

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18510173

研究課題名 (和文) ゲノム安定化領域の同定と機能解析

研究課題名 (英文) Identification and functional analysis of genome stabilized region

研究代表者

日比野 康英 (HIBINO YASUHIDE)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：10189805

研究成果の概要：

我々は、核マトリックスがゲノム機能を支える基盤として、遺伝子の発現、すなわち生命現象の機能発現と密接に関連していると考え、これまでに数百に及ぶ遺伝子について MAR/SAR 領域を同定してその機能を明らかにしてきた。その方法は、The Human Genome Database (GDB) (Future *et al.* 2000; <http://gdbwww.gdb.org/>) より得たヒトゲノム情報を用いて、MAR/SAR 領域検索プログラム [MARFinder あるいは SMARTest (Frisch *et al.* 2002; [http://www.genomatix.de/cgi-bin/smarestest\\_pd/smarestest.pl](http://www.genomatix.de/cgi-bin/smarestest_pd/smarestest.pl))] による候補領域の推定後、実験的にその存在を証明して同定することができた。一方で、この実験で用いたプログラムの信頼性を高く評価することも可能となった。今後、残された遺伝子に関する MAR/SAR 領域の同定には、このプログラムを原則として用いる点で有用性があるとの結論に至った。

一方、核基質足場タンパク質 (P130/MAT3) と MAR/SAR との相互作用を通して“細胞核のダイナミクス”を解析するために、種々の機能タンパク質の関与を調査した。

#### 1. P-糖蛋白質遺伝子の転写因子結合領域の推定

P-糖タンパク質遺伝子の MAR/SAR 領域と各種転写因子結合コンセンサス配列を推定した。その結果、P-糖タンパク質遺伝子には 3 種類の MAR/SAR 配列と NF- $\kappa$ B を含む種々の興味深い転写因子の結合コンセンサス配列の存在を確認した。

#### 2. NF- $\kappa$ B 結合領域の同定

抗転写因子抗体を用いて、NF- $\kappa$ B などの結合部位を転写上流 5000 塩基の領域内で同定した。また、多種類の因子の結合領域を同定した。

#### 3. MAR/SAR 領域の推定と P130/MAT3 および種々の転写因子との相互作用

抗 P130/MAT3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) によりそれらの相互作用を検討し、極めて巧みな調節制御を確認した。即ち、将来的に MAR/SAR 領域のエピジェネティクス解析が、遺伝子発現制御に重要な知見をもたらす可能性があるとの結論に至った。

本研究計画は、いわゆる塩基配列としての遺伝子の発現調節領域 (MAR/SAR) を同定する“ゲノム構造研究”と、MAR/SAR と相互作用する核基質足場タンパク質の機能解析を通して細胞核の機能を解明する“細胞核のダイナミクス研究”が融合したプロジェクトであると判断した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	510,000	4,110,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ヒトゲノム、核マトリックス、DNA 結合蛋白質、遺伝子発現、バイオフィンフォマティクス、転写因子、

## 1. 研究開始当初の背景

細胞核を構成する主要な構造体である染色体は、核基質 (nuclear matrix) に浮遊しているのではなく、染色体 DNA に内在する matrix/scaffold attachment region (MAR/SAR) を介して、核骨格と呼ばれる核基質の網状構造を作るタンパク質群の一種である足場タンパク質 (nuclear scaffold) と結合して保持され、細胞核内で chromosome territory を形成する (Zirbel *et al.* 1993)。base unpairing region あるいは bend 構造を共通構造とする MAR/SAR は、遺伝子の上流及び下流さらにはイントロンに存在し、およそ 100 k 塩基対に一ヶ所の頻度で分布すると考えられていることから、 $3 \times 10^9$  塩基対の染色体 DNA 全体で約 3 万ヶ所存在することになる (Schubeler *et al.* 1996)。その全てが核基質と結合すると仮定すれば、核骨格も染色体に沿って複雑に入り組んだ網目として個々の染色体を分離し、安定に保持することが重要な役割の一つになる。一方、プロモーターの近位に存在する MAR/SAR は、転写を活性化すると報告されており (Xu *et al.* 1989/ Forrester *et al.* 1994/Jenuwein *et al.* 1997)、さらに MAR/SAR のメチル化・脱メチル化によるクロマチンのリモデリングが転写の活性化に大きく影響することから (Poljak *et al.* 1997)、全ての染色体の MAR/SAR と直接結合する可能性がある足場タンパク質は、遺伝情報を保存する極めて静的な役割のほか、情報の利用の過程にも重要な役割を果たしていると予想される。平成 17 年度までの我々の基盤研究において、The Human Genome Database (GDB) (Future *et al.* 2000: <http://gdbwww.gdb.org/>) のゲノム情報から、バイオフィンフォマティクス的手法により MAR/SAR 領域を決定し、ゲノム上での分布図を作成し、現在までに薬物代謝、薬物排泄ポンプ、細胞周期、酸化ストレス等に関与する遺伝子群約 300 種類の MAR/SAR を決定した。これまでに得られた結果は、この領域がエクソンには全く見出されず、遺伝子の上流、下流、およびイントロンにのみ配置されることを

