



## 研究課題名 転写制御を担うエピゲノム調節の分子機構の解明

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

かとう しげあき  
加藤 茂明

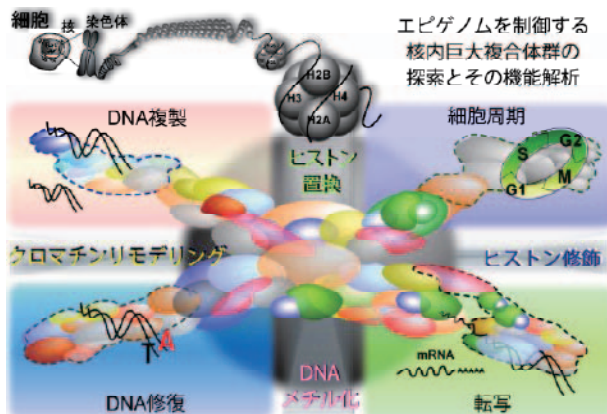
研究分野：生物学

キーワード：ゲノム機能・発現、分子遺伝

## 【研究の背景・目的】

真核細胞の染色体では、染色体 DNA はヒストンタンパクとヌクレオソーム構造をとっているため、一般的に遺伝情報発現は抑制されている。そのため特定遺伝子の発現には、染色体の構造調節を必要としている。最近このような染色体構造調節を指示する因子として、ヒストンタンパク N 末端に加えらるる数々のタンパク化学修飾の組み合わせが極めて重要であることが示されつつある。このようなヒストンタンパクの化学修飾の組み合わせはヒストンコードと提唱されつつあり、エピゲノム調節において中心的な役割を果たすと考えられている。

我々は DNA 結合性転写制御因子である核内ステロイドホルモン受容体群の転写制御の分子機構を解明する過程で、受容体群に相互作用する転写共役因子複合体群が極めて重要な役割を担うことを明らかにした。しかしながらこれら複合体群の種類や構成因子についての全貌は不明である。そこで本研究ではこれら染色体構造調節と転写制御に関与する複合体群を網羅的に同定・機能解析をすることで、転写制御におけるエピゲノム制御の分子基盤の解明を目指す。



## 【研究の方法】

核内受容体に加え、細胞分化増殖を規定する DNA 結合性転写制御因子群に着目し、生化学的アプローチにより、相互作用する複合体群を網羅的に検索・同定する。各々の転写制御因子の生理的機能が確立している標的細胞に着目し、当該細胞株を大量に培養し、核抽出液を調整し、転写因子に結合する複合体を精製、質量分析計にて複合体構成因子を同定する。次に精製した複合体やクロマチン化した構成因子の組換えタンパクを用い

ることで複合体の細胞核内における生化学的、もしくは細胞生物学的な機能を明らかにする。

一方、これら生化学的手法により同定できる複合体は直接的な相互作用に依存するため、機能的な相互作用因子をショウジョウバエを用いた分子遺伝学的手法により、検索する。同定された因子については上述と同様の方法で解析をする。

またこれら複合体および構成因子群の生理的機能を実証するため、これら因子遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作成し、その変異型を観察する。また胎生致死を回避するために、予め時期・組織特異的遺伝子破壊法にて高次機能を探る。

## 【期待される成果と意義】

転写制御の分子機構には染色体の構造調節が深く関与すると予想されるものの、その実体は長く不明であった。本研究により、その制御を担う調節因子群を同定することでその実体と全貌が解明できると期待される。特にエピゲノムと転写制御の接点を分子レベルで解明することは、高等生物のゲノム情報発現制御の基本原理の一端を明らかにするものと期待される。

## 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

・ Kim, M., Kondo, T., Takada, I., Youn, M., Yamamoto, Y., Takahashi, S., Matsumoto, T., Fujiyama, S., Shirode, Y., Yamaoka, I., Kitagawa H., Takeyama, K., Shibuya, H., Ohtake, F., **Kato, S.**: DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. *Nature*, 461, 1007-1012, 2009.

・ Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R. G., Kitagawa, H., **Kato, S.**: GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature*, 459, 455-459, 2009.

## 【研究期間と研究経費】

平成 22 年度 - 26 年度

605,300 千円

## 【ホームページ等】

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/bnsikato/index.html>



## 研究課題名 マクロファージによる死細胞貪食・分解の分子機構

京都大学・大学院医学研究科・教授

ながた しげかず  
長田 重一

研究分野：医歯薬学

キーワード：生体分子医学

### 【研究の背景・目的】

アポトーシスでは細胞や核が凝縮、断片化されるとともに染色体 DNA が切断される。そして、その最終段階ではマクロファージが死細胞を貪食・処理する。申請者らは Fas リガンドによるアポトーシスのシグナル伝達の解析から、この過程にはカスパーゼと呼ばれるプロテアーゼ、カスパーゼによって活性化される DNase (CAD) が関与していることを示した。ついで、CAD 欠損マウスの解析から、死細胞の DNA は、死細胞がマクロファージに取り込まれた後、リソソームに存在する DNase II によってさらに分解されることを見出した。DNase II 欠損マウスでは未分解の DNA を蓄積したマクロファージが IFN や TNF を分泌し、マウスは重篤な貧血、関節炎を発症した。この未分解 DNA によるマクロファージの活性化は Toll-like receptor (TLR) に依存せず、Eya (Eyes absent) と呼ばれる因子が関与していた。Eya にはスレオニン・フォスファターゼ活性が存在した。

一方、アポトーシス細胞の貪食を *in vitro* で検定する方法を樹立、貪食を促進する分子 MFG-E8、Tim-4 を同定した。MFG-E8 はアポトーシス細胞の表面に暴露されるフォスファチジルセリン (PS) を認識、死細胞をマクロファージに橋渡しする。一方、Tim-4 は 1 個の膜貫通領域を持つ膜タンパク質であり、その細胞外領域が PS を認識し、死細胞を捕捉貪食する。本研究はこの様な背景をもとに (1) マクロファージによるアポトーシス細胞貪食の分子機構 (2) 死細胞分解の異常が自然免疫を活性化する分子機構を明らかにする。

### 【研究の方法】

#### ①アポトーシスにおけるフォスファチジルセリンの細胞表面への暴露機構の解析

アポトーシス時には本来、細胞膜の内側に局在している PS が露出し、マクロファージに対して“eat me”シグナルとして作用する。PS の暴露はカスパーゼの下流で起こる反応と考えられるがその分子機構は不明である。私達は、低濃度の Ca 刺激では一過的に PS が細胞の表面に暴露されることを見いだした。そこで、まず、この Ca に依存して PS を暴露させる分子の同定を試みる。

#### ②Tim-4 と会合する分子の同定

Tim-4 がアポトーシス細胞の貪食を促進する際、シグナルを伝達する何らかの分子と会合すると考えられる。そこで、この因子の同定を試みる。すなわち、Tim-4 を発現し、死細胞の貪食能がある NIH3T3 の細胞表面タンパク質をビオチン標識する。この細胞を可溶化後、抗 Tim-4 抗体で沈降させ、Tim-4 と共沈するタンパク質があるかどうか検討、特異的なタンパク質が確認できればそれを同定する。

### ③IFN 遺伝子の発現など自然免疫の活性化に關与している Eya の生化学的解析

Eya にはスレオニンフォスファターゼ活性が存在する。この活性領域は既知のフォスファターゼのアミノ酸配列とは相似せず、新しいフォスファターゼドメインと考えられる。そこで、種々の欠質変異、点変異を導入し、スレオニンフォスファターゼドメインの最小ドメイン、活性部位を同定する。また、京都大学理学部・藤好研究室と共同でこのフォスファターゼの三次構造解析を進める。

### 【期待される成果と意義】

本研究は動物の発生、恒常性の維持において重要な役割を果たす細胞死、その最終段階でおこる死細胞貪食・分解の分子機構を明らかにしようとするものである。細胞死は細胞生物学、免疫学の重要な課題であり、本研究の成果はこれら分野の基礎研究の発展に貢献するであろう。これまでの申請者らの結果は死細胞の貪食・分解の異常が全身性エリテマトーデス、関節性リウマチなどの自己免疫疾患をもたらすことを示している。抗体の産生を伴う獲得免疫、種々のサイトカインの産生を促す自然免疫はウイルスや細菌など外来からの病原体によって引き起こされる。申請者らの結果は死細胞の貪食・分解の異常によって生成された物質が外来からの病原体と同様な機構で獲得免疫、自然免疫を活性化している可能性を示唆している。

本研究でアポトーシス細胞の貪食の分子機構、DNA による免疫の活性化機構が明らかになれば、全身性エリテマトーデス、関節性リウマチなどヒトの自己免疫疾患の原因解明に大きく貢献すると考えられる。

### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

1. Okabe, Y., Sano, T. and Nagata, S.: Regulation of the innate immune response by threonine phosphatase of Eyes absent. *Nature* **460**: 520-524, 2009
2. Nagata, S., Hanayama, R. and Kawane, K.: Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* **140**: 619-630, 2010

### 【研究期間と研究経費】

平成 22 年度 - 26 年度

318,700 千円

### 【ホームページ等】

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~nagata/snagata@mfour.med.kyoto-u.ac.jp>



研究課題名 植物の生存戦略としての細胞内膜系の分化機構の解明

京都大学・大学院理学研究科・教授

にしむら  
西村 いくこ

研究分野：生物学・基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、オルガネラ、植物微生物相互作用、植物分子機能

【研究の背景・目的】

免疫細胞を持たない植物は全身の細胞が外敵に対する防御機構を備えている必要がある。これまでの私たちの研究から、植物は、細胞内膜系を分化させることによって環境や感染のストレスに対処していることが分かってきた。例えば、細菌の感染時には液胞膜と細胞膜という異質な膜同士を融合させることにより液胞内抗菌物質を細胞外に放出して細菌を攻撃し<sup>[1]</sup> (図1)、ウイルス感染時には液胞膜を崩壊させることで直接ウイルスを攻撃する (*Science*, 2004)。また、病害虫等に対しては、小胞体から特殊なオルガネラ (ER ボディと命名) を誘導形成し忌避物質の生産を行っている。本研究では、植物細胞内膜系を利用した新しい植物の生存戦略を明らかにすることを目的としている。

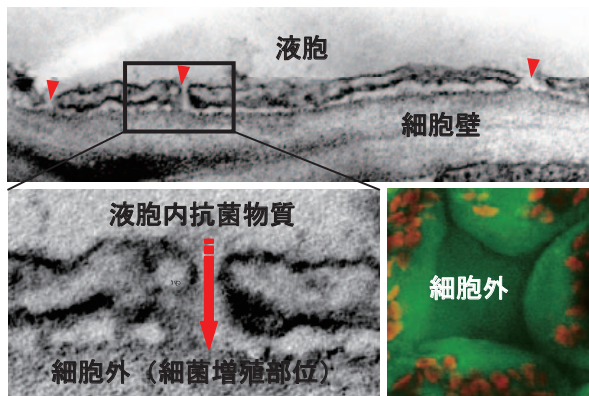


図1. 膜融合による新しい植物免疫機構。細菌感染依存的な膜融合 (電子顕微鏡像) と融合による液胞型 GFP の細胞外放出 (右下)。

【研究の方法】

本研究では、内膜系の分化によって支えられている植物免疫機構および環境適応機構を解明するために、次の4点に焦点をあてて、環境や感染ストレスに応じた植物の細胞内膜系の動態を解析する。(a)液胞膜・原形質膜の融合系、(b) ER ボディ・小胞体系、(c)原形質流動・細胞骨格系、(d)分泌系および内膜系によるシグナル受容系<sup>[2]</sup> (図2)。手法としては、モデル植物シロイヌナズナの正・逆分子遺伝学や形質転換体を用いた *in vivo* 解析、電子顕微鏡とライブセルイメージングによる解析、プロテオーム解析を実施する。

【期待される成果と意義】

「植物はコストをかけずに外敵から身を守るために全ての細胞が備えもっている液胞 (分解酵素と抗菌タンパク質を大量に含む) や小胞体を利用している」という新しい概念が生まれてきた。環境ストレスや外敵の種類に応じて使い分けられる細胞内膜系の動態・分化の機構の解明は、植物細胞の優れた環境適応能力の理解につながるものである。

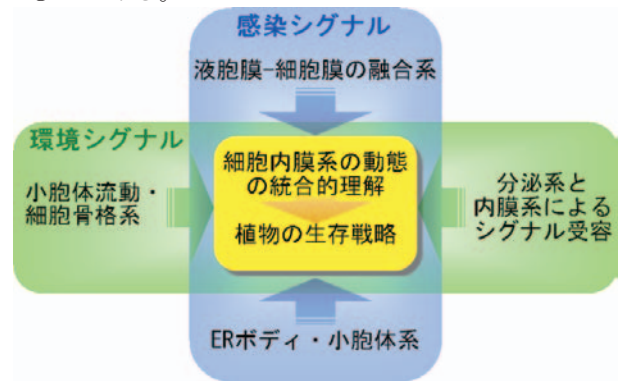


図2. 本研究課題の概念図.

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- [1] Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2009) A novel membrane-fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Gene. Dev.*, 23: 2496-2506.
- [2] Sugano, S. S\*, Shimada, T.\*, Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M., and Hara-Nishimura, I. (2010) Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature*, 463: 241-244. (\*These two authors contributed equally to this work)

【研究期間と研究経費】

平成22年度 - 26年度

419,700千円

【ホームページ等】

<http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/index.html>  
ihnishi@gr.bot.kyoto-u.ac.jp



## 研究課題名 A I Dによる topoisomerase1 を介したゲノム不安定性誘導のメカニズム

京都大学・大学院医学研究科・客員教授 ほんじよ たすく  
**本 席 佐**

**研究分野**：生物系・医歯薬学分野・基礎医学分科・医科学一般

**キーワード**：体細胞突然変異・クラススイッチ組換え・RNA 編集・大規模シーケンス・FACT 複合体

### 【研究の背景・目的】

1786 年ジェンナーによって天然痘ワクチンが初めて用いられて以来多くの感染症に対してワクチンが開発され、人類は感染症の脅威からほぼ完全に逃れることが可能となった。ワクチンが有効に働くためには、抗原を記憶した抗体が作られることが不可欠である。長らく、どのような仕組みで抗体に記憶が刻み込まれるのか不明であった。2000 年に私達のグループは、Activation-induced cytidine deaminase (AID) という酵素が抗体記憶をゲノムに刻み込む酵素であることを明らかにした。AID は抗体遺伝子に変化を起こし、抗原結合能力を増強させる体細胞突然変異と抗原の処理の多様化をもたらすクラススイッチ組換えを引き起こす。さらに AID の異常発現で発癌が起こることも明らかにした。この研究の目的は、AID がどのような仕組みで DNA に変化を引き起こすのか、なぜ抗体遺伝子のみならず、他の癌遺伝子にも変異を起こすのかという課題を解決することである。

### 【研究の方法】

我々は、昨年 AID が抗体の遺伝子を切断するために Topoisomerase 1 (Top1) という DNA の立体構造を変える酵素の量を低下させることを見いだした。Top1 の量が下がることにより、抗体遺伝子の DNA 構造に変化が起こり、ここに Top1 自身による切断導入が引き起こされる。本研究では AID がどのような仕組みで Top 1 の蛋白質の量を低下させるかを明らかにする。現在の作業仮説は Top1 mRNA の翻訳段階を AID が阻害すると考えている。その仕組みとしては、AID が cytidine 脱アミノ活性により低分子 RNA 中の C から U への変異を導入することによって Top 1 mRNA の翻訳効率を低下させると考えている。このために AID によって脱アミノ化される RNA を遺伝子塩基配列決定法により同定する方法や、Top1 mRNA に結合する RNA および蛋白質の分析法を用いる。また、AID によって切断を受ける全ゲノム中 DNA の構造を全ゲノム塩基配列決定により解明する。

### 【期待される成果と意義】

AID の作用を明らかにし、抗体記憶形成の仕組みを解明すれば、ジェンナー以来のワクチンの作用機構の本体が解明され、ワクチンの効率的な開発等に活用される道が拓ける。さらに AID によって引き起こされる発癌の仕組みの理解が進む。AID によって胃癌、肝臓癌、リンパ腫、骨髄白血病等の癌が引き起こされるのではないかと示唆する報告がある。AID の作用を理解し、その活性を制御することによって発癌の予防や増悪を防ぐことが可能である。

### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- 1) AID-induced decrease in topoisomerase 1 induces DNA structural alteration and DNA cleavage for class switch recombination. Kobayashi, M., \*Honjo, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 22375-22380 (2009) refereed
- 2) A memoir of AID, which engraves antibody memory on DNA. \*Honjo, T. Nature Immunol. 9 335-337 (2008) not refereed
- 3) Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. Muramatsu, M., \*Honjo, T. Adv. Immunol. 94 1-36 (2007) not refereed
- 4) *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. Matsumoto, Y., Honjo, T., \*Chiba, T. Nature Medicine 13 470-476(2007) refereed
- 5) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase(AID), a potential RNA editing enzyme. Muramatsu, M., \*Honjo, T. Cell 102 553-563 (2000) refereed

### 【研究期間と研究経費】

平成 22 年度 - 26 年度

343, 200 千円

### 【ホームページ等】

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>  
honjo@mfour.med.kyoto-u.ac.jp

