

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 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009 年度～2012 年度
 課題番号：21590354
 研究課題名（和文）核内膜構造とクロマチン
 研究課題名（英文）Nuclear architecture and chromatin

研究代表者

福井 由宇子 (FUKUI YUKO)

独立行政法人国立成育医療研究センター・分子内分沁研究部・研究員

研究者番号：50342639

研究成果の概要（和文）：クロマチン構成因子Cbx2に焦点をあて、核構造変換を介した新たなゲノム発現制御の分子機構解明を目指してきた。本課題では、成長期骨組織分化におけるCbx2の機能を明らかにした。Cbx2KOマウスは離乳期、長管骨骨密度が低下した。Cbx2KOマウス後肢長管骨骨髓由来RNAでは、骨芽細胞ならびに脂肪細胞分化特異的遺伝子の発現量変化を認めた。これらの表現型の浸透率は60～100%であった。マウス骨髓由来ストローマ細胞株ST2を用いたクロマチン免疫沈降法では、対象領域にCbx2およびH3K27me3ヒストン修飾を認めた。骨髓間葉系細胞分化特異的遺伝子を標的にしたCbx2による直接制御が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Focusing on member of polycomb group, Cbx2, we are investigating the relationship between nuclear architecture and gene regulation. In this project, we approved novel Cbx2 functions on growing long bone in mice. Cbx2 KO tibia had low bone mineral densities, and transcription profile in osteoblasts and adipocytes were clearly altered in KO bone marrow, with 60-100% penetrance. In ST2 cells (mouse bone marrow derived stroma cells), Cbx2 and H3k27me3 histone modification were tethering at the same target loci. These results strongly suggested the direct regulation of tissue specific genes by Cbx2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学、マウス遺伝学、遺伝子発現制御
 科研費の分科・細目：基礎医学 病態医化学 5906
 キーワード：クロマチン、ゲノム、性差、遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

これまでポリコム Cbx2/M33 は、発生過程において性分化、生殖腺、副腎、脾臓形成、体軸前後のアイデンティティーの決定、血球、リンパ組織分化等重要な発生過程に不可欠な因子である事が示されてきた。しかし、出生後の機能は明らかにされていない。Cbx2/M33 KO マウスは、汎用されている C57BL/6 genetic back ground では出生時全て死亡するが、129/C57BL/6 mixed genetic back ground では一部生存することを見出した。

2. 研究の目的

本研究課題は、細胞の転写状態の維持に関わるクロマチンタンパクである Cbx2/M33 に焦点をあてた解析により、核構造変換を介した出生後成長期にみられる新たなゲノム発現制御の分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

129/C57BL/6 mixed genetic back ground の出生後3週令の Cbx2/M33 KO マウス大腿骨、脛骨を用い、組織学的、細胞生物学的、次世代シーケンサーを用いた発現解析、分子生物学的解析を通じて、Cbx2/M33 欠損による影響を検討し、分子機能を明らかにする。

4. 研究成果

本課題では、出生3日後離乳期までの成長期における Cbx2/M33 タンパクの組織形成機能を明らかにした。Cbx2/M33 KO マウスでは出生後、成長遅滞(体重の増加不良)(以下浸透率は出生後3日までの死亡を免れた Cbx2/M33 KO マウスを分母とする)

(浸透率100%)、皮下脂肪の菲薄化(浸透率75%)、大腿骨骨密度の低下(浸透率約80%)(図1)、離乳期(早期)死亡(浸透率約80%)が認められた。

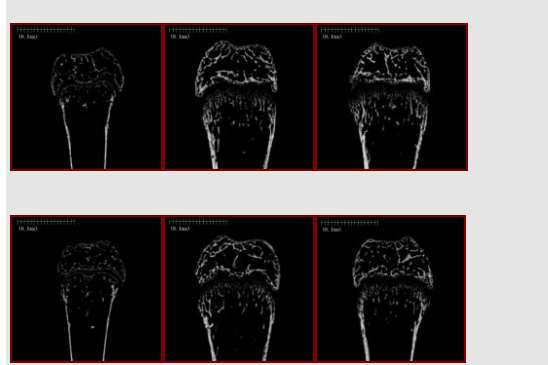


図1) 上段:XY, 下段:XX, 上下段ともに左から順にCbx2 KO Homozygous, Cbx2 KO Heterozygous, Wild-typeマウス大腿骨遠位骨幹端部分の μ CT画像を示す。CBX2/M33 KO マウスでは雌雄共に長管骨骨密度の低下が認められた

組織化学的解析では、海綿骨領域骨髓内に骨芽細胞が少なく、逆に正常な老化個体で見られる肥大化した脂肪細胞が顕著に多く、破骨細胞の密度は有意に高いことはなかった。次に、Cbx2/M33 KOマウス大腿骨、脛骨由来RNAを用いたRNA-sequence発現解析(九州大学大学院医学研究院分子生命科学系部門ならびに生体防御医学研究所との共同研究)を行なった。骨芽細胞系列分化特異的遺伝子 Sp7(Osx), Alpl, Colla1, Bglap (ostecalcin, Ogl) の発現量の低下を認めた(浸透率75%)(表1)。これらの表現型の浸透率は、25%の個体は、成長遅滞が穏やかで離乳期死亡がない個体であることと良く対応する。Cbx2/M33KOマウス大腿骨、脛骨由来RNAにおいて骨芽細胞系列分化カスケードの最上流で発現するマスター遺伝子Runx2の発現量に変化は認められず、前骨

芽細胞で発現する遺伝子Sp7およびその下流遺伝子transcriptsが減少していることから、Cbx2/M33は骨芽細胞系列へ分化決定後の前骨芽細胞分化に必要であることが示唆された。また、Cbx2/M33 KOマウス4匹中全てにおいて、脂肪細胞分化制御遺伝子PPAR γ ならびに脂肪細胞分化遺伝子Fabp4の発現量亢進を認めた。骨髄内脂肪細胞と骨芽細胞は共に骨髄間葉系細胞から分化することが知られているが、我々の得た結果は、クロマチン構成因子Cbx2/M33が骨髄間葉系細胞の分化維持機構に重要な役割を果たしているが、二つの細胞系譜制御は必ずしも相互作用するものではないことを示唆する。

表 1) 後肢長管骨髄腔由来 RNA を用いた RNA-sequence 解析結果の一部を示す。数字は 100,000 reads あたりの発現コピー数を示す。

Gene	XXWILD1	XXWILD2	XXWILD1	XXWILD2	XYCBX2KO1	XYCBX2KO2	XYCBX2KO1	XYCBX2KO2
Pparg	9.5	9.6	9.3	8.7	18.2	11.1	18.8	18.3
Fabp4	282.0	142.7	315.9	279.2	1707.6	888.7	1900.9	1616.1
Runx2	4.2	5.5	4.9	5.1	4.4	9.3	4.1	4.2
Sp7	7.1	17.5	17.7	11.4	3.2	32.2	4.0	4.5
Alpl	33.4	63.9	60.4	52.4	8.5	96.5	26.4	12.8
Col1a1	1268.7	3033.5	4351.0	2494.7	283.9	6060.1	407.0	385.9
Bglap	2648.1	4430.6	5626.8	3710.0	231.6	5264.1	473.9	265.3

さらに分子制御メカニズムを明らかにするためにクロマチンタンパクのゲノム上の局在を、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により、マウス骨髄由来ストローマ細胞株ST2を用いて検討した。対象とする遺伝子領域は、脂肪細胞分化制御遺伝子Ppar γ 遺伝子および脂肪細胞分化遺伝子aP2遺伝子のプロモーター領域とし

た。当該領域はSirt1, NCoR, PPAR γ の直接の転写制御を受けることが報告されている (Picard F et al., Nature 429, 771, 2004)。対象領域において、Cbx2/M33および H3K27me3 ヒストン修飾の集積を認めた (図 2)。

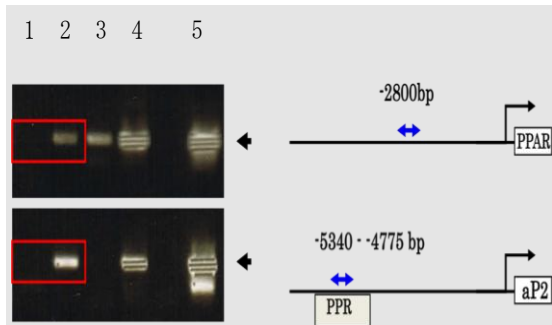


図2) マウス骨髄由来ストローマ細胞株ST2を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により Ppar γ 遺伝子 (上段) および脂肪細胞分化遺伝子 Fabp4 遺伝子 (下段) 転写制御領域 (青色矢印) にCbx2 (赤枠) の集積ならびに H3K27me3 ヒストン修飾を認めた。

1: コントロールIgG (モルモット) (陰性コントロール) 2: 抗Cbx2/M33抗体 (モルモット) 3: コントロールIgG (ウサギ) (陰性コントロール) 4: 抗H3K27me3ヒストン修飾抗体 (ウサギ) 5: 2% インプットDNA (陽性コントロール)

本研究の結果から、骨髄間葉系細胞の分化制御カスケードにおいて、分化特異的に発現する遺伝子を標的にしたCbx2/M33による直接制御が強く示唆された。近年全ゲノムChIP解析から、H3K27me3ヒストン修飾領域とLAMIN B 結合ゲノム領域が核膜下に隣接すること (Guelen L. et al., Nature, 453, 948, 2008) が示されている。核膜構造との関連も視野に入れた解析の糸口を見出した。

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 5 件)

1) Katoh-Fukui Y, Miyabayashi K, Komatsu T, Owaki A, Baba T, Shima Y, Kidokoro T, Kanai Y, Schedl A, Wilhelm D, Koopman P, Okuno Y, Morohashi K. (2012) Cbx2, a polycomb group gene, is required for sry gene expression in mice. *Endocrinology*, 153, 913-924. doi: 10.1210/en.2011-1055. (査読あり)

2) Kataoka M, Yamamori S, Suzuki E, Watanabe S, Sato T, Miyaoka H, Azuma S, Ikegami S, Kuwahara R, Suzuki-Migishima R, Nakahara Y, Nihonmatsu I, Inokuchi K, Katoh-Fukui Y, Yokoyama M, Takahashi M. (2011) A single amino acid mutation in SNAP-25 induces anxiety-related behavior in mouse. *PLoS One*, 6:e25158. doi: 10.1371/journal.pone.0025158. (査読あり)

3) Kusaka M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Miyabayashi K, Baba T, Shima Y, Sugiyama N, Sugimoto Y, Okuno Y, Kodama R, Iizuka-Kogo A, Senda T, Sasaoka T, Kitamura K, Aizawa S, Morohashi KI. (2010) Abnormal Epithelial Cell Polarity and Ectopic Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression Induced in Emx2 KO Embryonic Gonads. *Endocrinology*, 151:5893-5904. doi: 10.1210/en.2010-0915. (査読あり)

4) Yokoyama C, Katoh-Fukui Y, Morohashi K, Konno D, Azuma M, Tachibana T. (2010) Production and characterization of monoclonal antibodies to mouse germ cells. *Hybridoma*, 29:53-57. doi: 10.1089/hyb.2009.0101. (査読あり)

5) Hiramatsu R, Matoba S, Kanai-Azuma M, Tsunekawa N, Katoh-Fukui Y, Kurohmaru M, Morohashi KI, Wilhelm D, Koopman P, Kanai Y. (2009) A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development*, 136:129-138. doi: 10.1242/dev.029587. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 1 件)

基礎老化学会, 2011年6月東京
早期老化症様表現型を示すポリコムグループ遺伝子Cbx2ノックアウトマウス
福井由宇子 (筆頭著者、責任著者) 他 4 名
共著

〔図書〕 (計 0 件)

〔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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
福井 由宇子 (FUKUI YUKO)
独立行政法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・研究員
研究者番号 : 50342639

(2) 研究分担者 ()
研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()
研究者番号 :