示していた。我々は、このプログラムの信頼性を示すと共に、MAR/SAR が何らかの法則に基づいてゲノムに分布し、細胞核内での空間的な配置に深く関与していることを考察してきたが、その機能について明確な結論を得るためにはデータは不十分である。我々は、核マトリックスがゲノム機能を支える基盤として、遺伝子の発現、すなわち生命現象の機能発現と密接に関連していると考えている。従って、これまでの研究結果に基づいて、各遺伝子に配置された MAR/SAR 領域を同定してその機能を明らかにし、さらに核基質足場タンパク質 (P130/MAT3) と MAR/SAR との相互作用を通して“細胞核のダイナミクス”を解析することは、ゲノム解剖学を進展させる上でタイムリーなプロジェクトと考えていた。本研究計画は、いわゆる塩基配列としての遺伝子の発現調節領域 (MAR/SAR) を同定する“ゲノム構造研究”と、MAR/SAR と相互作用する核基質足場タンパク質の機能解析を通して細胞核の機能を解明する“細胞核のダイナミクス研究”が融合したプロジェクトと考えて計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、ヒトゲノム配列情報からバイオフィンフォマティクス的手法に基づいてゲノム DNA 中の MAR/SAR 領域を推定し、さらに、生化学的手法によってこの領域が実際に機能するのかどうかを証明することである。これによって正確なヒトゲノムの MAR/SAR 地図を作成することが可能となる。第二の目的は、核マトリックス構造を明らかにする手段として、核骨格足場タンパク質の一つとして我々が明らかにしてきた P130/MAT3 の興味ある種々の機能が、推定された MAR/SAR との相互作用を通して、その機能を発揮するのかどうかを証明することである。これは、全ての染色体の MAR/SAR と直接結合する可能性のある核基質足場タンパク質が、遺伝情報を保存する極めて静的な役割のほか、情報の利用の過程にも重要な役割を果たしていると予想されるためである。さらに、この研究には、P130/MAT3 が転写促進因子として働く為に必要な機能発現

部位を明らかにする項目が含まれる。これによって、P130/MAT3 がクロマチンの構造的・機能的基盤形成能とどのような関連があるのかを明らかにすることができる。このような目的を達成させるために、本実験が計画された。

### 3. 研究の方法

#### I : ヒトゲノム DNA 配列中の MAR/SAR 領域の推定

ヒトゲノム DNA の配列情報を用いて、バイオインフォマティクスに基づいた解析方法に従って、各遺伝子の MAR/SAR 領域を推定する。この方法は、MAR/SAR 領域が遺伝子の 5' -上流および 3' -下流、さらにはイントロン領域に存在するとの報告に基づくもので、The Human Genome Database (GDB) (Future *et al.* 2000; <http://gdbwww.gdb.org/>) より得たヒトゲノム情報により、MAR/SAR 領域検索プログラム [ MARFinder あるいは SMARTest (Friscm *et al.* 2002; <http://www.genomatix.de/cgi-bin/smartestpd/smartest.pl> ) ] を用いて候補領域を推定する。

II : 推定された MAR/SAR 配列の増幅とその構造解析 推定された MAR/SAR は、その領域を忠実に増幅できる DNA プライマーを設計し、ゲノム DNA を鋳型として PCR 法により増幅する。次に、この DNA を化学的に処理し、Maxam & Gilbert 法による電気泳動を用いて base unpairing region の存在をハイスループットな方法で解析する。一方、Bend 構造の確認には、推定された MAR/SAR の二量体を作成した後、circular permutation assay によりその存在を確認する。決定した MAR/SAR 領域は、新規な情報としてふさわしいデータベースに登録申請する。

