on chromatin., 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会 (口頭発表), 神戸, 2008年12月11日
- ⑥ Katoh Y, Ikura T, Igarashi K., MafK couples transcription repression and methionine metabolism., *The 21<sup>st</sup> NAITO CONFERENCE on Nuclear Dynamics and RNA [I]*, June 24-27, 2008 Yatsugatake Royal Hotel, Yamanashi, Japan.
- ⑦ Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Dohi Y, Muto A, Hoshikawa Y, Tashiro S, Noda T, Igarashi K., Purification and functional analysis of MafK complex., *The 21<sup>st</sup> NAITO CONFERENCE on Nuclear Dynamics and RNA [I]*, June 24-27, 2008 Yatsugatake Royal Hotel, Yamanashi, Japan.
- ⑧ Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Dohi Y, Muto A, Hoshikawa Y, Tashiro S, Noda T, Igarashi K., Purification of MafK complex., *JST-ERATO Yamamoto Environmental Response Project International Symposium: The Environmental Response*, December 21-22<sup>nd</sup>, 2007 EPOCHAL Tsukuba International Congress Center, Japan.
- ⑨ Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Dohi Y, Muto A, Hoshikawa Y, Tashiro S, Noda T, Igarashi K., The function of MafK complex regulating target genes., *MafK蛋白質複合体による遺伝子制御機構の解析*, 第30回日本分子生物学会年会, 第80回日本生化学会大会 (ポスター発表), 横浜, 2007年12月13日

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 恭丈 (KATOH YASUTAKE)  
 東北大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号: 40397914

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号