

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870038

研究課題名（和文） 世代を超えて保存される染色体構造変化の分子解析

研究課題名（英文） Molecular analysis for chromatin structure conserved beyond generations

研究代表者

吉田 圭介 (YOSHIDA KEISUKE)

独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：80587452

研究成果の概要（和文）：次世代遺伝効果に関与すると考えられている ATF-7 の自然免疫系における分子的役割を、腹腔常在性マクロファージを用いて検討した。ChIP-chip 解析を用いて ATF-7 結合領域を同定したところ、数十か所の自然免疫系に関わる遺伝子のプロモーター領域に ATF-7 が結合していた。これら結合領域の H3K9me2 レベルは、K.O. で減少しており、遺伝子活性が亢進していた。また自然免疫ストレスが加わると、ATF-7 結合量が低下し、それに伴い、H3K9me2 レベルが減少することが分かった。

研究成果の概要（英文）：ATF-7 is reported to contribute to transgenerational effect of heat shock stress in fly. This time, I investigated molecular function of ATF-7 in innate immunity system using resident peritoneal macrophages. ChIP-chip results with ATF-7 antibody showed ATF-7 binds to promoter region of several tens of innate immunity-related genes. At these sites, H3K9me2 level decrease and gene activity is enhanced in ATF-7 KO. I found that after treating macrophages by innate immune stress, ATF-7 binding and H3K9me2 level is decreased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：

次世代遺伝効果、自然免疫系、マクロファージ、ATF-7

1. 研究開始当初の背景

高等真核生物では、親の受けた環境ストレ

スや栄養状態の影響が細胞分裂を超えて、非遺伝的に次世代の子孫に伝わるという興味深い現象が知られている。この現象は特に植物で多く報告されており、温度変化や日照時間、紫外線ストレスによって生じる形質変化が、次世代に遺伝する現象が知られている (Youngson NA, Whitelaw E. *Annu Rev. Genomics*, 2008)。こうした現象には、DNA配列の変化を伴わないエピジェネティック (DNA や染色体ヒストンのメチル化等の化学修飾) な変化が関係していることが示されており、その分子メカニズムが次第に明らかになってきている。

所属研究室では、最近、転写因子 ATF-7 がこうした現象に関与していることをハエを用いた実験により示した (Seong KH et. al., *Cell*, 2011)。ATF-7 は、ATF/CREB ファミリーに属する転写因子で、所属研究室が同定した因子である。ATF-7 は、様々なストレスによってストレス応答性キナーゼ p38/JNK を介してリン酸化され、活性化される。ATF-7 は、ヒストンメチル化酵素と結合することが示されており、染色体が密に折り畳まれたヘテロクロマチン構造の形成と維持に関与すると考えられている (Wang et al, *Mol Cell*, 2003)。ショウジョウバエの発生初期段階に熱ショックを与え、ATF-2 (ハエ ATF-7 ホモログ) を活性化させると、眼の色を司る *wht* 遺伝子のヘテロクロマチン構造が壊れ、活性化した *wht* 遺伝子のために眼の色が赤く変化した。さらに、この形質変化は(熱ショックを与えていない)次世代にも伝わった。一方で、ATF-2 のノックアウト変異体ではこの現象が観察されなかった。この結果は、「ストレスによって誘導される形質変化が次世代に遺伝する」現象を観察したもので、ハエ ATF-2 がこの現象の分子メカニズムに関与していることを示唆するものである。

申請者は、ATF-7 のノックアウトマウスを飼育している中で、一部のノックアウトマウスの鼻部が異常に肥大していることを見出した。この切片を解析したところ、マクロファージなどの血球細胞が蓄積した慢性炎症であることが分かった。従って、ATF-7 ノックアウトマウスでは、炎症反応を担う自然免疫系(抗体反応などの適応免疫と対になる免疫系で、マクロファージが細菌・ウィルスの表面タンパク質を非特異的に認識し、活性化することで炎症反応を誘導する)が異常亢進しているのではないかと考えられた。そこで、自然免疫系における ATF-7 の役割、そして自然免疫ストレス時での ATF-7 の動的变化と次世代への影響を検討することにした。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、“微生物感染によって自然免疫系が活性化された時、ATF-7 の機能がどのように変化し、染色体構造に影響を与えるか”を明らかにし、“その影響が次世代へと伝わりうるか?”調べることである。

この目的のためにまず、“(1)マウス腹腔由来のマクロファージにおける ATF-7 の染色体結合領域のマッピング”を行い、ここで同定した結合領域について“(2) ATF7 の転写抑制能の制御メカニズム”、同時に“(3)マウスの自然免疫系が活性化された時、ATF-7 の活性や染色体結合がどのように変化するか”、を調べることにした。

3. 研究の方法

(1) 染色体上 ATF-7 結合領域のマッピング

ChIP-chip 解析により、ATF-7 の染色体結合領域を網羅的に特定する。マウス繊維芽細胞(MEF)または常在性腹腔マクロファージを回収し、ATF-7 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行う。回収した ATF-7 結合 DNA を増幅後、マウスゲノムタイリングアレイで解析し、ATF-7 結合領域を特定する。

(2) ATF-7 の転写抑制能の分子解析

(1)で特定した ATF-7 結合領域を上流に持つ自然免疫遺伝子の転写量を RT-qPCR 法により調べ、ATF-7 KO 由来のマクロファージでは野生型と比較してどのように変化しているか調べる。変化していた場所については、ヒストンのメチル化・アセチル化状態といったエピジェネティック状態を ChIP-qPCR 法により解析し、ATF-7 が染色体構造をどのように制御しているか、分子メカニズムを調べる。

(3) 自然免疫刺激時の ATF-7 の動態変化

単離した常在性マクロファージを LPS 処理し、自然免疫刺激後の ATF-7 結合状態と超ス トン修飾状態をクロマチン免疫参考報で調べる。マウス個体に LPS を投与し、刺激後のマクロファージと精巣細胞での ATF-7 の結合状態を調べる。

4. 研究成果

(1) 染色体上 ATF-7 結合領域のマッピング

野生型及び ATF-7 K.O. マウスから MEF を回収し、ATF-7 抗体を用いて ChIP-chip 解析を行った。マウス 5 番染色体を網羅するタイリングアレイを用いて解析した結果、70 ヶ所の ATF-7 結合領域を同定した。結果については、これら領域のプライマーを設計し、野生型・ATF7 K.O.の MEF で ChIP-qPCR 解析を行うことで検定した。結合領域の 84%は遺伝

子内部及び遺伝子近傍領域に局在しており、結合 DNA 配列からは過去の報告通り CRE(cAMP responsive element)に類似した配列が抽出された(図 1)。

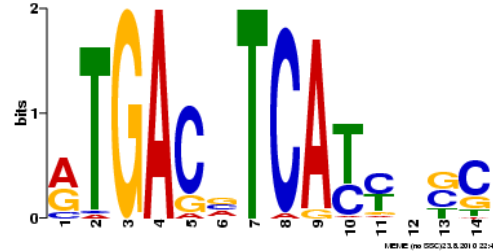


図 1

次に、腹腔常在性マクロファージを用いて同様の解析を行った。マウス全ゲノムを網羅するゲノムタイリングアレイを用いて解析した結果、4,217 ヶ所の ATF-7 結合領域を同定した。この結果の信頼性については、結合領域と非結合領域の ChIP-qPCR 解析及び、ATF-7 K.O.由来のマクロファージを用いた ATF-7 の ChIP-chip 解析により確認した。マクロファージの場合、ATF-7 結合領域の 74%が遺伝子プロモーターに局在しており、結合領域下流の遺伝子活性に影響を与えている可能性が示唆された(図 2)。そこで、ATF-7 結合領域の中から自然免疫系との関係が報告されている遺伝子のプロモーター領域にあるもの(Cxcl2、Ccl3、Stat1、Tlr4 など)をモデル領域とし、今後の解析で注目することにした。

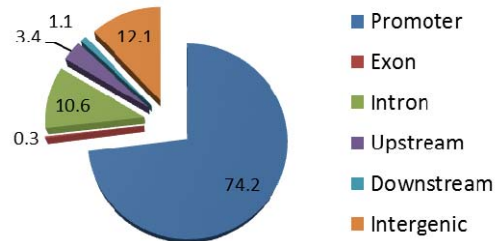


図 2

(2) ATF-7 の転写抑制能の分子解析

まず、これら遺伝子発現量を野生型、ATF-7

K.O.由来マクロファージで比較したところ、K.O.では有意に上昇していることが分かった。このことから、過去のハエでの報告通り ATF-7 がマウスマクロファージにおいても遺伝子活性を負に制御していることが分かった。次に、ATF-7 が遺伝子活性を抑制している分子メカニズムを明らかにするため、ATF-7 結合領域のヒストン修飾状態を調べることにした。発現アレイ解析により野生型・ATF-7 K.O.マクロファージの発現プロファイルを調べたところ、ATF-7 が結合している遺伝子は野生型で、ある程度発現しており、ATF-7 K.O.ではさらに亢進しているという傾向が見られた(上記 4 遺伝子を含む)。このことから、ATF-7 はユークロマチン領域に存在するプロモーターの転写活性を抑制している可能性が考えられた。そこで、ユークロマチン領域を不活性化するエピジェネティックマーカーの一つとして知られている H3K9ジメチル化の状態を調べた。すると、K.O.マクロファージでは、ATF-7 結合領域の H3K9me2 レベルが野生型と比較して 50%前後まで減少していることが分かった。そこで、H3K9me2 を誘導するヒストンメチル化酵素 G9a と ATF-7 との物理的相互作用について、マクロファージ培養細胞 J774 を用いた共免疫沈降法により検討したところ、ATF-7 との相互作用が観察された。さらに、大腸菌由来の ATF-7 の各断片タンパク質を用いて GST-pulldown 解析を行った結果、G9a は ATF-7 の bZip ドメインと相互作用することが分かった。

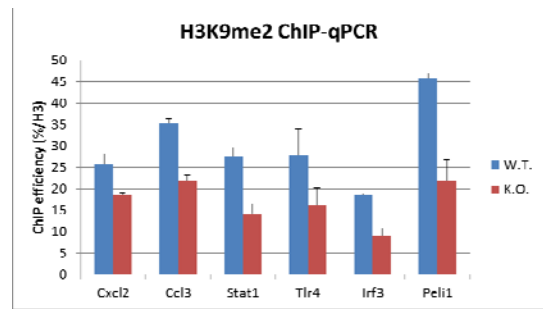


図 3

(3) 自然免疫刺激時の ATF-7 の動態変化

ハエでは、ストレスが加わると p38MAPK が活性化され、リン酸化された ATF-7 が染色体上から解離することが知られている。同様の現象がマウスマクロファージで観察されるか調べるため、強力な p38 活性化剤として知られている免疫アジュバント LPS マクロファージを処理し、その後の ATF-7 の染色体結合量を解析した。その結果、LPS 処理後では ATF-7 の染色体結合量が最大で 20%まで減少した。この実験は、未処理を含む 4 種類の LPS 濃度で処理を行い、LPS 濃度に伴って ATF-7 結合量の減少が観察された。同時に、この時の H3K9me2 レベルについて調べると、LPS 処理後では有意に低下していることが分かった。これらの結果から、マウスでは免疫ストレスにより ATF-7 の染色体結合が外れ、染色体のエピジェネティック制御を制御していることが分かった。

次に、マクロファージで免疫刺激後に ATF-7 結合領域の H3K9me2 レベルが変化するように、生殖細胞でも同様の現象が見られるかどうか、検討した。マウスに LPS を腹腔投与し、その後のマクロファージ及び精巣細胞での ATF-7 結合量を調べた。PBS 投与マウスと比較して、マクロファージでは ATF-7 結合量が減少するのに対して、精巣細胞では ATF-7 結合領域によって結合量が増減することが分かった。従って、これら結合領域を

ロモーターに持つ遺伝子については、生殖細胞のATF-7結合領域のエピジェネティック変化を通じて、次世代に影響を継承する可能性が示唆された。

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)

〔学会発表〕(計 1件)

①吉田 圭介、ATF-7は炎症の抑制因子として機能する、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、パシフィコ横浜(神奈川県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 圭介 (YOSHIDA KEISUKE)

独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：80587452