

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23657085

研究課題名（和文） 時計蛋白質BMAL1によるクロマチンダイナミクス制御機構及び生理機能の解明

研究課題名（英文） Role of circadian regulator BMAL1 in chromatin remodeling

研究代表者

平山 順 (HIRAYAMA JUN)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：90510363

研究成果の概要（和文）：クロマチンはコアヒストン各2分子と約147bpのDNAから構成されるヌクレオソームを基本単位とする。この機能はヒストンの化学修飾を介して調節されるが、この過程はクロマチンリモデリングと呼ばれる。また、コアヒストンをヌクレオソームに組み入れる過程はDepositionとよばれ、ヒストンシャペロンにより調節される。概日リズムは生体の生理機能の周期を外環境に適応させ恒常性を維持する生命現象であり分子時計と呼ばれる転写機構により制御されているが、特にBMAL1は分子時計の重要な制御因子である。一方細胞死制御因子DAXXは近年DAXXが新規のヒストンH3.3のシャペロンとして機能することが報告されている。研究代表者はDAXXを新規のBMAL1結合因子として同定しており、本研究は特にChIP解析を用いて、分子時計により制御される遺伝子のプロモーター上に時間依存的にヒストンH3.3がDepositionされることを見出した。さらに、研究代表者はこのヒストンH3.3のDepositionとDAXX:BMAL1複合体形成が同じタイミングで観察されることを見出した。これらの知見は、DAXX:BMAL1複合体が時間依存的にヒストンH3.3を分子時計の標的遺伝子のプロモーター上にDepositionすることで、転写を調節することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Chromatin, the nucleoprotein structure into which the eukaryotic genome is organized, enables essential biological processes such as regulation of transcription. A variety of remodeling events enable the architecture of chromatin to transition between a condensed and a decondensed state, each state being coupled to specific cellular functions. The covalent modifications occur on the N-terminal tails of the core histones H2A, H2B, H3 and H4. Several histone modifications contribute to chromatin remodeling and thereby to the control of a large array of nuclear processes. In addition, the disposition of the tails renders these domains accessible to modifications that could reversibly modulate chromatin structure. Although the death domain-associated protein DAXX has traditionally been associated with the regulation of cell death pathways, recent studies have demonstrated that DAXX can function as a histone chaperone.

Circadian clocks are intrinsic, time-tracking systems that endow organisms with a survival advantage. In mammals, the transcription factors, BMAL1, is an essential circadian regulator. I have identified BMAL1 as a novel DAXX-interacting protein. This study provides several lines of evidence indicating that DAXX-BMAL1 interaction may have important roles in dynamic changes in chromatin transitions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：概日リズム、DAXX、クロマチン、BMAL1、ヒストン、シャペロン、時計蛋白質

1. 研究開始当初の背景

真核細胞は、DNA 高次構造であるクロマチンを有し遺伝情報を安定に維持することで、細胞機能を健全に調節している。クロマチンはコアヒストン(H2A, H2B, H3, H4)各2分子と約147bpのDNAから構成されるヌクレオソームを基本単位とする。“ヌクレオソームの形成・維持”とクロマチンリモデリングに概日リズムを制御する分子時計が関与することを強く示唆する知見が以下の通り報告されている。

概日リズムは生体の多様な生理機能を制御する生命現象であり、分子時計と呼ばれる細胞自律的な機構により制御されている。分子時計は時計蛋白質 CLOCK 及び BMAL1 が形成する二量体を主要構成因子とする約24時間の周期性をもつ転写制御機構である。分子時計に関して、時計蛋白質 CLOCK がヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) を有し、クロマチンリモデリング因子として機能すること、また CLOCK がその HAT 活性により BMAL1 を時間依存的にアセチル化することで分子時計を制御することが報告されている。さらに、DNA 損傷応答や老化等と関連する NAD⁺依存的な脱アセチル化酵素 SIRT1 が分子時計により制御される遺伝子の発現調節領域においてヒストン及び BMAL1 を脱アセチル化し CLOCK と拮抗的に機能することが知られている。

細胞死制御因子 DAXX は、哺乳動物においてアポトーシスの制御に関与することが広く知られている。興味深いことに、DAXX が新規のヒストンシャペロンとして機能することが複数のグループから報告された。一方で、研究代表者は質量分析法を用いたスクリーニングにより DAXX を BMAL1 結合因子として同定し、DAXX が分子時計調節因子として機能することを見出した。これらの知見は、BMAL1 が DAXX と協調的に働きヌクレオソームの形成・維持に関与することを支持する。

2. 研究の目的

本研究は、特に BMAL1 と DAXX の相互関連に注

目し「分子時計によるヌクレオソームの形成・維持、さらにクロマチンダイナミクス制御」の分子メカニズムを深索することを目的に行った。特に、分子時計の主要制御因子である BMAL1 がヌクレオソーム形成・維持因子として機能することを証明し、「クロマチンダイナミクス調節因子としての概日リズムの機能」という新規の概念を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と遺伝子導入

マウス繊維芽細胞 (MEF)、NIH3T3 細胞、293T 細胞、293gag 細胞は 10%のウシ胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) 中で培養した。培養細胞への遺伝子導入には FuGENE HD (Roche) 又はレトロウイルス感染法を用いた。

(2) レトロウイルス感染

培養細胞への感染実験は RetroMax expression system (IMGENEX, San Diego, CA) を用いて参考文献に従って行った。pCLNCX レトロウイルスベクター (7 μg) とエンベロープベクター pMD.G/vsv-g (3 μg) を 293gag 細胞に遺伝子導入しレトロウイルスを産生させた。レトロウイルスを含む培地を回収し、ポリブレン存在下で目的細胞にレトロウイルスを感染させた。

(3) 共免疫沈降

phosphate-buffered saline (PBS) で培養細胞を洗い、Binding buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % Nonidet P-40, 1 mM EGTA, 5 % glycerol 20 mM Tris-HCl pH 7.4 protease inhibitor mixture tablet) で細胞を回収し 10 分間 15,000 x g で遠心した。遠心後、上清を回収し 15 μl の protein G-agarose beads (Amersham Biosciences) を加え 1 時間 4 °C で穏やかに混和した。再び 1 分間 3000 x

g で遠心した後上清を回収し、Flag 抗体と 20 μ l の protein G-agarose bead. を加え 12 時間 4 $^{\circ}$ C で穏やかに混和した。その後、Binding buffer で 3 回 protein G-agarose beads を洗い、SDS sample buffer を加え 100 $^{\circ}$ C で 5 分間サンプルを加熱した。サンプルをウエスタンブロッティング法を用いて解析した。

(4) その他の分子生物学・生化学的解析

Western Blot, ChIP, In vitro スクレオソーム解析は参考文献にしたがって行った。(Hirayama Jun et al. Nature 2007, Hirayama Jun et al. PNAS 2007, Nakahata Yasukazu et al Cell 2008)

4. 研究成果

スクレオソームを構成するコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) には様々なバリエーションが存在し、バリエーションの組み合わせを変えることにより多様な細胞機能を制御している。特に、ヒストン H3 のバリエーションである H3.3 は転写活性化と相関するが、DAXX はヒストン H3.3 に特異的なヒストンシャペロンとして機能することが報告されている。本研究は、ChIP 解析を用いて、分子時計により制御される *Dbp* 遺伝子のプロモーター上に時間依存的にヒストン H3.3 が Deposition されることを見出した。さらに研究代表者は、培養細胞の分子時計を DEX により同調し時間依存的な DAXX : BMAL1 複合体形成を免疫共沈法により解析した結果、DAXX : BMAL1 複合体形成が時間依存的に制御されることを見出した。興味深いことに、*Dbp* 遺伝子のプロモーター上へのヒストン H3.3 の Deposition と DAXX : BMAL1 複合体形成が同じタイミングで観察された。これらの知見は、DAXX : BMAL1 複合体が時間依存的にヒストン H3.3 を分子時計の標的遺伝子のプロモーター上に Deposition することで、転写を調節することを強く示唆している。「細胞内のヒストンの Deposition の日周性」という現象は非常に興味深くその生物学的な意義の解明は、新しい原理の発展や斬新な理論の提唱に貢献することが期待され

る。さらに、分子時計の転写制御、すなわち概日的な遺伝子発現、は転写因子 CLOCK:BMAL1 二量体の活性調節に依存すると現在まで考えられてきた。DAXX : BMAL1 複合体に依存的したヒストン H3.3 の Deposition による遺伝子の転写制御という概念は、概日的な遺伝子発現調節の新規の分子機構を提唱につながる可能性を有する。

時計蛋白質の変異マウスは、概日リズムの異常に加えて、精神疾患 (躁病)、脂肪代謝異常等の表現型を示すことが報告されている。特に BMAL1 の変異マウスは老化や発癌の表現型を示す。これらの事実は、時計蛋白質の制御異常が様々な疾患と関連していることを示唆する。哺乳動物の分子時計は全ゲノム上の約 10% の多様な遺伝子の転写制御を担うことが報告されており、時計蛋白質変異マウスの表現型は分子時計の転写制御の破綻に起因すると考えられている。しかし、BMAL1 と二量体を形成し分子時計において転写活性化因子として機能する CLOCK の変異マウスは BMAL1 変異マウスの老化や発癌の表現型を示さない。この事実は、時計蛋白質 BMAL1 が分子時計以外の機構を介して老化又は発癌に関与する細胞機能の制御を担うことを支持している。BMAL1 のスクレオソームの形成・維持の制御の分子メカニズムの理解は、BMAL1 の変異マウスで観察される老化や発癌等の疾患の病態解明、さらに時計蛋白質の新規の細胞機能制御における役割の同定に貢献することが期待される。

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 4 件)

(1) Uchida Y, Osaki T, Yamasaki T, Shimomura T, Hata S, Horikawa K, Shibata S, Todo T, Hirayama J^{*}, and Nishina H. Involvement of the stress kinase Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 7 in the regulation of mammalian circadian clock. *J. Biol. Chem.* 2012;287, 8318-8326. (*Corresponding author)

(2) Uchida Y, Shimomura T, **Hirayama J***, Nishina H. Light, reactive oxygen species, and magnetic fields activate ERK/MAPK signaling pathway in cultured zebrafish cells. *Appl. Magn. Reson.* 2012; 42: 69-77. (*Corresponding author)

(3) Osaki T, Uchida Y, **Hirayama J***, and Nishina H. Diphenyleneiodonium chloride, an inhibitor of NADPH oxidase, suppresses light-dependent induction of clock and DNA repair genes in zebrafish. *Biol. Pharm. Bull.* 2011; 34: 1343-1347 (*Corresponding author)

(4) Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, **Hirayama J**, Amin RH, Granneman JG, Piomelli D, Leff T, Sassone-Corsi P. PER2 Controls Lipid Metabolism by Direct Regulation of PPAR γ . *Cell Metab.* 2010; 12: 509-520.

[学会発表] (計 4 件)

(1) **Hirayama J**, Light-dependent transcription of circadian clock [Developmental Biology Seminar in University of Bath / November 2011, Bath, UK]

(2) **Hirayama J**, Shimomura T, Osaki T, Nishina H Identification of novel kinase phosphorylating CRYPTOCHROME 1 to regulate its protein stability [5th Asia and Oceania Conference for Photobiology/ July 2011, Nara, Japan]

(3) **Hirayama J**, Osaki Tomomi, Nishina H Light-dependent regulation of zebrafish circadian transcription [Spin Chemistry Meeting 2011 / May 2011, Noordwijk, Netherlands]

(4) **平山順** 細胞死制御因子 DAXX による分子時計制御[日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム/金沢国際がん生物学シンポジウム /2011 年 5 月 金沢]

[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
<http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/index.htm>
1

6. 研究組織
(1) 研究代表者
平山 順

研究者番号 : 90510363

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :