

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 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2012～2014

課題番号：22580107

研究課題名（和文）概年性の転写因子による哺乳動物の冬眠の発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of hibernation-associated gene regulation in chipmunk

研究代表者

高松 信彦（TAKAMATSU NOBUHIKO）

北里大学・理学部・教授

研究者番号：40206876

研究成果の概要（和文）：

冬眠哺乳動物シマリスにおける、冬眠と同期した遺伝子の発現制御機構はこれまで明らかになっていなかった。本研究では、肝臓において非冬眠時特異的に転写が活性化されるHSP70遺伝子の転写調節機構について解析し、その結果、非冬眠時特異的に存在するHSF-1およびHSF-2タンパク質が、概年性の転写因子として、HSP70遺伝子の転写を活性化することにより、冬眠と同期した転写を達成していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Mammalian hibernation is a seasonal phenomenon with a circannual rhythm, and molecular mechanisms that govern hibernation-associated gene regulation in a circannual manner are still unknown. In the chipmunk, a mammalian hibernator, HSP70 gene transcription in the liver is activated in nonhibernating animals, and repressed in hibernating animals. In this study, we analyzed the hibernation-associated transcriptional regulation of the HSP70 gene, and revealed that the protein levels of HSF-1 and HSF-2 oscillate between the nonhibernating and hibernating seasons, resulting in the hibernation-associated transcriptional regulation of the HSP70 gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2013年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2014年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：冬眠・転写制御・概年リズム・肝臓

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の冬眠は、脳に存在が推察される『冬眠中枢』による、全身の遺伝子発現の統合的な制御によって行われると考えられている。しかし、冬眠中枢の存在、冬眠中枢から末梢組織に発信される冬眠の発現制御に

関わるシグナルの実体、あるいは末梢組織における冬眠と同期した遺伝子の発現制御機構はまだ解明されておらず、概年性の冬眠の発現機構はまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

冬眠哺乳動物シマリスの冬眠は、内因性の概年リズムによって制御されている。申請者は、冬眠と同期した発現を示す遺伝子の発現制御機構の解析などから、「冬眠動物では、脳の『冬眠中枢』から発信されるシグナル（『冬眠シグナル』）によって活性が制御される転写因子（『概年性の転写因子』）が肝臓などの末梢組織に存在することにより、全身において、冬眠の発現に関わる遺伝子の発現が統合的に制御され、冬眠を行っている」というモデルを考えている。本研究では、この概年性の発現制御モデルを検証するため、末梢組織の肝臓において概年性の転写因子を同定し、概年性の転写因子による冬眠と同期した遺伝子の発現制御機構について解析した。

3. 研究の方法

(1) シマリス HSP70 遺伝子の転写に及ぼす影響の解析： HSP70 遺伝子の 5' 上流配列をプラスミドベクター pGV-B のホタルルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に連結したレポータープラスミドを、転写因子発現用のプラスミドとともに、ヒト肝臓癌由来の HepG2 細胞に TransIT-LTI を用いてトランスフェクションし、約 24 時間後に、Dual-luciferase Reporter Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

(2) シマリス HSP70 遺伝子 5' 上流配列への転写因子の結合のゲルシフト解析： HSP70 遺伝子の 5' 上流配列の二本鎖 DNA、または配列中の HSF 結合配列 (HSE) に 2 塩基置換を導入した二本鎖 DNA を ³²P 標識したプローブと、in vitro 転写-翻訳系で合成した HSF タンパク質とを混和し、4℃ で反応後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) にかけて、オートラジオグラフィーを行った。

(3) シマリス肝臓における HSF の発現のウエスタンブロットによる解析： 肝臓の細胞質あるいは核のタンパク質抽出液を SDS-PAGE にかけて、分画したタンパク質を PVDF 膜に転写し、抗 HSF 抗体を用いて HSF タンパク質を検出した。

(4) シマリス肝臓における HSF mRNA のノーザン解析： 肝臓ポリ A-RNA をホルマリンを含むアガロースゲルで電気泳動後、RNA をニトロセルロースフィルターに転写し、³²P 標識した HSF cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

