

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660286

研究課題名(和文)細胞核内に人為的に作成したアクチン繊維によるエピジェネティック操作基盤の創出

研究課題名(英文)Research for molecular basis of epigenetic operation in transcription by inducing nuclear actin filaments

研究代表者

原田 昌彦 (Harata, Masahiko)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70218642

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):培養細胞の核内にアクチン繊維を人為的に誘導し、遺伝子の発現を解析したところ、OCT4を含む多数の遺伝子の発現変化が観察された。Wnt/beta-cateninシグナルに核内アクチン繊維が影響を与えている可能性を考えて解析を行ったところ、核内アクチン繊維がbeta-cateninの核内蓄積を引き起こすとともに、クロマチンに結合してwnt/beta-cateninターゲット遺伝子を活性化させることが示された。

研究成果の概要(英文):We induced the formation of nuclear actin filaments in cultured cells, and analyzed gene transcription. In the cells, the expression of multiple genes, including OCT4, were changed. We then analyzed the effect of nuclear actin filaments on Wnt/beta-catenin signaling. We found that nuclear actin filaments induced the accumulation of beta-catenin in the nucleus and activate targets genes. In addition, nuclear actin filaments associated the promoter of the genes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞核 アクチン 転写 エピジェネティック

1. 研究開始当初の背景

ゲノムは細胞核内にクロマチンとして収納されており、クロマチンの局所的な構造に加えて、クロマチンの核内での空間配置がエピジェネティック制御に重要な役割を果たす。クロマチンの核内空間配置には、クロマチンと核骨格との相互作用が寄与するが、核骨格の機能には不明な点が多い。一方、アクチンファミリーが核骨格の形成・機能に重要な役割を果たすこと示されている。たとえば、2012年に山中博士と共にノーベル賞を受賞した Gurdon 博士は、体細胞の遺伝子が初期化して分化多能性を得る過程に、核内のアクチン繊維(フィラメント)形成が必要であることを見出した (Genes Dev, 2011; Nature Rev Mol Cell Biol, 2011)。また、発生分化、がん、DNA 損傷などに伴って、大規模なアクチン骨格のリモデリングが起こり、このリモデリングが遺伝子発現にも大きな影響を与えることから、アクチン骨格とエピジェネティック制御との関連が示唆されていた。しかし、核内に観察されるアクチンフィラメントは動的かつ不安定で、その機能を研究するためのモデル系が存在せず、その機能解明は遅れていた。

我々は、核内アクチンフィラメント形成とエピジェネティック制御との関連を研究するモデル系の開発に取り組み、核移行シグナル(NLS)を付加したアクチンが、低い確率で核内にフィラメントを形成することを観察した。さらに、アクチンに結合する Arp 遺伝子をロックダウンすることで、核内でのアクチン重合が促進されることを見出し、Arp ロックダウンと NLS 付加アクチンを組み合わせることで、人為的に核内アクチンフィラメントを形成させ、また形成の程度をコントロールすることを可能とした。これによって、核内アクチンフィラメントによって形成される核骨格がエピジェネティック制御に及ぼす影響の解析が行えるようになった。

2. 研究の目的

本研究では、核内のアクチンフィラメントの形成が、どのようにエピジェネティック制御に関わるかを明らかにすることを目的とした。さらに応用展開として、連携研究者である近畿大・三谷匡の協力を得て、核内アクチンフィラメント形成が遺伝子初期化に与える影響を、体細胞クローン胚作製と多能性幹細胞(iPS 細胞)形成の両面から解析し、応用への基盤を創出することを目的とした。

近年、核構造とエピジェネティック制御の明確な関連性を示す結果が蓄積している一方で、その分子機構の解明は遅れている。本研究はその解明への大きなブレークスルーとなると共に、育種や再生医療への応用を通じて、農学・医学分野にも大きく貢献できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1)核内アクチンフィラメントが、遺伝子発現、クロマチン修飾・構造、クロマチン核内配置に与える影響の解析

核移行シグナル(NLS)付加アクチンの発現や、Arp のロックダウンによって、培養細胞で核内アクチンフィラメントを形成する。予備的な実験により、核内アクチンフィラメント形成によって複数の遺伝子の発現が変化することを既に観察しているので、本研究ではマイクロアレイ解析によって、遺伝子発現変化を網羅的に検出する。特に、アクチンフィラメントが結合していることが示されている初期化因子 Oct4 遺伝子 (Miyamoto et al., Genes Dev., 2011)などに注目して解析を行う。次に、抗アクチン抗体や、アクチンフィラメントに結合するファロイジンなどを用いてクロマチン免疫沈降し、Oct4 遺伝子などへのアクチンフィラメント結合を解析すると共に、核内アクチンフィラメントのクロマチン結合部位を明らかにし、遺伝子発現との相関を解析する。

