

平成 23 年 4 月 18 日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20370074
 研究課題名（和文）
 シグナル依存的に制御される転写仲介因子の研究
 研究課題名（英文）
 Research on transcriptional mediators regulated by signals
 研究代表者
 石井 俊輔（ISHII SHUNSUKE）
 独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・主任研究員
 研究者番号： 00124785

研究成果の概要（和文）：

コリプレッサー Ski の複合体が Smad2/3/4、ヒストンデアセチラーゼ HDAC3、ヒストンアルギニンメチル化酵素 PRMT5 を含むことを見出した。この結果は、Ski 複合体が、Smad2/3/4 を介して、TGF- β や BMP の標的遺伝子上に存在し、その basal レベルを HDAC3 と PRMT5 を介して、低く保っていることを示唆している。また転写アダプター Shn-2 が、T 細胞分化過程において、アポトーシスを抑制することにより、細胞を生存させる役割を持つことが示された。

研究成果の概要（英文）：

We found that the Ski corepressor complex contained Smad2/3/4, histone deacetylase HDAC3, and protein arginine N-methyltransferase PRMT5. This suggests that Ski binds to the TGF- β /BMP target genes to keep their low basal transcription levels via HDAC3 and PRMT5. We also showed that Shn-2 adaptor protein has a role to maintain cellular proliferation via suppressing apoptosis during T cell development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：コリプレッサー、コアクティベーター、アダプター、Ski、Shn-2、ヒストンアセチル化、複合体

1. 研究開始当初の背景

1980 年代後半から多様なエンハンサー結

合因子やサイレンサー結合因子の cDNA クローニングが行われ、さらに 1990 年代前半か

らは、コアプロモーターに結合する基本転写因子の解析によって、転写制御の基本メカニズムを明らかにしようとする研究が精力的に行われた。その結果、エンハンサーやサイレンサーに結合する因子と基本転写因子は直接相互作用せず、両者の間にはブリッジ役の分子が存在することが分かってきた。1990年代半ばから、このブリッジ役を果すコアクティベーターやコリプレッサーなどの転写メディエーターが同定された。コアクティベーターやコリプレッサーは、それぞれヒストンアセチル化酵素および脱アセチル化酵素を構成因子として含む大きな複合体を形成し、ヒストンの修飾を介して、クロマチン構造を変化させることによって、転写を制御する。興味深いことに、最近の研究により、転写メディエーターの機能が特異的シグナルによって制御され得ることが示され、「特異シグナルによる転写メディエーターの機能制御」は大きな研究分野になりつつあった。私達はこの分野に関連する興味深い知見を得ており、これを基に研究を進め、「特異シグナルによる転写メディエーターの機能制御」の分子メカニズムを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

i) Myb などの多様な転写因子の機能を制御する Ski コリプレッサー :

発がん遺伝子産物 Ski はコリプレッサーとして機能し、Mad や Rb のようなリプレッサーによる転写抑制に必須である。また Ski は、c-Myb や Smad のような転写活性化因子に結合し、これらの転写因子による転写活性化を抑制する。しかし、Ski がコリプレッサーとして、転写を抑制する分子メカニズムは良く分かっていなかった。本研究では、Ski がコリプレッサーとして機能するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

ii) BMP シグナル依存的な Shn-2 (Schnurri-2) :

Shn は私達が同定した因子で、2つのメタルフインガー領域を有する約 300-kD の大き

なタンパク質である。動物 Shn ファミリーは Shn-1, 2, 3 の3つのメンバーを有する。私達はノックアウトマウスを解析し、Shn-2 が脂肪細胞の分化に重要な役割を果たすことを見出した。また、私達は以前に Shn-2 ノックアウトマウスでは、胸腺での T 細胞の分化、特にポジティブセレクションに異常があることを報告した。この現象を解析し、Shn-2 が T 細胞受容体からのシグナル依存的なコアクティベーターとして機能するかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

FLAG と HA タグを付けた Ski や Shn-2 を発現する HeLa 細胞株や Jurkat 細胞株を作製し、大量培養後、核抽出液から、抗 FLAG と抗 HA 抗体、およびグリセロール密度勾配遠心によって、Ski や Shn-2 を含む複合体を精製し、その構成因子を質量分析によって解析した。同定された因子と Ski や Shn-2 との相互作用を免疫共沈実験などで解析した。また同定された因子の発現ベクターやノックダウンのための siRNA を用いて、転写制御能への影響を解析した。

