

平成 23 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570188

研究課題名 (和文) 核膜周辺に存在するクロマチン境界領域の同定とその構造の解明

研究課題名 (英文) Identification and structural analysis of chromatin boundary present nuclear peripheral region

研究代表者

廣瀬 富美子 (HIROSE FUMIKO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号：60208882

研究成果の概要 (和文) : hDREF のノックダウンによりヘテロクロマチンが増加することを明らかにした。hDREF の相互作用因子の探索を行い、2つの新規な相互作用因子を同定した。そのうちのひとつは、核膜直下や核小体周辺などヘテロクロマチンが多い領域への局在が顕著であった。また、hDREF が他のたんぱく質を SUMO 修飾する SUMO リガーゼ活性を保有することを発見し、ヘテロクロマチンの形成に関わるクロマチン再構成因子 Mi2 α と、核膜直下に存在しクロマチンと相互作用をする lamin A/C が hDREF によって SUMO 化を受けることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : We identified two novel factors which interact with hDREF. One of these factors was localized periphery of nuclei and nucleoli and might be a key molecule to identify factors responsible for maintenance or formation of chromatin boundary at nuclear periphery. We also demonstrated that hDREF possesses SUMO E3 ligase activity and could specifically SUMOylates the C-terminal region of Mi-2 α , a component of NuRD complex and lamin A/C.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：転写因子、クロマチン、SUMO

1. 研究開始当初の背景

本研究の対象となる転写因子DREFは、これまで、ショウジョウバエおよびヒト培養細胞を用いて、細胞の増殖に必須な役割をもつ転写因子であることを証明してきた。ショウジョウバエにおいては500個以上の遺伝子が

DREFによる正の調節を受けていることを示唆している(Hirose F. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6020-6028, 1999; Hirose F. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7231-7242, 2001; Hirose *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5182-5193, 2002)。DREF

の細胞増殖における役割が高等哺乳動物でも普遍的であることは、培養細胞の系でhDREFをノックダウンしたときに、細胞増殖が停止し、一部の細胞はアポトーシスを起こすことから明らかである。しかしながら、hDREFのノックダウンは以下に挙げるように、hDREFの標的遺伝子であるリボソームタンパク質やヒストンH1遺伝子の発現低下では説明のできないユニークな表現型を引き起こす。

- (1)核膜および核膜直下に存在するラミンの構造が乱され、核の形態が異常を示す。
- (2)ヘテロクロマチン様の電子密度の高い領域が核膜周辺で増加する。
- (3)M期の極初期に起こる核膜周辺領域での染色体凝縮が起こらず、細胞周期が停止する。

これらの表現型に加えて、細胞をいわゆる“核マトリクス”にしたときに、DREFは核膜直下に局在すること、ショウジョウバエDREFが染色体境界領域の形成の調節に関与していることを考慮し、DREFが核膜周辺に存在するヘテロクロマチンと核内部のユークロマチンの境界領域の決定や形成に役割を担っているのではないかと考えた

2. 研究の目的

クロマチンは核内で均一な状態で存在するのではなく、各種の機能ドメイン（核内ドメイン）を形成して収納されている。各々の機能ドメインは、DNAのメチル化、ヒストンの化学修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化）、様々なDNA結合因子やクロマチンリモデリング因子、あるいは核マトリクスと呼ばれる核構造たんぱく質などの働きにより構築されることを示す証拠が集積しつつある。しかしながら、転写が活発なユークロマチンと抑制されているヘテロクロマチンの境界がどのように決定されているかについてはよくわかっていない。転写調節因子DREFは、核膜周辺で形成されるヘテロクロマチンが核内部に伝播するのを阻止し、転写が活性な“開いたクロマチン”を形成するうえで重要な役割を担っていると予想している。本研究の目的は、DREFの核膜周辺における存在様式やその活性を詳細に解析することにより、核膜周辺に存在する転写が不活性なヘテロクロマチン領域とその内側のユークロマチン領域の境界どのように形成・維持されるかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) hDREF をノックダウンしたときの細胞の観察: HeLa 細胞あるいは、HFF 細胞（不死亡したヒト正常繊維芽細胞）の内在性

