

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370079

研究課題名(和文) 転写メディエーターを介したシグナル伝達制御の研究

研究課題名(英文) Research on signal transduction via transcriptional mediators

研究代表者

石井 俊輔 (Ishii, Shunsuke)

独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・上席研究員

研究者番号：00124785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)： 転写コリプレッサー Ski が TRIM27 に結合すること、TRIM27は USP7 と複合体を形成し、脱ユビキチン化に参与することを見出した。TRIM27は poly(I-C) などの刺激により核内に移行することが示され、Ski のユビキチン化が TRIM27 を介して、特異的シグナル依存的に制御されることが示唆された。

転写アダプター Shn-2 の KO マウスでは、胸腺での T 細胞の分化が阻害される。Shn-2 の複数部位が O-GlcNAc 化され、その核移行が、制御されることが示唆された。Shn-2 が T 細胞受容体 遺伝子上に局在し、allelic exclusion に参与することが示された。

研究成果の概要(英文)： We found that corepressor Ski binds to TRIM27, and that TRIM27 contributes to deubiquitination via forming a complex with USP7. It was found that TRIM27 enters into the nucleus in response to poly(I-C) stimulation, suggesting that Ski ubiquitination may be regulated by TRIM27 in response to specific signaling.

In knockout mice of transcriptional adaptor Shn-2, T cell differentiation in thymus is blocked. It was found that Shn-2 is modified by O-GlcNAc at several sites which modulates nuclear entry of Shn-2. It was demonstrated that Shn-2 is localized on the T-cell receptor beta gene locus, and modulated allelic exclusion.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：転写メディエーター シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

特異 DNA 配列に結合する転写因子の活性は、どのような転写メディエーターに結合するかにより制御されている。転写メディエーターには、転写活性化を仲介するコアアクティベーターと、転写抑制を仲介するコリプレッサーがあり、これまでに多様な因子が同定されている。またこれらの転写メディエーターの中には、ヒストンのアセチル化やメチル化などの化学修飾に関与し、エピジェネティック制御に関与するものもある。最近の研究により、転写メディエーターの機能が特異的シグナルによって制御され得ることが示されているが、「転写メディエーターを介したシグナル制御」は未解明の部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、コリプレッサー Ski に結合する因子の機能、特にシグナル伝達経路との関連を解析し、Ski の制御メカニズムを探る。また、私達が同定した BMP シグナル依存的な転写メディエーター Shn-2 がどのようなメカニズムで機能するかを研究する。

3. 研究の方法

Ski や Shn-2 に結合する因子を、酵母 Two-hybrid スクリーニング法を用いて探索する。また FLAG と HA の 2 種類のタグを付けた Ski と Shn-2 を発現する HeLa 細胞株を作製し、大量培養し、抗 FLAG、抗 HA 抗体を用いて複合体を精製し、構成因子を質量分析で解析する。結合因子の生理機能を理解するため KO マウスを作製し、その異常を解析する。また Shn-2 の結合遺伝子を解析するため、ChIP-on-chip 法を用いてゲノムワイドな分布を解析する。

4. 研究成果

Two-hybrid スクリーニング法を用いて、転写コリプレッサー Ski に結合する因子とし

て、RBCC (RING finger-B-box-Coiled-coil) モチーフを有する TRIM27 を見出した。TRIM27 の生理機能を明らかにするため、TRIM27 変異マウスを作製・解析した。マウスに TNF- α /GalN を投与すると、肝障害が誘導されるが、TRIM27 変異マウスでは、野生型マウスに比べ、肝障害の程度が弱かった。さらにマウス線維芽細胞では、TNF- α /CHX により誘導されるアポトーシスの程度が、野生型細胞に比べ低いことが示され、TRIM27 は TNF- α によるアポトーシスを正に制御することが分かった。TNF- α によるアポトーシスは複合体 II に依存し、RIP1 からの脱ユビキチンは、複合体 II の形成に必須であることがすでに示されている。TRIM27 の役割をさらに詳細に解析した所、1) TRIM27 は脱ユビキチン化酵素 USP7 をユビキチン化し、その活性を活性化すること、2) 活性化された USP7 は RIP1 からユビキチンを除去することが示された。以上の結果から、TRIM27 は USP7 を介して、RIP1 の脱ユビキチン化を促進することにより、TNF- α によるアポトーシスを正に制御することが示された。TRIM27 は Poly(I-C) 刺激などの特異的刺激により、細胞質から核内へ移行し、核内でも USP7 と複合体を形成することを見出した。この結果から、TRIM27 は核内でコリプレッサー Ski などのユビキチン化・脱ユビキチン化を制御する可能性が示唆された。

私達が同定した転写アダプター Shn-2 は、BMP シグナル依存的に核内へ移行し、一群の遺伝子の転写活性化に関与する。また、Shn-2 ノックアウトマウスでは、胸腺での T 細胞の分化が、Double-positive から Single-positive への Positive selection の段階で停止している。Shn-2 の作用メカニズム、特に特異的シグナルとの関連を明らかにするため、Shn-2 を含む複合体を精製し、その構成因子として、多くのタンパク質の O-GlcNAc 化に関与する O-GlcNAc transferase (OGT) を同定した。ま

た、Shn-2タンパク質内の複数部位がOGTによりO-GlcNAc化されることが示された。Jurkat T細胞に野生型Shn-2を発現させると、そのほとんどは細胞質に局在するが、O-GlcNAc化部位に変異を導入した変異体は、核内に局在することが分かり、Shn-2の核-細胞質移行が、O-GlcNAc化により制御されることが示唆された。さらに野生型とShn-2ノックアウトマウスから調製した DP-T細胞を比較すると、Shn-2欠損T細胞ではアポトーシスが異常に亢進しており、そのためPositive selectionが正常に進行しないことが示された。さらに、DP-T細胞を用いたChip-on-Chip 法により、Shn-2が直接結合している遺伝子をゲノムワイドに解析した。その結果、Shn-2 は T細胞受容体β (TCRβ) 遺伝子上に局在することが分かった。また、OVA 特異的 TCRβ 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス D011.10 では、endogenousな TCRβ 遺伝子の発現は抑制されている (allelic exclusion) が、Shn-2ノックアウトマウスでは、allelic exclusion が阻害されていることが示された。これらの結果は、Shn-2 がTCRβ 遺伝子上に局在し、そのクロマチン構造を制御していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計13件)

1. Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Huynh LM, Sivaraman P, Kumarevel T, Inoue K, Nakato R, Katou Y, Sado T, Takahashi S, Ogura A, Shirahige K & Ishii S (2014). Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14, 217-227. doi: 10.1016/j.stem.2013.12.015. 査読有
2. Zaman MM, Nomura T, Takagi T, Okamura T, Jin W, Shinagawa T, Tanaka Y & Ishii S (2013).

Ubiquitination-deubiquitination by the TRIM27-USP7 complex regulates TNF- α -induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 33, 4971-4984. doi:

10.1128/MCB.00465-13. 査読有

3. Zaman MM, Shinagawa T & Ishii S (2013). Trim27-deficient mice are susceptible to streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Open Bio.* 4, 60-64. doi: 10.1016/j.fob.2013.12.002. 査読有
4. Seong KH & Ishii S (2013). Su(fu) switches Rdx functions to fine-tune hedgehog signaling in the *Drosophila* wing disk. *Genes Cells* 18, 66-78. doi: 10.1111/gtc.12018. 査読有
5. Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H, Umemori J, Toyama K, Nakamura HK, Kuroiwa M, Maeda J, Atsuzawa K, Esaki K, Yamaguchi S, Furuya S, Takagi T, Walton NM, Hayashi N, Suzuki H, Higuchi M, Usuda N, Suhara T, Nishi A, Matsumoto M, Ishii S & Miyakawa T. (2013). Deficiency of schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38, 1409-1425. doi: 10.1038/npp.2013.38. 査読有
6. Kanei-Ishii C, Nomura T, Egoh A & Ishii S (2012). Fbxw5 suppresses nuclear c-Myb activity via DDB1-Cul4-Rbx1 ligase-mediated sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 426, 59-64. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.032. 査読有
7. Seong KH, Maekawa T & Ishii S (2012). Inheritance and memory of stress-induced

- epigenome change: roles played by the ATF-2 family of transcription factors. *Genes Cells* 17, 249-263. doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01587.x. 査読有
8. Staton TL, Lazarevic V, Jones DC, Lanser AJ, Takagi T, Ishii S & Glimcher LH (2011). Dampening of death pathways by Schnurri-2 is essential for T cell development. *Nature* 472, 105-109. doi: 10.1038/nature09848. 査読有
 9. Seong KH, Li D, Shimizu H, Nakamura R & Ishii S (2011). Inheritance of stress-induced, ATF-2-dependent epigenetic change. *Cell* 145, 1049-1061. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.029. 査読有
 10. Nagao M, Saita Y, Hanyu R, Hemmi H, Notomi T, Hayata T, Nakamoto T, Kaneko K, Kurosawa H, Ishii S, Ezura Y & Noda M (2011). Schnurri-2 deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy. *J Cell Physiol.* 226, 573-578. doi: 10.1002/jcp.22521. 査読有
 11. Hou X, Omi M, Harada H, Ishii S, Takahashi Y & Nakamura H (2011). Conditional knockdown of target gene expression by tetracycline regulated transcription of double strand RNA. *Dev Growth Differ.* 53, 69-75. doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01229.x. 査読有
 12. Egoh A, Kanesashi S, Kanei-Ishii C, Nomura T & Ishii S (2010). Ribosomal protein L4 positively regulates activity of a *c-myc* proto-oncogene product. *Genes Cells* 15, 829-841. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01421.x. 査読有
 13. Seong KH, Akimaru H, Dai P, Nomura T, Okada M & Ishii S (2010). Inhibition of the nuclear import of cubitus interruptus by roadkill in the presence of strong hedgehog signal. *PLoS One* 5, e15365, 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0015365. 査読有
- [学会発表] (計 9 件)
1. Zaman MM, Nomura T, Takagi T, Okamura T, Jin W, Shinagawa T, Tanaka Y, Ishii S: Ubiquitination-deubiquitination by the TRIM27-USP7 complex regulates TNF- α -induced apoptosis、第36回日本分子生物学会年会、神戸、12月4日 (2013)
 2. Ishii S: Inheritance of stress-induced epigenome changes, Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprograming Asia-2013 Meeting, University of Tokyo, Tokyo, November 25-26 (2013).
 3. Ishii S: Inheritance of stress-induced chromatin alterations, Gordon Conference on Epigenetics: Mechanisms and Implications, Bryant University, Smithfield, RI, USA, August 5-8 (2013).
 4. 宮川剛, 高雄啓三, 萩原英雄, 大平耕司, 昌子浩孝, 服部聡子, 小清水久嗣, 梅森十三, 高木豪, 石井俊輔: Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia、第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月12日 (2012)
 5. Ishii S: Role of ATF-2 family transcription factors in inheritance of epigenetic change induced by stress, Joint Meeting of the 45th JSDB & the 64th JSCB, Kobe Convention Center, Kobe, May 28-30 (2012)
 6. Ishii S: Inheritance of stress-induced epigenome change: research using fly and

mouse, The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Pacifico Yokohama, Yokohama, December 13-16 (2011).

7. 高木豪, 石井俊輔 : Positive selection に必要な転写因子 Schnurr-2 の chip on chip 法を用いた解析、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 9 日 (2010)
8. 野村照明、Zaman MM、石井俊輔 : Analysis of relationship between TRIM27 and USP7 through ubiquitination and deubiquitination、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 8 日 (2010)
9. Ishii S: Epigenetic regulation by ATF-2 family of transcription factors in response to various stresses, Symposium on “Epigenetic inheritance and genome reprogramming”, The 62nd Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Osaka International Convention Center, Osaka, Japan, May 19-21 (2010).

[その他]

ホームページ等

<http://rtcweb.rtc.riken.jp/lab/mg/mg.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 俊輔 (ISHII SHUNSUKE)

独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・上席研究員

研究者番号 : 00124785