

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14706

研究課題名（和文）細胞核内アクチンの人為的操作に基づく遺伝子初期化機構の理解と制御技術基盤の創出

研究課題名（英文）Operation of nuclear actin filaments and its application to the analysis of gene reprogramming mechanisms

研究代表者

原田 昌彦（HARATA, MASAHIKO）

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70218642

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、人為的に形成した核内アクチン繊維がクロマチンと相互作用すること、また核内アクチン繊維の形成によって、Wnt/beta-cateninシグナルにも影響を及ぼすことを見出した。Wnt/beta-cateninシグナルは遺伝子初期化や細胞分化にも重要な役割を果たすことが知られているが、本研究において、遺伝子初期化に重要なOCT4遺伝子の発現が核内アクチン繊維によって制御されていることが示された。さらにG-アクチンあるいはF-アクチンに結合するbicyclic peptideをスクリーニングによって得て、これらが細胞核のアクチンフィラメントの人為制御に利用できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we showed that artificial nuclear F-actin associates with chromatin and that nuclear F-actin affects Wnt/beta-catenin signaling, which has important roles on gene reprogramming and cell development. Indeed, the expression of OCT4 is shown to be regulated by nuclear F-actin. By screening a peptide library, we identified bicyclic peptides binding to G- or F-actin. We also showed a possibility that these bicyclic peptides are useful for artificial regulation of nuclear F-actin.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞核 クロマチン 遺伝子発現

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、核内でのクロマチンの空間配置が遺伝子発現の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かった。しかし、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が明らかになってきた。例えば、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ている(図1)(Genes Dev, 2011; Nature Rev Mol Cell Biol, 2011; Science, 2013)。また、細胞分化や老化の過程、また DNA 損傷、がんの発生により、核内のアクチンに変化が観察されることも知られている。しかし、核内に観察されるアクチン繊維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。我々はこれまでに、核内アクチンファミリーによる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、転写やゲノム安定性維持にアクチンファミリーが関与することを明らかにしてきた(Curr Biol, 2008; PLoS Genet, 2011; Mol Cell, 2014)。また、核内アクチン繊維が遺伝子発現制御に関与する可能性を見出している。このような発見によって、核内アクチン繊維の形成・解消を人為的に操作することで、遺伝子発現や遺伝子初期化の制御が可能となることが示唆された。

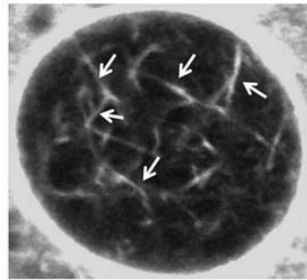


図1、遺伝子初期化に必要な核内アクチンフィラメント (Miyamoto et al., Genes Dev, 2011)

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ている(図1)(Genes Dev, 2011; Nature Rev Mol Cell Biol, 2011; Science, 2013)。また、細胞分化や老化の過程、また DNA 損傷、がんの発生により、核内のアクチンに変化が観察されることも知られている。しかし、核内に観察されるアクチン繊維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。我々はこれまでに、核内アクチンファミリーによる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、転写やゲノム安定性維持にアクチンファミリーが関与することを明らかにしてきた(Curr Biol, 2008; PLoS Genet, 2011; Mol Cell, 2014)。また、核内アクチン繊維が遺伝子発現制御に関与する可能性を見出している。このような発見によって、核内アクチン繊維の形成・解消を人為的に操作することで、遺伝子発現や遺伝子初期化の制御が可能となることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究ではまず、核内のアクチン繊維の形成・解消を人為的に操作する方法を確立を目指した。我々はこれまでに、核移行シグナル(NLS)を付加したアクチンの発現により核内アクチン繊維を人為的に形成させ、また核内のアクチン関連タンパク質 Arp4 が核内アクチンフィラメント形成を阻害することを示している。さらに、細胞内に導入して核内アクチンに結合可能な、低分子二重環状ペプチド(bicyclic peptide; 図2)のスクリーニング手法を確立している。これらの方法を組み合わせることにより、核内アクチンフィラメントによる遺伝子発現制御の可能性について解析した。

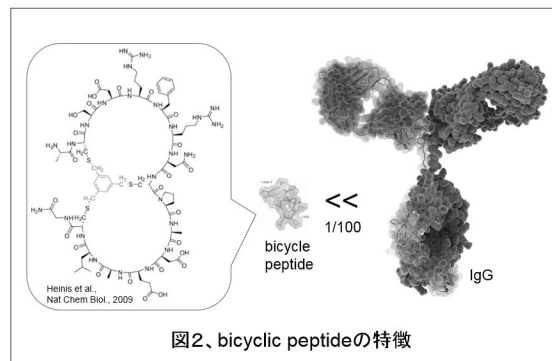


図2、bicyclic peptideの特徴

近年、核構造と遺伝子発現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。核内に一過性のアクチン繊維が形成される現象は、多くの生物で広く観察されているが、遺伝子発現制御におけるその役割については長い間疑問であった。また、核構造による遺伝子発現制御の機構を理解し、それを遺伝子初期化や発生工学に応用利用することは、農学・医学をはじめとする生命科学の広い範囲に大きなインパクトを与える。本研究の成果は、細胞核レベルでのエピジェネティック制御機構の理解とその応用可能性を飛躍的に高めるものと期待される。遺伝子の初期化は、iPS 細胞作製に必要であるほか、農学分野では特に、体細胞からのクローン胚作製において重要である。また、医学分野においては、再生医療に大きく貢献することが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、単量体アクチン(G-アクチン)、および重合アクチン(F-アクチン)に結合する bicyclic peptide をスクリーニング・単離して、研究に用いた。この bicyclic peptide に加え、核内でアクチン繊維を形成可能な核移行シグナル(NLS)付加アクチン(NLS-アクチン)や、核内アクチン繊維形成を阻害する Arp4 を組み合わせて用いることで、核内のアクチン繊維の形成・解消を人為的に操作する方法の確立を試みた。たとえば、アクチンに対する NLS 付加 bicyclic peptide により、NLS-actin による核内アクチン繊維形成・解消の人為的操作を行った。この際、ファロイジン染色、あるいは GFP を付加した NLS-actin を用いて、核内アクチンの繊維形成を顕微鏡下で観察した。また、核内アクチン繊維による遺伝子発現制御や遺伝子初期化の機構を明らかにすることを試みた。連携研究者の近畿大・三谷匡と海外共同研究者の Christian Heinis を加えた研究体制を組織した。

4. 研究成果

まず、核内のアクチン繊維を人為的に操作する方法の確立を目指した。その結果、変異型アクチンを利用することにより、異なった程度の核内アクチン繊維を人為的に形成することに成功した。さらに、この実験系を用いて、核内アクチン繊維が、遺伝子発現やシグナル伝達に及ぼす影響について解析を行った。その結果、核内のアクチン繊維がクロマチンと相互作用すること、また核内アクチン繊維の形成によって、Wnt/beta-catenin シグナル伝達にも影響を及ぼすことが見出された。Wnt/beta-catenin シグナルは、遺伝子初期化や細胞分化にも重要な役割を果たすことが知られている。本研究においても、遺伝子初期化に重要な OCT4 遺伝子の発現が核内アクチン繊維によって制御されていることを示すデータが得られた。本研究の結果は、遺伝子初期化機構の新しいメカニズムの解明につながると共に、その操作についても新しい知見を与えるものである。

さらに、G-アクチンあるいはF-アクチンに結合して、核内のアクチンフィラメント形成を制御できる可能性のある bicyclic peptide をスクリーニングしたところ、多くの候補配列を得ることができた。これらの候補については現在も順次解析を行なっているが、少なくとも複数の bicyclic peptide が、細胞核のアクチンフィラメントの形成や機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、細胞核内にアクチンフィラメントが遺伝子発現に与える影響を解析したところ、Wnt シグナルの co-factor である beta-catenin の細胞内局在性やクロマチン結合において、核内アクチンフィラメントが大きな影響を与えることが示された。さらに、核内のアクチンフィラメントとクロマチンの相互作用をクロマチン免疫沈降法によって明らかにすることができた。現在、得られた bicyclic peptide を細胞に導入することで、同様の解析を進めている。

また、目的タンパク質に高親和結合する二重環状ペプチド(bicyclic peptide)に注目し、核内アクチン繊維の形成を調節することで、エピジェネティクスを人為的に制御することを目指した。目的タンパク質に高親和結合する二重環状ペプチド(bicyclic peptide)に注目し、G-actin および F-actin に特異的に結合するペプチドのスクリーニングを行った。その結果、性質の異なる複数の二重環状ペプチドを得ることができた。これらの二重環状ペプチドの結合特性を in vitro の実験系で検証すると共に、これらを生細胞内に導入することでアクチン機能への影響を解析した。その結果、これらの二重環状ペプチドのうちいくつかは、細胞質および細胞核においてアクチン機能を阻害することが示された。この結果は、二重環状ペプチドを用

いて、細胞内および細胞核内のアクチン機能を制御できる可能性を示すものであり、今後さらにこの二重環状ペプチドによるエピジェネティクスの人為制御に向けた解析を続ける予定である。

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 11 件)

Takahashi Y, Murakami H, Akiyama Y, Katoh Y, Oma Y, Nishijima H, Shibahara KI, Igarashi K, Harata M., Actin Family Proteins in the Human INO80 Chromatin Remodeling Complex Exhibit Functional Roles in the Induction of Heme Oxygenase-1 with Hemin. *Front Genet.* 8:17 (2017) doi: 10.3389/fgene.2017.00017

Yamazaki S, Yamamoto K, de Lanerolle P, 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). doi: 10.1007/s00418-016-1416-9

Kusakabe M, Oku H, Matsuda R, Hori T, Muto A, Igarashi K, Fukagawa T, Harata M., Genetic complementation analysis showed distinct contributions of the N-terminal tail of H2A.Z to epigenetic regulations., *Genes Cells.* 21(2):122-135 (2016) doi: 10.1111/gtc.12327

[学会発表](計 58 件)

原田昌彦「エピジェネティクスによる生命機能制御:基本メカニズムから人為的操作の可能性まで」日本農芸化学会 2018 年度京都大会、2017 年 03 月 18 日、京都女子大学(京都府・京都市)

Masahiko Harata. “Actin-histone cross talk in chromatin and nuclear organization”, Japan-Swiss Symposium Chromatin Structure and Dynamics, 2017 年 1 月 20 日、Basel (Switzerland)

Masahiko Harata. “Modulating gene functions for immunity and susceptibility to diseases: Towards epigenetic control of innate immunity.” Lorentz Center Workshop “Innate Immunity of Crops, Livestock and Fish: The Dawn of Agricultural Immunology”, 2016 年 9 月 19 日、Leiden (The Netherlands)

日下部将之、堀越直樹、佐藤浩一、松田涼、奥裕之、堀哲也、深川竜郎、木村宏、胡桃坂仁志、原田昌彦「遺伝学的相補を用いたヒストンバリエント H2A.Z および変異体の機能解析」第 3 回 ヒストンバリエント研究

会、2016年02月28日、早稲田大学先端生命
医科学センター（東京都新宿区）

Masahiko Harata, “Roles of actin family
proteins in chromatin and nuclear organization.”,
24th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell
Nucleus + 57th Symposium of the Society for
Histochemistry, 2015年08月18日, Vienna
(Austria)

〔図書〕(計1件)

宇理須 恒雄、佐久間 哲史、高田 望、竹中 繁
織、小澤 岳昌、吉村 英哲、胡桃坂 仁志、
越阪部 晃永、原田 昌彦、束田 裕一、宮成 悠
介、塩見 美喜子、大西 遼、近代科学社、ナ
ノバイオ・メディシン：細胞核内反応とゲノ
ム編集、2017年、61-72ページ

〔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〕

ホームページ等

<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：10322265

(4) 研究協力者

Christian Heinis
École Polytechnique Fédérale de Lausanne,
Switzerland