4. 研究成果

i) Myb などの多様な転写因子の機能を制御する Ski コリプレッサー :

Ski 複合体を精製し、Smad2/3/4 と共にヒストンデアセチラーゼ HDAC3 とヒストンアルギニンメチル化酵素 PRMT5 が構成因子として同定された。この結果は、Ski 複合体が、Smad2/3/4 を介して、TGF- β や BMP の標的遺伝子上に存在することを示唆している。そして ChIP アッセイの結果、TGF- β の標的遺伝子上には、Ski 複合体が存在することが確認された。さらに、HDAC3 と PRMT5 のレベルを siRNA を用いて低下させると、TGF- β の標的遺伝子の basal レベル (TGF- β 非存在下の発現レベル) が顕著に上昇することが分かった。これらの結果は、Ski 複合体が TGF- β の標的遺伝子の basal レベルを低く保つために、2つのヒストン修飾酵素、HDAC3 と PRMT5 を介して、

機能していることを示唆している。また、Sno 複合体も精製し、Smad2/4 と TIF1 γ が含まれることを見出した。TIF1 γ は、ヘテロクロマチン依存的な転写抑制状態の維持に関与することが示唆されているので、これらの結果は、Sno が Ski とは異なるメカニズムで転写の抑制状態の維持に関与することを示唆している。

ii) BMP シグナル依存的な Shn-2 (Schnurri-2) :

Shn-2 複合体を精製し、その構成因子の生化学的解析を行い、OGT (O-GlcNAc transferase) を同定した。PPAR γ 2 遺伝子は脂肪細胞分化に重要な役割を果たすが、脂肪細胞分化の際に幾つかの転写因子も O-GlcNAc による修飾を受けることが知られている。Shn-2 が OGT により O-GlcNAc 化される可能性を解析した結果、Shn-2 は幾つかのサイトで直接 O-GlcNAc 化されることが示された。OGT 活性は細胞内の代謝と密接に関連することが示唆されているので、この結果は Shn-2 活性と糖代謝系の関連を示唆するものとして興味深い。一方、Shn-2 がどのようなメカニズムで T 細胞の分化、特に Positive selection に関与するかを解析した。DP (Double-positive) T 細胞が SP (Single-positive) T 細胞に分化する際には、細胞増殖とアポトーシスのバランスが重要であるが、Shn-2 はアポトーシスを抑制することにより、細胞を生存させる役割を持つことが示唆された。

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 20 件)

1. Staton TL, Lazarevic V, Jones DC, Lanser AJ, Takagi T, Ishii S & Glimcher LH (2011) Dampening of death pathways by Schnurri-2 is essential for T cell development. *Nature* 472, 105-109. 査読有り
2. Nagao M, Saita Y, Hanyu R, Hemmi H, Notomi T, Hayata T, Nakamoto T, Kaneko K, Kurosawa H, Ishii S, Ezura Y & Noda M (2011). Schnurri-2 deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy. *J Cell Physiol.* 226, 573-578. 査読有り
3. Hou X, Omi M, Harada H, Ishii S, Takahashi Y & Nakamura H (2011). Conditional knockdown of target gene expression by tetracycline regulated transcription of double strand RNA. *Dev Growth Differ.* 53, 69-75. 査読有り
4. Maekawa T, Kim S, Nakai D, Makino C, Takagi T, Ogura H, Yamada K, Chatton B & Ishii S (2010) Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. *EMBO J.* 29, 196-208. 査読有り
5. Maekawa T, Jin W & Ishii S (2010). The role of ATF-2 family transcription factors in adipocyte differentiation: anti-obesity effects of p38 inhibitors. *Mol. Cell. Biol.* 30, 613-625. 査読有り
6. Egoh A, Kaneshashi S, Kanei-Ishii C, Nomura T & Ishii S (2010). Ribosomal protein L4 positively regulates activity of a *c-myc* proto-oncogene product. *Genes Cells* 15, 829-841. 査読有り
7. Seong KH, Akimaru H, Dai P, Nomura T, Okada M & Ishii S (2010). Inhibition of the nuclear import of cubitus interruptus by roadkill in the presence of strong hedgehog signal. *PLOS One* 5, e15365, 1-12. 査読有り
8. Jones DC, Schweitzer MN, Wein M, Sigrist K, Takagi T, Ishii S & Glimcher LH (2010). Uncoupling of growth plate maturation and bone formation in mice lacking both Schnurri-2 and Schnurri-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 8254-8258. 査読有り
9. Tabata T, Kokura K, Ten Dijke P & Ishii S

- (2009). Ski co-repressor complexes maintain the basal repressed state of the TGF-beta target gene, SMAD7, via HDAC3 and PRMT5. *Genes Cells* 14, 17-28. 査読有り
10. Hirose N, Maekawa T, Shinagawa T & Ishii S (2009). ATF-2 regulates lipopolysaccharide-induced transcription in macrophage cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 72-77. 査読有り
 11. Chen D, Lin Q, Box N, Roop D, Ishii S, Matsuzaki K, Fan T, Hornyak TJ, Reed JA, Stavnezer E, Timchenko NA & Medrano EE (2009). SKI knockdown inhibits human melanoma tumor growth in vivo. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22, 761-772. 査読有り
 12. Pattabiraman DR, Sun J, Dowhan DH, Ishii S & Gonda TJ (2009). Mutations in multiple domains of c-Myb disrupt interaction with CBP/p300 and abrogate myeloid transforming ability. *Mol Cancer Res.* 7, 1477-1486. 査読有り
 13. Ito H, Yoshimura N, Kurosawa M, Ishii S, Nukina N, Okazawa H. (2009). Knock-down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse. *Hum Mol Genet.* 18, 4239-4254. 査読有り
 14. Yamauchi T, Ishidao T, Nomura T, Shinagawa T, Tanaka Y, Yonemura S & Ishii S (2008). A B-Myb complex containing clathrin and filamin is required for mitotic spindle function. *EMBO J.* 27, 1852-1862. 査読有り
 15. Maekawa T, Sano Y, Shinagawa T, Sakuma T, Nomura S, Licht JD, & Ishii S (2008). ATF-2 controls transcription of Masp1 and GADD45 genes independently from p53 to suppress mammary tumors. *Oncogene* 27, 1045-1054. 査読有り
 16. Shimizu H, Shimoda M, Yamaguchi T, Seong KH & Ishii S (2008). ATF-2 regulates sleep and locomotor activity in pacemaker neurons. *Mol. Cell Biol.* 28, 6278-6289. 査読有り
 17. Kanei-Ishii C, Nomura T, Takagi T, Watanabe N, Nakayama KI & Ishii S (2008). Fbxw7 acts as an E3 ubiquitin ligase that targets c-Myb for nemo-like kinase (NLK)-induced degradation. *J. Biol. Chem.* 283, 30540-30548. 査読有り
 18. Yamauchi T, Keough RA, Gonda TJ & Ishii S (2008). Ribosomal stress induces processing of Mybbp1a and its translocation from the nucleolus to the nucleoplasm. *Genes Cells* 13, 27-39. 査読有り
 19. Shimada N, Shinagawa T & Ishii S (2008). Modulation of M2-type pyruvate kinase activity by the cytoplasmic PML tumor suppressor protein. *Genes Cells* 13, 245-254. 査読有り
 20. Kojima M, Suzuki T, Maekawa T, Ishii S, Sumi-Ichinose C, Nomura T & Ichinose H (2008). Increased expression of tyrosine hydroxylase and anomalous neurites in catecholaminergic neurons of ATF-2 null mice. *J. Neurosci. Res.* 86, 544-552. 査読有り
- [学会発表] (計26件)
1. ATF-2 ファミリー転写因子を介したストレス依存的なエピジェネティック制御。石井俊輔、成耆鉉, 志水英之, 季棟, 前川利男。第33回日本分子生物学会年会、神戸、12月14日(2010)
 2. ATF-7依存的なヒストンH3メチル化を介したストレスによる転写制御。前川利男、中井大助、金昇準、吉田圭介、小倉博雄、山田一之、石井俊輔。第33回日本分子生物学会年会、神戸、12月14日(2010)
 3. Analysis of relationship between TRIM27 and USP7 through ubiquitination and deubiquitination.

