

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570219

研究課題名(和文) 翻訳後修飾依存的なクロマチン構造変換解析システムの構築

研究課題名(英文) Regulation of nuclear receptors by SUMO through recruitment of chromatin remodeling factors

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研究所 バイオICT研究室・主任研究員

研究者番号：20370132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の増殖分化において、転写因子のクロマチン上にある標的遺伝子への結合制御は重要なステップであり、その過程に必須なクロマチン構造変換機構の解析が、エピジェネティック制御を理解する上でも重要な課題である。この観点からステロイドレセプター(GR)の標的配列(MMTV)を直列に複数コピーゲノム上に有したMMTVアレイ細胞株を樹立し、核内受容体(GR)およびクロマチン構造変換因子(ARIP4)の動態観察を行った。その結果ARIP4はGRとの複合体形成の前に核内構造体に局在することが判明した。このシステムは細胞分化におけるクロマチン構造変化と核内構造との相互作用を解明する手掛かりとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：For understanding on the molecular processes of development, cell growth and homeostasis, it is required to reveal a regulation mechanism of binding of the transcription factors to the target genes. One of a useful method to introduce a new insight into the complex formation with the target DNA is to visualize the processes using the cell line that possesses a tandem repeat array of the mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter that is the target of the steroid receptor (GR, glucocorticoid receptor). Using this system, we succeeded in finding of a novel complex formation on the MMTV array. Although the chromatin-remodeling factor, ARIP4, is localized on nuclear structure without the glucocorticoid, after addition of the ligand, ARIP4 is co-localized with GR on the target DNA. This suggests that the MMTV array system is useful to analyze an important role of nuclear structure in the regulation of nuclear transcriptional complex formation.

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 クロマチン 核内受容体

## 1. 研究開始当初の背景

転写機構の緻密で精巧な制御機構の重要性はその破綻によって引き起こされる様々な発生異常や疾患の解析からも明らかであり、その中でも転写因子がクロマチンの構造変換によって標的遺伝子に結合する過程はエピジェネティック制御の観点からも非常に興味深い。ゲノム情報が解読され、クロマチン免疫沈降を用いたゲノムワイドな解析により従来まで未知であった転写因子の標的遺伝子とその遺伝子発現制御に関する結合様式の包括的な理解が進みつつある。これらの膨大な情報から得られる知見の一方で、転写因子の結合に関わるクロマチン構造の制御については、ヌクレアーゼの感受性を指標としたヒストンとDNAとの相互作用について生化学的に評価されるのが主流であった。そのため数個のヌクレオソームの範囲での解析にとどまり、高次クロマチン構造を含めクロマチン構造変換の全体像は未だほとんど解明がなされていない。本研究はこの観点から、転写領域におけるクロマチン構造変換の経時的な可視化システムの構築を目指し、クロマチン構造変換に関与する転写介在因子の解析と、それによって制御される細胞分化に対する生理的意義を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

細胞分化過程において、転写因子のクロマチン上にある標的遺伝子への結合制御は細胞の運命決定に重要なステップであり、その過程に必須な転写制御領域のクロマチン構造変換機構の解析が、エピジェネティック制御を理解する上でも重要な課題の一つとなっている。我々は核内レセプターに一過的になされるSUMO化修飾がクロマチンレベルで転写を制御することを明らかにし、そのSUMO化依存的に核内受容体に結合するARIP4を発見した。本研究では転写制御領域のクロマチン動態をモニターする実験系を確立し、ARIP4のクロマチン構造変換複合体の解析を細胞レベルで解析し、クロマチン構造の制御機構とその生理的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

平成23年度の計画  
従来の手法ではゲノム上の転写制御領域の

クロマチン構造を可視化することは困難であり、クロマチン構造変換の全体像はとらえられていなかった。この問題に対してMMTVアレイ細胞をモデル系として用い、ホルモンの添加によって活性のON/OFFが可能なステロイドレセプターによる転写活性化時のクロマチン構造変換を蛍光顕微鏡および超高解像度顕微鏡によって経時観察を行った。

平成24年度の計画

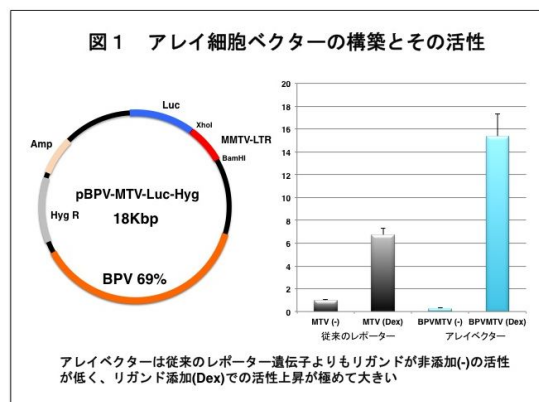
ARIP4複合体以外にもこの転写領域において大きなクロマチン構造変換に関与する因子の存在が示唆される場合が考えられる。この高次クロマチン構造変換に関与する因子に関しては、核内レセプターのリガンド誘導後の経時観察によってクロマチン構造変換のタイミングを限定した上で、時期特異的に核内レセプターに結合する複合体の精製を試みた。

平成25年度の計画

平成23年度よりARIP4およびp62のノックアウトマウスの掛け合わせによるARIP4複合体ノックアウトマウスの作製を行うが、連携研究者である諸橋憲一郎教授、竹内純准教授の協力の下、現在までに、心臓特異的ARIP4欠損マウスの作製に成功しそれらの解析および、組織特異的な機能の解析をすすめた。

## 4. 研究成果

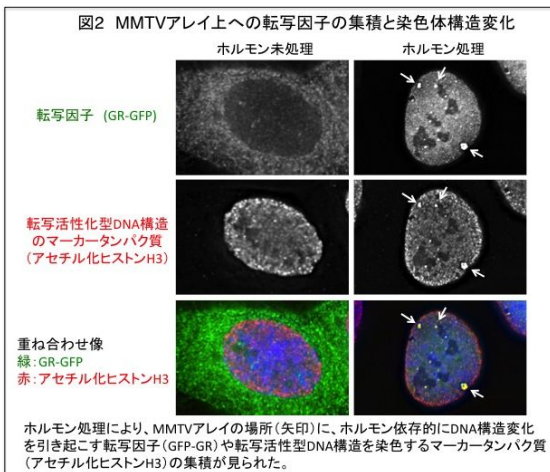
ステロイドレセプター(GR)の標的配列(MMTV-LTR)を直列に複数コピーゲノム上に有したMMTVアレイ細胞株の作製を試み、MMTV配列を細胞に導入するためのアレイベクターの構築を行った(図1)。



このアレイベクターが従来のレポータープラスミドと比較してどのような活性を有するのかを検討した。その結果従来知られているレポータープラスミドよりもバックグ

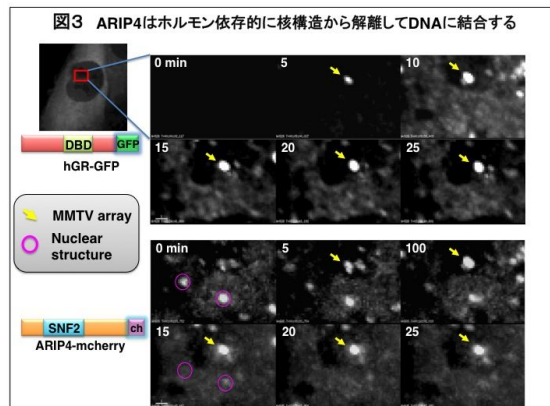
ラウンドが非常に低く、さらに活性のダイナミックレンジが非常に高い事が判明した(図1)。これはこのアレイベクター自身がクロマチン構造を形成できることを示唆しており、このプラスミドを用いることで有用なアレイ細胞を樹立できると考えた。このプラスミドと同時に GR と GFP の融合タンパク質を導入した細胞を作製し、MMTV のアレイ領域が可視化出来るかを指標に細胞をスクリーニングした。その結果、リガンド依存的に複数のアレイ領域が観察される細胞が複数株、ヒトがん細胞で樹立できた(図2)。

さらに、この細胞を用いて GR とともに、申



請者達が SUMO 化修飾依存的に GR に結合する介在因子 ARIP4 の局在変化を経時的に観察した(図3)。観察の結果、GR は予想通りホルモン依存的に細胞質から核へ移行し、速やかに MMTV アレイ上に局在する様子が見られた。一方 ARIP4 はホルモン非添加で核内にドット上の局在を示し、核内の特定の構造体に局在しているがホルモン添加によって、その構造体から速やかに解離した後 MMTV アレイ上に局在するのが観察された(図3)。

この事は核内構造体が標的遺伝子への介



在因子のリクルートに対して重要な前段階

である可能性を示している。また ARIP4 が ATP 依存的なクロマチン構造変換因子であることから、ホルモン依存的な核内での局在変化は核内構造とクロマチン構造変換のクロストークを示唆するものだと考えられる。

## 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 3件)

1. Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang C, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung BC, and Morohashi K Glycolytic genes as the targets of a nuclear receptor Ad4BP/SF-1 **Nature Communication** 5:3634 ncomms4634 Apr 14, 2014 (査読有り)

2. Miyabayashi K, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Baba T, Shima Y, Sugiyama N, Kitamura K, and Morohashi K Aristaless Related Homeobox Gene, Arx, Is Implicated in Mouse Fetal Leydig Cell Differentiation Possibly through Expressing in the Progenitor Cells. **PLoS ONE**. 8(6): e68050 Jun 28, 2013 (査読有り)

3. Tsuchiya M, Ogawa H, Suzuki T, Sugiyama N, Haraguchi T and Hiraoka Y Exportin 4 interacts with Sox9 through the HMG box and inhibits the DNA binding of Sox9. **PLoS ONE**. 6(10): e25694 Oct 3, 2011

( 査読有り )

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

1. 浅野 哲也, 小川 英知, 森下 環, 小島 瑞代, 土屋 恵, 福井 由宇子, 原口 徳子, 平岡 泰, 諸橋 憲一郎, 小柴 竹内 和子, 竹内 純  
性差による心発生異常と心疾患  
第 36 回日本分子生物学会年会 ( 2013 年 12 月 9 日 ) 神戸ポートアイランド、兵庫県
2. 小川英知、土屋恵、原口徳子、平岡泰  
SUMO 化依存的クロマチン構造変換因子 ARIP4 の核内受容体との複合体形成および核内動態の解析  
第 65 回 日本細胞生物学会大会 ウィンクあいち ( 2013 年 6 月 20 日 ) 愛知県
3. 小川英知、土屋恵、原口徳子、平岡泰  
クロマチン構造変換因子 ARIP4 の核内受容体との複合体形成および核内動態の解析  
第 35 回 日本分子生物学会年会 ( 2012 年 12 月 13 日 ) 福岡国際会議場・マリノメッセ福岡、福岡県
4. 小川英知、土屋恵、原口徳子、平岡泰  
Exportin 4 interacts with Sox9 through the HMG box and inhibits the DNA binding of Sox9  
JSCB2012 第 45 回発生生物学会・第 64 回細胞生物学会合同大会 ( 2012 年 5 月 31 日 ) 神戸国際会議場・神戸商工会議所、兵庫県
5. 土屋 恵, 小川 英知, 原口 徳子, 平岡 泰  
HMG box 転写因子 Sox9 のゲノム DNA への結合調節機構  
Exportin 4 interacts with Sox9 through the HMG box and inhibits the DNA

binding of Sox

第34回日本分子生物学会年会 ( 2011年12月16日 ) パシフィコ横浜、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 ハイ ICT グループ・主任研究員  
研究者番号 : 20370132
- (2)連携研究者  
諸橋 憲一郎 ( MOROHASHI, KEN-ICHIROU )  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号 : 30183114
- 竹内 純 ( TAKEUCHI, JUN )  
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授  
研究者番号 : 10451999