

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840008

研究課題名(和文)核膜による細胞周期・分化依存的転写制御機構の解明

研究課題名(英文)Cell cycle- and differentiation-dependent transcriptional regulation by nuclear envelope

研究代表者

平野 泰弘 (HIRANO, Yasuhiro)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：10508641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は核膜内膜特異的タンパク質ラミンB受容体(LBR)による転写制御機構をゲノムワイドに解明することを通して、核膜による転写制御機構を明らかにすることを目的とした。HL60細胞をレチノイン酸で分化させ、分化前後での遺伝子発現量の変動およびLBRの染色体結合量の変動を網羅的に解析したところ、LBRが細胞外マトリクス関連遺伝子の発現調節を行っていることが示唆された。一方、LBRをノックダウンしたHeLa細胞での遺伝子発現解析においても細胞外マトリクス関連遺伝子の発現変動が見られたことから、核膜が分化などのシグナルに応じて細胞外環境を変化させるという新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I attempted to reveal how the nuclear envelope regulates transcription thorough analyzing the gene regulation mechanism by one of the nuclear membrane proteins, lamin B receptor (LBR), at genome-wide level. I investigated the relationship between the LBR-binding and the transcriptional level of the gene across the whole genome before and after differentiation of HL60 cells by retinoic acid treatment, and found that LBR regulated extracellular matrix-related genes and its pathway. Those genes were also varied in LBR-knocked down HeLa cells. Taken together, those results suggested that the nuclear envelope plays a role to create an extracellular environment in response to a biological signal such as differentiation.

研究分野：生化学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：核膜 ラミンB受容体 転写制御 ヘテロクロマチン 細胞外マトリクス

1. 研究開始当初の背景

細胞は数万の遺伝子の中から細胞周期や分化過程に応じて必要な遺伝子のみを正確に取り出し、厳密にその転写を制御している。このような厳密な転写制御には、核膜や核小体、核マトリクス、核スペckルなどの核内構造体が関与する。特に核膜付近では、核膜内膜特異的タンパク質がつなぎ止めるクロマチン領域(ヘテロクロマチン)は負に、核膜孔複合体付近のクロマチン領域(ユークロマチン)は正に転写が制御されていることが報告されているが、このような部位特異的転写制御メカニズムは未だ不明な点が多い。一方、核膜内膜特異的タンパク質がつなぎ止める遺伝子は常に不活性ではなく、核膜から離れて核内に移動することで再活性化されるダイナミズムも併せ持つ。したがって、核膜がクロマチンのどの部位を、いつ・どのように転写制御しているかは、細胞周期や細胞の初期化、幹細胞からの分化など、細胞の運命決定メカニズムを理解する上でも重要な問題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、核膜内膜特異的タンパク質であるラミン B 受容体 (LBR) による転写制御機構をゲノムワイドに解明することに主眼を置き、その分子メカニズムを通して核膜による転写制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的には以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) LBR の下流で転写制御される遺伝子群の網羅的同定

(2) LBR の転写制御機構の解明

(3) 細胞周期および分化過程におけるクロマチンリモデリング機構の解明

3. 研究の方法

(1) LBR は好中球の分化に必須であることが報告されており、分化特異的な遺伝子群を制御していることが推察される。そこで、好中球分化のモデル細胞である HL60 細胞を用いて、LBR の下流で転写制御される遺伝子群を分化前後で比較しながら、網羅的に同定する。同定した遺伝子群を系統的に解析し、LBR の好中球分化における役割を明らかにする。また血球系細胞以外の細胞とも比較することにより、LBR による転写制御の細胞種依存性の有無を明らかにする。

(2) I で同定された遺伝子群において、転写が LBR によって直接的・間接的に調節されているものに分別し、直接的に調節されている遺伝子周辺のヒストン修飾の状態、LBR が遺伝子の特定の部位に結合するか否か、遺伝子そのものの核内配置を調べることで、LBR の転写制御機構の分子メカニズムを明らかにする。

