

クロマチン内の平滑筋サブタイプ特異的転写調節

真鍋 一郎 永井 良三

要旨: 血管平滑筋細胞分化の分子機構の解明は、血管発生分化とともに病態形成の理解のためにも重要である。われわれは、平滑筋ミオシン重鎖遺伝子の発現制御機構に関して、個体レベルとクロマチン内メカニズムに着目して検討した。この遺伝子は、多数の転写制御モジュールによって制御されていた。全体の転写制御は、これらのモジュール間の複雑な相互作用によって決定されていた。また平滑筋特異的遺伝子発現制御にクロマチン構造の変化が重要であった。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, 43: 131-135)

Key words: Smooth muscle, Transcription, Chromatin, Differentiation, Phenotypic modulation

はじめに

平滑筋細胞は環境に応じて柔軟に変化し、多彩な機能を果たす。成体の血管での平滑筋細胞は、主に収縮による血圧維持の機能を持つが、血管形成過程においては内皮細胞によって形作られた管腔構造の周囲を取り巻き、細胞外基質や増殖因子を産出し、漏れのない成熟した血管を形作る。さらに、血管病態においては、収縮に特化した形質(収縮型)から増殖因子や細胞外基質などを産生する形質(合成型)に変化し、病変形成に重要な働きをする。このような平滑筋細胞の形質や機能の変化は、環境から与えられた刺激(environmental cues)に応じて、多数の遺伝子が協調的に発現変化することによってもたらされる。そのため、血管の発生や病変形成のメカニズムの解明に、平滑筋細胞の遺伝子発現の変化をもたらし機構を理解することが必要となる^{1,2)}。

これまでに、平滑筋細胞の分化度や形質の状態を示す多数のマーカー遺伝子が同定されている。これらの遺伝子は、血管病態における平滑筋の形質を知るのに重要なだけでなく、平滑筋分化/形質変換の分子機構の研究にも有用である。特に平滑筋ミオシン重鎖SM1とSM2は、平滑筋細胞に特異的に発現するマーカーであり、平滑筋の分化や形質変換に応じてダイナミックに発現制御される^{3,4)}。そこでわれわれは、SM1とSM2

をコードするミオシン重鎖遺伝子(SM-MHC遺伝子)の発現制御機構の研究を行った。

SM-MHC遺伝子の転写は多数の転写モジュールの相互作用によって制御される

平滑筋細胞は、培養すると直ちにその形質を変化させ、未分化な形質を示すようになり、分化マーカー遺伝子の発現は低下する。そのため、培養平滑筋細胞における遺伝子発現調節は、*in vivo*の組織におけるメカニズムと大きく異なっている可能性がある。このような問題を回避するために、われわれはSM-MHC遺伝子の転写制御を、トランスジェニックマウスを用いて*in vivo*の環境で検討することとした。

SM-MHC遺伝子のトランスジェニックマウスでの発現には、転写開始点から-4.2kbから+11.6kbまでの領域が必要であった⁵⁾。次に、この領域がどのように転写を制御しているかを明らかにするために、さまざまな部分の機能をトランスジェニックマウスで検討した^{6,7)}。その結果、-4.2kbから+11.6kbの全体にわたって、多数の転写を制御するサブ領域(転写調節モジュール)が存在することが明らかとなった(Fig. 1)。これらのモジュールの機能は平滑筋サブタイプによって異なる。また、平滑筋の分化の段階でも異なった。モジュールによっては転写を負に調節するものがあり、平滑筋特異性に重要である。さらに、あるモジュールの機能は、他のモジュールの存在によって変化した。例え

東京大学大学院循環器内科，クリニカルバイオインフォマティクス研究ユニット

2002年12月24日受付 2003年3月4日受理

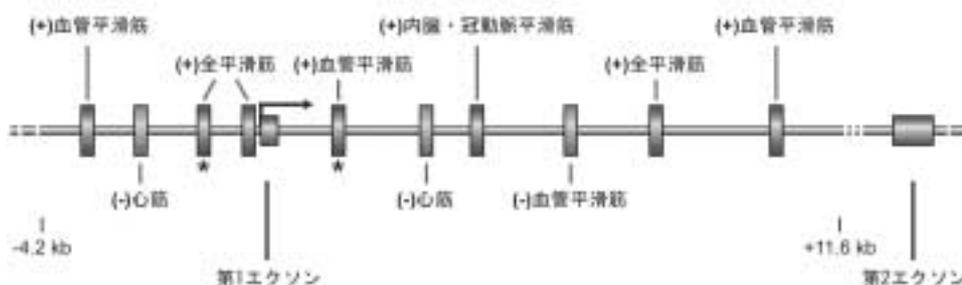


Figure 1 Modular regulation of SM-MHC transcription. SM-MHC transcription in transgenic mice requires the genomic region from position -4.2kb to +11.6kb. This region contains multiple transcriptional regulatory modules that are differentially involved in the overall transcription of SM-MHC in various SMC subtypes. The SMC subtypes in which each module mainly functions are indicated. Modules that act as repressors are marked (-).

ば，+2.5から+5.3 kbまでの領域は，+5.3から+11.6 kbまでの領域が存在しないときには転写を負に調節するが，後者の存在下ではむしろ正に調節する機能を持つ。以上のことより，SM-MHC遺伝子全体の転写は転写調節モジュールの相互作用によって決定されると考えられる。全体の転写は，各モジュール活性の単なる総和で決定されるのではなく，モジュール間の複雑な相互作用によって決定される。また，SM-MHC遺伝子の転写調節プログラムは単一ではなく，平滑筋サブタイプや分化の段階において異なるといえる。

平滑筋特異的遺伝子はCArGエレメントとSRFによって調節される

トランスジェニックマウスの検討により，SM-MHC遺伝子が，遺伝子座の広い範囲に分散する転写調節モジュールの相互作用によって調節されていることが明らかとなった。では，各転写調節モジュールはどのように機能しているのだろうか。われわれは複数のSM-MHC転写調節モジュールを同定し，機能を解析した。モジュールにはいくつかの共通した特徴がある。まず，モジュールの配列は種を超えて保存されている。SM-MHC遺伝子の配列は，これらモジュールの部分を除けばあまり保存されていない。また，モジュールは一つのシスエレメントではなく，複数のシスエレメントによって構成されている。

われわれは第1イントロン内+1.5 kbの位置にあるモジュールに着目し，このモジュールの機能の様式を検討した。このモジュールはCArGエレメントを含む。

CArGエレメントはほとんどすべての平滑筋特異的遺伝子の転写に重要なシスエレメントであり，転写因子 serum response factor (SRF) が結合する。SM-MHCには5'隣接領域の-1.3 kbの部分にさらに二つのCArGエレメント (CArG1とCArG2) が存在する。われわれはこれらのCArGエレメントが，トランスジェニックマウスにおけるSM-MHC遺伝子発現に必要であることを明らかにした⁶⁾。

平滑筋特異的クロマチンリモデリングと転写制御

以上の結果や他の平滑筋特異的遺伝子の転写制御の研究結果から，SRFが平滑筋特異的遺伝子の発現に重要であることが明らかとなった。しかしSRF自体はあらゆる細胞に広範に発現する。したがって，SRFのみによって平滑筋特異的な遺伝子制御を説明することはできない。これまでにさまざまな仮説が立てられてきたが，SRFが平滑筋特異的転写を制御するメカニズムは未だに明らかではない。われわれは，クロマチンの構造が遺伝子転写に重大な影響を与えることに着目し，クロマチンレベルの転写制御によって，平滑筋特異性が得られているという仮説を立てた。

クロマチン内DNAへの蛋白の結合を直接的に検討する方法であるクロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation [ChIP] assay) を用いて，SRFのCArGエレメントへの結合を検討した⁶⁾。その結果，SM-MHCのCArGエレメントに，SRFが平滑筋細胞のクロマチン内で結合していることを確認した。重要なことに，この

SRFの結合は平滑筋細胞でしか認められず、骨格筋細胞や線維芽細胞では認められなかった。逆に、骨格筋 α アクチンのCArGエレメントへのSRF結合は、骨格筋細胞でしか見られなかった。一方、どの細胞においてもSRFは同程度に発現し、ゲルシフトアッセイではSM-MHCのCArGエレメントに結合した。つまり*in vitro*のデータとは異なり、クロマチン内では、平滑筋細胞のみで平滑筋特異的なCArGエレメントにSRFが結合していることが明らかとなった。この結果は、何らかの機構が存在し平滑筋細胞特異的にクロマチン内の平滑筋CArGエレメントにSRFが誘導されることを示唆する。

次に平滑筋特異的なSRF誘導メカニズムを検討するために、胚性癌細胞P19から高効率に平滑筋細胞に分化する培養細胞系を確立した⁸⁾。この系を用いて、平滑筋分化におけるSRFの結合を検討した。この細胞ではSRFの発現は平滑筋分化の過程でほとんど変化しない。ゲルシフトアッセイにおける、SRFのCArGエレメントへの結合活性も変化しない。ところが、SM-MHCや平滑筋 α アクチンのCArGエレメントに対するSRF結合をChIPアッセイで見ると、未分化な状態ではこれらのCArGエレメントへのSRF結合は認められなかった。平滑筋分化後にはSRFの結合が明らかであった。また、骨格筋 α アクチンCArGエレメントへのSRF結合は認められず、平滑筋分化の過程で平滑筋遺伝子CArGエレメントへSRFが特異的に誘導されることが示された。つまり平滑筋の分化とともに、平滑筋遺伝子のCArGエレメントに特異的にSRFが誘導されると考えられた。

クロマチンの構造は、基本的に転写に対して抑制的である。ヒストンにDNAが密に巻きついた状態(閉じた状態)では転写因子が結合配列にアクセスできず、転写が抑制される。転写が活発に生じている領域ではクロマチン構造が開き、転写因子がアクセスできるようになる。ヒストン蛋白のN末端領域のアセチル化が、クロマチン構造の変換に重要であることが知られている。そこでわれわれは、平滑筋分化における平滑筋CArG領域のヒストンアセチル化を検討した⁹⁾。平滑筋分化に伴ってSM-MHCおよび平滑筋 α アクチンのCArGを含む領域のヒストンは、明らかにアセチル化が進んだ。これに対して遺伝子発現の見られない非平滑筋遺伝子のヒストンは、アセチル化されていなかった。この結果は、平滑筋細胞分化に伴って、平滑筋遺伝子の

転写調節領域に特異的にクロマチンリモデリングが生じていることを示す(Fig. 2)。つまり、未分化な状態では平滑筋遺伝子のCArGを含む領域のクロマチン構造は閉じており、SRFがアクセスできず、SRFの結合が見られない。平滑筋の分化に伴って、これらの領域のクロマチン構造がリモデリングを受けるとともに、SRFを選択的に誘導する。したがって、平滑筋特異的な遺伝子制御の解明には、このようなクロマチンレベルでのメカニズムを検討することが重要となる。

平滑筋特異的転写はクロマチン内で 転写因子・コレギュレーター・シスエレメントの ネットワークによって制御されている

平滑筋分化におけるSM-MHC遺伝子発現制御の解析から、これまで見てきたように二つのことが明らかとなった。まず、SM-MHC遺伝子の転写は、単一のエンハンサーやプロモーターによって制御されているのではなく、多数の転写調節モジュールの相互作用によって決定されていること。そしてクロマチン構造の制御が平滑筋特異的な転写に重要であること。それでは、実際にはどのようにして平滑筋特異的なクロマチンリモデリングが制御されているのであろうか。

SM-MHC遺伝子第1イントロンのCArGエレメントを含む領域227bplは、最小thymidine kinaseプロモーターに接続することによって、トランスジェニックマウスで血管平滑筋と横紋筋に特異的な活性を示した(Fig. 3)。つまり、この領域は独立した転写制御モジュールとして機能する。そこで、このモジュールの構造に関して検討を進めた。染色体内のこの領域への転写因子の結合を*in vivo* footprintingによって検討したところ、複数のシスエレメントに蛋白質が結合していた。シスエレメントとしてCArGエレメント、YY1結合配列、GATAエレメント等が存在した。したがって、複数のシスエレメントに結合する転写因子が、このモジュールの機能に重要であると考えられた。

SRF自体には平滑筋特異性がない。しかし、SRFとある程度の組織選択性を持つ転写因子との組み合わせは、平滑筋特異性を獲得する可能性がある。最近、多数の転写因子・コレギュレーターによる転写制御のメカニズムとしてエンハンスオソームが提唱されている。エンハンスオソームは、多数の転写因子および転写コファクターなどの蛋白がDNA上に築く大きな複合

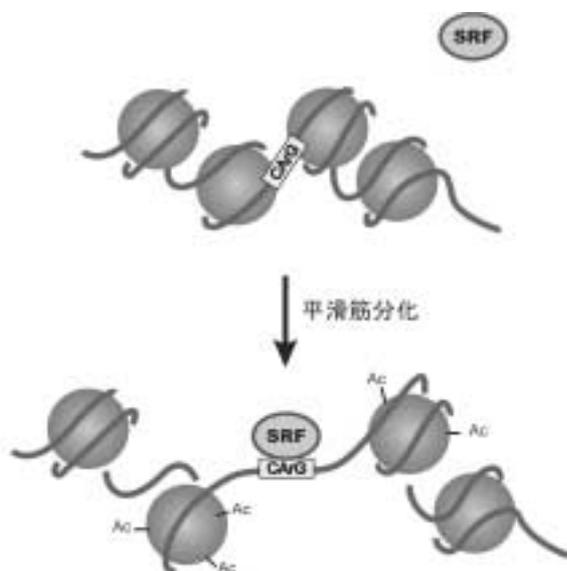


Figure 2 Chromatin remodeling and SMC-specific transcription. Within cell nuclei, DNA is organized in a higher order chromatin structure. The basic unit of chromatin is the nucleosome, within which DNA is tightly wrapped around a histone octamer. In general, the structure of the nucleosome represses transcription by inhibiting access of transcription factors (“closed” chromatin). Remodeling of the chromatin structure dictated by chromatin remodeling factors, including histone acetyltransferases (HATs) and ATP-dependent chromatin remodeling complexes, “opens” the chromatin structure and permits access of transcription factors. In undifferentiated cells, the CArG elements in SMC differentiation marker genes are within the “closed” chromatin and are therefore unavailable for binding by SRF. During SMC differentiation, the regulatory regions containing the CArG elements undergo chromatin remodeling and become available for SRF binding. Notably, the model illustrated here may be overly simplified. Gene expression during cell differentiation likely requires multiple steps involving both large- and small-scale chromatin remodeling, and activation and repression involving dynamic chromatin remodeling.

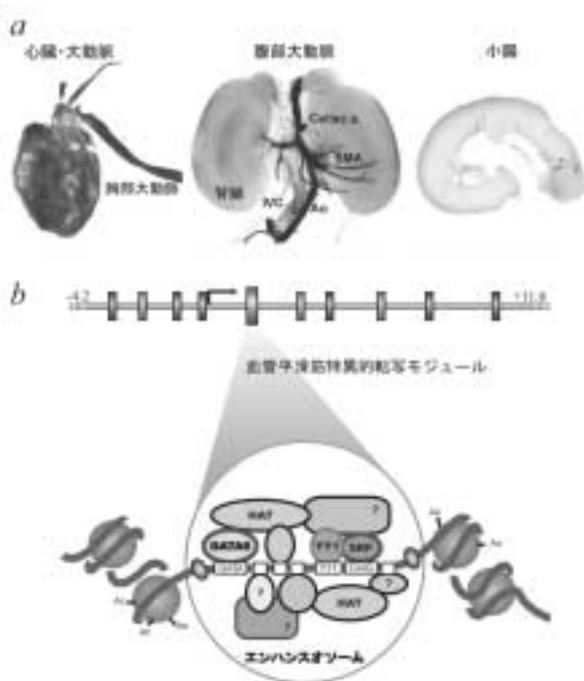


Figure 3 The SM-MHC transcriptional regulatory module in the first intron.

(a) An intronic transcriptional regulatory module at +1.5 kb is sufficient to drive transgene expression in vascular SMCs and striated muscle cells in transgenic mice. Modified from Ref. 6. (b) Multiple transcription factors and coregulators bind to the module. Transcription factors involved in the control of the module are schematically shown.

体である⁹⁾。エンハンスオソームでは、全体の活性が各構成要素の相乗作用によって決定されるため、エンハンスオソームの機能は各構成要素の活性とは質的に異なる。また、エンハンスオソーム全体の機能には、クロマチンやDNAの構造変化が重要である。われわれ

の研究結果から考えると、SM-MHC遺伝子の転写制御モジュールにおいても、このようなエンハンスオソームが構築されていることが強く示唆される。転写因子やクロマチン構造、DNAの相互作用によって、SRFが平滑筋遺伝子のCArGエレメントに特異的に誘導され、

エンハンスオソームが形成されることによって、モジュールが機能を示すのであろう。今後、エンハンスオソームの解析とともに、クロマチン構造モデリングの詳細の検討が重要となる。また、エンハンスオソームは平滑筋形質変換の制御にも重要である^{10,11)}。今後、エンハンスオソーム内で展開している蛋白相互作用をターゲットとする新しい治療戦略も考えられるだろう。

文 献

- 1) Nagai R, Kowase K, Kurabayashi M: Transcriptional regulation of smooth muscle phenotypic modulation. *Ann NY Acad Sci*, 2000, **902**: 214-222.
- 2) Owens GK: Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 1995, **75**: 487-517.
- 3) Aikawa M, Sivam PN, Kuro-o M, et al: Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res*, 1993, **73**: 1000-1012.
- 4) Aikawa M, Kim HS, Kuro-o M, et al: Phenotypic modulation of smooth muscle cells during progression of human atherosclerosis as determined by altered expression of myosin heavy chain isoforms. *Ann NY Acad Sci*, 1995, **748**: 578-585.
- 5) Madsen CS, Regan CP, Hungerford JE, et al: Smooth muscle-specific expression of the smooth muscle myosin heavy chain gene in transgenic mice requires 5'-flanking and first intronic DNA sequence. *Circ Res*, 1998, **82**: 908-917.
- 6) Manabe I, Owens GK: CArG elements control smooth muscle subtype specific expression of smooth muscle myosin in vivo. *J Clin Invest*, 2001, **107**: 823-834.
- 7) Manabe I, Owens GK: The Smooth Muscle Myosin Heavy Chain Gene Exhibits Smooth Muscle Subtype-selective Modular Regulation in Vivo. *J. Biol. Chem*, 2001, **276**: 39076-39087.
- 8) Manabe I, Owens GK: Recruitment of SRF and hyperacetylation of histones at smooth muscle-specific regulatory regions during differentiation of a novel P19-derived in vitro smooth muscle differentiation system. *Circ Res*, 2001, **88**: 1127-1134.
- 9) Merika M, Thanos D: Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, **11**: 205-208.
- 10) Shindo T, Manabe I, Nagai R, et al: Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med*, 2002, **8**: 856-863.
- 11) Manabe I, Shindo T, Nagai R: Gene Expression in Fibroblasts and Fibrosis: Involvement in Cardiac Hypertrophy. *Circ Res*, 2002, **91**: 1103-1113.

Smooth Muscle Subtype-specific Transcriptional Control in Chromatin

Ichiro Manabe, and Ryozo Nagai

Department of Cardiovascular Medicine and Department of Clinical Bioinformatics,
University of Tokyo Graduate School of Medicine

Key words: Smooth muscle, Transcription, Chromatin, Differentiation, Phenotypic modulation

Smooth muscle cells (SMCs) dynamically change their phenotype and function in divergent and changing environments. Since expression of SM myosin heavy chain (SM-MHC) is precisely regulated depending on the differentiated state of SMCs, to unravel the dynamic transcriptional control of the phenotype and function of SMCs we analyzed the gene using transgenic mice and other strategies for studying the control mechanism of the endogenous SM-MHC gene within chromatin. Transgenic mouse analyses demonstrated that the SM-MHC gene was controlled by multiple transcriptional regulatory modules widely distributed within the -4.2kb to +11.6kb genomic region. Importantly, these regulatory modules were required differentially for expression in different SMC-subtypes and during development, suggesting that the regulatory modules functioned differentially in SMC-subtypes and that transcriptional control of the entire gene was determined by the complex interplay between modules but not by an isolated module. Analyses of the induction of SM-MHC expression during SMC differentiation using a novel *in vitro* SMC differentiation system showed that chromatin remodeling played an essential role in the initiation and SMC-specific control of SM-MHC and other SMC differentiation marker genes. We further demonstrated that SM-MHC transcriptional regulatory modules formed large nucleoprotein complexes (enhanceosomes). A novel view that emerges from these studies is that SMC genes are controlled by the network of multiple enhanceosomes within chromatin. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, **43**: 131-135)