

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：32675

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21200040

研究課題名（和文）核膜の構造変化による核膜の高次構造とクロマチン機能の相関関係の解明

研究課題名（英文）Investigating the relationship between the conformation of nuclear membrane and the functions of chromatin.

研究代表者

大場 誠介 (OHBA TOMOYUKI)

法政大学・企画戦略本部・特任准教授

研究者番号：80380666

研究成果の概要（和文）：遺伝子のシグナル伝達と転写調節を通して核膜構造とクロマチンの機能の相関関係を明らかにするために、新規の活性操作系を用いた多様な生命現象の制御を可能にする有用な実験系を確立した。これは、エストロゲン受容体との融合タンパク質を活用したもので、この実験系を活用することにより、炎症の調節に関わる重要な転写因子、I κ B- ζ 自身の転写後制御に従来では知られていなかったシグナル伝達系を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to control the activity of signal transduction components, they were expressed as mutated hormone binding domain of human estrogen receptor fusion proteins, whose activity is regulated by the addition of a small synthetic compound, 4-hydroxytamoxifen. These components show that the signaling pathway leading to nuclear factor- κ B activation and the post-transcriptional activation bifurcates at IRAK1, suggesting a new pathway activated by IRAK1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
総計	22,700,000	6,810,000	29,510,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：染色体構造、転写因子、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

核と細胞質を隔てている核膜は、外膜、内膜、核膜孔の三つの構造から成り立っている。核の内膜は核ラミナによって裏打ちされており、核の構造維持に関わっている。クロマチンを含む核は、顕微鏡を用いた三次元解析より、遺伝子発現が活発でないヘテロクロマチ

ン領域、ゲノム上で遺伝子が疎な部位は核の周辺部に位置することが判明した (Croft *et al.*, 1999. *J. Cell Biol.*; Mayer *et al.*, 2005. *BMC Cell Biol.*)。更に核内でのクロマチンの局在を強制的に核の内膜に近接させる解析により、内膜構造に近接したクロマチン領域の遺伝子は、その発現が抑制され、

遺伝子領域が核の内膜から離れることにより発現が回復することが示された。また、B細胞では活発に発現される免疫グロブリンの遺伝子は、NIH3T3細胞内では遺伝子発現がみられないが、免疫グロブリン遺伝子の位置するクロマチン領域が、NIH3T3細胞では内膜に近接しているのに対し、B細胞では内膜から離れていることが明らかになり、強制的ではない系に於いてもクロマチンの核内での局在が転写調節に関わることが判明した (Reddy *et al.*, 2008. *Nature*)。一方酵母を用いた実験系では、発現が不活化した核膜周辺部に局在する遺伝子が、核膜孔の領域に移動することで遺伝子発現が活性化することが明らかになった (Casolari *et al.*, 2004. *Cell*; Taddei *et al.*, 2006. *Nature*)。つまり核内におけるクロマチンの局在は均一ではなく、役割に応じて幾つかの区画に分けられていること、細胞種に応じて変化させることが示唆された。

核膜の内膜に局在するタンパク質、LAP2、Emerin、MAN1 と結合する BAF はクロマチンと結合し、クロマチンと核膜の結合を仲介している (Margalit *et al.*, 2007. *Trends Cell Biol.*)。BAF の変異はクロマチン構造異常、特異的な遺伝子の発現異常、核膜の形成異常、特異的な発生過程の異常といった多様な細胞活動に異常を引き起こす。一方、核ラミンの異常は、核内のクロマチン局在の異常、特異的な遺伝子の発現異常を誘導する (Malhas *et al.*, 2007. *J. Cell Biol.*)。ヒトにおいては、核ラミナタンパク質の異常は早老症 Hutchinson-Gilford progeria syndrome や筋肉の機能疾患 Emery-Dreifuss muscular dystrophy といった疾患を引き起こす (Somech *et al.*, 2005. *Pediatr. Res.*; Worman and Bonne, 2007. *Exp. Cell Res.*)。クロマチンは内膜に繋がれており、繋がれ方の異常は遺伝子発現に影響を与えることが示唆された。

2. 研究の目的

これまで核膜は、細胞内で核と細胞質を隔てているクロマチンの単なる容器物だと考えられてきた。しかしながら、最近の研究により、真核生物における細胞の核膜構造はクロ

マチンの構造を安定的に保持するだけでなく、DNA の複製調節や遺伝子の発現調節に深く関係していることが明らかになりつつある。本研究では、核の周辺部に位置する遺伝子の発現が不活化されているクロマチン領域にノックインマウスを用いることで蛍光マーカーを導入し、生きた細胞に低分子物質を細胞外から加えることで、核膜構造を人工的に大きく変化させる。蛍光マーカーの核内での局在とこのクロマチン領域の遺伝子発現に与える影響を時間経過と共に観察することで、核膜の高次構造とクロマチン機能の相関関係を解明することが可能になる。こうした実験系を活用し、核膜構造が転写調節に関係し、多様な生命現象の制御を可能にする一つの要因であることを明らかにする。

3. 研究の方法

核構造とクロマチン機能の相関関係を解明するために、次の順番に研究を進める。

(1) 染色体上への蛍光マーカーの導入
クロマチンの構造変化を蛍光顕微鏡を用いて観察するために、染色体上に蛍光マーカーを導入する。これには大腸菌の DNA 配列、lac オペレーター配列に lac リプレッサーが特異的に結合することを利用する。この方法においては、大腸菌の DNA 配列、タンパク質を哺乳類の細胞内で用いることで非特異的な結合を除外することができる。哺乳類の細胞の染色体上に lac オペレーター配列を導入し、GFP と lac リプレッサーを融合させたタンパク質を恒常的に発現させる。この GFP-lac リプレッサー融合タンパク質が lac オペレーター配列に結合することで、lac オペレーター配列が導入されたクロマチン領域は蛍光顕微鏡によって観察することが可能になり、これは蛍光マーカーになる。また、細胞にイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を加えることで、IPTG は GFP-lac リプレッサー融合タンパク質と結合し、染色体上から GFP マーカーを除くこともできる。哺乳類の細胞に lac オペレーター配列の導入を行うには、ノックインマウスを用いた方法を用いる。免疫グロブリン Igh-VJ558 遺伝子はマウスの 12 番染色体上に位置し、この領域は核の周辺部に局在し、NIH3T3 細胞では遺

伝子が不活性化されていることが明らかになっている (Reddy *et al.*, 2008. *Nature*)。この遺伝子の機能を損なわない様に polyA シグナルの 3' 側に Lac オペレーターくり返し配列と遺伝子導入マーカーとして Neo 耐性遺伝子を導入する。GFP-lac リプレッサーはレトロウィルスを用いて細胞に導入する。上記の遺伝子を含むターゲットベクターを作製し、ES 細胞への遺伝子の導入を行う。ネオマイシンを用いて ES 細胞の選択を行い、これをマウスの胚に注入してキメラマウスを得る。ES 細胞由来の産仔の取得を経て、ノックインマウスを作製する。ノックインマウスよりマウス胎仔繊維芽細胞を培養し、これを実験系に用いる。

(2) 人工的に核膜の構造変化を誘導する系の確立

これまでに、生きた細胞内での核膜の構造変化を時間経過と共に観察する実験系を構築した。これは低分子物質が誘導するタンパク質-タンパク質結合実験系を利用している。免疫系に関係する FK506 結合タンパク質 (FKBP) は低分子物質 rapamycin と結合し、この複合体に FR 結合タンパク質 (FRB) は結合できる。つまり、rapamycin を加えることで FKBP は FRB と複合体を形成する (Chen *et al.*, 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; Klemm *et al.*, 1997. *Curr. Biol.*)。内膜に局在するタンパク質の膜貫通領域と FRB を合成したキメラタンパク質と、ラミナに局在する LAP2 タンパク質の膜貫通領域を除いた部位と FKBP を合成したキメラタンパク質を構築した。これら二つのタンパク質を細胞内で発現させると、FRB-膜貫通領域キメラタンパク質は内膜に、LAP2-FKBP キメラタンパク質は、ラミナ上に局在する。二つのタンパク質が発現した細胞に rapamycin をアンカーとして加えることが引き金となり、FRB-膜貫通領域キメラタンパク質と LAP2-FKBP キメラタンパク質は結合する。結果、内膜はラミナとアンカーを介して結合する。このことにより核は柔軟性を失い、きれいな球状を形成する。更に FRB を含むキメラタンパク質に蛍光タンパク質 DsRed を融合したタンパク質を発現することで、生きた細胞内で核膜の構造を観察することが可能になる。

従来の実験系では、主に HeLa 細胞が使用されてきた。これをマウス胎仔繊維芽細胞に切り替え、遺伝子導入を行うために、既に作製している融合タンパク質をレトロウィルスベクターに組み込む。

核膜の緊張状態を変動することで、更なる核膜構造の変動を誘導する。

これまで、FRB-膜貫通領域キメラタンパク質は 1 分子あたり 1 ヶ所のアンカー結合領域を有し、LAP2-FKBP キメラタンパク質は 1 分子あたり 3 ヶ所のアンカー結合領域を有したものをを用いた。この条件では、rapamycin を加えた後、約 2 時間で核はきれいな球状になった。LAP2-FKBP キメラタンパク質のアンカー結合領域の数を増やすことにより、1 分子あたりより多くの FRB-膜貫通領域キメラタンパク質と結合することになり、核膜の緊張状態をより早く、より強く誘導することが可能になることが予想される。逆に、アンカー結合領域の数を減らすことで、より穏やかな核膜の緊張状態を誘導することが可能になる。アンカー結合領域の数の検討を行うことで、観察条件の最適化を図る。

(3) 蛍光顕微鏡を用いた核構造変化に伴う核膜とクロマチンの局在解析

遺伝子の導入を行った細胞において、GFP はクロマチンの局在を示し、DsRed は核膜を示す。遺伝子組換えを行ったマウスがヘテロの場合、GFP は核内に一箇所、ホモの場合二箇所存在する。蛍光顕微鏡を用い、Z 軸にそって核を観察することで、rapamycin を加えた後の時間経過に伴う、核内のクロマチンの局在、核膜の構造の変動を、時間進行と空間、4 次元解析を行うことが可能になる。

遺伝子の転写が不活性化されたクロマチン領域は核の周辺部に局在し、遺伝子の転写が活性化された場合は核膜から離れるという報告がされている (Reddy *et al.*, 2008. *Nature*)。一方、遺伝子の転写の活性化は核膜孔上でされているという報告もある (Taddei *et al.*, 2006. *Nature*)。これらの報告より、クロマチンの核膜からの距離を測定することはクロマチンの機能の変動を示す一つの指標になる。

(4) 核膜構造変化が転写活性に与える影響の解析

クロマチンの遺伝子が不活化された領域に lac オペレーター配列と Neo 耐性遺伝子を組み込んでいる。このため、マウス胎仔繊維芽細胞では Neo 耐性遺伝子の発現が不活化、もしくは発現が弱いと予想される。そこで核膜構造に伴うクロマチン機能、転写活性変動の測定には、不活化した状態から活性化に移行する、Neo 耐性遺伝子の mRNA 量の増え方を測定することが最適だと考えられる。新規に転写された mRNA を測定するために細胞は、アクチノマイシン D 処理により一旦転写活性を阻害する。培地交換を行い阻害剤を除いた後、rapamycin を加え反応を開始する。時間経過ごとの細胞を回収し、mRNA 量を RT-PCR 法、もしくはノーザンハイブリダイゼーション法を用いて測定する。

上記の方法は、ほぼ全ての細胞に遺伝子導入を行えた場合には可能だが、遺伝子導入細胞がまばらな場合は難しい。その場合、個々の細胞の新規に転写された Neo 耐性遺伝子の mRNA を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いることで標識する。カバーガラス上に細胞を播種したものを幾つか用意しておき、反応時間経過ごとの細胞を回収し固定する。固定された細胞内の Neo 耐性遺伝子の mRNA に対する蛍光標識されたプローブを用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションを行う。これを蛍光顕微鏡で観察することで、個々の細胞の蛍光強度の測定を行い、細胞数あたり、ある蛍光強度以上に達している細胞数の統計的処理を行う。この結果を転写が活性化されている指標にする。一方、常に転写が活性化している遺伝子として知られている U7 small nuclear RNA を核膜の構造変化に左右されない、転写活性が変動しないコントロールとして用いる (Reddy *et al.*, 2008. *Nature*)。

4. 研究成果

(1) 転写因子 I κ B- ζ は、刺激により活性化された転写因子 NF- κ B の作用により発現され、クロマチンの構造変化を伴って、NF- κ B と共に特定の遺伝子の発現調節を行っている。刺激を起点として、クロマチンの構造変化、核内の遺伝子調節をダイナミックに行う I κ B- ζ は、核膜構造が多様な生命現象の制御を行う

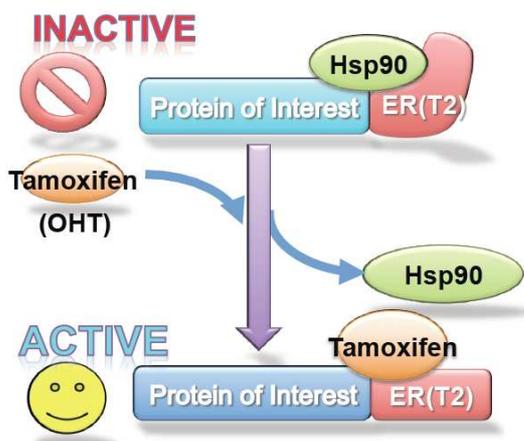
転写因子の有用なモデルの一つだと考えられたことにより、核膜構造変化に伴う I κ B- ζ の活性についての研究を行った。その結果、I κ B- ζ が多様な生命現象に関係することを明らかにした。個体としての表現系としては、I κ B- ζ ノックアウトマウスは皮膚の異常を示す。更に、非リンパ球において I κ B- ζ の欠損が自己免疫応答を引き起こすことを発見した。また個々の細胞レベルとしては、B 細胞抗原受容体刺激においても、転写制御と転写後制御を介した I κ B- ζ の発現誘導が行われていることを明らかにした。また、クロマチンの構造変化を蛍光顕微鏡を用いて観察することを含め、転写制御を視覚的に確認するために、染色体上の I κ B- ζ 遺伝子の下流に蛍光タンパク質ビーナスを組み込んだ。これはノックアウトマウスの技術を用いることで成功した。

(2) シグナル伝達因子 TAB2 は、クロマチンの構造変化に関係することが示唆されていることから、この因子は核膜構造変化と核内の転写調節を動的に行う有用なモデルの一つだと考えられた。TAB2 が核内で I κ B- ζ と相互作用していること、核、細胞質間を移動すること、核内で TAB2 自身の分解が行われていることを示した。このことは、TAB2 が細胞質から核内に輸送されることで分解され、自身の機能制御に関係している事を示唆している。

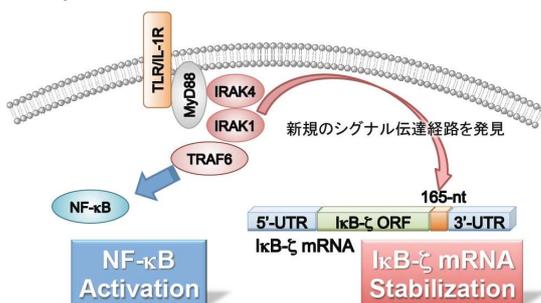
(3) 遺伝子のシグナル伝達と転写調節を通して核膜構造とクロマチンの機能の相関関係を明らかにするために、新規の活性操作系を用いた多様な生命現象の制御を可能にする有用な実験系を確立した。

I κ B- ζ の転写後制御に関わるシグナル経路の詳細は明らかになっていない。TLR4/IL-1 受容体の下流では、MyD88、IRAK4、IRAK1、TRAF6 を介して TAK1 複合体が活性化され、NF- κ B の活性化が誘導される。一方、サイトカイン TNF- α 刺激時には、同様に TAK1 複合体を介して NF- κ B が活性化されるものの、I κ B- ζ の転写後制御は活性化されない。従って、I κ B- ζ の転写後制御に関与するシグナル経路は、TAK1 の上流に存在する MyD88、IRAK4、IRAK1、TRAF6 のいずれかから分岐すると考えられた。そこで I κ B- ζ の転写後制御に関わるシグナル

伝達因子の同定を目的として、estrogen receptor (ER) リガンドの添加による活性の制御が可能である ER 融合タンパク質を活用して、シグナル伝達経路の解析を行った。



その結果、転写因子 $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ 自身の転写後制御に従来では知られていなかった IRAK-1/4 から分岐されるシグナル伝達系路を明らかにした。



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 1 件)

① Tomoyuki Ohba, Yujiro Ariga, Takashi Maruyama, Nha K. Truong, Jun-ichiro Inoue, Tatsushi Muta
FEBS Journal 査読有り 279(2) 2012 211-222

[学会発表] (計 15 件)

① Hanihara F., Ohba T., Muta T.
Induction of $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ by Activations of Transcription and Post-transcriptional Regulation on B Cell Receptor Stimulation.
第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 14 日、横浜 パシフィコ横浜

② Okuma A., Ohba T., Ono M., Muta T.
 $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ -deficiency in Non-lymphoid Cells Spontaneously Induces Autoimmune Reactions.

第 40 回日本免疫学会総会、2011 年 11 月 28 日、千葉 幕張メッセ

③ Okuma A., Ohba T., Muta T.
Roles for Lymphocytes and Non-hematopoietic Cells in the Pathogenesis of Chronic Skin Inflammation in $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ -deficient Mice.
The 11th Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society, 2010 年 10 月 7-9 日、Vancouver, Canada.

④ Hanihara F., Takahashi Y., Ohba T., Muta T.
Stimulus-specific Post-transcriptional Regulation of $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ in Innate and Adaptive Immune Responses.
The 11th annual IEIIS meeting, 2010 年 10 月 7-9 日、Vancouver, Canada.

⑤ Ariga Y., Ohba T., Truong N. K., Muta T.
Identification of the Toll-like receptor signaling components involved in the post-transcriptional regulation of $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$
14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22-27 日、Kobe, Japan, Kobe Convention Center Complex.

⑥ Hanihara F., Takahashi Y., Ohba T., Muta T.
Stimulus-specific post-transcriptional regulation of $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$, an essential regulator on inflammatory responses
14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22-27 日、Kobe, Japan, Kobe Convention Center Complex.

⑦ Kimura T., Watanabe E., Hanihara F., Ohba T., Muta T.
Chemokines induction of macrophages in response to dead cells
14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22-27 日、Kobe, Japan, Kobe Convention Center Complex.

⑧ Okuma A., Ohba T., Ono M., Shibuya S., Aiba S., Muta T.
Analysis on the pathogenesis of chronic skin inflammation that spontaneously develops in $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ gene-deficient mice
14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22-27 日、Kobe, Japan, Kobe Convention Center Complex.

⑨ Ariga Y., Hanihara F., Ohba T., Muta T.

Molecular Dissection of the MyD88-dependent Signaling that Leads to Specific mRNA Stabilization
Keystone Symposia Meeting Innate Immunity: Mechanisms Linking with Adaptive Immunity, 2010年6月7-12日、Dublin, Ireland.

⑩ Okuma A., Ohba T., Muta T.
Chronic Skin Inflammation Developed in Mice Lacking I κ B- ζ , Crucial NF- κ B Regulator
Keystone Symposia Meeting NF- κ B in Inflammation and Disease 2010年1月7日、Santa Fe, USA.

⑪ 埴原文人、高橋優太、大場誠介、牟田達史
Mechanisms for stimulus-specific post-transcriptional regulation that determines induction of I κ B- ζ , an essential regulator for selective gene expression on inflammatory responses
第32回日本分子生物学会年会、2009年12月12日、横浜 パシフィコ横浜

⑫ 大坪茂記、有賀裕二郎、大場誠介、牟田達史
I κ B- ζ 結合タンパク質としてのTAB2の同定とそのI κ B- ζ 依存性転写活性化における関与
第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、横浜 パシフィコ横浜

⑬ 有賀裕二郎、大場誠介、Nha K. Truong、牟田達史
エストロゲン受容体との融合タンパク質を活用した Toll-like Receptor シグナル伝達因子の活性操作系の確立
第32回日本分子生物学会年会、2009年12月10日、横浜 パシフィコ横浜

⑭ 大熊敦史、大場誠介、小野栄夫、渋谷佐和子、相場節也、牟田達史
I κ B- ζ 遺伝子欠損マウスにおける慢性皮膚炎の発症機序の解析
第39回日本免疫学会総会、2009年12月4日、大阪 大阪国際会議場

⑮ 埴原文人、高橋優太、大場誠介、牟田達史
Mechanism for Stimulus-specific Post-transcriptional Regulation of I κ B- ζ , which Controls Selective Gene Expression in Inflammatory Responses
第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸 神戸国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場 誠介 (OHBA TOMOYUKI)

法政大学・企画戦略本部・特任准教授

研究者番号：80380666