

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号： 24601
研究種目： 挑戦的萌芽研究
研究期間： 2011～2013
課題番号： 23659425
研究課題名（和文） 転写因子機能メカニズムの汎用解析システムの創出
研究課題名（英文） New Transgenic Mouse System to Analyze Functional Mechanisms of Transcription Factors
研究代表者 中川修（NAKAGAWA OSAMU） 奈良県立医科大学・先端医学研究機構・教授 研究者番号： 40283593

研究成果の概要（和文）：

転写因子は、遺伝子発現調節領域の DNA 配列に結合すると同時に、多様なパートナー分子（コファクター）、クロマチン修飾酵素と転写複合体を作ってターゲット遺伝子群の発現調節に働く。本研究では、特異抗体を用いずに転写複合体形成分子の Mass Spec 同定や ChIP-Sequence 法を行う方法として、Tandem Affinity Purification (TAP)-tag を用いた二重精製法に利用可能なトランスジェニックマウスを作成することを試みた。この Transgenic マウスは臓器特異的・時期特異的に TAP 標識転写因子を発現することが可能であり、特異抗体に頼らない新しい in vivo 転写因子作用メカニズム解析に用いる実験系として期待される。

研究成果の概要（英文）：

Transcription factors form multi-protein complexes with various partner proteins including non-DNA binding co-factors and chromatin remodeling enzymes, and regulate expression patterns of numerous target genes. In this study, we generated transgenic mouse lines that express a transcription factor containing Tandem Affinity Purification (TAP)-tag. These transgenic mice express TAP-tag proteins tissue-dependently in an inducible manner, and are applicable to various experiments such as mass spec analyses of transcriptional co-factors as well as ChIP-sequencing of target genes. Such studies will help dissection of molecular mechanisms of in vivo transcriptional regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード： 分子心臓病態学・転写調節因子・心血管系・トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

心血管系の分化・形態形成と成熟機能は循環器系のみならずあらゆる臓器のため必須であり、その精緻な調節メカニズムの解明は医学の重要な課題である。

転写調節因子（転写因子）は、遺伝子発現調節領域の DNA 配列に結合すると同時に、多様なパートナー分子（コファクター）、クロマチン修飾酵素と転写複合体を作って働く。発生シグナル・環境要因・病的刺激などの上流制御系が、転写複合体を構成する多様な分

子の機能を修飾することにより、時間・空間特異的な遺伝子発現調節が行われる。一方、ひとつの転写複合体が制御する下流遺伝子は多数にわたり、それらの遺伝子群の発現制御により細胞全体の機能・形質の劇的な変化をもたらす。

このように、転写複合体による遺伝子発現調節は「ゲノム遺伝子数をはるかに越えた多様な細胞分化・臓器機能調節の根幹」として働き、その破綻は様々な病態に直結する。この見地より私達は、心血管系の分化・形態形成・成熟機能の制御に働く転写因子の研究を行ってきた。

2. 研究の目的

転写因子による遺伝子発現調節は、心血管系の発生・形態形成・成熟機能の制御において中心的な役割を有し、多数の心血管系転写因子が様々な循環器疾患の病因、病態生理に関与する。

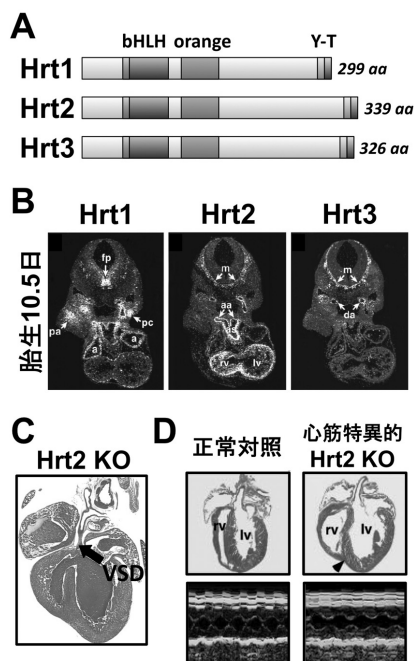
転写因子の機能メカニズム、特に、「複合体形成を介した転写調節機構」と「ターゲット下流遺伝子群」の解析法である IP-Mass Spec 法 (Bienvenu et al., *Nature* 2010) や ChIP-Sequence 法 (Park, *Nature Rev Genet* 2009) は近年開発されたポテンシャルの高い網羅的解析法であるが、対象分子に対する感度と特異性に優れた抗体が無い場合には行うことができない。幅広く多数の転写因子に適用できる実験法として利用するためには、抗体の有無に左右されないシステムを確立することが重要と考えられる。