- 野村照明、Zaman Md Mahabub-Uz、石井俊輔。第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 14 日 (2010)
4. Positive selectionに必要な転写因子 Schnurr-2 の chip on chip法を用いた解析。高木豪、石井俊輔。第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 14 日 (2010)
 5. A possible involvement of Drosophila ATF-2 in epigenetic regulation of innate immune response。中邑亮一、成耆鉉、李棟、石井俊輔。第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 14 日 (2010)
 6. ATF-2 ファミリー転写因子とエピジェネティック制御。石井俊輔。阪大蛋白研セミナー「ゲノム機能の記憶の成立機序とその制御」。東京、11 月 20 日 (2010)
 7. Inheritance of stress-induced epigenetic change。石井俊輔。第 15 回分生研シンポジウム「エピゲノム研究の最先端」。東京、11 月 12 日 (2010)
 8. Epigenetic regulation by ATF-2 family of transcription factors in response to various stresses。 Shunsuke Ishii. Symposium on “Epigenetic inheritance and genome reprogramming”, The 62nd Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology. Osaka, Japan, May 11 (2010)
 9. TRIM27 タンパク質複合体の精製と解析。野村照明、石井俊輔。第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 15 日 (2009)
 10. ショウジョウバエATF-2 はストレス依存的なエピジェネティック変化の遺伝に関与する。成耆鉉、志水英之、野村照明、石井俊輔。第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 15 日 (2009)
 11. マウスDP細胞からのSchnurri-2 複合体の精製と解析。高木豪、石井俊輔。第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 15 日 (2009)
 12. リボソームタンパク質L4 によるc-Myb 活性の制御。江郷彩子、野村照明、金刺進之介、石井知恵、石井俊輔。第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 15 日 (2009)
 13. ATF-7 依存的なヒストン H3 メチル化を介したストレスによる転写制御。前川利男、金昇準、小倉博雄、山田一之、中井大助、石井俊輔。第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 15 日 (2009)
 14. PQBP1 ノックダウンマウスにおける認知記憶機能の低下。伊藤日加瑠、吉村奈津江、黒澤大、石井俊輔、貫名信行、岡澤均。第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 15 日 (2009)
 15. Epigenetic regulation by ATF-2 family of transcription factors in response to various stresses。 Shunsuke Ishii, Ki-Hyeon Seong, Toshio Maekawa, Hideyuki Shimizu, Seungjoon Kim, Daisuke Nakai. The 4th International Workshop on Cell Regulation in Division and Arrest. Okinawa, Japan, December 4 (2009)
 16. Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. Toshio Maekawa, Seungjoon Kim, Daisuke Nakai, Chieko Makino, Tsuyoshi Takagi, Hiroo Ogura, Kazuyuki Yamada, Bruno Chatton & Shunsuke Ishii. The 24th Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA [II]. Sapporo, Japan, June 7 (2009)
 17. Drosophila ATF-2 controls the transgenerational inheritance of stress-induced epigenetic change. Ki-Hyeon Seong, Hideyuki Shimizu, Teruaki Nomura, Shunsuke Ishii. The 24th Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA [II]. Sapporo, Japan, June 7 (2009)
 18. Role of ATF-2 in epigenetic regulation。 Shunsuke Ishii, Ki-Hyeon

- Seong, Toshio Maekawa, Hideyuki Shimizu, Seungjoon Kim, Daisuke Nakai. The 24th Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA [II]. Sapporo, Japan, June 6 (2009)
19. TRIM27 結合タンパク質の同定と解析。野村照明、堂元沙織、高木豪、石井俊輔。第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 14 日 (2008)
20. ショウジョウバエRdxは2つのメカニズムによってHhシグナルを抑制する。成耆鉉、野村照明、秋丸裕司、戴平、岡田聖裕、石井俊輔。第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 14 日 (2008)
21. Zn-finger型転写因子Schnurri-2 を含む複合体の精製と解析。高木豪、石井俊輔。第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 (2008)
22. Ski/Sno複合体による転写制御メカニズムの解析。田畑考統、古倉健嗣、石井俊輔。第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 14 日 (2008)
23. リボソームタンパク質L4 によるc-Myb 活性の制御。江郷彩子、野村照明、金刺進之介、石井俊輔。第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 14 日 (2008)
24. ATF-7 依存的なヒストン H3 メチル化を介したストレスによる転写制御。前川利男、金昇準、小倉博雄、中井大助、石井俊輔。第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 14 日 (2008)
25. Regulation of cell cycle by Myb family

transcription factors. Shunsuke Ishii, The 21st Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA [I]. Yamanashi, Japan, June 20 (2008)

26. A B-Myb complex containing clathrin and filamin is required for mitotic spindle function. Shunsuke Ishii, The 3rd International Workshop on Cell Regulation in Division and Arrest Under Stress. Okinawa, Japan, April 10 (2008)

〔産業財産権〕
なし。

〔その他〕

ホームページ：
<http://rtcweb.rtc.riken.jp/lab/mg/mg.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 俊輔 (ISHII SHUNSUKE)

独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・主任研究員
00124785

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。