(2)核内アクチンフィラメント形成が培養細胞の分化に与える影響の解析

単層上皮細胞から扁平上皮への分化を誘導できる HaCaT 細胞を用いて、細胞分化の解析を行う。アクチンフィラメントを安定化する薬剤であるファロイジン処理によって、HaCaT 細胞の分化が変化することを予備的な実験により確認している。この細胞を用い、核内アクチンフィラメント形成によってどのように細胞分化が影響を受けるかを解析する。この実験によって得られた、NLS 付加アクチンだけでは分化効率の変化が小さい場合には、核内 Arp のロックダウンや、フィラメントを安定化させる変異アクチンの発現によってアクチンフィラメント形成を促進する対策を講ずる。また、マウス ES 細胞に NLS 付加アクチンを導入して、核内アクチンフィラメントの形成を行い、分化誘導してその解析を行う。

(3)核内アクチンフィラメントが、遺伝子発現、クロマチン修飾・構造、クロマチン核内配置に与える影響の解析

核内アクチンフィラメント形成が、クロマチンの修飾や構造に与える影響を解析する。活性クロマチンやヘテロクロマチンに特異的なヒストン修飾抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、マイクロアレイや次世代シーケンサーで解析することにより、これらのヒストン修飾の変化を明らかにする。また、修飾の変化が観察された領域については、核内アクチンフィラメントの結合との関連を解析すると共に、ヌクレアーゼ感受性を指標にしたクロマチン構造変化の検出を行う。さらに、細胞をヒストン修飾抗体を用いて染色することにより、核内アクチンフィラメント

と共局在するクロマチン領域の特徴を明らかにする。核内には、ヘテロクロマチンや、転写ファクトリー・複製ファクトリーなどの機能ドメインが特定の空間に配置されていることが知られている。HP1 抗体、RNA ポリメラーゼ抗体、DNA ポリメラーゼ抗体などを用いてこれらの核内機能ドメインを検出し、核内アクチンフィラメントの局在と比較することにより、クロマチンや核内ドメインの核内空間配置機構を解析する。

さらに、核内アクチンフィラメントが、ゲノム安定性維持に与える影響を解析する。核内アクチンフィラメントを有する細胞に、DNA 損傷試薬を作用させ、その感受性を比較すると共に、ゲノムの変動を比較する。特に、ヒト染色体上の脆弱領域やトリプレットリピート配列などに注目する。また、gamma-H2AX 抗体で核内の修復ドメインを可視化し、核内アクチンフィラメントとの局在を比較する。

4. 研究成果

(1)培養細胞の核内に、アクチン繊維を人為的に誘導し、この細胞の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて解析した。その結果、多数の遺伝子が、核内のアクチン繊維形成に伴って発現変化を示した。注目すべきことに、遺伝子リプログラミングに中心的な役割を果たす *OCT4* の発現が上昇した。このことは、核内の人為的なアクチン繊維形成を多分化能細胞作成に利用する上において、大変に興味深い結果である。さらに、連携研究者と協力して、核内移行シグナルを付加したアクチンを構成的に発現する ES 細胞の構築を試みた。その結果、複数のクローンを得て、これらのクローンにおける核内アクチンの存在、および核内でのアクチン繊維の形成を確認した。さらに、核内のアクチン関連タンパク質 (Arp5 および Arp8) をノックアウトした細胞を樹立して、その解析を行った。その結果、これらのアクチン関連タンパク質が細胞核内のアクチンダイナミクス制御に関与することを観察した。これまでにも、細胞質においてはアクチン関連タンパク質である Arp2/3 がアクチン骨格形成の制御をおこなっていることが報告されていることから、これらの結果は、細胞核内でのアクチンファミリー間での相互作用によって核内のアクチン機能が制御されていることを示唆するものである。

(2)核内アクチン繊維が転写に影響を与える分子メカニズムの一つとして、細胞増殖や分化に重要なシグナル経路である Wnt/ β -catenin シグナルへの影響を考え、その検証を行った。その結果、核内アクチン繊維の形成によって、核内の β -catenin 量の増加が観察された。また同時に、Wnt/ β -catenin ターゲット遺伝子への β -catenin 結合が増加

していることが示され、同時にこれらの遺伝子転写量の増加も観察された。また興味深いことに、これらの遺伝子の上流のクロマチン領域に対してクロマチン免疫沈降法で解析を行ったところ、核内のアクチン繊維がこれらのクロマチン領域に結合していることが示された。これらの結果は、核内のアクチン繊維が、核内の β -catenin の存在量や状態を変化させることにより、エピジェネティック制御に関与していることを示唆するものである。

(3)核内アクチン繊維の、細胞分化への影響を解析した。ES 細胞で恒常的に NLS-アクチンを発現する細胞株を作成した。また、培養細胞中の細胞核に人為的に核内アクチン繊維を誘導し、この細胞に対して DNA 損傷試薬を作用させたところ、薬剤感受性の増加が観察された。このことは、核内アクチン繊維が、ゲノム安定性維持にも寄与していることを示唆している。さらに核内アクチン繊維を形成した HaCaT 細胞においては、細胞分化の促進が観察された。

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 18 件)

Yamazaki, S., Yamamoto, K., de Lanerolle, P. and Harata, M. Nuclear F-actin enhances the transcriptional activity of β -catenin by increasing its nuclear localization and binding to chromatin. **Histochem. Cell Biol.** 145(4):389-399 (2016) (査読有り)
doi: 10.1007/s00418-016-1416-1419

Kusakabe, M., Oku, H., Matsuda, R., Hori, T., Muto, A., Igarashi, K., Fukagawa, T. and Harata, M. Genetic complementation analysis showed distinct contributions of the N-terminal tail of H2A.Z to epigenetic regulations. **Genes Cells** 21, 122-135 (2016) (査読有り)
doi: 10.1111/gtc.12327

Kitamura, H., Matsumori, H., Kalendova, A., Hozak, P., Goldberg, I.G., Nakao, M., Saitoh, N. and Harata, M. The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. **Biochem Biophys Res Commun.** 464, 554-560 (2015) (査読有り)
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.005

Osakabe, A., Takahashi, Y., Murakami, H., Otawa, K., Tachiwana, H., Oma, Y., Nishijima, H., Shibahara, K., Kurumizaka,

H. and Harata, M. DNA binding properties of the actin-related protein Arp8 and its role on DNA repair. **PLoS One** 9(10), e108354 (2014) (査読有り)
doi: 10.1371/journal.pone.0108354

Horigome, C., Oma, Y., Konishi, T., Schmid, R., Marcomini, I., Hauer, M.H., Dion, V., Harata M. and Gasser, S.M. SWR1 and INO80 chromatin remodelers contribute to DNA double-strand break perinuclear anchorage site choice. **Mol. Cell** 55, 626-639 (2014) (査読有り)
doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.027

Konishi, T. and Harata, M. Improvement of the transformation of efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* by altering carbon sources in pre-culture. **Biosci. Biotech. Biochem.** 78(6), 1090-1093 (2014) (査読有り)
doi: 10.1080/09168451.2014.915730

[学会発表](計 56 件)

原田昌彦「クロマチン構造の階層的変換によるゲノム機能制御メカニズム」アクチンファミリーによるクロマチン構造の階層的変換、第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 4 日(神戸)(招待講演)

Masahiko Harata "Contribution of nuclear actin filaments in transcriptional regulation." Institute for Protein research (IRP) Seminar "Nuclear organization and actin-dependent mechanisms in genome stability", May 19, 2015, Osaka (招待講演)

Masahiko Harata "Nuclear actin and ARPs involved in the functional organization of chromatin." The 2014 ASCB/IFCB Meeting, December 6, 2014, Philadelphia, USA (招待講演)

原田昌彦「核構造タンパク質によるクロマチン時空間制御の理解とマニピュレーション」アクチンファミリーによる細胞核とクロマチンの機能構造制御、第 87 回日本生化学会大会シンポジウム、2014 年 10 月 18 日(京都)(招待講演)

原田昌彦「細胞核内構造体の構築原理と高次生命機能」アクチンファミリーによる細胞核・クロマチンの機能構造形成、第 86 回日本生化学会大会シンポジウム、2013 年 9 月 11 日(横浜)(招待講演)

Masahiko Harata "Actin family proteins involved in the functional organization of the nucleus." 23th Wilhelm Bernhard

Workshop in the cell nucleus, August 19-26, 2013, Debrecen, Hungary (招待講演)

[図書](計 2 件)

原田昌彦、ベーシックマスター分子生物学(改訂版)(東中川徹、大山隆、清水光弘編)第 8 章「翻訳の調節」、オーム社、(2013) p216-241

原田昌彦、染色体と細胞核のダイナミクス-DNA を操る細胞の仕組み-(原口徳子・平岡泰編) 第 11 章「核タンパク質と核骨格」、化学同人、(2013) p169-183

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.harata-lab.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 昌彦 (HARATA MASAHIKO)

東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：70218642

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

三谷 匡 (MITANI TASUKU)

近畿大学・先端技術総合研究所・教授
研究者番号：00322265