そこで今回、感度・特異性ともに優れた「Tandem Affinity Purification (TAP)-tag を用いた二重精製法」 (Rigaut et al., *Nat Biotechnol* 1999) を採用し、抗体を用いない解析法の導入を試みた。

3. 研究の方法

私達は以前、心血管系特異的な新しい basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子ファミリー Hrt1/Hrt2/Hrt3 を同定した (Nakagawa et al., *Dev Biol* 1999) (図 1, panel A・B)。また、Hrt ファミリーが発生期の細胞分化や形態形成に重要な Notch 情報伝達系により活性化される転写因子であることを報告した (Nakagawa et al., *PNAS* 2000)。さらに、Hrt 転写因子が転写複合体形成を介して多様な生理作用調節に働くことを示した (Kathiriya et al., *J Biol Chem* 2004)。一方、Hrt2 ノックアウト (KO) マウスは心室中隔欠損症 (VSD) などの心奇形を示して生後すぐ死亡すること、心筋特異的 Hrt2 conditional KO マウスが心室筋における心房型遺伝子の異常発現により成長後の心機能

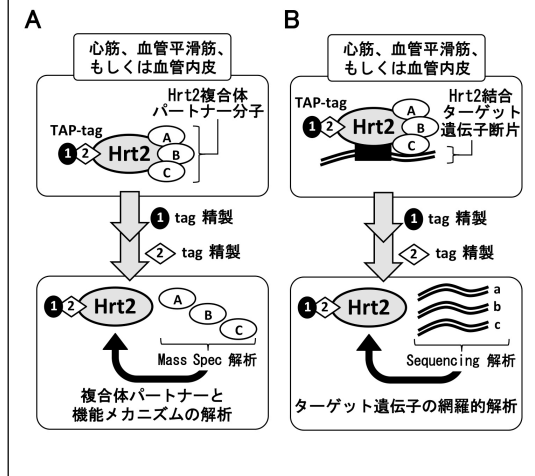
図 1 A: bHLH 型転写因子 Hrt ファミリーの構造模式図. B: Hrt1/Hrt2 の心血管系特異的発現 (*in situ* hybridization). Hrt3 の発現パターンとともに示す. C: Hrt2 KO マウスの心室中隔欠損 (VSD). D: 心筋特異的 Hrt2 KO マウスの心拡大と収縮不全 (心エコー M mode) .



不全を呈すること (Xin et al., *PNAS* 2007) を発見した (図 1, panel C・D)。このように、Hrt2 転写因子が胎生期の心臓形態形成・生後の心機能調節の双方に重要な役割を有することから、今回まず Hrt2 を解析対象として、様々な転写因子に対して用いることができる新しい機能解析システムの創出を目指した。

図 2 に模式的に示したように、TAP 精製法は、2 種類の異なるエピトープをもった tag を用いて二段階の精製を行うことにより、分子の精製度の高めることができる。先述のように、このトランスジェニックマウス組織を TAP 精製法に適用することにより、図 2 の (A) に示した Hrt2 転写因子と複合体を形成する分子の同定、(B) に示した Hrt2 転写因子複合体が結合する遺伝子断片、つまり転写複合体結合遺伝子領域の同定に用いることが可能である。先行して行った培養細胞系における解析では、TAP 精製法によって様々な分子と複合体を形成するパートナー分子群が精製され、Mass Spec 法によって明らかになったそれぞれの分子との有意な結合が確認された。さらに本研究では、生体 (*in vivo*) の心筋・血管平滑筋もしくは血管内皮におけ

図2 A: TAP 二重精製を用いた転写複合体構成分子の同定 (TAP-Mass Spec 法). B: TAP 二重精製を用いた転写因子ターゲット遺伝子の網羅的解析 (TAP-Sequencing 法).



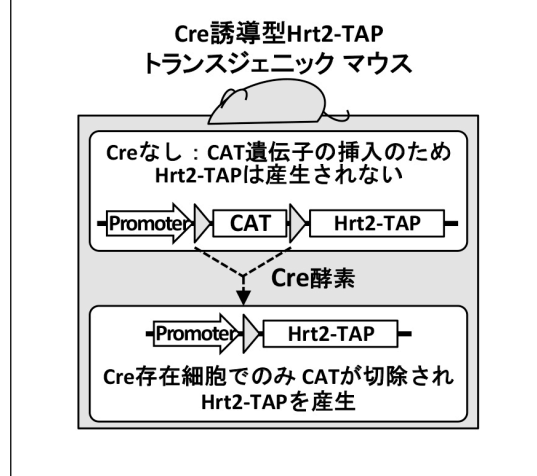
る Hrt2 の機能メカニズムを解析するため、下記の組織特異的・誘導型トランスジェニックマウスを作成した。

4. 研究成果

今回作成したトランスジェニックマウス (CAG Promoter-LoxP-CAT-LoxP-Hrt2-TAP) 系統はあらゆる細胞に発現活性を有するとされる CAG Promoter を使用しているが、これに加えて Cre 酵素を発現しない細胞では CAT 遺伝子のみを発現し、Hrt2-TAP を発現しない (図3)。私たちは、トランスジェニックマウス作成と並行して、心血管系を構成する代表的細胞種である心筋、血管平滑筋、血管内皮に特異的に Cre 酵素を発現するマウス系統 (それぞれ alpha MyHC-Cre, SM22-Cre, Tie2-Cre) を導入し、これらの Cre マウスと Hrt2-TAP トランスジェニックマウスを交配することにより、細胞特異的な Hrt2-TAP を発現することが可能とした。また将来的には、タモキシフェン誘導型 Cre マウスを用いて、成獣の限られた組織・細胞のみに Hrt2-TAP 発現を誘導して解析を行うことも計画している。

現在、この誘導型・組織特異的トランスジェニックマウスを用いて、図2に示した Hrt2 複合体形成パートナー分子の解析、Hrt2 ターゲット遺伝子の解析を進めている。一方、この Hrt2-TAP 分子が内因性 Hrt2 の機能を維持しているかを検証するため、培養細胞を用いた様々な Luciferase レポーター系における転写制御機能解析 (Kathiriya et al., *J Biol Chem* 2004) を行っている。さらに、Hrt2 KO マウス (Xin et al., *PNAS* 2007) における

図3 Cre 酵素による誘導型・組織特異的 Hrt2-TAP トランスジェニック発現. 異なる様式で Cre 酵素を発現するマウス系統との交配により、様々な Hrt2-TAP 発現を実現することが可能である。



Hrt2-TAP 分子の組織特異的発現を行い、心筋、血管平滑筋、血管内皮における Hrt2-TAP 発現による KO 表現型 (VSD などの心奇形により出生直後に死亡) の rescue 能を解析している。

今回作成したトランスジェニックマウス系統は、Hrt2 転写因子による心血管系の発生・形態形成制御メカニズムを明らかにするために有用であるだけでなく、今後様々な転写因子に応用可能である新しい in vivo 転写複合体機能メカニズム・ターゲット遺伝子解析法として重要である。心血管奇形は出生児の約 100 人に 1 人発症する最も多い先天奇形であり、その疾患機序の解明が急務となっている。これまでに同定されたヒト心血管奇形の原因遺伝子の多くが転写因子であることより、転写調節機構の臨床的意義は明白である。さらに多数の転写因子がマウスの心血管系発生に必須であることが KO マウス解析を通じて示されており、今後の患者研究の進展により、さらにヒト疾患の原因となる転写因子が増加すると予想される。今回用いた解析法を多数の転写因子の研究へ適用することにより、心血管系の転写調節・シグナル伝達ネットワークの全体像の解明に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Somekawa S, Imagawa K, Hayashi H, Sakabe M, Ioka T, Sato GE, Inada K, Iwamoto T, Mori T, Uemura S, Nakagawa O, Saito Y. Tmem100, an ALK1 signaling-dependent gene

essential for arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 109(30): 12064-9, 2012.

DOI 10.1073/pnas.1207210109
(査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

代表的な 3 件を示す。

中川修、Notch および ALK1 受容体シグナル伝達系の下流因子による心血管系の分化・形態形成制御機構、日本心脈管作動物質学会、2013 年 2 月 9 日、奈良県奈良市

林寿来 他、虚血後血管新生における Hairy-related transcription factor (Hrt) の発現プロファイルと意義の解明、日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日、福岡県福岡市

森岡崇 他、Significance of Hairy-related transcription factors in endothelial differentiation and vascular morphogenesis、日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日、福岡県福岡市

[図書] (計 1 件)

中川修、診断と治療社、最新内分泌代謝学(中尾一和編・970 頁)、第 5 章 心臓と腎臓の内分泌代謝「心臓の発生・先天性心疾患と分泌性シグナル因子」p271-273、2013

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ

<http://www.naramed-u.ac.jp/csr/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川修 (NAKAGAWA OSAMU)
奈良県立医科大学・先端医学研究機構・教授
研究者番号：40283593

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

林 寿来 (HAYASHI HISAKI)
奈良県立医科大学 先端医学研究機構
生命システム医科学分野
循環器システム医科学研究室
研究者番号：30533715

坂部 正英 (SAKABE MASAHIDE)
奈良県立医科大学 先端医学研究機構
生命システム医科学分野
循環器システム医科学研究室
研究者番号：00525983