III : 推定された MAR/SAR の転写活性化能の解析 base unpairing region や bend 構造を持つ複数の動植物から得られた MAR/SAR を、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして導入されたプラスミドベクターのプロモーター上流に挿入して、これを培養細胞内にリポフェクション法により導入して transient 系での転写活性化能の有無を判定する。

#### IV : 推定された MAR/SAR 配列と P130/MAT3 との結合解析

- 核マトリックス画分に残存する DNA を鋳型にした推定 MAR/SAR の増幅
- 抗 P130/MAT3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降物中の MAR/SAR の同定
- Electrophoretic Mobility Shift

Assay (EMSA) による結合の解析

#### V : P130/MAT3, 転写因子, MAR/SAR の協調的作用が転写活性に及ぼす影響

- 抗 NF- $\kappa$ B 抗体によるクロマチン免疫沈降物中の P130/MAT3 と MAR/SAR の同定
- 変異 P130/MAT3 を強制発現した細胞を用いた、抗 NF- $\kappa$ B 抗体によるクロマチン免疫沈降物中の P130/MAT3 および MAR/SAR の同定

### 4. 研究成果

#### I : ヒトゲノム DNA 配列中の MAR/SAR 領域の推定

バイオインフォマティクスに基づいた解析方法に従って、ヒト遺伝子の MAR/SAR 領域を推定した。すでに、薬物代謝、薬物排泄ポンプ、細胞周期、酸化ストレスなどの機能に関与する約 300 種類の遺伝子について、約 2,000 ヶ所の MAR/SAR 領域を決定しヒトゲノム上の分布図を作成した。その結果、この推定プログラムは、非常に高い精度で MAR/SAR 領域を推定することが可能であり、すべての推定領域が本来の MAR/SAR の特徴を示すことを明らかにしつつある。今後もこのプログラムを用いて、未解析遺伝子の推定領域を同定する必要がある。

#### II : 推定した MAR/SAR 配列と P130/MAT3 との結合解析

核マトリックスタンパク質である P130/MAT3 は、すでに複数の MAR/SAR と結合することが確認されていることから、今回推定した MAR/SAR との結合能を、以下の3つの方法でスクリーニングした。

##### A. 核マトリックス画分に残存する DNA を鋳型とした推定 MAR/SAR の増幅

核マトリックス画分から DNA を回収し、この DNA を鋳型として研究の方法 I で得られた各遺伝子の情報に基づいてプライマーを設計し、DNA の増幅の有無を確認した。その結果、すべての推定 MAR/SAR 領域が増幅され、推定プログラムの信頼性を今回の遺伝子を用いた場合でも証明できた。

##### B. 抗 P130/MAT3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降画分中の MAR/SAR の同定

抗 P130/MAT3 抗体による ChIP アッセイで得られた画分に含まれる MAR/SAR 領域を同定するために、上記で設計したプライマーを用いて増幅の有無を確認した。その結果、遺伝子ごとに増幅されるは MAR/SAR 領域ごとに異なるものの、P130/MAT3 と相互に作用する

MAR/SAR領域が明らかにできた。

### C. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) による結合の解析

単離した P130/MAT3 と MAR/SAR との結合実験を、EMSA により解析した。その結果、上記 B の結果をすべて支持する結果となった。

### III : P-糖タンパク質遺伝子の MAR/SAR 領域と NF-κB 結合領域の推定

P-糖タンパク質遺伝子の MAR/SAR 領域と転写因子 NF-κB 結合コンセンサス配列を推定した。その結果、P-糖タンパク質遺伝子には3種類の MAR/SAR 配列と NF-κB 結合コンセンサス配列の存在が確認できた。

### IV : NF-κB 結合領域の同定

転写上流5000塩基の領域からNF-κB結合部位を以下の方法で同定した。

#### 抗NF-κB抗体を用いたクロマチン免疫沈降による同定

抗NF-κB抗体によるChIPアッセイで得られた画分に含まれるDNAを、あらかじめ設計したプライマーを用いて領域を絞り込み、上流4 kおよび1 kの2ヶ所に結合していると考えられる領域を明らかにした。

### V : MAR/SAR領域の推定とP130/MAT3およびNF-κBとの相互作用

MAR/SAR推定領域に相当するプライマーセットの設計とともに、以下の方法で相互作用を検討した。

#### 抗P130抗体を用いたクロマチン免疫沈降による同定

抗P130/MAT3抗体によるChIPアッセイで得られた画分に含まれるDNAを、あらかじめ設計したプライマーを用いて領域を絞り込み、NF-κBの存在について確認中した。また、そのカウンターパートについても実施した。

