

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16084205

研究課題名（和文） 核内ドメインの局在・動態制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of nuclear domain localization and dynamics

研究代表者

田代 聡 (TASHIRO SATOSHI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：20243610

研究成果の概要：

DNA 代謝制御に関わる核内ドメインの局在と動態の制御機構の解明に取り組んだ。その結果、転写因子 Bach2 が形成する核内ドメインの動態制御には蛋白質翻訳後修飾 SUMO 化修飾が重要であること、ヒストン H2AX のゲノム損傷依存的なアセチル化がゲノム修復関連核内ドメイン RAD51 フォーカスの形成制御に係わっていることが明らかになった。これらの研究から得られた知見から、核内ドメイン形成制御機構の一端が明らかになり、今後様々な疾患の新しい診断法、治療法の開発に結びつくことが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	15,600,000	0	15,600,000
2005 年度	11,700,000	0	11,700,000
2006 年度	11,700,000	0	11,700,000
2007 年度	11,700,000	0	11,700,000
2008 年度	11,700,000	0	11,700,000
総計	62,400,000	0	62,400,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：細胞核, バイオイメーjing, 核内ドメイン

1. 研究開始当初の背景

顕微鏡、タンパク質局在解析技術の進歩により、核内に存在する機能性タンパク質は、高次構造体「核内ドメイン」を形成することが明らかになってきた。核内ドメインには、様々な機能を持つタンパク質が局在するが、核内ドメインが形成されるメカニズムや、核内ドメインが形成されることの生物学意義については不明な点が多い。一部の核内ドメインは「速い動き」や「融合」することなどが報告され、機能的蛋白質が形成する核内ドメインがダイナミックな構造体であるこ

とが明らかになりつつある。一方、核内ドメインが形成される「足場」としては、「核マトリックス」、「クロマチン間領域」などが提唱されているが、その本態は不明である。本研究では「核マトリックス」や「クロマチン間領域」などの概念を統合した新しい核内ドメインの機能的「足場」モデルの構築を目指す研究と位置づけられる。

2. 研究の目的

本研究では、光学顕微鏡レベルでのバイオイ

メージングを用いて核内ドメインの局在・動態を制御する機構と核機能の関連を検討し、核内ドメインによる核機能統合システムの解明を目指す。

このために、まず核内ドメインの局在・動態を核機能可視化技術および生細胞実験系を用いて解析するとともに、核内ドメイン構成因子の生化学的解析を行い、核内ドメイン形成の「足場」となる共通因子の同定を行う。ついで、核に伝えられる様々な「情報」による核内ドメインの局在・動態変化、および核内ドメイン構成蛋白質の翻訳後修飾など質的・動的変化と核機能の関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 核内ドメインの局在・動態データベースの構築

複数の核内ドメイン形成蛋白質の局在を効率的に解析するため、マルチカラー-FISH法を応用したマルチカラー免疫蛍光抗体法を確立する。ついで核機能可視化技術を用いて個々の核機能と核内ドメイン局在の関連を網羅的に解析することにより、核機能との関連を含めた新しい核内ドメイン局在・動態データベースを構築する。特に転写制御に関連する核内ドメインに関しては、特定の染色体DNAの局在および遺伝子発現との関連をマルチカラー-FISH法およびRNA-FISH法を併用して検討する。PMLボディなど代表的な核内ドメインに局在する蛋白質に関しては、蛍光蛋白質との融合蛋白質発現ベクターを構築し生細胞実験系による動態解析を行う。マルチカラー免疫蛍光抗体法を用いた実験等の効率化を図るため、画像解析装置（蛍光顕微鏡）を初年度に導入する。

(2) 核内ドメイン形成の「足場」の同定

核内ドメイン局在・動態データベースをもとに、核内ドメイン形成の「足場」となりえる構造蛋白質の探索と同定を行う。一方、RAD51が形成するフィラメント状構造体に代表的な核内ドメインPMLボディが形成されることに着目し、この構造体に含まれる蛋白質の生化学的解析を行い、フィラメント形成に関連する蛋白質を同定する。さらに、これらの蛋白質の生化学的解析を行い「クロマチン間ドメイン」および「核マトリックス」との関連を検証することにより、核内ドメインを中心とした新しいモデルの構築を行う。