(5) クロマチン免疫沈降法 (ChIP)： シマリス肝臓をホルムアルデヒドで処理して、ゲノム DNA と DNA に結合している転写因子・ヒストンを架橋後、超音波処理によりゲノム DNA を断片化した。抗 HSF 抗体あるいは抗ヒ

ストン抗体を加えて、4℃ で一晩混和後、遠心により抗体と結合したゲノム DNA 断片を回収した。回収した DNA に HSP70 遺伝子 5' 上流配列が含まれているかどうかを、PCR により解析した。

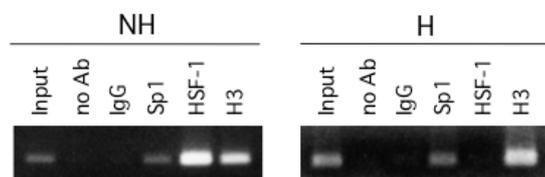
(6) シマリス初代肝細胞を用いたノックダウン実験： コラゲナーゼ灌流法により調製したシマリス初代肝細胞に HSF に対する siRNA をトランスフェクションし、3 日間培養した。細胞から total RNA を調製し、ランダムプライマー法で cDNA を合成し、qPCR によりアルブミン、HSF、HSP70 mRNA 量を解析した。

4. 研究成果

(1) HSF-1 は概年性の転写因子として HSP70 遺伝子の冬眠と同期した転写を制御する

①シマリス生体における HSF-1 の HSP70 遺伝子の転写への関与に関する ChIP 解析：

シマリスの生体において、肝臓における HSP70 遺伝子の転写に HSF-1 が関与しているかどうかを明らかにするため、クロマチン免疫沈降法により解析した。その結果、抗 HSF-1 抗体を用いた場合、非冬眠個体 (NH) では HSP70 遺伝子の HSF 結合配列 (HSE) を含む 5' 上流領域の DNA 断片の増幅が確認されたが、冬眠個体 (H) では 5' 上流領域の増幅は起こらなかった (図 1)。従って、シマリスの肝臓において、HSF-1 は非冬眠時特異的に HSP70 遺伝子の 5' 上流領域に結合していることが



明らかになった。

図 1 ChIP 解析

②シマリス初代肝細胞における HSF-1 のノックダウンの HSP70 遺伝子の転写への影響の解析：

非冬眠時シマリスからコラゲナーゼ灌流法により調製した初代肝細胞に、GFP または HSF-1 に対する siRNA をトランスフェクションし、コラーゲンコートしたシャーレで培養した。72 時間後に total RNA を調製し、ランダムプライマー法で cDNA を合成、定量 PCR により HSF-1、HSP70、Albumin の cDNA のコピー数を測定した。その結果、ネガティブコントロールの GFP siRNA と比較して、HSF-1 siRNA をトランスフェクションした場合には、HSF-1 mRNA 量が減少していたことから、HSF-1 がノックダウンされていたことが確認できた (図 2)。さらに、HSF-1 siRNA をトラ

ンスフェクションした場合には、HSP70 mRNA量が減少していた(図2)ことから、シマリスの肝細胞において HSF-1 が HSP70 遺伝子の転写活性化に関与していると考えられた。

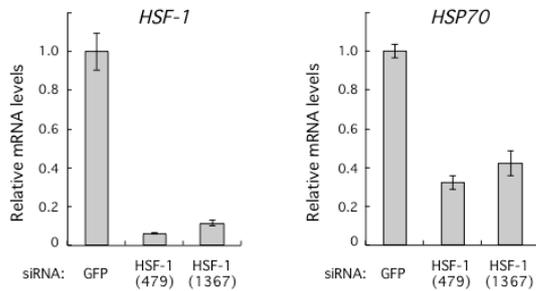


図2 シマリス初代肝細胞における HSF-1 のノックダウン実験

(2) HSF-2 も概年性の転写因子として HSP70 遺伝子の冬眠と同期した転写を制御する

①シマリス肝臓における HSF-2 の発現のウエスタン解析:

シマリス肝臓において HSF-2 も非冬眠時特異的に発現しているかどうかを、抗 HSF-2 抗体を用いた全細胞抽出液のウエスタン解析により調べた。その結果、非冬眠時のシマリスの肝臓では HSF-2 タンパク質は検出されたが、冬眠時には殆ど検出されなかった(図3)。さらに肝臓の核抽出液と細胞質抽出液を用いてウエスタン解析を行った結果、非冬眠時の HSF-2 タンパク質の大部分は核内に存在することが明らかになった。

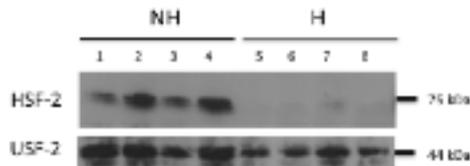


図3 HSF-2 のウエスタン解析

②HSP70 遺伝子の 5' 上流領域の HSE への HSF-2 の結合の解析:

シマリス HSP70 遺伝子の 5' 上流領域の HSE への HSF-2 の結合をゲルシフト法により解析した。in vitro 転写-翻訳系により HSF-2 を合成後、そのまま (Heat -) 或いは 42°C で 1 時間の加熱処理 (Heat +) を行ってから、³²P 標識した HSP70 遺伝子の HSE を含む二本鎖 DNA (WT) と混和し、氷中に 30 分間放置してから、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、HSF-2 とプローブ DNA との複合体形成について解析した。その結果、HSF-2 の結合によるシフトしたバンドが観察され、HSE に変異を導入 (Mut) すると、シフトしたバンドが観察されなかったことから、HSF-2 が HSE に配列特異的に結合すると考えられた(図

4)。

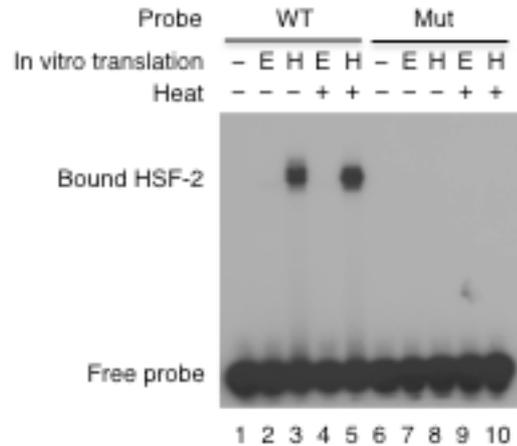


図4 HSF-2 の HSE への結合のゲルシフト解析

③HSF-2 が HSP70 遺伝子の転写に及ぼす影響の解析:

HSP70 遺伝子の HSE を含む 5' 上流領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に持つレポータープラスミドを、HSF-2 発現用プラスミド、内部標準用のウミシイタケのルシフェラーゼ発現用プラスミドと共に、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に細胞抽出液を調製し、ホタル及びウミシイタケのルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ホタルルシフェラーゼ活性は HSF-2 の共発現により量依存的に増大したが、HSE に変異を導入すると HSF-2 による活性化は見られなくなった。これらの結果から、HSF-2 は HSP70 遺伝子の 5' 上流領域の HSE に配列特異的に結合し、転写を活性化させると考えられた。

④シマリス肝臓における HSF-2 の HSP70 遺伝子の転写への関与に関する解析:

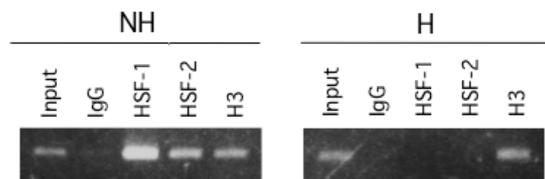


図5 ChIP 解析

シマリスの生体において、HSP70 遺伝子の肝臓における転写に HSF-2 が関与しているかどうかを明らかにするため、ChIP 解析を行った。その結果、抗 HSF-2 抗体を用いた場合、非冬眠個体では HSP70 遺伝子の HSE を含む 5' 上流領域の DNA 断片の増幅が確認されたが、冬眠個体では 5' 上流領域の増幅は起こらなかった(図5)。従って、非冬眠時のシ

マリスの肝臓において、HSF-2 は HSP70 遺伝子の 5' 上流領域に結合し、HSP70 遺伝子の転写に関与していると考えられた。

⑤シマリス初代肝細胞における HSF-2 のノックダウンの HSP70 遺伝子の転写に及ぼす影響の解析：

ChIP 解析により、非冬眠時シマリス肝臓において HSF-2 が HSP70 遺伝子の 5' 上流領域に結合していることが明らかになったので、シマリス初代肝細胞において HSF-2 を siRNA によりノックダウンし、HSF-2 が HSP70 遺伝子の転写の活性化に関与しているかどうかを解析した。非冬眠時シマリスから調製した初代肝細胞に、GFP または HSF-1、HSF-2 に対する siRNA をトランスフェクションし、72 時間後に total RNA を調製し、定量性 RT-PCR により HSF-1、HSF-2、HSP70、Albumin の cDNA のコピー数を測定した。その結果、ネガティブコントロールの GFP siRNA と比較して、HSF-1 siRNA あるいは HSF-2 siRNA をトランスフェクションした場合には、それぞれ HSF-1 mRNA 量、HSF-2 mRNA 量が減少しており、ノックダウンが確認されるとともに、HSP70 mRNA 量も減少していた (図 6)。これらの結果から、シマリスの肝細胞において、HSF-1 と HSF-2 が HSP70 遺伝子の転写活性化に関与していると考えられた。

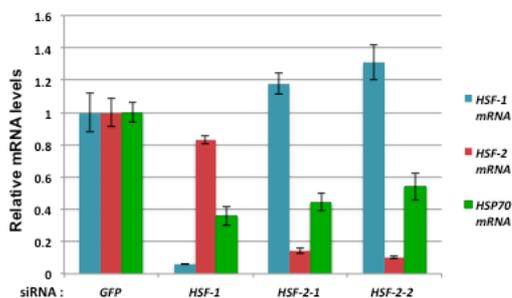


図 6 シマリス初代肝細胞における HSF-1 のノックダウン実験

以上の結果から、非冬眠時特異的に肝臓に存在する HSF-1 および HSF-2 によって HSP70 遺伝子の転写が活性化されるため、HSP70 遺伝子の転写は冬眠と同期した変動を示すと考えられた。

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 1 件)

- ① Fujita, S., Okamoto, R., Taniguchi, M., Ban-Tokuda, T., Konishi, K., Goto, I., Yamamoto, Y., Sugimoto, K., Takamatsu, N., Nakamura, M., Shiraki, K.,

Buechler, C., Ito, M., Identification of bovine hibernation-specific protein complex and evidence of its regulation in fasting and aging., J. Biochem., 査読有, 153 巻, 2013 年, 453-461

DOI: 10.1093/jb/mvt008

[学会発表] (計 3 件)

- ① 松澤彰彦, 川島祐介, 齋藤達也, 大橋和也, 高松信彦, 小寺義男, 哺乳動物の冬眠にともなう肝臓のプロテオーム変動の解析, 日本分子生物学会, 2010 年 12 月 9 日, 神戸市
- ② 菅井玲, 綿引陽子, 廣瀬真一, 伊藤道彦, 高松信彦, Hibernation-associated transcriptional regulation of the chipmunk HP-25 gene., 日本分子生物学会, 2011 年 12 月 15 日, 横浜市
- ③ 飯尾浩子, 伊藤道彦, 高松信彦, シマリス HSP70 遺伝子の HSF-2 による冬眠に伴う転写調節機構の解析, 日本分子生物学会, 2012 年 12 月 13 日, 福岡市

[その他]

ホームページ:

<http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/eibutsu/joho/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松 信彦 (TAKAMATSU NOBUHIKO)

北里大学・理学部・教授

研究者番号: 40206876

(2) 研究分担者

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号: 60265733

(3) 連携研究者

()

研究者番号: