

機関番号：82636

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～2010

課題番号：21770197

研究課題名 (和文) SUMO 化依存的なクロマチン構造変換の 1 分子解析

研究課題名 (英文) Single molecular analysis of sumoylation-dependent chromatin remodeling factor

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 バイオ ICT グループ・専攻研究員

研究者番号：20370132

研究成果の概要 (和文)： 翻訳後修飾依存的な転写抑制機構の解明を目的に、我々は SUMO 化修飾に着目した。核内受容体に SUMO 化依存的に結合する介在因子 ARIP4 の精製に成功し、その分子機構の解明を行った。その結果、ARIP4 の核内での複合体形成を可視化することに成功し、その複合体形成が転写抑制に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)： The small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugates transcription factors, and suppresses the transcription of their target genes. Although various SUMO-conjugated transcription factors have been isolated, mechanisms how sumoylated-transcription factors suppress transcription remain largely unknown. To understand mechanisms of SUMO-dependent transcriptional repression, we purified interacting partners for a nuclear receptor and identified ARIP4 known as a SNF2 chromatin-remodeling factor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学、生化学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写因子、核内受容体、クロマチン、SUMO 化修飾、転写制御、核内構造

1. 研究開始当初の背景

核内レセプターは非常に多くのコファクター複合体が秩序だって標的遺伝子上にリクルートされ、クロマチン上でそれぞれの役割を果たしながら多段階で転写のシステムが進行していくと考えられている。このような秩序だった機構の進行にはおそらく転写

因子側の質的变化、つまり転写因子の分子表面上または構造上に変化が起きていることが予測されるものの、現在まで多くの部分が不明なままであった。私はこの観点からの転写の分子機構解析を始めるに当たって、生殖腺の分化に必須な核内受容体型転写因子 Ad4BP に興味を持ち、Ad4BP の翻訳後修飾と

転写制御の関連について研究を始めた。我々は SUMO 化修飾が転写誘導後きわめて短時間に一過的に起きること、その作用は短時間であるが非常に大きいことを見出し、まだ未同定のコファクターが SUMO 化 Ad4BP に特異的に結合することによりクロマチンレベルで制御しているとの発想に至った。我々は SUMO 化 Ad4BP を試験管内で作製し、アフィニティ精製カラムによって SUMO 化依存的に Ad4BP に強く結合する因子の精製を試みた。精製の結果、我々は Ad4BP の SUMO 化修飾特異的に結合する新規介在因子 ARIP4 を発見した。さらに ARIP4 は ATP 依存的クロマチンリモデリング因子様の Snf2 ドメインを有すること、Ad4BP の標的遺伝子に非常に短時間結合し、ATP 依存的に一過的に転写抑制することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

長年にわたり転写研究は、活性化および抑制化という二つの状態を、細胞の集団平均として計測してきた。しかしながら、転写が個々の細胞のレベルで時間的・量的に正確に制御されることを考えれば、経時的に進行する分子レベルの現象を個々の細胞で解析することが、転写制御の厳密で複雑な動作原理の理解に重要である。本研究は転写因子 Ad4BP の翻訳後修飾 SUMO 化による一過的な抑制過程を、特定のプロモーター上での分子レベルの動態観察を行うことにより、転写活性化プロセスの動作原理を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

クロマチンリモデリング因子の中でも、ARIP4 の属する Rad54 ファミリー因子群は、従来の ATP 依存的なクロマチン構造変換活性の検出が困難であるとの複数の報告がなさ

れている。この原因として、従来のクロマチンリモデリング活性の評価系が適切でないことが上げられる。このことから、申請者は適切なクロマチンまたは DNA 構造変換活性の評価系を構築することが、ARIP4 の本来の機能を明らかにする上で最重要であると考えた。本申請研究では、二つの 1 分子蛍光観察システムを駆使し、今まで検出が困難であったクロマチン構造変換機構を可視化によって明らかにする。さらにセミインタクト細胞系を用いて ARIP4 複合体の高次クロマチン上での活性評価を行うことを計画した。

平成 21 年度研究計画

「蛍光観察による転写複合体構成系の確立」

一般に ATP 依存的なリモデリング活性の本質はヒストンと DNA の相互作用の調節であるとされ、一説では ATP 依存的な DNA をねじる力がその動作原理とされている。現在までに、DNA 構造変換活性を蛍光 1 分子の可視化システムを利用した実験系の構築を行っている。さらに、この実験系の構築と共に ARIP4 複合体の形成機構の解明を行い、その細胞内複合体形成の可視化システムの構築および検出を試みた。

平成 22 年度研究計画

ARIP4 の標的遺伝子の構造変換機構に関して得た知見を、よりタンパク質複合体として検証するため、原子間力顕微鏡および、ARIP4 複合体の細胞レベルでの解析を進めた。

4. 研究成果

転写機構は多段階の周期的なステップを経て厳密な制御がなされていると考えられる。我々は、この分子機構解明のため、核内受容体の転写抑制活性に着目した。

Ad4BPが翻訳後修飾であるSUMO化依存的に転写抑制を受けることから、Ad4BPのSUMO化に特異的に結合する因子ARIP4を同定することができた。本研究課題では、ARIP4の転写制御機構の分子メカニズムを明らかにするために、ARIP4が細胞内で形成する複合体の同定と機能解析、またその複合体の構成因子とARIP4の分子レベルでの動態観察を行った。ARIP4複合体を細胞核抽出液より精製すると特異的に約60kDaのタンパク質p60が結合することが見出された。この因子はARIP4のATPase活性を促進すると共に、転写抑制活性を促進した。この結果はp60が機能的にARIP4の複合体構成因子であることを意味している。この両者の結合領域をARIP4の欠失変異体の作成によって検討したところ、進化的に保存されている約90アミノ酸の領域がp60との結合に重要であることが判明し、その領域を欠いたARIP4は転写抑制能が顕著に減少した。これらの結果からARIP4にp60が結合することが転写抑制能において必須であることが明らかとなったため、さらに、二つの因子が細胞内で近傍に存在するときに蛍光を発するin situ PLAシステムを用い、内在のARIP4とp60が細胞内で複合体を形成しているかどうかを可視化できるか試みた。その結果、ARIP4とp60は正常な状態では核で主に複合体を形成しているが、一部細胞質においても複合体を形成する可能性が示された。さらにこれらの複合体を分子レベルで観察するために、原子間力顕微鏡を用いてARIP4とp60の複合体を観察した。興味深いことにこれらの相互作用はATP非依存的に見られるが、ATP存在下では、この複合体が集積した大きな集合体を形成することが明らかとなった。p60は特定の薬剤によって核内で集積する染色パターンが

観察されることから、これらの結果はARIP4の複合体がATP依存的に集合体を形成し、核内で存在形態を変化させることで転写調節を行っていることを意味する。これらの成果はARIP4複合体形成機構とその転写制御機構への影響について分子レベルでクロマチンの動態を含め解析をすすめる上で重要な知見であり、今後のクロマチンレベルでの新規転写調節機構の解明につながると考えている。

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3件)

- ① **Kusaka M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Miyabayashi K, Baba T, Shima Y, Sugiyama N, Sugimoto Y, Okuno Y, Kodama R, Iizuka-Kogo A, Senda T, Sasaoka T, Kitamura K, Aizawa S, Morohashi K.**
Abnormal epithelial cell polarity and ectopic epidermal growth factor receptor (EGFR) expression induced in Emx2 KO embryonic gonads.
Endocrinology. (査読有), 151(12): 5893-5904, 2010
- ② **Ogawa H, Komatsu T, Hiraoka Y, Morohashi K.**
Transcriptional Suppression by Transient Recruitment of ARIP4 to Sumoylated nuclear receptor Ad4BP/SF-1.
Mol Biol Cell. (査読有), 20(19): 4235-45, 2009
- ③ **Yokoyama C, Komatsu T, Ogawa H, Morohashi K, Azuma A, and Tachibana T.**

Generation of Rat Monoclonal Antibodies
Specific for Ad4BPSF-1
Hybridoma. (査読有), 113-119, 2009

[学会発表] (計 6 件)

- ① 小川英知、土屋恵、小松朋子、原口徳子、平岡泰、諸橋憲一郎
SUMO化依存的コファクターARIP4の核内受容体との複合体形成および動態の解析
第3回 核内受容体研究会 (2011年3月11日) 霞が関コモンゲート西館 会議室、東京都
- ② 小川英知、土屋恵、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
文部科学省科学研究費補助金・特定領域研究「遺伝情報デコード」成果報告シンポジウム、転写研究会・若手シンポジウムGene Regulatory Complexes & Networks (2011年2月18日) 東北大学東京分室、東京都
- ③ 小川英知、土屋恵、小松朋子、原口徳子、平岡泰、諸橋憲一郎
SNF2 ファミリーARIP4 複合体によるSUMO化依存的なAd4BP/SF-1の転写調節機構
第62回日本細胞生物学会大会、(2010年5月21日) 大阪国際会議場、大阪府
- ④ Hidesato Ogawa, Megumi Tsuchiya, Tomoko Komatsu, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi and Ken-ichirou Morohashi

Interaction of ARIP4 complex with sumoylated Ad4BP/SF-1
第14回 国際内分泌学会議(ICE2010)サテライトシンポジウム (may.31,2010) 京都市勧業館みやこめッセ, Japan

- ⑤ Megumi Tsuchiya, Hidesato Ogawa, Tomoko Komatsu, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi, Kenichiro Morohashi
Interaction of ARIP4 complex with sumoylated Ad4BP/SF-1
Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Mar.24,2010) Keystone Resort, Colorad, USA
- ⑥ Hidesato Ogawa, Tomoko Komatsu, Yasushi Hiraoka, Kenichirou Morohashi
Purification and analysis of a complex interacting with sumoylated Ad4BP/SF-1
第24回内藤コンファレンス(2009年6月25日)シャトレレーゼ ガトーキングダム サッポロ、北海道

[その他]

ホームページ等
<http://www-karc.nict.go.jp/w131103/CellMagic/index.html>

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 バイオ ICT グループ・専攻研究員
研究者番号：20370132

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：