(3) 「情報」応答システムとしての核内ドメイン動態制御機構の解析

細胞増殖・分化刺激、DNA損傷（紫外線マイクロ照射法、放射線照射など）・酸化ストレス誘導など核に伝えられる種々の「情報」に対する核内ドメインレベルでの応答機構について、核内ドメインの局在・動態変化および核内ドメイン内での蛋白質の動態を免疫蛍光

抗体法、生細胞実験系を用いて検討する。さらに、これらの「情報」による蛋白質のリン酸化、SUMO化、ユビキチン化など翻訳後修飾と核内ドメイン局在・動態の関連を解析することにより、「情報」に対する核内ドメインレベルでの応答と「足場」の関連を検討し、核内ドメインによる核機能統合機構を明らかにする。

(4) 本研究で開発した画像解析技術の応用

本研究で開発するマルチカラー免疫蛍光抗体法やタンパク質翻訳後修飾解析法などを応用して、核内ドメインを形成しないタンパク質についても動態・局在解析を行い、その生物学的機能の検討を行う。

4. 研究成果

本研究では、細胞核高次構造、特に非クロマチン核内ドメインがDNA代謝の制御にどのように関与しているかを明らかにするために、主に転写、修復に関連する核内ドメインの局在、動態制御機構について検討を行ってきた。

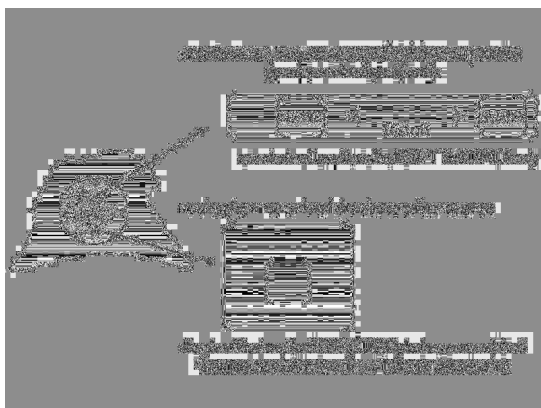
転写と核内ドメインの関連では、転写因子Bach2が形成する転写抑制性核内ドメインBach2フォーカスに着目し、研究を進めた。その結果、転写抑制に関わるタンパク質がBach2フォーカス形成に関与していることが明らかになった。さらに生細胞実験系を用いたBach2フォーカスの動態解析から、Bach2フォーカスは酸化ストレスに応答する動的構造体であり、Bach2フォーカスの「動き」を制限する核内構造の存在が示唆され、またその動態制御にはBach2のSUMO化修飾が重要であることを明らかにした(図)。さらに、Bach2遺伝子自体の発現調節機構の解析から、核内の転写抑制区画であるセントロメアヘテロクロマチン領域がBach2遺伝子発現調節に関わっていることがあきらかになった。

DNA修復では、ゲノム損傷に応答して修復関連蛋白質が核内ドメインを形成することが知られている。そこで、修復関連核内ドメインの形成に関わると考えられるゲノム損傷部位のクロマチン構造変換の解析を行った。その結果、ヒストンH2AXの損傷依存的なアセチル化、ユビキチン化により損傷クロマチンからH2AXが放出されることが、組換え修復機構で中心的役割を果たすRAD51の損傷部位での核内ドメイン形成に係わっていることを明らかにした。我々は、最近RAD51フォーカスの局在・動態の制御に係わる新たな蛋白質翻訳後修飾を見出し、現在論文投稿中である。さらに、この蛋白質修飾とRAD51核内ドメイン形成の「足場」構造の関連についての解析を進めている。このような研究から得られる核内ドメインの局

在・動態およびその制御機構についての知見は、様々な疾患の新しい診断法、治療法の開発に結びつくことが期待される。

また、本研究を通して開発したマルチカラー免疫蛍光抗体法を用いて、核内ドメインを形成しない蛋白質の局在・機能解析を共同研究として行い、報告した

図；SUMO化修飾による核内ドメイン動態制御機構のモデル



SUMO化修飾を受けたBach2を含む核内ドメインは、核内の特定の部位で制限された動態を示す。一方、非SUMO化Bach2核内ドメインは自由拡散に近い動態を示す。SUMO化修飾を受けた蛋白質が形成する核内ドメインは、核内の特定の構造体中に形成され、その動態が制限されている可能性が示唆される。

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 17 件)

1. Kitayama K, Kamo M, Oma Y, Matsuda R, Uchida T, Ikura T, Tashiro S, Ohyama T, Winsor B, Harata M. The human actin-related protein hArap5: nucleo-cytoplasmic shuttling and involvement in DNA repair. *Exp Cell Res.* 315(2) ; 206-217. 2009. 査読有

2. Kobayashi J, Tauchi H, Chen B, Bruma S, Tashiro S, Matsuura S, Tanimoto K, Chen DJ, Komatsu K. Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochem Biophys Res Commun.* 380:752-757. 2009. 査読有

3. Ishiai M, Kitao H, Smogorzewska A, Tomida J, Kinomura A, Uchida E, Saberi A, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T,

Tashiro S, Elledge SJ, Takata M. FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 15(11) ; 1138-1146. 2008. 査読有

4. Sakoda E, Igarashi K, Sun J, Kurisu K and Tashiro S. Regulation of heme oxygenase-1 by transcription factor Bach1 in the mouse brain. *Neurosci letters.* 440 ; 160-165. 2008. 査読有

5. Nobuzane T, Tashiro S, Kudo Y. Morphologic effects of epithelial ion channels on the mouse uterus: differences between raloxifene analog (LY117018) and estradiol treatments. *Am J Obstet Gynecol.* 194(4) ; 363.e1-6. 2008. 査読有

6. Kono K, Harano Y, Hoshino H, Kobayashi M, Bazzet-Jones D, Muto A, Igarashi K, Tashiro S. The mobility of Bach2 nuclear foci is regulated by SUMO-1 modification. *Exp Cell Res.* 314; 903-913. 2008. 査読有

7. Ikura T*, Tashiro S*, Kakino A, Shima H, Jacob N, Amunugama R, Yoder K, Izumi S, Kuraoka I, Tanaka K, Kimura H, Ikura M, Nishikubo S, Ito T, Muto A, Miyagawa K, Takeda S, Fishel R, Igarashi K, Kamiya K. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol.* 27; 7028-7040. 2007. (*these authors contributed equally) 査読有

8. Hoshino H, Nishino TG, Tashiro S, Miyazaki M, Igarashi K, Horinouchi S and Yoshida M. Corepressor SMRT and class II histone deacetylases promote Bach2 nuclear retention and formation of nuclear foci that are responsible for local transcriptional repression. *J. Biochem.* 141; 719-727. 2007. 査読有

9. Ono A, Kono K, Ikebe D, Muto A, Sun J, Kobayashi M, Ueda K, Melo JV, Igarashi K and Tashiro S. Nuclear positioning of the BACH2 gene in BCR-ABL positive leukemia cells. *Genes, Chromosomes & Cancer.* 46; 67-74. 2007. 査読有

10. Nakano Y, Tashiro S, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takenaka S, Miyoshi M, Ogi H, Sakoda E, Oda N, Suenari K, Tonouchi Y, Okimoto T, Hirai Y, Miura F, Yamaoka K,

Koike T, Chayama K. Non-SCN5A related Brugada syndromes: verification of normal splicing and trafficking of SCN5A without exonic mutations. *Ann Hum Genet.* 71; 8-17. 2007. 査読有

1 1. Ochiai K, Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Noda T, Karasuyama H, Tashiro S, Muto A, Igarashi K. Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. *J. Biol. Chem.* 281; 38226-38234. 2006. 査読有

1 2. Yamasaki C, Tashiro S, Nishito Y, Sueda T, Igarashi K. Dynamic Cytoplasmic Anchoring of the Transcription Factor Bach1 by Intracellular Hyaluronic Acid Binding Protein IHABP. *J Biochem (Tokyo).* 137; 287-96. 2005. 査読有

1 3. Miyazaki M, Kawamoto H, Kato Y, Itoi M, Miyazaki K, Masuda K, Tashiro S, Ishihara H, Igarashi K, Amagai T, Kanno R, Kanno M. Polycomb group gene mel-18 regulates early T progenitor expansion by maintaining the expression of Hes-1, a target of the notch pathway. *J Immunol.* 174; 2507-2516. 2005. 査読有

[学会発表] (計 70 件)

1. Jiying Sun, Yukako Oma, Masahiko Harata, Kazuteru Kono, Hiroki Shima, Aiko Kinomura, Tsuyoshi Ikura, Shuki Mizutani, Roland Kanaar and Satoshi Tashiro: ATM modulates the loading of recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot in therapy-related leukemia. Keystone symposia on molecular and cellular biology. Taos, USA (2009. 2. 28-3. 5)

2. Tashiro S: ATM modulates the loading of recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot in therapy-related leukemia. The 3rd International Open Laboratory Workshop. Chiba (2009. 2. 27)

3. 田代 聡: 放射線誘発核内ドメインのダイナミクス. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸 (2008. 12. 12)

4. Satoshi Tashiro: Dynamics of higher order nuclear architecture upon DNA damage.

The 7th Japan-France Workshop on Radiation Biology. Chiba, (2008. 10. 14-15)

5. Kazuteru Kono, Thomas Cremer, Satoshi Tashiro: DISTRIBUTION OF NON-CHROMATIN NUCLEAR DOMAINS IN INTERCHROMATIN COMPARTMENT. Cold Spring Harbor Laboratory meeting. New York, USA (2008. 9. 18-21)

6. JIYING SUN, Satoshi Tashiro: Mechanism of chromosomal translocation involving the MLL gene. Ataxia-Telangiectasia Workshop. 大津, (2008. 4. 22-26)

7. 田代 聡: ゲノム修復の細胞核ダイナミクス. 「特定領域研究」2 領域合同公開シンポジウム「クロマチンシグナリングの分子機構」. 東京, (2008. 1. 8)

8. Tashiro S: Dynamics of BACH2 nuclear foci regulated by SUMOylation. International Symposium on Functional Organization of the Nucleus. Awaji. (2007. 1. 9)

9. Tashiro S, Ikura T: In vivo analysis of DNA damage response using microirradiation and living cell imaging techniques. 日本分子生物学会 2006 フォーラム. 名古屋. (2006. 12. 8)

1 0. Tashiro S, Joachim W, Cremer T, Suzuki H, Shima H: Dynamics of DNA damage induced nuclear domains after laser-UVA-microirradiation. International Symposium Optical analysis of Biomolecular Machines, Berlin, Germany, (2006. 7. 13-16)

1 1. Tashiro S, Shima H, Suzuki H, Sun J: Dynamics of higher order nuclear architecture upon DNA damage. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, (2006. 6. 23)

1 2. Tashiro, S.: Characterization of Interchromatin Compartment. International Symposium on Ran and Cell Cycle. Awaji, (2005. 10. 2-4)

1 3. Satoshi Tashiro: Dynamic organization of nuclear domains in DNA damage response. The 21st Radiation Biology Center International Symposium on

Chromatin and Epigenetic Memory in Damage Response. Kyoto (2004. 11. 27-29)

14. Satoshi Tashiro, Akihiko Muto, Keiji Tanimoto, Haruka Tsuchiya, Hiroshi Suzuki, Hideto Hoshino, Minoru Yoshida, Joachim Walter, and Kazuhiko Igarashi: Repression of PML nuclear body-associated transcription by oxidative stress-activated Bach2. 46th SYMPOSIUM OF THE SOCIETY FOR HISTOCHEMISTRY. Prague, Czech Republic (2004. 9. 22-25)

〔図書〕 (計 2 件)

1. Tashiro S, Cremer M, Solovei I, Cremer T. Nuclear Architecture: Topology and Function of Chromatin- and Non-Chromatin Nuclear domains. Nuclear Dynamics. (Nagata K, Takeyasu K, ed.), pp197-226, Springer, Tokyo, 2007.

2. 小野 厚、五十嵐和彦、田代聡. 分子標的療法薬 imatinib による慢性骨髄性白血病治療とその問題点. 健康管理と臨床検査. (神部眞之、渡辺清明編) 宇宙堂八木書店, pp247-250, 2005

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/cellbio/Seite/18ECC511-D377-11DA-83B6-000A956E89D4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 聡 (TASHIRO SATOSHI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：20243610

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

(海外) Thomas Cremer
ミュンヘン大学・生物学部 II・教授