hDREF をレンチウイルスベクターを利用した RNAi によりノックダウンしたときの、細胞核への影響を蛍光免疫染色法で詳しく観察する。

(2) 電顕による hDREF の核内局在の観察: 内在性 hDREF の核膜周辺での局在や存在様式を調べるため、免疫電顕による観察を行う。さらに①で行った蛍光免疫染色で興味深い(3)核膜周辺で hDREF が結合している DNA 領域の同定と単離: 細胞内 hDREF のうち約 50% が、細胞を界面活性剤、DNase などで処理して調整したいわゆる核マトリクス画分に存在することがわかっている。HeLa 細胞を用いて調整した核マトリクスから、hDREF に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、hDREF が結合している DNA 断片を回収する。DNA 断片を蛍光ラベルし、ヒトゲノムのタイリングアレイを用いて結合領域を同定する (ChIP on chip 法)。

(4) 染色体末端部位への hDREF の結合の解析: 10 bp よりなる hDREF の結合配列 (5' -TGTCG(C/T)GA(C/T)A) でヒト全ゲノムを BLAST 検索した結果、209 個の結合配列が見つまっている。そのうち、20 箇所は染色体の末端から 1 Mbp 以内に存在する。これらの結合配列は、染色体の末端に存在するテロメア周辺のヘテロクロマチン領域からユークロマチンに切り替わった領域に位置する。20 箇所のうちいくつかを選び、クロマチン沈降法 (ChIP 法) にて、hDREF が結合しているかどうかを調べる。

(5) hDREF と相互作用する因子の探索: hDREF と相互作用し、核膜周辺でのクロマチンの機能ドメインの制御を行う因子を探索する。

4. 研究成果

(1) DREF をノックダウンしたときに生じる核内の構造とクロマチンの変化を詳細に解析した。電子顕微鏡による観察の結果、hDREF のノックダウンにより、核膜直下や核小体周辺でのヘテロクロマチンと考えられる電子密度の高い領域が増加していることが判明した。さらに、hDREF のノックダウンによりヘテロクロマチンの量が増加しているかどうかを、クロマチンの動態変化をモニターすることができるヒストン H3 の特定のアミノ酸残基特異的な化学修飾を認識する抗体を用いた細胞の免疫染色やイムノプロット解析により調べた。さらに *in vivo* スクレアーゼ感受性アッセイを行い、核内のスクレオソームの状態を調べた。こ

これらの実験から、hDREF のノックダウンはヘテロクロマチン化を亢進させることを意味する結果が得られた。一般的な転写因子の核内局在とは異なり、hDREF は核膜直下のヘテロクロマチン領域や、核マトリクス上にも存在することも判明した。

(2)hDREF の核膜直下での機能を知るためのアプローチとして hDREF の相互作用因子の探索を行った。Flag-hDREF を発現させた HeLa 細胞の核抽出液を用いて hDREF と相互作用する因子を免疫沈降し質量分析により新たな相互作用因子を 2 つ同定した。同定した因子のうちのひとつは、核膜直下や核小体周辺などヘテロクロマチンが多い領域への局在が顕著であった。今後はこの因子が直接クロマチンに結合していることを証明したうえでこの因子の結合しているクロマチン領域を同定していく予定である。

(3)hDREF が他のたんぱく質を SUMO 修飾する SUMO リガーゼ活性を保有することを発見した。さらに、hDREF の SUMO 修飾の標的たんぱく質のひとつが、ヘテロクロマチンの形成に関わるクロマチン再構成因子 Mi2 α であることを見つけた。このことから、hDREF は SUMO 化修飾を介して Mi2 α の機能を阻害し、ゲノムのヘテロクロマチン化を負に制御しているのではないかという今後の研究を進めるうえで重要な仮説を立てることができた。さらに、核膜直下に存在し、核構造のみならず、クロマチンおよびクロマチン結合因子との相互作用を介して遺伝子の転写調節に関わることがわかっている lamin A/C も hDREF によって SUMO 化を受けることを示唆する予備的な結果も得た。

