

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670130

研究課題名(和文) 転写環境を再構成したDNAビーズによる転写制御因子同定法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the strategy to purify transcription regulatory complex using immobilized DNA template

研究代表者

高橋 秀尚 (Takahashi, Hidehisa)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30423544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子によって、転写調節領域にリクルートされる転写制御因子の同定法の確立を行った。現在、質量分析計を用いて転写制御因子の同定を行っている。本研究推進によって、転写調節領域マイクロビーズを用いて、メディエーター複合体によって、新規の転写伸長因子複合体Little elongation complex (LEC)がsmall nuclear RNA遺伝子などのプロモーター領域にリクルートされることもわかった。

研究成果の概要(英文)：We performed the purification of transcription regulatory factors using immobilized promoter DNA template. We perform Mass spectrometric analysis to identify transcription regulatory factors. We took advantage of the method and found that novel transcription elongation complex called "little elongation complex (LEC)" is recruited to the snRNA gene promoters by Mediator complex.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：転写制御

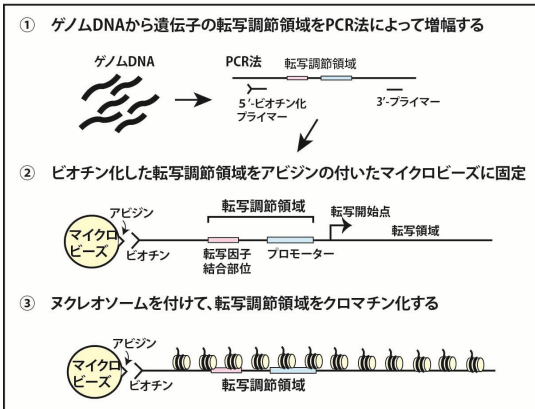
1. 研究開始当初の背景

転写因子によって制御される遺伝子のほとんどはRNAポリメラーゼII(以下Pol II)によってmRNAに転写される。転写の過程は、転写開始、伸長、そして終結の主に3つの過程からなるが、転写因子は特に転写開始において重要な役割を果たす。転写開始の過程で、転写因子は特定のDNA配列に結合すると、クロマチンリモデリング因子やヒストン修飾因子、コアクチベーターなどのさまざまな因子を転写調節領域にリクルートし、それらの働きを利用して転写調節領域のクロマチン構造を解く。その後、転写因子はさらにコアクチベーターなどと共役し、基本転写因子群やPol IIをプロモーター領域にリクルートし、転写開始を促進する。申請者はこれまでに、細胞の核抽出液から転写因子を免疫沈降法により精製し、それと結合する転写制御因子を同定してきた【Takahashi H, et al. Cell 2011】Takahashi H, et al. J Biol Chem 2009】。ところが、遺伝子発現制御に関わる因子のほとんどは、転写調節領域などのDNAあるいはクロマチン上で機能している。そのため、DNA存在下で転写因子を精製することが、転写因子と共に機能する転写制御因子を同定する上で有利であることが判明した。本研究において、申請者はクロマチン再構成した転写調節領域をマイクロビーズに固定化し(以下、クロマチン化転写調節領域マイクロビーズと呼ぶ)、それを用いて転写因子と結合し転写調節領域にリクルートされる転写制御因子を網羅的に同定する方法を確立する。

2. 研究の目的

転写因子による遺伝子発現制御の解明を目的に、さまざまな転写因子によって転写調節領域に特異的にリクルートされる転写コアクチベーターやクロマチン制御因子を、クロマチン再構成した転写調節領域をマイクロビーズに固定化し、それを用いて網羅的に同定する方法を確立する(図1参照)。さら

図1: クロマチン化転写調節領域マイクロビーズ

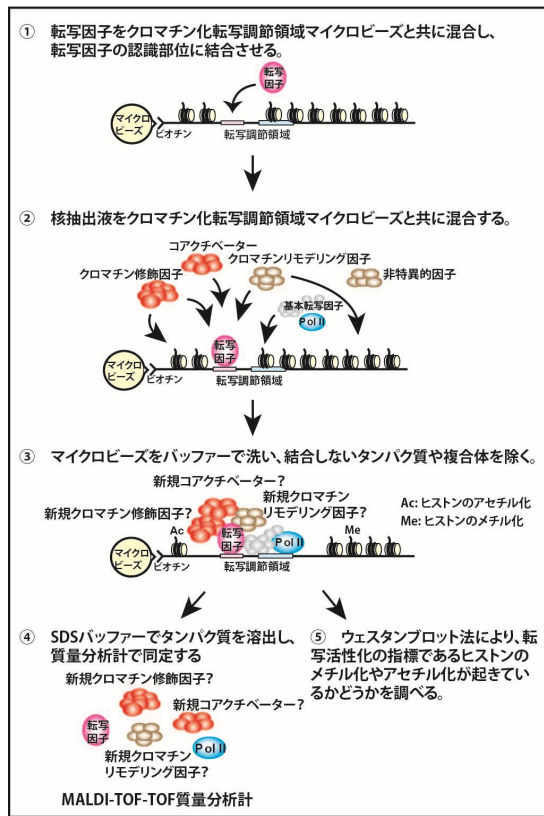


に本研究では、さまざまな転写因子によって、どのような転写制御因子が転写調節領域に特異的にリクルートされるのかについて、網羅的に明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 転写因子のそれぞれの結合配列を有するクロマチン化転写調節領域マイクロビーズ(図1参照)、転写因子のリコンビナントタンパク質、HepG2細胞やHeLa細胞から抽出した核抽出液をそれぞれ作製する。
- (2) クロマチン化転写調節領域マイクロビーズを用いて、転写因子によってプロモーター領域にリクルートされる転写制御因子を精製し、それらを質量分析計によって網羅的に同定する(図2参照)。
- (3) 同定された転写制御因子が転写因子と結合し、転写因子の存在下で、マイクロビーズ上の転写調節領域にリクルートされるかどうかを明らかにする。

図2: マイクロビーズを用いた新規転写制御因子の同定法



- (4) 同定された転写制御因子が転写因子によって実際の転写調節領域にリクルートされ、細胞内でそれらの遺伝子発現制御に関わっているのかに関して、ChIP(クロマチン免疫沈降)解析を行い明らかにする。

4. 研究成果

転写因子Sp1とHNF4αによって特異的にリクルートされる転写制御因子を同定するために、Sp1やHNF4α結合配列をそれぞれ有する転写調節領域DNA、Sp1とHNF4αのリコンビナントタンパク質を作製した。また、HeLa細胞とHepG2細胞の大量培養を行い、その核抽出液を精製した。Sp1とHNF4α結合配列を有するクロマチン付きの転写調節領域DNAとヌクレオソームを混合

し、転写調節領域 DNA をクロマチン化した。マイクロビーズに固定化した転写調節領域を、Sp1 や HNF4 α リコンビナントタンパク質、核抽出液と共に混合し、Sp1 と HNF4 α によってそれぞれ転写調節領域にリクルートされる転写制御因子の精製を行っている。また、転写調節領域マイクロビーズを用いて、メディエーター複合体によって、新規の転写伸長因子複合体 Little elongation complex (LEC) がプロモーター領域にリクルートされることがわかった。この時、メディエーター複合体は LEC を *small nuclear RNA* 遺伝子領域にリクルートし、それらの転写を制御することも明となった【Takahashi H, et al. *Nature communications* 2015】。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Fujieda Y., Amengual O., Matsumoto M., Kuroki K., Takahashi H., Kono M., Kurita Y., Otomo K., Kato M., Oku K., Bohgaki T., Horita T., Yasuda S., Maenaka K., Hatakeyama S., Nakayama K.I. and Atsumi T.: Ribophorin II is involved in the tissue factor expression mediated by phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on monocytes. *Rheumatology*, in press. 査読有
2. Suzuki M., Watanabe M., Nakamaru Y., Takagi D., Takahashi H., Fukuda S. and Hatakeyama S.: TRIM39 negatively regulates the NF κ B-mediated signaling pathway through stabilization of cactin. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73, 1085-1101, 2016. doi:10.1007/s00018-015-2040-x. 査読有
3. Hayashi M, Maehara K, Harada A, Semba Y, Kudo K, Takahashi H, Oki S, Meno C, Ichiyangi K, Akashi K, Ohkawa Y. Chd5 Regulates MuERV-L/MERVL Expression in Mouse Embryonic Stem Cells Via H3K27me3 Modification and Histone H3.1/H3.2. *J Cell Biochem.*, 117(3), 780-792, 2016. doi: 10.1002/jcb.25368. 査読有
4. Masuda Y, Takahashi H, Sato S, Tomomori-Sato C, Saraf A, Washburn MP, Florens L, Conaway RC, Conaway JW, *Hatakeyama S. TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin. *Nat Commun*, 6:7299. doi:

10.1038/ncomms8299, 2015. 査読有

5. Masuda, Y., Takahashi H, and *Hatakeyama, S.: TRIM29 regulates the p63-mediated pathway in cervical cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, pii: S0167-4889(15)00190-1. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.05.035, 2015. 査読有
6. Watanabe M, Takahashi H, Saeki Y, Ozaki T, Itoh S, Suzuki M, Mizushima W, Tanaka K, *Hatakeyama S.: The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR γ . *Elife*, 23:4. doi: 10.7554/eLife.05615, 2015. 査読有
7. Tsukiyama T, Fukui A, Terai S, Fujioka Y, Shinada K, Takahashi H, Terry P, Yamaguchi, Ohba Y, and *Hatakeyama S.: Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol*, 35(11):2007-2023, doi:10.1128/MCB.00159-15, 2015. 査読有
8. Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, *Hatakeyama S.: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. *Nat Commun*, 5:5941 doi: 10.1038/ncomms6941, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Hidehisa Takahashi, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama. Role of Human Mediator Subunit Med26 in Transcription Elongation. 第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピアホテル, 兵庫県, 神戸市, 2015. 12. 01-04.
2. Hidehisa Takahashi, Ichigaku Takigawa, Masashi Watanabe, Delnur Anwar, Mio Shibata, Chieri Tomomori-Sato, Shigeo Sato, Amol Ranjan, Chris W. Seidel, Tadasuke Tsukiyama, Wataru Mizushima, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama. MED26 regulates the transcription of snRNA

genes through the recruitment of little elongation complex. Mechanism of Eukaryotic Transcription, Cold spring harbor laboratory, NY,USA,2015. 8. 25-29.

3. 高橋秀尚, 畠山鎮次, Med26 は Little elongation complex をリクルートすることで small nuclear RNA 遺伝子の発現を制御する, 第 17 回日本 RNA 学会年会, ホテルライフオーブ札幌, 北海道, 札幌市, 2015. 7. 15-17.
4. 高橋秀尚, 瀧川一学, 渡部昌, Delnur Anwar, 柴田美音, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Amol Ranjan, Chris W. Seidel, 築山忠維, 林正康, 大川恭行, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, 畠山鎮次, メディエーター複合体による転写伸長制御, 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 神奈川県, 横浜市, 2014. 11.25-27
5. 高橋秀尚, 瀧川一学, 渡部昌, Anwar Delnur, 柴田美音, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Ranjan Amol, Seidel Chris, 築山忠維, 林正康, 大川恭行, Conaway Joan, Conaway Ronald, 畠山鎮次, Med26 は Little elongation complex をリクルートすることで small nuclear RNA 遺伝子の発現を制御する, 第 87 回日本生化学会, 国立京都国際会館, 京都府, 京都市, 2014. 10.15-18

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~d20505/takahashi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 秀尚 (TAKAHASHI HIDEHISA)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30423544