

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890103

研究課題名（和文）

c-myc による心筋細胞特異的遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文）

Identification of cardiomyocyte-specific transcriptional mechanism of c-myc

研究代表者

塚本 蔵 (TSUKAMOTO OSAMU)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：80589151

研究成果の概要（和文）：癌遺伝子でもある転写因子 c-myc が心筋細胞において特異的な遺伝子発現制御を示すことから、心筋細胞特異的な c-myc の転写制御機構の解明を目的とした。当初、クロスリンク反応を応用して転写複合体を化学的に安定化させ、構成する転写制御因子や転写共役因子群を網羅的に同定することを試みたが再現性に乏しかった。しかし、それに代わる転写複合体を比較的安定化したまま精製する方法を確立した。c-myc にて心筋細胞特異的に抑制された遺伝子の候補プロモーター領域の DNA を bait にして、この DNA に特異的に結合する転写複合体を超高感度 LC/MS で解析・同定する方法を確立できた。

研究成果の概要（英文）：We found that the expression of one gene is down-regulated in cardiomyocytes while up-regulated in HUVEC or smooth muscle cells by c-myc. To clarify this cardiomyocyte-specific transcriptional mechanism by c-myc, we developed the nuclear extraction method that can obtain structurally-intact transcription complexes binding with high-affinity to their specific DNA sequences. Next, we narrowed the range of putative binding site of c-myc transcription complexes in promoter region of the gene by using both comparative genomics approach and transactivation assay. We performed DNA affinity chromatography using oligonucleotides containing the binding site of c-myc transcription complex as bait and nuclear extracts from cardiomyocytes or HUVEC. Using a high-sensitive LC-MS/MS technology, we identified cardiomyocyte-specific components in c-myc transcription complexes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2012 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

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：c-myc, 転写複合体, 心筋細胞特異的遺伝子発現制御, クロスリンク反応

1. 研究開始当初の背景

重症末期心不全に対する根本的治療方法は、心臓移植しかないのが現状であるが、心

臓移植に代わり得る重症心不全に対する根治療法として心筋再生療法があり、iPS 細胞

(人工多能性幹細胞：induced pluripotent stem cells) は再生医療や病態解明への応用が期待されている。分化した細胞に特定の遺伝子群である four factors (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc) を導入することで、iPS 細胞を作成できるが、中でもとりわけ特異な役割を担うのが c-myc である。iPS 化に際し、c-myc はまず単独で分化した細胞に特異的に発現している遺伝子群の発現を抑制し、次いで他の 3 つの因子の一部と複合体を形成して、iPS 細胞の代謝調節を行う遺伝子群の発現を促進、維持することで細胞のリプログラミングに寄与する。心臓での c-myc の発現は、発生初期から増加し、胎生 13 日目でピークとなり、生後 14 日までにはほぼ消失するが、心臓に圧負荷など何らかの負荷がかかると一過性に再発現することが知られている。心不全において心筋細胞遺伝子発現プロファイルが大きく変化していることは多くの報告があるが、この不全心筋細胞における遺伝子発現制御機構の変化の初期段階に c-myc が何らかの役割を担っていることが示唆される。

一方、心筋細胞の非分裂性・非癌化という特徴からも、癌遺伝子でありかつ four factors の 1 つでもある c-myc の心筋細胞における転写誘導反応は興味深い。実際、c-myc による心筋細胞における転写誘導反応を他の細胞（内皮細胞）と比較検討したところ、ある遺伝子 X が心筋細胞においてのみ、特異的にその転写が抑制されることが明らかになった。そこで心筋細胞特異的な c-myc の転写制御機構の解明を目的とする本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

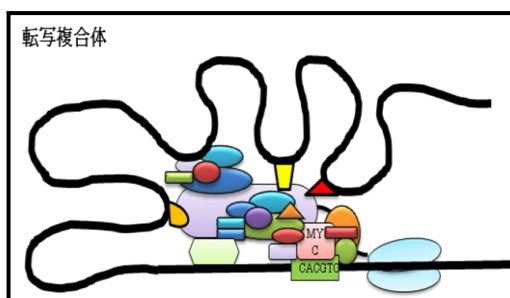
癌遺伝子 c-myc の心筋細胞における特異的な遺伝子発現制御機構を解析し、心臓組織の機能維持・増殖制御の分子メカニズムを明らかにすることにより、心不全の病態解明・新たな治療法の確立を目指す。かかる目的のため、心筋細胞特異的な発現誘導反応を示す遺伝子を同定し、*in vivo* においてその転写複合体を構成する転写制御因子や転写共役因子群を、独自の方法で網羅的に同定する。