得られた結果を総合して、hDREF は核膜直下におけるクロマチンの動態制御に関与していることが強く示唆された。また、転写因子でありながら SUMO E3 活性を有する因子の報告は国内外を問わず、これまでにされていない。したがって、核内での SUMO 修飾を介した未知の転写やクロマチン構造変換の制御に関与している可能性があり、その標的たんぱく質を明らかにすることでクロマチン構造の新規なメカニズムに世界に先駆けて迫ることができると考えている。

laminA/C が SUMO 化修飾を受けること、また SUMO 修飾を受けないアミノ酸置換が起こった変異体が遺伝的な心筋症の原因になっていることが報告されている。なぜ、laminA/C の SUMO 化されないと心筋症を誘発するのかそのメカニズム

は不明である。これを明らかにするためには laminA/C たんぱく質の機能が SUMO 化によってどのように調節されるのかを調べる必要がある。hDREF によって SUMO 化 laminA/C たんぱく質を細胞で発現させ、その性質や相互作用因子を解析することで、そのメカニズムの一端を明らかにしたい。

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 3 件)

- ① Ida H, Suzusho N, Yoshida H, Ohno K, Hirose F, Itoh M, Yamaguchi M. Genetic screening for modifiers of the DREF pathway in *Drosophila melanogaster*: identification and characterization of HP6 as a novel target of DREF. *Nucleic Acids Res.* 査読有 37 (5) 1423-1437 (2009)
- ② Akter MH, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T. Perilipin, a critical regulator of fat storage and breakdown, is a target Gene of estrogen receptor-related receptor alpha *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 368 (3) 563-568 (2008)
- ③ Matsukage A, Hirose F, Yoo MA, Yamaguchi M. The DRE/DREF transcription regulatory system; a master key for cell Proliferation. *Biochim. Biophys. Acta.* 査読有 1779 (2) 81-89 (2008)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 廣瀬富美子、西村理津子、大隅隆 : hDREF negatively regulates heterochromatin formation at nuclear periphery 2008 年 5 月 日本細胞生物学会 (名古屋国際会議場)
- ② 廣瀬富美子、大和茜、山口智広、大隅隆 : 転写因子 hDREF によるクロマチンリモデリング因子 Mi2a の SUMO 化とその意味 2008 年 12 月 日本分子生物学会 (神戸国際会議場)
- ③ 西村理津子、大隅隆、廣瀬富美子 : 転写因子 h DREF によるクロマチン構造制御 2008 年 12 月 日本分子生物学会 (神戸国際会議場)
- ④ 橋本健志、森本絵美、原口徳子、平岡泰、加納英明、浜口宏夫、山口智広、廣瀬富美子、大隅隆 : 脂肪分解刺激に対する脂肪滴表面タンパク質の応答の解析 2008 年 12

月 日本分子生物学会 (神戸国際会議場)
⑤廣瀬富美子、大隅隆: hDREF negatively regulates heterochromatin formation at periphery nuclear and nucleoli 2009年12月 日本分子生物学会 (パシフィコ横浜)
⑥五十嵐彩乃、西村理津子、大隅隆、廣瀬富美子: hDREF plays a critical role in late S-M phase events. 2009年12月 日本分子生物学会 (パシフィコ横浜)

⑦ 森内 昂文、岡村智雄、奥村克純、玉置大介、峰雪芳宣、大隅隆、廣瀬富美子: SUMO化により制御される hDREF/Mi2 α 複合体の解析 2010年12月 日本分子生物学会(神戸ポートアイランド)

⑧長谷川雄基、玉置大介、峰雪芳宣、大隅隆、廣瀬富美子: クロマチン再構成因子 Mi2- α のSUMO修飾による活性制御 2010年12月 日本分子生物学会(神戸ポートアイランド)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://proxy.sci.u-hyogo.ac.jp/life/molbio/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 富美子 (HIROSE FUMIKO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号: 60208882

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号:

