

## 発生分化過程におけるヒストンシャペロンTAF-I の機能

著者	村野 健作
著者別名	MURANO KENSAKU
発行年	2012
その他のタイトル	Function of histone chaperone, TAF-I, during embryonic development
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/118493">http://hdl.handle.net/2241/118493</a>

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770182

研究課題名（和文）発生分化過程におけるヒストンシャペロン TAF-I の機能

研究課題名（英文）Function of histone chaperone, TAF-I, during embryonic development

研究代表者

村野 健作 (MURANO KENSAKU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員

研究者番号：80535295

研究成果の概要（和文）：*TAF-I* ノックアウト（KO）マウスを作製したところ、重度な貧血と未熟な血管形成が見られ、胎生 12.5 日目までに致死であった。網羅的遺伝子発現解析により、*TAF-I* KO 胚では低酸素に応答する遺伝子群および解糖系に関連する遺伝子群の発現量が増加していることが明らかとなった。また *TAF-I* KO ES 細胞の増殖速度は LIF 非存在下で野生株と比較して大きく低下した。以上の結果から、分化した *TAF-I* KO 細胞は増殖速度が低く、胚発生において血液・血管を含む組織の形成ができず、胎生致死となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：*TAF-I* knock out (KO) mouse died until 12.5 dpc, showing severe anemia and immature vascular remodeling. By analysis of whole gene expression pattern, the expression levels of genes related to hypoxia response and glucose metabolism were increased in *TAF-I* KO embryos compared with those in wild type (WT). Furthermore, *TAF-I* KO ES cells showed the lower proliferation rate in the absence of LIF compared with WT. Collectively, it is suggested that the lower proliferation rate of differentiated cells lacking *TAF-I* may cause some defects including erythrocyte and immature vascular cells, thereby resulting in embryonic lethality.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：ヒストンシャペロン、クロマチン、発生

## 1. 研究開始当初の背景

生物の発生分化をとおして生じる同じ遺伝情報をもつ様々な細胞の性質と機能は、時間的・空間的制御を受けた遺伝子の発現パターンで決定されている。遺伝子発現制御の最も重要なステップのひとつは転写の段階であり転写調節に関わる分子は発生分化の制御に重要な役割を果たし

ている。細胞内における転写反応をはじめとするゲノム DNA にまつわる細胞核内反応は、ヒストンと DNA の複合体であるクロマチン構造を鋳型とした反応である。Fig.1 に示したように、クロマチン構造をとったゲノム DNA は試験管内反応系で用いられた裸の DNA とは異なり、転写や複製を担う因子がアクセスしにくい。そのた

め、そのままの状態では転写や複製反応の鋳型にはなることはできない。転写や複製反応に先立ち、クロマチン構造をとった鋳型 DNA はクロマチン構造変換因子により、反応の鋳型になりやすい形に変換されること (Chromatin Remodeling) が必要だと考えられている。クロマチン構造変換因子はヒストン修飾酵素、ATP 依存性クロマチンリモデリング因子、ヒストンシャペロンに分類される。これら 3 種類のクロマチン構造変換因子の協調的な作用によって、転写反応をはじめとする細胞核内反応は時間的、空間的制御を受けていると考えられている。

我々は真核細胞におけるクロマチン構造変換メカニズムを明らかにすることを目的とし、アデノウイルス (Ad) のクロマチンを真核細胞クロマチンのモデルと考え、Ad クロマチンの試験管内複製反応促進活性を指標に非感染 HeLa 細胞抽出液から Template Activating Factor (TAF) -I/SET、TAF-III/B23 (TAFs) を同定してきた。TAFs は Ad の塩基性コアタンパク質と相互作用し、Ad クロマチンの構造を変換することで Ad ゲノムの複製反応を促進する。また TAFs は試験管内において真核細胞のヒストンとも相互作用し、DNA へ受け渡す活性を持つことからヒストンシャペロンであることが示されてきた。しかし、細胞レベルあるいは個体レベルにおけるヒストンシャペロンとしての機能についての解析は不十分であった。

## 2. 研究の目的

これまでに TAF-I と B23 に着目してヒストンシャペロンの *in vivo* における機能を解析してきた。B23 は核小体に局在するヒストンシャペロンであることから rRNA 遺伝子の転写に着目した。B23 は核小体内においてヒストンシャペロンとして機能し、クロマチン構造変換を介して rRNA 遺伝子の転写反応を制御することにより、細胞増殖過程に関与していることを示してきた。一方で、TAF-I には細胞内で転写制御に関わる可能性を示す報告が多数なされているにもかかわらず、B23 とは異なり標的遺伝子がはっきりしていない。ヒストンシャペロンである TAF-I は DNA を標的とする転写因子とは異なり、ヒストンを介して転写制御を行うため遺伝子特異性が低いと考えられる。またシャペロンという性質から対象物質との相互作用も弱く、酵素的な反応を仲介するのではなく化学量論的に機能すると考えられるため、siRNA を用いた発現抑制では表現型が顕著には現れなかった。そこで TAF-I ノックアウト (KO) マウスを作製することが、生体内における TAF-I の主要な機能を明らかにする最も単

純で有効な方法だと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) TAF-I KO マウスの作製と観察

TAF-I 遺伝子 KO マウスの作製と観察を通じて、発生過程において TAF-I が大きな役割を果たす組織 (TAF-I 標的組織) を明らかにする。TAF-I 標的組織の網羅的遺伝子発現パターンの解析により標的遺伝子を同定し発現制御機構を解明する。

### (2) TAF-I 遺伝子の発現パターンの解明

マウスの発生過程における TAF-I の遺伝子の組織特異的あるいは時期特異的な発現パターンを詳細に追うことにより、TAF-I の発生過程における機能にせまることができると考えている。

### (3) TAF-I KO 培養細胞系の構築

TAF-I KO mouse embryonic fibroblast (MEF) および Embryonic stem cell (ES 細胞) を構築する。細胞周期の進行にともなう染色体構造の動的変動に TAF-I が関与するか明らかにする。また、細胞分化の進行過程や分化にともなう細胞増殖過程への TAF-I の影響を検討する。

### (4) TAF-I 遺伝子ヘテロ欠損マウスを用いた白血病発症機構の解析

TAF-I は別名 SET と呼ばれ、急性骨髄性未分化白血病でみられる融合タンパク質 SET-CAN として同定された。TAF-I 遺伝子ヘテロ欠損マウスを用いて SET-CAN による白血病発症機構の解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) TAF-I 遺伝子欠損マウスの作製

TAF-I にはオルタナティブプロモーターにより転写される TAF-I $\alpha$  と TAF-I $\beta$  の 2 つのサブタイプが存在する。TAF-I $\alpha$  と TAF-I $\beta$  はアミノ末端の数十アミノ酸残基のみが異なる。両者の共通部分は 3 番目のエクソンから翻訳される。本研究では TAF-I $\alpha$  と TAF-I $\beta$  の両者を欠損する TAF-I 遺伝子欠損マウス (KO) マウスを作製するため、4 番および 5 番目のエクソンの欠損を標的にターゲティングベクターを作製した。内在性 TAF-I 遺伝子のプロモーターと内在性スプライシングアクセプターによりネオマイシン耐性遺伝子を発現させるプロモータートラッピング法を用いて TAF-I 遺伝子変異 ES 細胞 (C57BL/6J) を作製した。スクリーニングは PCR 法により行い、さらにサザンブロット法によって相同組換えを起こしていることを確認した。

筑波大学生命科学動物資源センターの協力のもと、TAF-I 遺伝子変異 ES 細胞より 3 匹のキメラマウスを作製した。C57BL/6J マウスと交配し、TAF-I 遺伝子ヘテロ欠損マウ

スを得た。引き続き *TAF-I* 遺伝子ヘテロ欠損マウスの交配により *TAF-I* KO マウスの作製を試みたが、得られなかった。*TAF-I* 遺伝子ヘテロ欠損マウスの交配により得られた F1 マウス 33 匹の遺伝子型を調べたところ 12 匹は野生型であり、残り 21 匹が *TAF-I* 遺伝子ヘテロ欠損マウスであった。この結果から 99.25% の確率で *TAF-I* KO マウスは胎生致死であることが示唆された。そこで *TAF-I* 遺伝子ヘテロ欠損マウスの交配により得られた胎仔の遺伝子型を解析したところ、胎生 11.5 日目までは *TAF-I* 遺伝子を欠損した胎仔の生存が確認できた。

#### (2) *TAF-I* KO マウスの表現型

胎生 9.5 日目の *TAF-I* KO マウスは野生型に比べて同じ程度に発生していたが、10.5 日目以降は野生型と比べ明らかに発生が遅れる様子が観察された。最終的に 12.5 日以降は *TAF-I* KO マウスの生存は観察されなかった。胎生 10.5 の野生型の卵黄嚢は血液・血管の発生のため赤いが、*TAF-I* KO マウスの場合では非常に白いことから、血液・血管の発生が未熟であることが示唆された。そこで定量 RT-PCR 法により血液血管関連遺伝子の転写量を野生型と比較したところ、*TAF-I* KO マウスでは major- $\beta$ -globin 遺伝子の発現量が顕著に減少していることが明らかとなった。また抗 PECAM1 抗体を用いた免疫染色法により血管の形成を検討したところ、*TAF-I* KO マウスでは野生型に比較して卵黄嚢および胎仔の血管が細く、未熟であることが観察された。以上の結果から *TAF-I* 遺伝子は血液・血管の発生分化に関わっていることが示唆された。

#### (3) 赤血球前駆細胞の試験管内分化系

*TAF-I* KO マウスでは赤血球の発生異常が観察された。そこで赤血球前駆細胞の試験管内分化系 (EryP-CFC および BFU-E) を用いて、*TAF-I* 欠損による赤血球前駆細胞の形成と分化能への影響を検討した。その結果、野生型と *TAF-I* KO の間に、1 次および 2 次造血前駆細胞の個数に差はみられなかった。また形成されたコロニーのサイズも同じであり、major- $\beta$ -globin 遺伝子の発現量にも差はみられなかった。

#### (4) *TAF-I* KO マウスの遺伝子発現パターン

血液・血管発生に関わる遺伝子の *TAF-I* による発現調節機構を解析するため、*TAF-I* KO マウスの遺伝子発現パターンの変化を 9.5 日目および 10.5 日目の胚を用いて野生型と比較した。野生型と *TAF-I* KO マウスの発生ステージは体節の数に着目して合わせた。遺伝子発現量の検出にはアフィメトリクス社のマイクロアレイ (GeneChip) を用いた。その結果、9.5 日胚では野生型と *TAF-I* KO

マウスで差はみられなかった。一方、10.5 日胚では 54 遺伝子の発現に 2 倍以上の差が観察された。Gene Ontology による解析結果と NCBI データベースのアノテーションをもとに分類したところ、10 遺伝子が解糖系をはじめとするエネルギーコントロールに関わる遺伝子群に属し、また 15 遺伝子が低酸素応答および血液・血管形成にかかわる遺伝子群に属していた。低酸素応答はエネルギーコントロールと強く関連することから、合わせた 25 遺伝子の変動は同じ現象を表していると考えられる。これら遺伝子の発現量は予想と反し、*TAF-I* KO マウスにおいて高発現していた。以上の結果から *TAF-I* KO マウスで観察された血液・血管の異常は低酸素および低エネルギー状態を引きおこし、胚を死に至らせるものであると考えられる。

#### (5) *TAF-I* の局在

これまでに *TAF-I* は ES 細胞や HeLa 細胞をはじめとする様々な培養細胞で発現が確認されている。また、腎臓や胸腺などのマウス組織でも発現していることが報告されており、*TAF-I* はユビキタスに発現していると考えられている。そこで、*TAF-I* KO マウスの表現型があらわれ始める胎生 10.5 日目胚の切片を作製し *TAF-I* の発現分布を観察した。その結果、10.5 日胚でも *TAF-I* はユビキタスに発現しており、赤血球や血管細胞に偏って発現している訳ではないことが明らかとなった。このことは *TAF-I* KO マウスで観察された血液・血管の異常は *TAF-I* 遺伝子の欠損による 2 次的効果であること支持している。

#### (6) *TAF-I* 遺伝子欠損培養細胞の構築

さらに詳細な解析を進めるため、*TAF-I* 遺伝子を欠損した培養細胞の構築を試みた。10.5 日胚より MEF を構築したものの、野生株でさえ満足に増殖しないため解析が進められなかった。そこで、試験管内受精により得た受精卵を培養し胚盤胞まで発生させたのち、内部細胞塊より ES 細胞を樹立した。*TAF-I* KO ES 細胞の倍加時間は 18 時間程であり野生株とほぼ同程度の増殖速度を保っていた。フィーダー細胞上の *TAF-I* KO ES 細胞のコロニーは対称な球状であり、未分化状態を維持していると考えられる。*TAF-I* KO ES 細胞の分化能を検討するためハンギングドロップ法によって LIF 非存在下で Embryonic body (EB) を形成させた。その結果、1000 個の野生株 ES 細胞に形成させた EB の大きさは形成開始後 48 時間では 200  $\mu$ m、120 時間では 450  $\mu$ m 程度まで成長した。一方、*TAF-I* KO ES 細胞に形成させた EB の大きさは形成開始後 48 時間から 120 時間にかけて 200  $\mu$ m 程度と成長しなかった。以上

の結果から、*TAF-I* KO ES 細胞は分化刺激により細胞の増殖を止めてしまうことが明らかとなった。ES 細胞による EB 形成は胚盤胞から 6.5 日胚までの発生過程を再現していると考えられている。したがって、分化刺激にともなう *TAF-I* KO ES 細胞の増殖停止は *TAF-I* KO マウスの発生異常を再現していると考えられる。

(7)SET-CAN による急性骨髄性身分化白血病における *TAF-I/SET* の役割

*TAF-I* は別名 *SET* とも呼ばれ、急性骨髄性未分化白血病でみられる染色体転座で生じた融合タンパク質 SET-CAN として同定された。血球系のみで SET-CAN を発現するトランスジェニックマウス (Tg) の解析から、SET-CAN の発現は赤血球数と血小板数を減少させることが報告されている。しかし、SET-CAN 発現 Tg では急性骨髄性未分化白血病患者と異なり、両アリの *TAF-I* 遺伝子が機能している。そこで、*TAF-I* ヘテロ欠損マウスと交配させ SET-CAN 発現 *TAF-I*(+/-)Tg を作製し、赤血球数および血小板数への影響を検討した。その結果、*TAF-I*(+/-)Tg では Tg に比べて赤血球数および血小板数が低下した。以上の結果から、SET-CAN による急性骨髄性白血病の患者では、*TAF-I* 遺伝子の片アリルを欠損していることが病状をより深刻にしていることが予想される。

## 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 1 件)

- ① Miharu Hisaoka, Shuhei Ueshima, Kensaku Murano, Kyosuke Nagata, Mitsuru Okuwaki, Regulation of nucleolar chromatin by B23/nucleophosmin jointly depends upon its RNA binding activity and transcription factor UBF. Mol. Cell. Biol., 2010; 20: 4952-4964  
(査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kensaku Murano, Masatsugu Ema, Kaori Kajitani, Kohsuke Kato, Satoru Takahashi, Osamu Ohneda, Masumi Nagano, Kyosuke Nagata, Developmental defects and embryonic lethality caused by knock out of a histone chaperone, TAF-I. 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
- ② Kensaku Murano, Masatsugu Ema, Kaori Kajitani, Satoru Takahashi, Osamu Ohneda, Masumi Nagano, Kyosuke Nagata, Knock out of TAF-I, a histone chaperone, causes developmental defects and embryonic

lethality, 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日、横浜

- ③ Kensaku Murano, Mitsuru Okuwaki, Miharu Hisaoka, Kyosuke Nagata, Chromatin regulation of the rRNA gene transcription by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. The 24<sup>th</sup> Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA. Sapporo, 2009. 6. 23-26

[図書] (計 1 件)

- ① 村野 健作、加藤広介、目的別に選べるタンパク質発現プロトコール 実験医学別冊、永田 恭介、奥脇 暢 編、羊土社、2010、p79-87、p172-196

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

村野 健作 (MURANO KENSAKU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員

研究者番号：80535295