

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670035

研究課題名(和文) Photo-crosslinkを用いたPPAR δ 転写共役因子複合体の解析研究課題名(英文) Identification of PPAR δ transcriptional complex by photo-crosslinking

研究代表者

田中 十志也(Tanaka, Toshiya)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：20396930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： PPAR δ をモデル転写因子としてクロスリンクを用いたタンパク複合体同定法を検討した。光反応性アミノ酸の添加では細胞毒性が、ホルムアルデヒドにてクロスリンクを行った場合には、PPAR δ の同定率が低下すること、非特異的なタンパク結合の増加が認められた。その一方、PPAR δ のマクロファージ特異的な共役因子として同定したSATB1のshRNAによるノックダウンによりPPAR δ アゴニストによるマクロファージ特異的な標的遺伝子の誘導が減弱することを見いだした。以上の結果より、クロスリンクを用いたプロテオミクスによりPPAR δ の生理的な相互作用タンパクを同定することが可能である。

研究成果の概要(英文)： We have carried out to establish a transcription factor complex identification method combining cross-linking and high-resolution mass spectrometry using PPAR δ as a model transcription factor.

We found photo-reactive amino acids induce cell toxicity. Formaldehyde cross-linking causes decrease in coverage of target protein and increase in non-specific protein binding. Knockdown of SATB1, which is identified as macrophage-specific PPAR δ interact protein, by shRNA reduces macrophage-specific PPAR δ target gene induction by PPAR δ agonist.

These results suggest the possibility of the identification of native PPAR δ transcriptional complex using combination of cross-linking and high-resolution mass spectrometry.

研究分野：核内受容体医学

キーワード：核内受容体 プロテオミクス クロスリンク PPAR

1. 研究開始当初の背景

核内受容体は、発生・分化といった生理的因子あるいは環境因子など種々の刺激に応答してリガンド依存的に遺伝子発現を調節する転写制御因子である。核内受容体の転写活性は、核内受容体タンパク発現量、リン酸化等による翻訳後修飾、リガンド結合、およびコアクチベーターやコリプレッサー等の転写共役因子との相互作用によって制御されている。とりわけ、DNA上に結合した核内受容体にリクルートされる転写共役因子複合体はその酵素活性によりヒストンを翻訳後修飾することでクロマチン構造を制御するという重要な役割を担っていることが明らかになってきた (*Genes & Dev*, 20, 1405(2006))。申請者らは、これまでに核内受容体に対するモノクローナル抗体を系統的に作成し (Tanaka T. et al., *J Atheroscler Thromb*, 9, 233(2002))、内在性のタンパク複合体を免疫沈降して同定する手法 (targeted proteomics) を確立し (Daigo K. et al., *J Biol Chem*, 286, 674(2011))、10 cm² dish 1枚から核内受容体 hepatocyte nuclear factor 4- α (HNF4 α) と相互作用するヒストンアセチル/脱アセチル化、メチル化/脱メチル化などの酵素活性を有する転写共役因子や ATP 依存性リモデリング因子複合体の同定に成功している。また、マクロファージの分化に伴い発現誘導される核内受容体 PPAR δ の targeted proteomics 解析から、PPAR δ が種々の scaffold/matrix attachment regions (S/MARs) 結合タンパク質と複合体を形成すること、リガンド存在下では S/MARs 結合タンパク質に加え special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1) やコヒーシンサブユニット SA-2 (STAG2) と結合することを見いだしている (未発表)。CTCF やコヒーシンは細胞特異的なクロマチンループ構造を制御する因子であること、SATB1 は S/MARs を足場として IL-4 や IL-13 などを含む Th2 サイトカイン locus や major histocompatibility complex (MHC) class-I locus のクロマチンループの形成に関わり組織特異的な遺伝子発現を制御すると報告されている (*Nat Genet*, 38, 1278(2006), *Nat Cell Biol*, 9, 45(2007))。したがって、PPAR δ は S/MARs 結合タンパク質との複合体を形成することでクロマチン構造の変化を誘導してマクロファージ特異的な遺伝子発現を制御すると考えられた。しかし、PPAR δ と相互作用する転写共役因子複合体の種類や構成因子、さらにはどのような順序で転写共役因子複合体が入れ替わることでクロマチン構造を制御し転写を促しているかを明らかにするためには経時的に複合体を同定する手法が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

転写因子による遺伝子発現制御機構を理解するには、転写因子-DNA 相互作用に加え DNA 上で形成される転写共役因子複合体やヒストン修飾に伴うクロマチン構造の変化

を明らかにすることが重要である。本研究では、リガンド依存的に遺伝子発現を制御する核内受容体の一つ peroxisome proliferator-activated receptor- δ (PPAR δ) について、アゴニストによる活性化にともない変遷する転写共役因子複合体を同定する手法を確立する。さらに、クロマチン免疫沈降 (ChIP)-seq、Chromosome Conformation Capture (3C)、chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing (ChIA-PET)、および fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を駆使し、PPAR δ の活性化によって核マトリックスを足場として形成されるクロマチンループ構造を介した転写制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

ネイティブなタンパク質複合体を取り扱うプロテオミクス解析では、過剰発現系とは異なり微量なタンパク質を効率良く濃縮する必要があることに加え、核抽出液調製時の高塩濃度への暴露により結合エネルギーの弱いタンパク質の複合体が形成できなくなること、足場となる応答配列を含む DNA がいないために複合体形成が困難になることが予想される。さらには、PPAR δ の転写共役因子複合体は経時的に変化することも組織あるいはリガンド依存的に形成される複合体の同定を困難にしている。申請者らは、これまでに核内受容体に対する高親和性モノクローナル抗体を作成し、非特異的吸着の少ない磁性ビーズに結合させて、内在性のタンパク複合体を免疫沈降にて回収した後にトリプシン消化し、得られたペプチド混合物をイオントラップ・オービトラップ質量分析装置を装備した HPLC システムにて解析するショットガンプロテオミクス (targeted proteomics) を確立している (Daigo K. et al., *J Biol Chem*, 286, 674(2011))。本手法によりこれまでに我々は、PPAR δ が THP-1 マクロファージにおいて SAF-A, Ku70, Ku86, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1), protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide (PRKDC) といった S/MARs 結合タンパク質や、リガンド依存的に SATB1 や STAG2 などのクロマチンループ形成に関与するタンパクと相互作用することを見いだしている。本研究では、従来の装置よりもさらに高速・高分解能・高感度な Orbitrap ELITE ETD を用い、THP-1 マクロファージにおいてリガンド有無の条件下での PPAR δ 複合体解析を実施する。さらに、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および光反応性の diazirine 環を有する L-photo-Leucine と L-photo-Methionine とを含む培地中 (*Nat Methods*, 2, 261(2005)) にて THP-1 細胞を培養しマクロファージへ分化させた後、リガンド処理し UV (365 nm) 照射することで PPAR δ タンパク複合体を photo-crosslink させる。細胞から得られた核ペレットをソニケーションあるいはエンドヌクレアーゼ処理した後、遠心して得られた上清から PPAR δ タンパク

複合体を免疫沈降させることで、生理的条件下での相互作用タンパク複合体を捕捉、同定する手法を確立する。

4. 研究成果

(1) Photo-crosslink を用いたショットガンプロテオミクス

Tet-off システムにて PPAR δ を発現する HepG2 細胞を用い、光反応性アミノ酸を添加した培養液中にて PPAR δ を誘導した結果、細胞毒性が認められたことから、次に THP-1 細胞を PMA および光反応性アミノ酸を添加した培地でマクロファージ様細胞へと分化させた。しかしながら、THP-1 細胞においても毒性が認められたことから、PPAR δ を光反応性アミノ酸に置換して photo-crosslink することは難しいと判断した。そこで、ホルムアルデヒドを用いたクロスリンクを実施した。その結果、同定率は低下するものの PPAR δ および相互作用タンパクを同定することに成功した。ただし、非特異的なタンパクの同定数も増加した。従って、シグナル/ノイズ比を改善するためのサンプル調製方法、クロスリンク条件、洗浄条件については引き続き検討を行うこととした。

(2) SATB1 の PPAR δ 標的遺伝子発現に及ぼす影響

PPAR δ の THP-1 マクロファージにおける相互作用タンパクとして SATB1 を見いだした。そこで、SATB1 の PPAR δ の機能に及ぼす影響を検討するために、shRNA によるノックダウンを実施した。

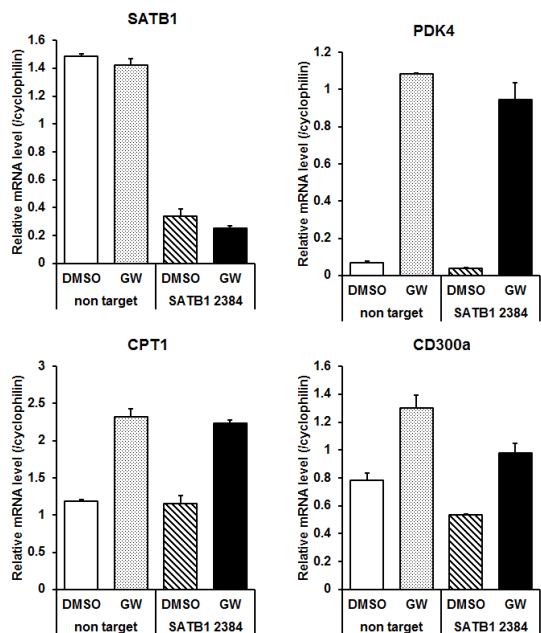


図1 PPAR δ 標的遺伝子の発現に及ぼす SATB1 の影響

その結果、骨格筋やマクロファージにおける PPAR δ 標的遺伝子である PDK4 や CPT1 の発現に及ぼす影響は認められなかったが、PPAR δ のマクロファージ特異的な標的遺伝子として同定した CD300a(Tanaka T. et.al. *Sci Rep*, 4, 5412(2014))の発現を低下させることが明らかとなった(図1)。このことから、

SATB1 は PPAR δ の組織特異的な遺伝子発現を制御することが示唆された。この結果を踏まえ、PPAR δ のゲノム上の結合部位に SATB1 が共局在していることをクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)にて証明するために免疫沈降可能な抗体作成に着手した。

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)

[雑誌論文](計 7 件)

Keisuke Tachibana, Kentaro Takeuchi, Hirohiko Inada, Ken Sugimoto, Kenji Ishimoto, Masanori Yamashita, Takashi Maegawa, Daisuke Yamasaki, Shigehiro Osada, Toshiya Tanaka, Hiromi Rakugi, Takao Hamakubo, Juro Sakai, Tatsuhiko Kodama and Takefumi Doi. Human mannose-binding lectin 2 is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptors via a peroxisome proliferator responsive element. *J. Biochem.*, 154, 265-273 (2013).

DOI: 10.1093/jb/mvt050

Tsuyoshi Inoue, Takahide Kohro, Toshiya Tanaka, Yasuharu Kanki, Guoliang Li, Huay-Mei Poh, Imari Mimura, Mika Kobayashi, Akashi Taguchi, Takashi Maejima, Jun-ichi Suehiro, Akira Sugiyama, Kiyomi Kaneki, Hirofumi Aruga, Shoulian Dong, Junko F Stevens, Shogo Yamamoto, Shuichi Tsutsumi, Toshiro Fujita, Xiaoan Ruan, Hiroyuki Aburatani, Masaomi Nangaku, Yijun Ruan, Tatsuhiko Kodama and Youichiro Wada. Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two response elements. *Genome Biol.*, 15, R63 (2014).

DOI: 10.1186/gb-2014-15-4-r63

Takashi Maejima, Tsuyoshi Inoue, Yasuharu Kanki, Takahide Kohro, Guoliang Li, Yoshihiro Ohta, Hiroshi Kimura, Mika Kobayashi, Akashi Taguchi, Shuichi Tsutsumi, Hiroko Iwanari, Shogo Yamamoto, Hirofumi Aruga, Shoulian Dong, Junko F. Stevens, Huay Mei Poh, Kazuki Yamamoto, Takeshi Kawamura, Imari Mimura, Jun-ichi Suehiro, Akira Sugiyama, Kiyomi Kaneki, Haruki Shibata, Yasunobu Yoshinaka, Takeshi Doi, Akimune Asanuma, Sohei Tanabe, Toshiya Tanaka, Takashi Minami, Takao Hamakubo, Juro Sakai, Naohito Nozaki, Hiroyuki Aburatani, Masaomi Nangaku, Xiaoan Ruan, Hideyuki Tanabe, Yijun Ruan, Sigeo Ihara, Akira Endo, Tatsuhiko Kodama, and Youichiro Wada. Direct Evidence for Pitavastatin Induced Chromatin Structure Change in the KLF4

Gene in Endothelial Cells. PLoS ONE, 9, e96005 (2014).

DOI: 10.1371/journal.pone.0096005

Toshiya Tanaka, Satoko Tahara-Hanaoka, Tsukasa Nabekura, Kaori Ikeda, Shuying Jiang, Shuichi Tsutsumi, Takeshi Inagaki, Kenta Magoori, Takuma Higurashi, Hirokazu Takahashi, Keisuke Tachibana, Yuya Tsurutani, Sana Raza, Motonobu Anai, Takashi Minami, Youichiro Wada, Koutaro Yokote, Takefumi Doi, Takao Hamakubo, Johan Auwerx, Frank J. Gonzalez, Atsushi Nakajima, Hiroyuki Aburatani, Makoto Naito, Akira Shibuya, Tatsuhiko Kodama and Juro Sakai. PPAR β/δ activation of CD300a controls intestinal immunity. Sci. Rep., 4, 5412 (2014).

DOI: 10.1038/srep05412

Takeshi Inagaki, Satoshi Iwasaki, Yoshihiro Matsumura, Takeshi Kawamura, Toshiya Tanaka, Yohei Abe, Ayumu Yamasaki, Yuya Tsurutani, Ayano Yoshida, Yoko Chikaoka, Kanako Nakamura, Kenta Magoori, Ryo Nakaki, Timothy F. Osborne, Kiyoko Fukami, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiko Kodama, and Juro Sakai. The FBXL10/KDM2B Scaffolding Protein Associates with Novel Polycomb Repressive Complex-1 to Regulate Adipogenesis. J. Biol. Chem., 290, 4163-4177 (2015).

DOI: 10.1074/jbc.M114.626929

Yohei Abe, Royhan Rozqie, Yoshihiro Matsumura, Takeshi Kawamura, Ryo Nakaki, Yuya Tsurutani, Kyoko Tanimura-Inagaki, Akira Shiono, Kenta Magoori, Kanako Nakamura, Shotaro Ogi, Shingo Kajimura, Hiroshi Kimura, Toshiya Tanaka, Kiyoko Fukami, Timothy F. Osborne, Tatsuhiko Kodama, Hiroyuki Aburatani, Takeshi Inagaki, and Juro Sakai. JMJD1A is a signal-sensing scaffold that regulates acute chromatin dynamics via SWI/SNF association for thermogenesis. Nat. Commun., 6: 7052 (2015).

DOI: 10.1038/ncomms8052

Sana Raza-Iqbal, Toshiya Tanaka, Motonobu Anai, Takeshi Inagaki, Yoshihiro Matsumura, Kaori Ikeda, Akashi Taguchi, Frank J. Gonzalez, Juro Sakai, and Tatsuhiko Kodama. Transcriptome Analysis of K-877 (a Novel Selective PPAR α Modulator (SPPARM α))-Regulated Genes in Primary Human Hepatocytes and the Mouse Liver. J. Atherosclero. Thromb., In press.

[学会発表](計 6 件)

Toshiya Tanaka, Satoko Tahara-Hanaoka, Tsukasa Nabekura, Shuying Jiang, Shuichi Tustumi, Takeshi Inagaki, Hiroyuki Aburatani, Makoto Naito, Akira Shibuya, Tatsuhiko Kodama and Juro Sakai. PPAR β/δ

activation of CD300a controls intestinal immunity.

Keystone Symposia, Alpbach, Austria, April, 2013

Toshiya Tanaka, Satoko Tahara-Hanaoka, Shuying Jiang, Takeshi Inagaki, Gonzalez Frank J., Hiroyuki Aburatani, Makoto Naito, Akira Shibuya, Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai. PPAR β/δ activation of CD300a controls intestinal immunity.

EMBO Conference Series, Nuclear Receptors: Linking molecules, genomes & physiology, Sorrento, Italy, September, 2013

田中十志也: PPAR β/δ は CD300a の活性化を介して腸管免疫を制御する

第 22 回ステロイドホルモン学会学術集会, 東京, 2014 年 11 月

稲垣毅, 岩崎聡, 松村欣宏, 川村猛, 阿部陽平, 吉田文乃, 中村加奈子, 馬郡健太, 仲木竜, 田中十志也, 児玉龍彦, 油谷浩幸, 酒井寿郎: FBXL10 によるエピゲノム複合体を介した脂肪細胞分化調節機構

第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月

阿部陽平, Royhan Rozqie, 松村欣宏, 川村猛, 仲木竜, 鶴谷悠也, 稲垣(谷村)恭子, 塩野陽, 馬郡健太, 田中十志也, 児玉龍彦, 油谷浩幸, 稲垣毅, 酒井寿郎: JMJD1A のリン酸化スイッチはクロマチンリモデリング因子および PPAR \square と複合体を形成し、クロマチンの高次構造を変化させる

第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月

田中十志也, 田原聡子, Jiang Shuing, 内藤眞, 渋谷彰, 児玉龍彦, 酒井寿郎: PPAR β/δ は CD300a の活性化を介して腸管免疫を制御する

第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月

[図書](計 1 件)

田中十志也、株式会社エルアイシー、脂質代謝異常と関連疾患 < 上巻 > pp86-pp94 (2015)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 十志也 (TANAKA Toshiya)
東京大学先端科学技術研究センター・特任准
教授

研究者番号：20396930

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：