

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440015

研究課題名(和文) 心筋細胞の増殖分化におけるSUMO化依存的なクロマチン構造変換機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of SUMOylation dependent chromatin remodeling in heart development

研究代表者

小川 英知 (OGAWA, Hidesato)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：20370132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：外的シグナルに応答し細胞の増殖や分化を統合する制御機構の理解は重要であるが不明な点が多い。この制御機構に必須な因子として我々はARIP4を発見し、新たにプロモーター上で細胞周期制御因子E2F6と相互作用することを見出した。ARIP4の複合体を精製したところ、選択的オートファジーのレセプター-p62と複合体を形成していること、細胞外環境に応答してp62依存的にARIP4がオートファジーで分解されることを発見した。本研究は外的環境に応答するクロマチン構造変換を明らかにする上で極めて重要であり、細胞増殖分化とクロマチン構造変換を統合して理解する上で極めて重要な知見だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Transcriptional coregulators contribute to several processes involving nuclear receptor transcriptional regulation. The transcriptional coregulator androgen receptor-interacting protein 4 (ARIP4) interacts with nuclear receptors and regulates their transcriptional activity. In this study, we identified p62 as a major interacting protein partner for ARIP4 in the nucleus. Nuclear magnetic resonance analysis demonstrated that ARIP4 interacts directly with the ubiquitin-associated (UBA) domain of p62. ARIP4 and ubiquitin both bind to similar amino acid residues within UBA domains; therefore, these proteins may possess a similar surface structure at their UBA-binding interfaces. We also found that p62 is required for the regulation of ARIP4 protein levels under nutrient starvation conditions. We propose that p62 is a novel binding partner for ARIP4, and that its binding regulates the cellular protein level of ARIP4 under conditions of metabolic stress.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチン構造変換 核内受容体 転写因子 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

組織において細胞の増殖と分化のタイミングは精巧に制御されているが、増殖と分化は一般に排他的と言われ、分化が進むにつれて細胞の増殖速度が低下することが知られている。これは組織が形作られていく上で極めて重要な仕組みであり、その破綻は癌をはじめとする様々な疾患を引き起こす。このような細胞の増殖や分化の制御には遺伝情報を正確に読み出す機構である転写制御が重要であり、その制御は遺伝配列に加えエピジェネティックなクロマチンレベルでの制御を受けている事が判明してきている。申請者はこの細胞分化過程における細胞増殖制御に興味を持ち、特にそれに関わるクロマチンレベルでの転写制御機構の解明を目指している。本研究の立案に当たってこれまでの研究の経緯として、申請者は細胞周期進行に必須な遺伝子の転写制御を行う E2F ファミリーおよび Myc のファミリーを同一複合体に含み、さらにポリコム因子群、ヘテロクロマチンタンパク質などに加え様々なヒストン修飾関連酵素を保持している巨大複合体 E2F6 複合体の精製に成功した。そしてこの複合体が標的遺伝子プロモーターの転写活性化をクロマチン構造の制御によって抑制し、細胞の停止期を調節することを解明した (Ogawa et al. Science 296 1132-1136, 2002)。生殖腺の大きさや副腎癌の細胞増殖を制御する Ad4BP と呼ばれる核内受容体が、翻訳後修飾である SUMO 化を受けること、その SUMO 化によって転写が抑制されることを見だし、この核内受容体に SUMO 化修飾特異的に結合する新規介在因子 ARIP4 を発見した。ARIP4 は ATP 依存的クロマチンリモデリング因子様の SNF2 ドメインを有し、Ad4BP に加え他の一群の核内受容体に結合し、その標的遺伝子の発現を抑制することを明らかにした (Ogawa et al. Mol Biol Cell. 20(19): 4235-45, 2009)。さらに細胞を用いた ARIP4 のゲノムワイドの解析で、ARIP4 の標的遺伝子をデータベースと

照合した結果、アポトーシス、心筋分化、細胞増殖に関連する遺伝子が多く含まれることが判明した。特に心筋分化関連遺伝子が関与することを踏まえ、心臓特異的な ARIP4 欠損マウスを作製した結果、ARIP4 の欠損によって、心室中隔欠損、心室心筋の肉柱形成異常や心筋層の菲薄化の表現型を示し、これらがヒトの疾患である心筋緻密化障害に酷似した表現型である事が判明した。これらの結果に加え、(1) 多くの ARIP4 結合領域近傍に Myc および E2F の結合配列が存在すること (2) 高感度の質量分析による ARIP4 結合因子の解析では、E2F6 複合体の構成因子 Mga, MBLR および G9a といった因子との相互作用が確認されること (3) ARIP4 が結合する核内受容体 (Ad4BP, LRH-1 や AR) は、細胞種特異的にリガンドなど外界シグナルを受けて細胞周期制御に重要な役割をすることが報告されていること、等の結果を踏まえると ARIP4 は核内受容体に加え、細胞周期進行の抑制に重要な役割を果たす E2F6 複合体と相互作用していることが予想された。さらに ARIP4 が 2 つの SUMO 化修飾認識部位を持つことから、SUMO を楔とした複合体形成を想定できる。すなわち外界シグナルに応答する核内受容体と E2F6 複合体はそれぞれの SUMO 化を介して ARIP4 を中心とした複合体を形成し、それらが協調して細胞周期を制御している可能性が考えられる。これは、ARIP4 を中心とした細胞外からの分化シグナルと細胞周期の制御を統合的に制御する機能複合体の形成を示唆するものである。

2. 研究の目的

組織の形成や未分化細胞の維持、癌化といった現象の解明には細胞の分化と増殖を統合する制御機構の理解が重要である。細胞の分化、増殖は厳密に調節された転写機構によって制御されているが、これら両者の統合的な制御機構については不明な点が多い。この制御機構に必須な転写制御領域のクロマチン構造変換機

構の解析は、分化と増殖のエピジェネティック制御を理解する上でも重要な課題の一つとなっている。我々はSUMO化依存的にクロマチン構造変換するARIP4を発見し、新たにプロモーター上で細胞周期制御複合体 E2F6 複合体と相互作用することを見出した。本研究では細胞周期制御複合体と結合するARIP4の細胞分化過程における分子機構を明らかにすると共にその生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

本申請研究では既に申請者が精製したE2F6 複合体およびARIP4, 両者の関係を以下の計画で解析した。

平成 26 年度の計画

in vitro と培養細胞を用いた生化学的解析で E2F6-ARIP4 の結合を明らかにすると共に、E2F6 と ARIP4 の複合体形成をゲノムワイドに解析した。

平成 27 年度の計画

その知見を基に、ARIP4 複合体の機能解析をすすめた。特にその複合体に含まれる p62 の機能解析を行った。さらにARIP4 複合体が細胞周期に関わる可能性を考え、癌細胞からARIP4 複合体を精製し、網羅的に結合因子を同定した。

平成 28 年度の計画

詳細な細胞の分化過程と細胞の機能維持機構を解析するために、マウス ES 細胞の心筋細胞分化系の経時的な観察によってARIP4の細胞周期と分化における機能を明らかにし、さらに分化後の心筋細胞の拍動に着目しARIP4 とE2F6の相互作用のもつ生理的な意味を解明した。

4. 研究成果

ゲノムワイドなE2F6 とARIP4の複合体の挙動を明らかにするために、培養細胞を用いてゲノムワイドに結合を調べる手法であるChIP-seqを行うと共に、クロマチンの構造変換をゲノムワイドに調べることができるFAIRE-seqを行った。そ

の結果、ARIP4 は全ゲノムに対して約5000箇所以上の結合が見られ、それらの80%以上がプロモーター領域に結合することを見出した。さらにARIP4を欠損させた場合、ARIP4の結合領域の約70%でクロマチンがDNA切断酵素感受性になった。すなわちARIP4がなくなることで標的プロモーター領域のクロマチンが開いていることが判明した(図1)。

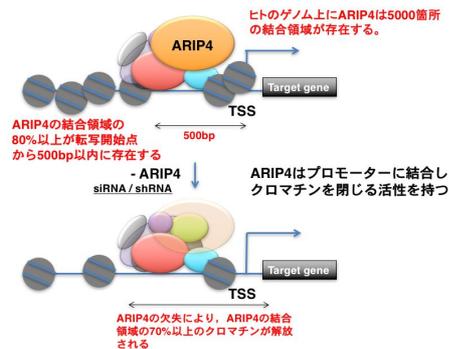


図1 ARIP4抗体を用いたChIP-seqによるゲノムワイドの解析

この結果は、ARIP4がプロモーター領域で遺伝子発現制御に関わると共に、クロマチンを閉じる過程に関わっていることを強く示唆する。またE2F6の標的遺伝子について調べたところ幾つかの遺伝子においてARIP4が特異的に結合していることが判明した。このことからE2F6とARIP4は細胞内で確かに複合体を形成しクロマチン制御を行っていると考えられる。さらにE2F6-ARIP4複合体の調節機構を明らかにする上で、ARIP4の複合体を精製しその構成因子を同定した。その結果構成因子のなかに選択的オートファジーのレセプターとして知られるp62/SQSTM1(p62)が含まれていることが明らかとなった。さらにこのp62を中心に解析を進めたところ(1)細胞外環境に反応してARIP4が選択的オートファジーを介し分解されること、(2)p62のUBA domainとARIP4の内部に含まれる90アミノ酸の領域(SID)が特異的に強く結合すること、

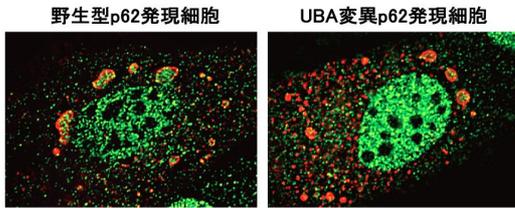


図2 p62はARIP4複合体をオートファジーで分解する。p62 KO MEFへのp62 (赤)の過剰発現によってARIP4(緑)は細胞質のaggresomeに運ぶ。一方UBAの変異体は、ARIP4をaggresomeに運ぶ能力が無い

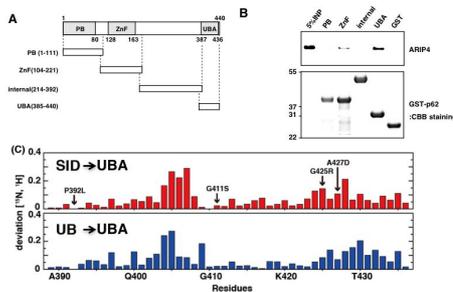


図3 ARIP4はp62のUBAドメインに特異的に結合し、その結合はユビキチンと同様の様式を示す。(A,B) In vitroでARIP4とp62はUBAを介して結合し、(C)そのARIP4とUBAとの結合のケミカルシフトを測定すると、ユビキチンとUBAのそれと非常に似たパターンを示した。この結果はARIP4は分子内にユビキチンと類似の構造を持つことを意味する。

さらに(3) その分解機構が ARIP4 複合体に含まれる p62/SQSTM1 依存的であることを明らかにした(図 2,3)。

これらの結果から、ARIP4 の核内タンパク量は細胞外の環境をモニターしつつ p62 の結合を介して厳密に制御されていることが判明した。興味深いことに p62 を原因とする遺伝子疾患としてパジェット病が知られるが、その疾患変異には UBA domain 上の変異が多く知られている。ARIP4 は核内で UBA domain に強く結合することから、これまで不明であった疾患の原因のなかに ARIP4 が関与する遺伝子発現の異常が含まれている可能性がでてきた。また心筋組織ではストレス環境下においてこの複合体が ARIP4 の分解によって減少するため、標的遺伝子のプロモーター構造が開き遺伝子発現が起きやすい状況が作り出されることを示唆されている。すなわち心臓においてのストレスセンサー複合体として機能する可能性があると考えられる。興味深いことに、E2F6-ARIP4 複合体の調節機構を明ら

かにする上で、様々な細胞から複合体を精製し、その構成因子を同定したところ、アデノウイルスタンパク質を発現している HEK293 細胞から精製した ARIP4 複合体には、アデノウイルスタンパク質が強く結合している事が判明した。さらにそのタンパク質の細胞内局在は p62 依存的であり、直接 p62 に結合することを明らかにした。これらの結果は、ARIP4 複合体がウイルスの標的複合体であることを意味している。一般にウイルスは感染した細胞の増殖や分化、細胞死などを制御するために宿主タンパク質の中でもそれらの制御に重要な因子に強く結合する。すなわち ARIP4 複合体が細胞において増殖および分化の制御に中心的な役割を担っており、そのためにウイルスタンパク質の標的になっていると考えられた。

これらの結果を統合すると、ストレスのセンサーとしても働く ARIP4 複合体は、心臓などの組織において外的環境をモニターし必要に応じて強く発現する必要がある遺伝子のプロモーターを解放し一過的な高い遺伝子発現活性を維持すると考えられる。一方これらのストレス応答機能はウイルスにとっては宿主で生き残るためには統治下におくべき機能であるため、ARIP4 の複合体の p62 を機能不全にすることで、細胞のストレス応答を減弱してウイルスの感染、増殖、潜伏に関して有利に働くように調節しているのだと考えられる。このような点からも、ARIP4 複合体は心筋組織において外的環境をモニターしつつこれらの細胞の増殖分化および細胞死をコントロールする中心的な役割をもつ複合体であることが示唆された。今後ウイルスによる不活性化のメカニズムおよび複合体のプロモーター領域での機能を明らかにすることで、外的因子にตอบสนองしながら細胞の増殖と分化を制御するメカニズムを明らかにできると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Syu JS, Baba T, Huang JY, Ogawa H, Hsieh CH, Hu JX, Chen TY, Lin TC, Tsuchiya M, Morohashi K, Huang BM, Lu FI.

Lysosomal activity maintains glycolysis and cyclin E1 expression by mediating Ad4BP/SF-1 stability for proper steroidogenic cell growth
Scientific Reports accepted, 2017
doi: 10.1038/s41598-017-00393-4.
査読有り

Tsuchiya M, Karim M. R, Matsumoto T, *Ogawa H, *Taniguchi H

A protein preparation method for the high-throughput identification of proteins interacting with a nuclear cofactor using LC-MS/MS analysis.
J. Vis. Exp. (119), e55077, 2017,
doi:10.3791/55077
査読有り

Tsuchiya M, *Ogawa H, Koujin T, Kobayashi S, Mori C, Hiraoka Y, and Haraguchi T

Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells.
FEBS letter 590(16):2671-80, 2016.
doi: 10.1002/1873-3468.12262.
(Corresponding author) 査読有り

Nakamura R, Koshiba-T K, Tsuchiya M, Kojima M, Ogawa H, and Takeuchi-K J

Expression analysis of Baf60c during heart regeneration in axolotls and neonatal mice.
Development Growth and Differentiation 58(4):367-382, 2016.
doi: 10.1111/dgd.12281

査読有り

Tsuchiya M, Isogai S, Taniguchi H, Tochio H, Shirakawa M, Morohashi K, Hiraoka Y, Haraguchi T and *Ogawa H
Selective autophagic receptor p62 regulates the abundance of transcriptional coregulator ARIP4 during nutrient starvation
Scientific Reports 5, 14498; srep14498, 2015
doi: 10.1038/srep14498
(Corresponding author)
査読有り

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 7 件)

分裂酵母における複製開始複合体形成の核内局在による制御
升方 久夫, 小川英知, 浅川東彦, 高橋達郎, 中川拓郎, 平岡泰, 小川志帆
第39回日本分子生物学会年会(2016年11月30日) パシフィコ横浜, 横浜市

心臓運命をプログラムする因子とその発展性
森田唯加, 堀田秋津, Peter Andersen, 小川英知, 吉田善紀, 塚原由布子, 黒川洵子, 相賀裕美子, Sylvia Evans, 西中村隆一, 小柴和子, Chulan Kwon, 竹内純
第 38 回日本分子生物学会年会(2015 年 12 月 4 日) 神戸ポートアイランド, 神戸市

DNA複製開始を制御する高次複合体ダイナミクス: 多様性と普遍性
小川志帆, 中村優太, 高橋達郎, 中川拓郎, 小川英知, 浅川東彦, 平岡泰, 升方久夫
第 38 回日本分子生物学会年会(2015 年 12 月 3 日) 神戸ポートアイランド, 神

戸市

土屋恵, 磯貝信, 谷口浩章, 朽尾豪人,
白川昌宏, 諸橋憲一郎, 平岡泰, 原口徳
子, 小川英知

SUMO化Ad4BP/SF-1に結合する転写制
御複合体の精製と解析
第38回日本分子生物学会年会(2015年12
月2日)神戸ポートアイランド, 神戸市

Ogawa H

Purification and analysis of a
transcriptional-coregulator complex
interacting with sumoylated Ad4BP/SF-1.
2nd International Conference on Advance
Molecular Bioscience & Biomedical
Engineering, Malang, Indonesia Aug
13-15 2015

小川英知, 土屋恵, 原口徳子, 平岡泰
クロマチン構造変換因子のタンパク質
分解経路を介した制御機構
第67回日本細胞生物学会大会,(2015年7
月2日)タワーホール船堀, 東京都

小川(長田) 志帆, 高橋達郎, 中川拓郎,
小川英知, 浅川東彦, 平岡泰, 升方久夫
S期後期複製開始点の時空間的制御機構
第37回日本分子生物学会年会(2014年
11月25日)パシフィコ横浜, 神奈川県横
浜市

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: 核酸導入促進剤

発明者: 小川英知, 土屋恵, 平岡泰, 原口徳
子

権利者: 国立大学法人大阪大学, 国立研究
開発法人情報通信研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2016-006937

出願年月日: 2016年1月18日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 英知 (OGAWA, Hidesato)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授
研究者番号: 20370132

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

竹内 純 (TAKEUCHI, Jun)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
研究者番号: 10451999

(4) 研究協力者

土屋 恵 (TSUCHIYA, Megumi)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教
研究者番号: 00390691