3. 研究の方法

(1) 転写複合体を構成する転写調節蛋白質群を網羅的に同定する独自の方法の開発

真核生物の遺伝子発現（転写）は、基本転写因子群、転写制御因子、および転写共役因子群（コアクチベーター、コリプレッサー、メディエーター）により制御され、プロモーターから遠く離れた DNA に結合して転写を調節でき、遺伝子発現を調節する DNA 配列は広い範囲に散在しており、複雑な転写複合体を形成し、これら全ての蛋白質の作用を総合して遺伝子の発現レベルが決定される(図)。

本研究では、臓器特に心臓独自の転写制御を担う複合体を生化学的に安定させ、*in vivo*



の状態のまま抽出、その構成単位となる蛋白質を同定する新たな手法の開発を目指す。培養細胞に FLAG タグ付き c-myc 蛋白質をアデノウイルスで発現させ、c-myc の標的遺伝子の

プロモーター上に転写複合体を形成させる。次に膜透過性架橋剤であるホルムアルデヒドにて *in vivo* クロスリンク反応を行い、細胞を壊すことなく、より生理的な条件下で DNA 上の転写複合体を固定する。これにより相互作用の不安定な因子も捉える事が可能となる。その後、細胞核分画を回収し、超音波破碎にてクロマチン分画を可溶化したサンプルを用いる。可溶化したクロマチン分画に FLAG ビーズを加え、免疫沈降法により c-myc を含む転写複合体を回収する。複合体のビーズからの溶出には回収率を増加するため 1%SDS を含む溶出バッファーを用いる。この溶出液を SDS 除去カートリッジにかけ、SDS を除去した後、フェニル基を用いた逆相高圧液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) にて複合体を精製する。さらに精製した複合体にリバースクロスリンク反応を行った後、転写複合体を構成する蛋白質を SDS-PAGE で分離し、質量分析により同定する。

(2) 心筋特異的 c-myc 転写制御因子の精製・同定

c-myc の転写共役因子には、メディエーター複合体、P-TEBb、ATPase TIP48、TIP49、CBP/p300、GCN5、TIP60、TRAP adaptor protein、p400 histone-exchange protein などが知られているが、いずれも心筋細胞に特異的なものでなく、c-myc による心筋細胞特異的転写反応を説明できない。そこで独自に開発した方法を用いて、従来の方法では同定できなかった心筋細胞特異的な c-myc による心筋細胞特異的転写誘導反応に関与する転写調節因子を同定する。心筋細胞と内皮細胞 (あるい

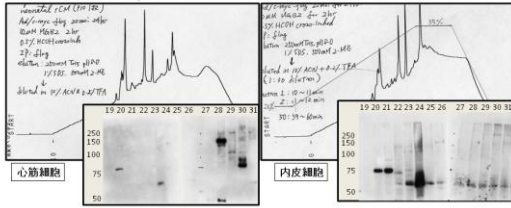
は平滑筋細胞) とを比較をすることで、心筋細胞に特異的な転写調節蛋白質が見つかる可能性がある。そこで、新生仔ラット培養心筋細胞およびラット内皮細胞 (あるいは平滑筋細胞) にアデノウイルスを用いて c-myc を発現させ、上述の方法を用いて、心筋細胞特異的な転写複合体の構成分子を検索・同定する。

4. 研究成果

(1) 転写複合体を構成する転写調節蛋白質群の網羅的同定方法の確立

前述のように、心筋細胞と内皮細胞 (HUVEC) にアデノウイルスを用いて FLAG タグ付 c-myc 蛋白質を発現させ、ホルムアルデヒドにて *in vivo* クロスリンク反応を行い、この転写複合体を生化学的に安定化させた後、細胞核分画を超音波破碎法しクロマチン分画を可溶化し回収した。免疫沈降法 (FLAG ビーズ) にて転写複合体を回収した後、FLAG peptide あるいは低 pH での elution を試みたが、非特異的吸着のため最終的に SDS でしか elution されなかった。Elution したサンプルを anti-FLAG 抗体で Western blot を行ったところ、高分子量領域にシフトしたバンドを認めたことから、クロスリンクされ安定化した転写複合体が形成されていると考えられた。次にこの SDS で elution したサンプルから逆相高圧液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) の前にタンデムに SDS removal cartridge を繋げたシステムを用いて転写複合体の精製を試みた。

図4: 免疫沈降法後、c-mycを含む転写複合体をRP-HPLCで分離



上図のようにレーン 28 と 30 にて、心筋細胞においてのみ認められる複合体を認めたが、結果の再現性に乏しく、目的とする転写複合体の同定は本方法では困難と考えられた。原因として、ホルムアルデヒドの架橋反応は主にリジン残基に起こるため、FLAG タグのエピトープが破壊されたため FLAG タグの特異性が失われたためと考えられた。そこでタグを His タグに変更し、あるいは別の *in vivo* クロスリンク法(photo-reactive amino acids)を用いて同様の検討を行ったが再現性が得られなかった。

次に、クロスリンク反応を行わずに転写複合体を核から溶出する方法を確立することを目指した。核蛋白質の抽出は核分画から高塩濃度 buffer あるいは超音波により溶出する方法が一般的だが、高塩濃度 buffer では affinity が高かつ微量しか存在しない転写因子は抽出困難であり、また超音波では蛋白質複合体の破壊や DNA の混入が起こるため、独自の抽出法を確立することとした。培養心筋細胞から核分画を精製後、数種類の核蛋白抽出溶液を試し、そのうち 1 種類で DNA 混入が無く蛋白質複合体を保ったまま核蛋白質群を抽出することに成功した。次に、c-myc が心筋細胞特異的にその発現を抑制した 1 つの遺伝子 X に着目し、比較ゲノミクス法を用いて、その遺伝子の種を超えて保存されているプロモーター候補領域約 3,000bp を同定し、

クローニングした。その後、これらの候補領域を分割して transcriptional reporter lentivector に組み込み、心筋細胞に発現させ、候補領域をさらに狭めていくことを行った。最終的に数百 bp 程度に絞り込んだプロモーター候補領域を bait として、c-myc を発現させた心筋細胞および内皮細胞の核抽出液を用いて、心筋細胞特異的転写複合体を構成する転写調節因子群を超高感度 LC/MS を用いて同定する方法を確立した。

本研究で確立した方法は、c-myc に限らず心筋細胞において特異的動態を示す他の転写因子群について応用していく予定である。また、2011 年より所属する研究室に次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) が導入された。次世代シーケンサーにより得られる情報を組み合わせることで、心筋細胞における特異的転写制御機構が詳細かつ包括的に解析していく予定である。

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 7 件)

1. Tsukamoto O and Kitakaze M. It is Time to Reconsider the Cardiovascular Protection Afforded by RAAS Blockade – Overview of RAAS Systems. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2012 (in press) (査読あり)
2. Drews O, Tsukamoto O, Liem D, Streicher J, Wang Y, Ping P. Differential regulation of proteasome function in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2010;107:1094-1101. (査読あり)
3. Higo S, Asano Y, Kato H, Yamazaki S,

- Nakano A, Tsukamoto O, Seguchi O, Asai M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Minamino T, Komuro I, Kitakaze M, Takashima S. Isoform-specific intermolecular disulfide bond formation of heterochromatin protein 1 (HP1). *J Biol Chem*. 2010;285:31337-31347. (査読あり)
4. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T. Ablation of C/EBP Homologous Protein Attenuates Endoplasmic Reticulum-Mediated Apoptosis and Cardiac Dysfunction Induced by Pressure Overload. *Circulation*. 2010;122:361-369. (査読あり)
5. Kitakaze M and Tsukamoto O. What is the role of ER stress in the heart? Introduction and series overview. *Circ Res*. 2010;107:15-18. (査読あり)
6. Sawada T, Minamino T, Fu HY, Asai M, Okuda K, Isomura T, Yamazaki S, Asano Y, Okada K, Tsukamoto O, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Kitakaze M, Komuro I. X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:1280-1289. (査読あり)
7. Tsukamoto O, Minamino T, Kitakaze M. Functional alterations of cardiac proteasomes under physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 2010;85:339-346. Review. (査読あり)

あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 蔵 (TSUKAMOTO OSAMU)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：80589151

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし