

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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24657084

研究課題名（和文）概日リズム制御因子によるヌクレオソーム形成・維持の分子機構及び生理学的意義の解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism and physiological roles of the formation and maintenance of nucleosome by circadian regulator.

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）：

概日リズムとは、睡眠/覚醒やホルモン分泌といった生命現象に観察される約24時間周期の変動であり、生物に内在する分子時計により形成される。分子時計は一連の時計蛋白質により構成され、細胞自律的に制御されている。本研究の目的は、主要な時計蛋白質の一つであるBMAL1によるヌクレオソーム形成・維持の分子メカニズムに注目し解析を行った。本研究は、(1)分子時計標的遺伝子のプロモーターへのヒストンH3.3が日周期的にDepositionされること、(2)この周期的なH3.3のDepositionがBmal1を機能抑制した細胞において阻害されることを見出した。これらの知見は、BMAL1がヒストンH3.3のDepositionの日周性形成に寄与することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Circadian clocks constitute ubiquitous processes that regulate various biochemical and physiological events occurring with a 24 hour periodicity. Dysfunction of these circadian rhythms can be the cause of a variety of diseases. The exact timing of this rhythm is established in cell-autonomous molecular clocks, and in mammals, the transcription factors, BMAL1, is an essential regulator of molecular clock. This study provides several lines of evidence indicating that BMAL1 may have important roles in dynamic changes of deposition of the specific histone, namely histone H3.3.

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、クロマチン、時計蛋白質、ヒストンシヤペロン

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。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、ヒストンシヤペロンにより調節される。近年、細胞死制御因子 DAXX は転写制御に関与するヒストン H3.3 に特異的なヒストンシヤ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ている。一方で、申請者は質量分析法を用いたスクリーニングにより DAXX を新規の時計蛋白質 BMAL1 結合因子として同定してきた。また、自身の生化学的解析の結果から BMAL1 が DAXX の機能調節を介して Deposition を制御するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、時計蛋白質 BMAL1 による新規ヒストンシヤペロン DAXX の Deposition 制御に注目し「時計蛋白質によるヌクレオソーム機能調節」の分子メカニズムならび生理学的意義を解明することである。

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 μ g) とエンベロープベクター pMD.G/vsv-g (3 μ g) 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 μ l の protein G-agarose beads (Amersham Biosciences) を加え 1 時間 4 $^{\circ}$ C で穏やかに混和した。再び 1 分間 3000 x g で遠心した後に上清を回収し、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) レポーター遺伝子安定発現培養細胞株の樹立とリアルタイムルシフェラーゼ解析

線形化した mPER2 promoter (1.8kb)-luciferase-pGL3basic 7 μ g と pcDNA3.1 1 μ g を哺乳動物培養細胞に遺伝子導入し、ゲノムにレポーター遺伝子が組み込まれた培養細胞を複数クローン得た。これらの

クローンの中から luciferase 活性の高いクローンを選択し、実験に用いた。

(5) その他の分子生物学・生化学的解析

ウェスタンブロッティング、クロマチン免疫沈降法, In vitor ヌクレオソーム解析は参考文献にしたがって行った。(Nakahata Y et al Cell 2008, Lewis PW et al. PNAS 2010)

4. 研究成果

ヌ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は転写の活性化と関連するが、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。

本研究は、時計遺伝子レポーター発現培養細胞を用いたリアルタイムルシフェラーゼ解析より、siRNAによりヒストンH3.3を機能阻害すると培養細胞の分子時計に依存した遺伝子発現が顕著に抑制されることを見出した(図1A)。また、研究代表者は、クロマチン沈降法を用いて、分子時計の標的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ている(図1B)。さらに本研究は、分子時計標的遺伝子のプロモーターへのヒストンH3.3のDepositionの周期性がBMAL1を機能阻害した細胞内ではコントロール細胞に比較して抑制されることを見出した。

生化学的解析を用いた自身の先行研究により、BMAL1がDAXXのヒストンDeposition活性を促進することを見出していることから、本研究の成果は、時計蛋白質BMAL1がDAXXによるDeposition能を調節することで、時計標的遺伝子のプロモーターへのヒストンH3.3

のDepositionに周期性を与えること、またこの周期的なヒストンH3.3のDepositionが分子時計調節に寄与することを示唆している。

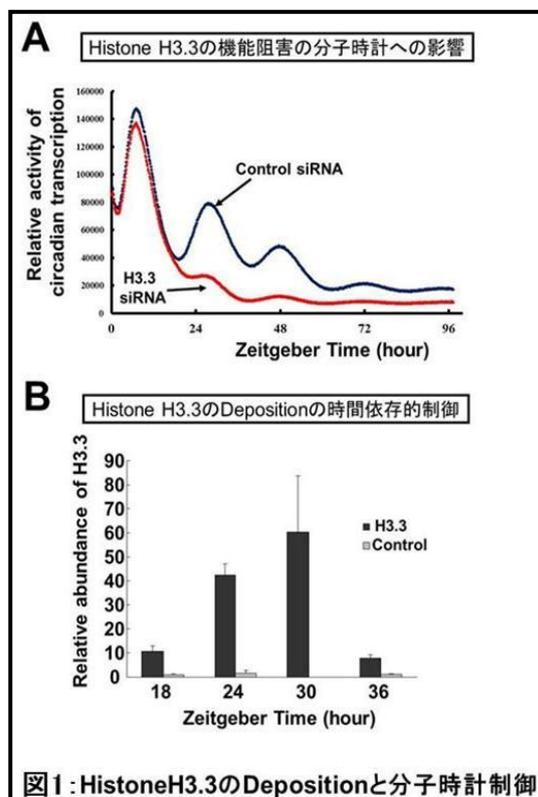


図1: HistoneH3.3のDepositionと分子時計制御

上記の成果に加えて、本研究は、ストレス応答性 JNK シグナル経路の主要構成因子であるキナーゼ JNK が BMAL1 に結合しリン酸化することを見出した。JNK は物理化学的ストレス刺激に応答した MKK7 により活性化され、細胞死や分化などの様々な細胞機能を制御する。特に、本研究では、JNK による BMAL1 のリン酸化には、MKK7 によるリン酸化を介した JNK の活性化が必要であることを支持する知見を得ている。興味深いことに、JNK がクロマチンリモデリング制御因子であることが近年報告されている (Tiwari VK et al. *Nat. Genet.* 2011)。この背景より、今後の研究は、BMAL1 による DAXX の Deposition 制御における JNK の役割に注目し「時計蛋白質によるヌクレオソーム機能調節」の分子メカニズムを深索していく予定である。

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1件)

1. Hata S, Hirayama J, Kajiho H, Nakagawa K, Hata Y, Katada T, Furutani-Seiki M, and Nishina H. A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S_N2 alkylating agents.

J. Biol. Chem. 2012; 287, 22089-22098

[学会発表] (計2件)

1. 平山順

ストレス応答キナーゼによる概日リズム制御 [第19回日本時間生物学会学術大会: 生物時計と時を刻む分子の翻訳後修飾制御 / 2012年9月 札幌]

2. 平山順

ストレス応答キナーゼによる概日リズム制御 [第35回日本分子生物学会年会: DNA損傷応答研究の新境地 / 2012年12月 福岡]

[図書] (計2件)

1. 平山順[#] 時計タンパク質の翻訳後修飾と分子時計制御: *ファルマシア* 48: 285-289 (2012) (#責任著者)

2. 平山順[#]、仁科博史 活性酸素シグナルと概日リズム: *実験医学* 11月増刊号 (2012) (#責任著者)

[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.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

