

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24年4月2日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770166

研究課題名（和文）パフ局在化因子の分子遺伝学的探索を基盤とした活性化クロマチン構造調節機構の解明

研究課題名（英文）A genetical screening of a protein trap library for active chromatin-binding factors on polytene chromosome in *Drosophila*

研究代表者

沢津橋 俊（SAWATSUBASHI SHUN）

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：70535103

研究成果の概要（和文）：真核生物の遺伝子発現においてクロマチン構造変換が重要な過程であることは明白であるが、この過程は多種多様なタンパク質群により制御されており、その分子メカニズムには不明な点が多い。本研究ではショウジョウバエのプロテントラップシステムライブラリーを利用した分子遺伝学的スクリーニングにより、エクダイソンパフ領域に局在化する新規因子の探索を試みた。その結果、CG11138 (Ringfect と命名) と enolase が新たなパフ局在化因子として同定され、これらの因子はエクダイソンレセプターに対する新たなコアアクチベータとして機能する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It is evident that gene regulation is coupled with chromatin reorganization, but factors and molecular basis involving in this process remain to be identified. In the present study, factors responsible for ecdysone-induced puff formation were genetically screened in *Drosophila* fly by establishing an EGFP protein-trap approach. Among the candidates, *Drosophila* CG11138/Ringfect was found as a co-activator for ecdysone receptor (EcR). Through biochemical characterization, Ringfect could be shown to serve as a histone chaperon. We describe the identification of novel puff-localized factors by screening the protein trap transgenic fly library. *Drosophila* CG11138/Ringfect and enolase were genetically identified as a puff-localized factor and a co-activator, and interacted with EcR in S2 cell. Thus, the present study suggests that Ringfect and enolase are categorized as a novel class of nuclear receptor co-activators.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：遺伝子発現

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写、クロマチン、核内受容体、エクダイソン

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物を構成する種々の細胞は、遺伝情報として同じセットのゲノムDNAを有しており、同一の遺伝情報から選択的に遺伝子発現することで、細胞種固有の形質が規定される。この選択的な遺伝子発現には染色体の構造とその機能調節が密接に関連しており、染色体構造は一般的に、転写の不活化した領域(ヘテロクロマチン)と、転写反応の活性化した領域(ユークロマチン)に大別される。このクロマチン構造のダイナミックな変換において、近年、DNAメチル化、ヒストンの翻訳後修飾、クロマチンリモデリングといったエピジェネティックな制御機構が注目されている。また、これらエピゲノム制御系の破綻は、個々の細胞固有の形質が損なわれ、異常な細胞が生じる原因となるため、癌をはじめとする疾患の観点からも重要な学問領域である。しかしながら、ヘテロクロマチンとは対照的に、ユークロマチン形成・維持の分子機構に関する知見は乏しく、特徴的なヒストン修飾パターンが知られているものの、依然としてクロマチン構造の活性化機構は明らかではない。これはクロマチン構造活性化の鍵となる因子群の同定が進んでいない為であり、早急に着手すべき研究課題である。そこで、本研究の全体構想では、クロマチン構造の活性化に関与する新規因子の探索を基盤とし、活性化クロマチン構造を規定する新たなエピゲノム制御系の解明を目的とする。

2. 研究の目的

本研究は、エクダイソンパフを「活性化クロマチン構造のモデル系」と捉え、新たに構築したショウジョウバエ分子遺伝学スクリーニングによるパフ局在化因子の探索からクロマチン構造の活性化の鍵となる新規因子の取得を目的とし、これまで研究対象として焦点を当てるのが困難であった活性化クロマチン構造の分子制御機構の解明を目指す。また、本スクリーニングによって新たに同定された機能未知パフ局在化因子の機能解析から活性化クロマチン構造を規定する新たなエピゲノム制御系の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) GFPプロテイントラップシステムを利用したショウジョウバエ分子遺伝学的スクリーニングによる新規クロマチン構造変換因子の探索と同定

研究代表者がこれまでに構築したスクリーニング系を利用して、更なるパフ局在化候

補因子の探索を継続する。具体的には、本スクリーニングではGFP融合タンパク質を発現するGFPプロテイントラップシステムをライブラリーとして用い、ショウジョウバエ三齢幼虫唾腺染色体に惹起されるエクダイソンパフへのGFP融合タンパク質局在化の有無を観察する。現在までに、全1484系統のうちおよそ500系統の観察を終了しており、継続して残るおよそ900系統の観察を完了する。さらに、転写活性化に寄与するクロマチン構造調節因子を絞り込むための2次スクリーニングとして、候補因子の唾腺特異的ノックダウンシステムと*in vivo*レポーターショウジョウバエを用いたEcR標的遺伝子の転写活性解析を行い、転写活性化に寄与する因子の選別を行う。また同時に、候補因子ノックダウンシステムを用いて、多糸染色体のヒストン修飾パターン・ヒストン置換反応への影響の有無を指標としたクロマチン構造調節因子の選別も試みる。これらのスクリーニングの継続には、東京大学大学院博士課程の林珍仙と分担し、各種行程のさらなる効率化を進める。

(2) スクリーニングにより取得された機能未知パフ局在化因子CG11138/Ringfectが形成する複合体のプロテオミクス解析

これまでに上述のスクリーニング系から取得された候補因子のうち機能未知因子CG11138 (Ringfectと命名)の性状解析を行うため、FLAGタグ融合Ringfectを恒常的に発現するショウジョウバエS2培養細胞株を樹立し、複合体精製を行う。また、Ringfectはそのアミノ酸配列からN末端領域とC末端領域にそれぞれ進化的に保存されたジンクフィンガーモチーフとリングフィンガーモチーフを有することが示唆される。リングフィンガーモチーフは、一般にDNA結合やタンパク質間相互作用に関連するほかに、ユビキチンリガーゼとしての酵素活性の報告がある。そこで、このモチーフに対して点変異の導入を行った変異型Ringfectの複合体解析を行い、このモチーフの重要性を生化学的手法により検討する。これに加えて、スクリーニングにより取得された他の候補因子も同様な方法で複合体解析を行い、その性状を明らかにする。特にこれらの解析は、機能未知因子かつ高等動物ホモログの存在が予想されるものを優先的に解析対象とし、施行する。このようなプロテオミクス解析にて複合体の性状解析を行うことにより、機能未知因子複合体の活性中心となりうる鍵因子の探索と機能予測が可能であると考える。

(3) 生化学的アプローチによる Ringfect 複合体としての機能解析

Ringfect 複合体のプロテオミクス解析からタンパク複合体としての機能解析を試みる。特に、Ringfect 複合体形成の分子機構を明らかにする。この解析には Ringfect および複合体構成因子間のそれぞれの相互作用領域を、*in vitro* プルダウンアッセイによりマッピングを行い、機能欠失変異体の作成に利用する。また、本スクリーニングにより新たに取得された候補因子も、同様な方法での複合体解析を試みる。

(4) 分子遺伝学的アプローチによる Ringfect および Ringfect 複合体構成因子の生体内におけるクロマチン構造調節機能の解析

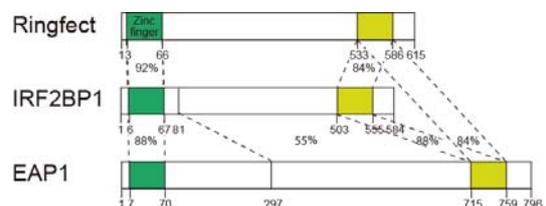
(3)で述べた *in vitro* における解析の知見から、Ringfect の機能ドメイン欠損変異体や複合体構成因子の相互作用領域欠損変異体を遺伝子導入したショウジョウバエ系統や、複合体構成因子のノックダウンシステムを作出することで Ringfect 複合体の生体内機能を明らかにする。特に、唾腺多糸染色体でのエクダイソンパフ形成に対する効果に着目し、ヒストン修飾パターン・ヒストン置換反応への影響を検討する。また、本スクリーニングにより新たに取得された候補因子についても、同様な方法での生体内高次機能の解析を試みる。これらの新規候補因子の機能解析は、東京大学大学院博士課程の林珍仙と分担して行う。

4. 研究成果

本研究では、GFPプロテイントラップシステムのショウジョウバエ三齢幼虫唾腺染色体に惹起されるエクダイソンパフへのGFP融合タンパク質局在化の有無を検討した。利用可能な全GFPプロテイントラップ系統、1484 系統のすべての局在観察を終了し、クロマチン構造変換候補因子と予想される複数のパフ局在化因子を同定した。これらの因子はEcRと共局在したことからEcRの転写制御に関与する可能性が考えられた。そこで、合成エクダイソンであるMuristerone A存在下におけるEcRの転写活性をショウジョウバエ胚由来培養細胞(S2 細胞)を用いたルシフェラーゼアッセイで検討した。その結果、CG11138 は発現量依存的にEcRのリガンド依存的な転写活性化を促進し、CG11138 はEcRの転写共役因子の可能性が考えられた。そこで、N末端領域とC末端領域にそれぞれ進化的に保存されたジンクフィンガーモチーフとリングフィンガーモチーフを有するCG11138 をRingfect(Ring finger protein for EcR transactivation)と命名し、性状解析を行った。RING fingerドメインがEcRの転写活性化

に必要な否かを検討するために、RING fingerドメインの欠失変異体と点変異体を用いた。S2 細胞においてルシフェラーゼアッセイを行った結果、これら変異体はEcRの転写促進を抑制した。このことから、RingfectのEcR転写活性化能はRING fingerドメインを介していることが示唆された。更にRingfectがEcRの標的遺伝子E75Bの発現を促進するかを検討するために、S2 細胞においてRingfectをノックダウンして、RT-qPCRを行った。その結果、E75B mRNAの発現量が減少したことから、RingfectはEcRの転写活性共役因子である可能性が示唆された。加えて、RingfectはEcRのリガンド依存的な転写活性を、p160ファミリータンパク質Taimanと協調的に促進していることも明らかにした。次にRingfectとEcRの相互作用を検討するために、Ringfect恒常発現S2 細胞にEcRを過剰発現させ免疫沈降を試みた。その結果、エクダイソンの有無にかかわらずRingfectとEcRの相互作用を確認した。また、RingfectはRING fingerドメインを持つことから、ユビキチンE3 リガーゼ活性を持つ可能性が考えられた。そこでRingfectのE3 活性を検討するために、大腸菌で発現させたリコンビナントのRingfectタンパク質をE3 として*in vitro* ubiquitination assayを行った。その結果、Ringfectの自己ユビキチン化活性が認められ、E3 リガーゼ活性を持つことが示唆された。以上の結果から、本研究ではショウジョウバエ核内受容体EcRのクロマチン共局在を指標とし、エクダイソン依存的にE3 リガーゼ活性を持つ新たな転写活性化共役因子と予想されるRingfectの性状解析を進展させることができた。これまでエクダイソン依存的なパフ形成において、ユビキチンE3 リガーゼが機能することは報告がなく、今後Ringfectの基質の同定とクロマチン構造変換機構におけるRingfectの機能の解明は非常に興味深いと考えられる。特に、Ringfect恒常発現株を利用したRingfect複合体構成因子の同定はさらなる機能解析を試みるうえで有用であるため、複合体精製を試みたものの残念ながらその同定には成功していない。

本研究で同定した Ringfect のヒトホモログは、以下に示す IRF2-BP1 (Interferon regulatory factor-2-binding protein 1)、EAP1 (Enhanced at puberty 1)であると推測されるが(Ensembl genome browser)、コアクチベーターとしての機能に加え、コリプレッサーとしての機能も報告されている。IRF2-BP1 は、転写因子 IRF2(Interferon



regulatory factor 2) による *interferon (IFN)* 遺伝子の転写を抑制するコリプレッサーとして同定され、Zinc finger ドメインと Ring finger ドメインを有し、Ringfect との相同性は、それぞれ 92% と 84% である(上図)。ショウジョウバエには、IRF2 のホモログは存在しないため、Ringfect/IRF2-BP1 が相互作用する転写因子は未知である。本研究では、Ringfect はコアクチベーターとして機能していることから、相互作用因子や標的遺伝子によって、転写を促進する場合と、抑制する場合があると推測される。実際、もう一つのヒトホモログ EAP1 には、双方の役割があることが以下のように示されている。霊長類・げっ歯類において、第二次性徴期の視床下部特異的に発現量が増える mRNA の探索を目的として、ゲノムワイド・スクリーニングを行った結果、EAP1 遺伝子が同定された。第二次性徴期に発現量が増加した EAP1 タンパク質は、*GNRHI* 遺伝子の転写を活性化することで、Gn-RH (gonadotropin-releasing hormone) 分泌に関わる神経細胞のネットワークを制御することが示された。一方、同時期に抑制されることが必要な *preproenkephalin* 遺伝子も標的遺伝子の一つであり、EAP1 によって合目的的に転写が抑制されることが示された。本報告では、EAP1 の相互作用因子や、ユビキチン E3 リガーゼ活性、その基質については解析されておらず、どのような分子メカニズムで転写活性化能・抑制化能を発揮しているかは解明されていない。本研究では、Ringfect がエクダイソンパフに局在を示したことから、Ringfect/EAP1 は、クロマチン上で転写制御能を発揮すると推測される。また、Ring finger ドメインの欠失変異体では、転写活性化能が消失したことから、ユビキチン E3 リガーゼ活性と転写制御能には関連がある可能性が示唆された。Ringfect の機能解析は、高等生物ホモログである EAP1 高次機能を理解するための基盤となる可能性がある。

一方で、更なるスクリーニングの結果、ヒストン修飾への関連が予想される因子として CG8209、14-3-3、spt6、DNA 結合能が予想される因子として Alh、cg、Zn72D、kay、Topo1、RNA 結合能が予想される因子として CG11266、CG7185、Hrb98DE、sqd 等と共に、Enolase がパフに局在化することを見出した。抗 Enolase 抗体による多糸染色体の免疫染色の結果、解糖系酵素として細胞質への局在が知られる Enolase が核内において転写反応に関与する可能性が示された。そこで、EcR の転写活性をルシフェラーゼアッセイで検討した結果、enolase は発現量依存的に EcR のリガンド依存的な転写活性化を促進し、enolase は EcR の転写共役因子の可能性が示唆された。近年、解糖系酵素 PKM2 が核内タ

ンパク質のリン酸化を行うプロテインキナーゼとしても機能しうることが報告された。PKM2 はリン酸基のドナーとして解糖系において enolase が産生するホスホエノールピルビン酸を利用すると考えられ、このような解糖系酵素群が核内でクロマチン構造制御に関わる新たな機能の可能性を示唆している。

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 2 件)

① Ito S, Fujiyama-Nakamura S, Kimura S, Lim J, Kamoshida Y, Shiozaki-Sato Y, Sawatsubashi S, Suzuki E, Tanabe M, Ueda T, Murata T, Kato H, Ohtake F, Fujiki R, Miki T, Kouzmenko A, Takeyama K, Kato S, Epigenetic silencing of core histone genes by HERS in drosophila.、Molecular Cell、査読有、Vol. 45 (4), 2012, pp. 494-504

② Ochiai E, Kitagawa H, Takada I, Fujiyama S, Sawatsubashi S, Kim MS, Mezaki Y, Tsushima Y, Takagi K, Azuma Y, Takeyama K, Yamaoka K, Kato S, Kamimura T, CDP/cut is an osteoblastic coactivator of the vitamin D receptor (VDR).、J Bone Miner. Res.、査読有、Vol. 25 (5), 2010, pp. 1157-1166

[学会発表] (計 7 件)

① 沢津橋 俊、多糸染色体から理解するクロマチン構造調節を介したゲノムデコードー新規ヒストンシャペロン *Drosophila* DEK によるエクダイソン受容体転写機構の解明一、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012. 3. 25、京都女子大学 (京都府)

② 沢津橋 俊、DEK はヒストンシャペロンとして機能する新規転写活性化共役因子である、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011. 3. 27、京都女子大学 (京都府)

③ Sawatsubashi S、A Histone chaperone DEK transcriptionally coactivating a nuclear receptor: a functional link to leukemia.、Keystone Symposia (Histone Code: Fact or Fiction?)、2011. 1. 13、ミッドウェイ (米国・ユタ州)

④ 沢津橋 俊、A Histone chaperone DEK transcriptionally coactivating a nuclear receptor: a functional link to leukemia.、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010. 12. 8、神戸ポートアイランド (兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沢津橋 俊 (SAWATSUBASHI SHUN)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：70535103

研究協力者

林 珍仙 (LIM JINSEON)

東京大学・分子細胞生物学研究所・博士課程