

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659121

研究課題名(和文)核内環境を忠実に模倣したクロマチン再構成ビーズによる転写制御因子同定法の確立

研究課題名(英文)Identification of transcription regulatory factor using chromatinized DNA template immobilized on microbeads

研究代表者

高橋 秀尚 (Takahashi, Hidehisa)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30423544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞の多能性を規定する因子として発見された4つの因子が、全て転写因子であったことから、転写因子による遺伝子発現制御の重要性が再認識されている。本研究では転写因子による遺伝子発現制御の解明を目的に、肝細胞分化に必須の転写因子HNF4alphaによって特異的にリクルートされる転写制御因子を、クロマチン化転写調節領域を固定化したマイクロビーズを用いて、同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：Many evidence including that all of the Yamanaka factors necessary for generation of IPS cells are transcription factors indicates that transcription factors play an very important role in regulation of gene expression. To address the mechanism how transcription factor regulates gene transcription, we performed the identification of transcription regulatory factor using chromatinized DNA template.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：転写因子 転写制御因子 HNF4 alpha ES細胞

1. 研究開始当初の背景

転写因子によって制御される遺伝子のほとんどは RNA ポリメラーゼ II (以下 Pol II) によって mRNA に転写される。転写の過程は、転写開始、伸長、そして終結の主に 3 つの過程からなるが、転写因子は特に転写開始において重要な役割を果たす。転写開始の過程で、転写因子は特定の DNA 配列に結合すると、クロマチンリモデリング因子やヒストン修飾因子、コアクチベーターなどのさまざまな因子を転写調節領域にリクルートし、それらの働きを利用して転写調節領域のクロマチンを解く。その後、転写因子はさらにコアクチベーターなどと共役し、基本転写因子群や Pol II をプロモーター領域にリクルートし、転写開始を促進する。申請者らはこれまでに、細胞の核抽出液から転写因子を免疫沈降法により精製し、それと結合する転写制御因子を、質量分析計を用いて同定してきた。ところが、遺伝子発現制御に関わる因子のほとんどは、転写調節領域などの DNA あるいはクロマチン上で機能している。そのため、DNA 存在下に転写因子を精製することが、転写因子と共に機能する転写制御因子を同定する上で有利であることが判明した。

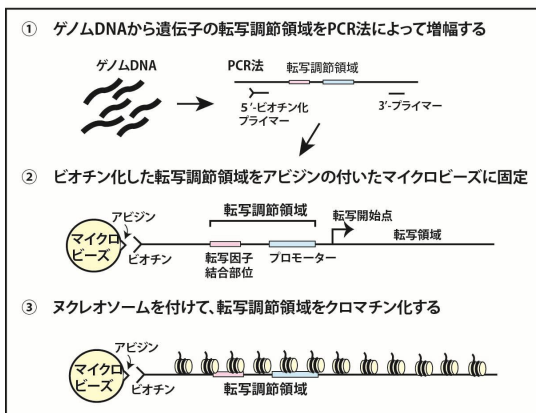
2. 研究の目的

本研究では転写因子による遺伝子発現制御の解明を目的に、さまざまな転写因子によって転写調節領域に特異的にリクルートされる転写コアクチベーターやクロマチン制御因子を、クロマチン再構成した転写調節領域をマイクロビーズに固定化し、それを用いて網羅的に同定する方法を確立する (図 1 参照)。申請者らはこれまでに、類似の方法を用いて、転写因子の存在下にメディエーター複合体が新規複合体を遺伝子上にリクルートすることを明らかにした。本研究ではこの方法を発展させ、さまざまな転写因子によって、どのような転写制御因子が転写調節領域に特異的にリクルートされ機能するのかを、網羅的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 転写因子のそれぞれの結合配列を有するクロマチン化転写調節領域マイクロビーズ

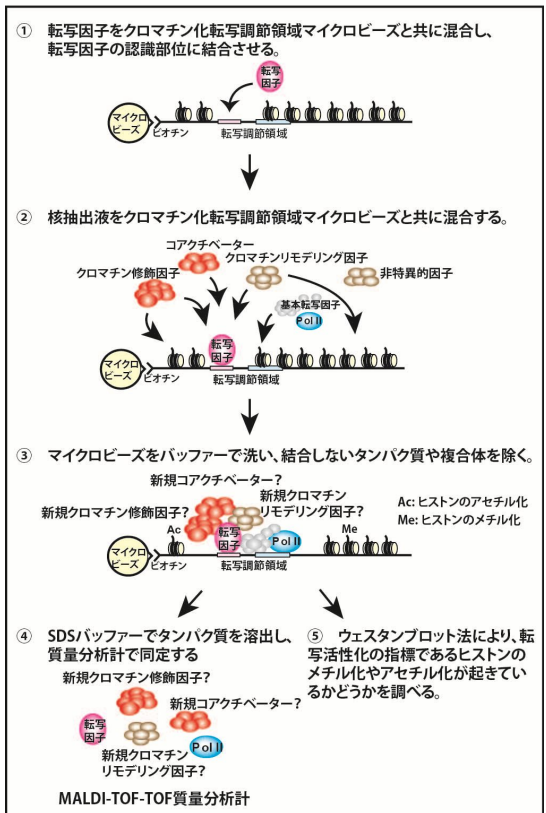
図1: クロマチン化転写調節領域マイクロビーズ



(図 1 参照) 転写因子のリコンビナントタンパク質、HepG2 細胞やマウス ES 細胞から抽出した核抽出液をそれぞれ作製する。

(2) クロマチン化転写調節領域マイクロビーズを用いて、転写因子によってプロモーター領域にリクルートされる転写制御因子を精製し、それらを質量分析計によって網羅的に同定する (図 2 参照)。

図2: マイクロビーズを用いた新規転写制御因子の同定法



(3) 同定された転写制御因子が転写因子と結合し、転写因子の存在下で、マイクロビーズ上の転写調節領域にリクルートされるかどうかを明らかにする。

(4) 同定された転写制御因子が転写因子によって実際の転写調節領域にリクルートされ、細胞内でそれらの遺伝子発現制御に関わっているのかに関して、ChIP (クロマチン免疫沈降) 解析を行い明らかにする。

4. 研究成果

肝細胞の分化に必須の転写因子 HNF4α によって特異的にリクルートされる転写制御因子を同定するために、HNF4α 結合配列を有する転写調節領域 DNA、HNF4α のリコンビナントタンパク質を作製した。また、肝がん細胞株 HepG2 細胞の大量培養を行い、その核抽出液を精製した。HNF4α 結合配列を有する転写調節領域 DNA とヌクレオソームを混合し、転写調節領域 DNA をクロマチン化した。マイクロビーズに固定化したクロマチン化転写調節領域を、HNF4α リコンビナ

ントタンパク質、核抽出液と混合し、HNF4 α によって転写調節領域にリクルートされる転写制御因子の精製を行った。現在、質量分析計を用いて、転写制御因子の同定を行っている。

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5件)

1. Sato T, Takahashi H., Hatakeyama S., Iguchi A. and Ariga T.: The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway. *Oncogene*, 査読有 31;0, 2014. doi: 10.1038/onc.2014.68.
2. Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H., Okumura F, Takeuchi A, Horiuchi K, Kano T, Kanda A, Saito W, Matsumoto M, Nakayama KI, Hatakeyama S, Sasaki H. Identification of anti-Sez6l2 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. *Journal of Neurology*, 査読有 261(1), 224-226, 2014. DOI: 10.1007/s00415-013-7134-5.
3. Yasukawa T, Bhatt S, Takeuchi T, Kawauchi J, Takahashi H., Tsutsui A, Muraoka T, Inoue M, Tsuda M, Kitajima S, Conaway RC, Conaway JW, Trainor PA, Aso T.: Transcriptional Elongation Factor Elongin A Regulates Retinoic Acid-Induced Gene Expression during Neuronal Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell reports*, 査読有 29;2(5):1129-1136, 2012. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.09.031.
4. Yaguchi H, Okumura F, Takahashi H., Kano T, Kameda H, Uchigashima M, Tanaka S, Watanabe M, Sasaki H, Hatakeyama S.: TRIM67 protein negatively regulates Ras activity through degradation of 80K-H and induces neuritogenesis. *J Biol Chem*, 査読有 287(15):12050-12059, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M111.307678.
5. Takahashi H.: Role for the human mediator subunit Med26 in transcription elongation. *Seikagaku*, 84(7): 577-581, 2012. 査読無

[学会発表](計5件)

1. 高橋秀尚, 瀧川一学, Delnur Anwar, 柴

田美音, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Ranjan Amol, Chris W. Seidel, 築山忠維, 渡部昌, 林正康, 大川恭行, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, 畠山鎮次, Med26はLittle elongation complexをリクルートすることでsmall nuclear RNA遺伝子の発現を制御する, 第36回日本分子生物学会, 神戸ポートピアホテル, 神戸, 2013.12.3-5.

2. Hidehisa Takahashi, Chieri Tomomori-Sato, Shigeo Sato, Amol Ranjan, Masayasu Hayashi, Yasuyuki Ohkawa, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama. Human Mediator subunit Med26 regulates the transcription of small nuclear RNA genes through the recruitment of little elongation complex. Mechanism of eukaryotic transcription, Cold spring harbor meeting, 2013.8.27-30
3. 高橋秀尚, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, 畠山鎮次, Med26はLittle elongation complexをリクルートすることでsmall nuclear RNA遺伝子の発現を制御する, 第85回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡, 2012. 12. 14-16.
4. 榊田安志, 高橋秀尚, 畠山鎮次, TRIM29によるTRRAP/Tip60複合体の機能制御とがん化との関わり, 第85回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡, 2012. 12. 14-16.
5. 高橋秀尚, 佐藤智信, Conaway, J.W., Conaway, R.C., 畠山鎮次, Med26はLittle elongation complexをリクルートすることでsmall nuclear RNA遺伝子の発現を制御する, 第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡, 2012. 12. 11-14.

[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〕

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~d20505/takahashi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 秀尚 (TAKAHASHI HIDEHISA)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：30423544

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：