(3) 核膜直下の遺伝子の転写活性 / 抑制のダイナミクスを明らかにするため、I および II で得られた LBR によって直接的に制御される遺伝子群を lacI-lacO システムにより可視化する。遺伝子の核内配置に注目しながら、好中球分化の全過程を経時観察することにより、クロマチンリモデリングの有無と分化の関係を明らかにする。また、クロマチンリモデリングが起こる場合、それが局所的な変化なのか、巨視的な変化なのかを chromosome painting 法により可視化することで、分化過程におけるクロマチンリモデリングの全容を観察する。

4. 研究成果

(1) LBR は細胞外マトリクス関連遺伝子の転写調節に関わる

LBR により転写制御される遺伝子群を調べるため、好中球分化のモデル細胞である HL60 細胞をレチノイン酸 (ATRA) で処理し、分化誘導を行った。分化前後の HL60 細胞から LBR が結合する染色体領域をクロマチン免疫沈降法により分離し、次世代シーケンサーによりその部位を網羅的に同定した (ChIP-seq, 図 1)。

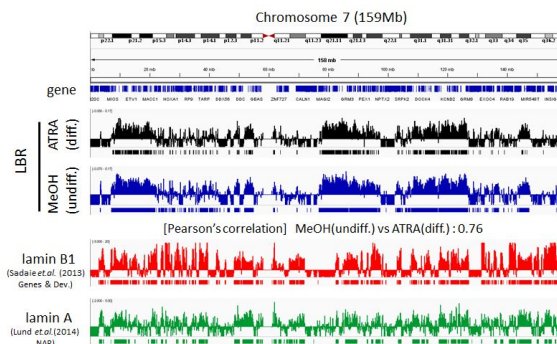


図 1 LBR の染色体結合部位

HL60 細胞の顆粒球への分化前 (上から 2 番目、MeOH)・分化後 (上から 1 番目、ATRA) における LBR の染色体結合部位を ChIP-seq により同定した。ピークが上に出ている部分が結合部位。下二つはそれぞれ B 型ラミン (ラミン B1, Sadaie et al., Genes & Dev. (2013)) と A 型ラミン (ラミン A, Lund et al. NAR (2014)) の染色体結合部位。

LBR は数百 kbp ~ 数十 Mbp という非常に広範な領域で染色体と結合し、分化前後での結合パターンに大きな差は見られなかった。一方、LBR の結合タンパク質で、早老症の原因遺伝子として知られている A 型・B 型ラミンの染色体結合領域とオーバーラップする領域はおよそ半分に止まった。また、LBR の染色体結合パターンは、構成的ヘテロクロマチンに見られるヒストン修飾である H3K9me3 に弱い相関が見られたものの、他のヒストン修飾との相関は見られなかった。これらの結果は、LBR はこれまで報告されている転写抑制

機構とは異なる機構で転写抑制を行っていること、LBR とラミンでは異なる遺伝子群を制御していることを示唆していた。

次に分化前後における各遺伝子発現の変化量を mRNA-seq により網羅的に解析し、その遺伝子における LBR の結合量の変化との相関を調べた (図 2)。

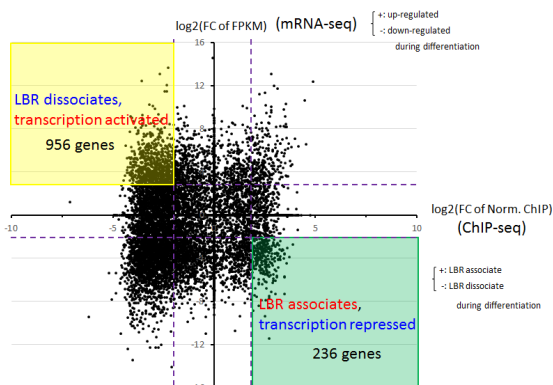


図 2 分化前後における LBR の結合量と遺伝子発現変動
分化前後での各遺伝子の発現量を縦軸、各遺伝子での LBR の結合量の変化を横軸としてプロットした。

これにより分化依存的に LBR が解離することで遺伝子発現が上昇する遺伝子として 956 種、LBR が結合して遺伝子発現が抑制される遺伝子として 236 種を同定した。これらの遺伝子群をジーンオンロジー解析したところ、前者では細胞外マトリクス関連遺伝子が、後者では細胞周期の調節を行う遺伝子が変動していることがわかった。

LBR の転写調節における直接的役割を明らかにするため、LBR の発現を 90%以上抑制した HeLa 細胞株を作製した。この HeLa 細胞株をマイクロアレイを用いて解析したところ、2 倍以上遺伝子発現量が変化したものが 769 種同定された。上記同様、これらの遺伝子群をジーンオンロジー解析したところ、細胞外マトリクス関連遺伝子が変動していた。

(2) 染色体部位特異的生細胞イメージング技術の開発

LBR に結合する染色体部位が細胞分化に伴って転写制御される様子を生細胞内で観察するため、染色体部位を生細胞で観察する技術の開発を行った。計画当初は CRISPR/Cas9 と lacO/lacI システムを用いて染色体の特異的部位を行う予定であったが、目的の細胞株を得ることができなかった。

そこで、Cas9 の DNA 切断活性を欠失させた変異体 dCas9 に GFP を融合させたタンパク質 (dCas9-GFP) を染色体部位特異的なラベルに用いることとした。生細胞観察への最適化を行うため、テロメアを標的的部位とし、

dCas9-GFP の発現量の調節、ガイド RNA の最適化を行い、高い特異性でテロメアを観察できる細胞株を樹立した (図 3)。

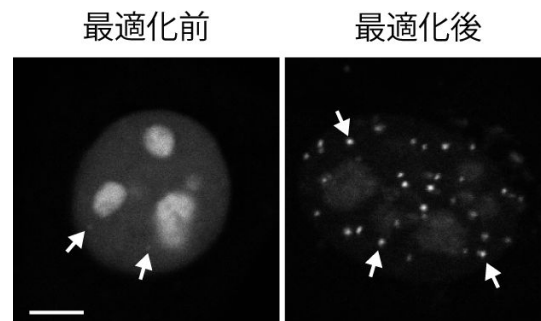


図 3 染色体部位特異的生細胞イメージング技術の開発
dCas9-GFP を用いてテロメアを標識した (矢印)。最適化前は高いバックグラウンドに埋もれてテロメアの観察は困難であったが、最適化後は高い特異性で観察することが可能となった。図中のバーは 5 μm

現在、この細胞株を用いて、(1) で決定した LBR が結合する染色体部位の転写制御メカニズムを検討している。

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 3 件)

Gómez-Saldivar G, Fernandez A., Hirano Y et al. Identification of Conserved MEL-28/ELYS Domains with Essential Roles in Nuclear Assembly and Chromosome Segregation. *PLOS Genet.*, in press (2016) 査読有

Tange Y., Hirano Y (著者 12 人、8 番目) et al. Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. *Genes Cells*, in press (2016) 査読有

Hirano Y, Matsuda A. & Hiraoka Y. Recent advancements in structured-illumination microscopy toward live-cell imaging. *Microscopy*, **64**, 237-249 (2015) 査読有
DOI: 10.1093/jmicro/dfv034

[学会発表] (計 4 件)

平野泰弘、前原一満、近重裕次、森知栄、大川恭行、原口徳子、平岡泰 ラミン B 受容体による転写制御機構のゲノムワイド解析 BMB2015 2015 年 12 月 1 日~4 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

Hirano Y., Maehara K., Chikashige Y. et al.
Genome-wide analysis of the gene regulation
mechanism by lamin B receptor. The nuclear
lamina in health and disease 2015年11月
15日～18日 Baeza (Spain)

Hirano Y., Maehara K., Chikashige Y. et al.
Genome-wide analysis of the gene regulation
mechanism by lamin B receptor International
Symposium on chromatin Structure,
Dynamics and Function 2015年8月23日
～26日 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県
神戸市)

平野泰弘、近重裕次、森知栄、原口徳子、
平岡泰 Lamin B receptor によって制御さ
れる遺伝子群の探索 第31回染色体ワー
クショップ・第12回核ダイナミクス研究
会(2013年11月25日～27日 ホテルお
かだ(神奈川県足柄下郡箱根町)

[図書](計 2件)

平野泰弘、松田厚志 共立出版 新・生
細胞蛍光イメージング 第7章 超分解
能蛍光顕微鏡法 49-58 (2015)

松田厚志、原口徳子、平野泰弘 日本工
業出版 光アライアンス 3月号 31-35
(2014)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hirano/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 泰弘 (HIRANO, Yasuhiro)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：10508641

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし