

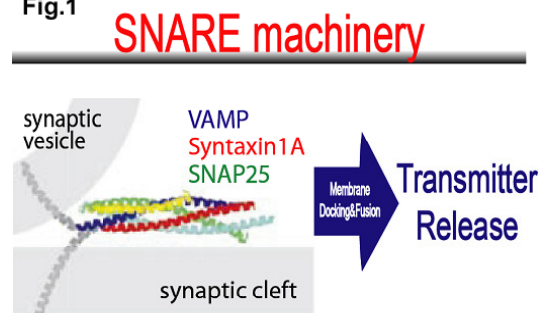
Syntaxin1A のシグナル伝達系・細胞種特異的発現制御機構の解析

中山高宏¹, 御子柴克彦², 赤川公朗¹

(¹ 医学部 細胞生理、² 理研 BSI 発生神経)

小胞輸送機構はエキソサイトーシスを代表とする膜の融合過程を調節する上で重要な役割を担っていることが知られている。この分野において当教室を含む世界中のグループによって、小胞膜上の分子(v-SNARE)と標的膜上の分子(t-SNARE)との間での動的融合を基本とする SNARE 仮説を中心的パラダイムとした研究が過去二十年間にわたり行われてきた(Fig.1)。その

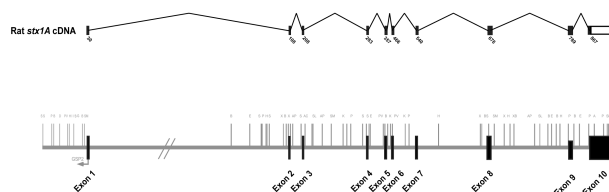
Fig.1



中でも t-SNARE に属する HPC-1/syntaxin 1A (*stx1A*) は神経系細胞において特に顕著な発現を示し、神経伝達物質の開口放出に関わる中心的分子として発見されてきた(Bennett, *Science* 1992)(Inoue, *J Biol Chem* 1992)。我々はこれまでに、*stx1A* 発現量の変化が神経発芽と神経伝達効率の変化をもたらす現象を見出し(Yamaguchi, *Brain Res* 1996)、記憶力亢進等の特徴的な神経症状を示す Williams 症候群において *stx1A* の半接合体欠失によって遺伝子量が半減していることを明らかにしてきた(Nakayama, *Cytogenet Cell Genet* 1998)。また Sutton らによって PKA シグナル依存的に発現が誘導されることが報告されてきた(Sutton, *Nature* 1999)が、これらの特徴的な発現様式を説明する制御メカニズムについては、これまでに全く明らかにされていなかった。

そこで我々はこの *stx1A* の発現制御機構を解明するため、まず遺伝子構造の決定を行った。ゲノムライブラリーよりスクリーニングを行った結果、25 kb に及ぶ構造領域と 2 kb のプロモーター領域を単離し(Fig.2)、以降それらの解析を行ってき

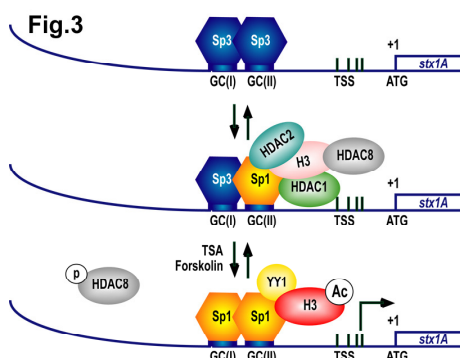
Fig.2



た。これまでの解析により *stx1A* 遺伝子は複数の転写開始点を有する TATA less gene であり、-200bp 付近に結合する Sp1 によって転写が活性化されることを見出し、この領域を *stx1A* コアプロモーター領域(*stx1A*-CPR)として同定してきたが、フォールスコリンに代表される PKA analog に応答性を持つ転写因子もしくは細胞種特異的な転写を司る因子を同定することはできなかった。そこで我々は DNA メチル化やヒストンのアセチル化に代表されるエピジェネティックな転写制御機構の関与を次に検討することにした。興味深いことに中心活性を有する *stx1A*-CPR には多くの DNA メチル化サイトが存在し、外来性に酵素処理によって *stx1A*-CPR をメチル化するとプロモーター活性が抑制されることを見出してきた。しかし Bisulfate 処理により内在性メチル化状態を解

析した結果、細胞種に関わらず脱メチル化状態にあることを見い出した。更に組織を用いたメチル化状態の検討からも同様に組織の種類に関わらず脱メチル化状態であったことから、生体内における *stx1A* の遺伝子発現には DNA メチル化は関与していないことが明らかとなった。そこで我々はエピジェネティック制御のもう一つの機構であるヒストンのアセチル化に注目をし検討を行ってきた。*stx1A* をほとんど発現していない上皮細胞株に対しアセチル化を抑制する薬剤である TSA で処理を行った結果、*stx1A* mRNA 発現が有意に増強される現象を見出した。また ChIP 解析により TSA 処理前後におけるアセチル化 Histone H3 (Ac-H3) の *stx1A*-CPR への結合状態を検討した結果、定常状態では上皮細胞株で Ac-H3 が解離しているのに対し、TSA 処理後には Ac-H3 が結合する現象を見出した(Fig.3)。更に我々は *stx1A* 転写の中心活性を有する転写因子である Sp1 がヒストンのアセチル化を制御しているヒストン脱アセチル酵素(HDAC)と機能的複合体を形成することに着目し、HDAC の阻害剤及び ChIP による解析を行った。その結果、class-1 HDAC の中でも特に HDAC1,2,8 の抑制により *stx1A* 遺伝子発現が促進されることを見出した(Fig.3)。また PKA シグナルの活性化によって HDAC8 が不活化されることにも着目し *stx1A* 遺伝子発現との関連を調べた結果、Forskolin 刺激 によって *stx1A* mRNA 発現が増強される現象を見出した(Fig.3)。一方でヒストンアセチル化の過程における転写因子群の *stx1A*-CPR への結合を ChIP 解析した結果、*stx1A* を発現している細胞では Sp1、YY1 が結合しているが、発現していない細胞では Sp3 のみが結合している現象を明らかにした(Fig.3)。

これらの結果から、我々は *stx1A* 遺伝子の細胞種特異的発現はDNA メチル化ではなくclass-1 HDAC による Ac-H3 の *stx1A*-CPR への結合制御とSp1、Sp3、YY1 転写因子群の協調作用によって行われていることを明らかにした(Fig.3)。



講演記録

[1] 中山高宏、御子柴克彦、赤川公朗

「Syntaxin1A のシグナル伝達系・細胞種特異的発現制御機構の解析」

第 41 回杏林医学会大会 東京 (2012.11.17)

[2] 中山高宏、御子柴克彦、赤川公朗

「An acetylation switch by Class-1 HDACs modulates the transcriptional activity of the TATA-less syntaxin 1A gene.」

第 85 回日本生化学会大会 福岡 (2012.12.16)