### VI : P-糖タンパク質遺伝子内の転写因子結合領域の推定

薬物の排泄ポンプとしての機能を示すP-糖タンパク質遺伝子の発現制御解析に着手した。まず、バイオインフォマティクスに基づいた解析方法に従って、P-糖タンパク質遺伝子の MAR/SAR 領域と各種転写因子結合コンセンサス配列を推定した。その結果、P-糖タンパク質遺伝子には3種類の MAR/SAR 配列と NF-κB を含む種々の興味深い転写因子の結合コンセンサス配列の存在を確認した。

### VII : NF-κB 結合領域の同定

抗転写因子抗体を用いて、クロマチン免疫沈降によるNF-κBなどの結合部位

を転写上流5000塩基の領域内で同定した。抗NF-κB抗体によるChIPアッセイで得られた画分に含まれるDNAを、あらかじめ設計したプライマーを用いて領域を絞り込み、上流4 kおよび1 kの2ヶ所に結合していると考えられる領域を明らかにするとともに、他の因子の結合領域を同定した。

### VIII : MAR/SAR領域の推定とP130/MAT3および種々の転写因子との相互作用

MAR/SAR推定領域に相当するプライマーセットを用いて、抗P130/MAT3抗体を用いたクロマチン免疫沈降によりそれらの相互作用を検討し、極めて巧妙な調節制御を確認した。抗P130抗体によるChIPアッセイで得られた画分に含まれるDNAを解析した結果、MAR/SAR領域のゲノムDNAのエピジェネティクス解析が、遺伝子発現制御に重要な知見をもたらす可能性があるとの結論に至った。従って、次年度に向けて新たな実験計画を申請することにした。

## 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 11 件)

- ① Iwata, N., Okazaki, M., Kasahara, C., Kamiuchi, S., Suzuki, F., Iizuka, H., and Hibino Y., Protective effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia against neuronal damage after cerebral ischemia/reperfusion in diabetic rats. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 61: 119-127 (2008) (査読あり)
- ② Okazaki M., Iwata N., Horiuchi S., Kamiuchi S., Suzuki F., Iizuka H. and Hibino Y., Protective effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia against neuronal damage after hypoxia- ischemia in mice. *Jap. J. Complement. Alter. Med.* 5: 153-162 (2008) (査読あり)
- ③ Okazaki M., Tanaka A., Hatta Y., Kawahara Y., Kamiuchi S., Iwata N., Asano S., Suzuki F., Iizuka H. and Hibino Y., Antioxidant properties of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* (Reishi) mycelia and antidiabetic effects in streptozotocin-treated mice. *Jap. J.*

- Complement. *Alter. Med.*, 5: 209-218 (2008) (査読あり)
- ④ Kinoshita A., Kobayashi D., Hibino Y., Isago T., Uchino K., Yagi K., Hirai M., Saitoh Y. and Komada F., Regulation of CMV promoter-driven exogenous gene expression with doxorubicin in genetically modified cells. *J. Pharmacy Pharmacol.* 60: 1659-1665 (2007) (査読あり)
- ⑤ Kudo, N., Sakai, A., Mitsumoto, A., Hibino, Y., Tsuda, T. and Kawashima, Y., Tissue distribution and hepatic subcellular distribution of perfluorooctanoic acid at low dose are different from those at high dose in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30: 1535-1540 (2007) (査読あり)
- ⑥ Usui, T., Okazaki, M., Kamiuchi, S., Suzuki, F., Iizuka, H. and Hibino, Y., Inhibitory effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia on postprandial blood glucose elevation in mice and additional effect with  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 60: 249-255 (2007) (査読あり)
- ⑦ Toyama, T., Kudo, N., Hibino Y., Mitsumoto A., Nishikawa M. and Kawashima Y., Effects of pioglitazone on stearyl-CoA desaturase in obese Zucker fa/fa rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 104: 137-145 (2007) (査読あり)
- ⑧ Toyama T., Kudo N., Mitsumoto A., Hibino Y., Tsuda T. and Kawashima Y., Steroyl-CoA desaturase activity is elevated by the suppression of its degradation by clofibric acid in the liver of rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 103: 383-390 (2007) (査読あり)
- ⑨ Katakura M., Kudo N., Tsuda T. Hibino Y., Mitsumoto A. and Kawashima Y., Rat organic anion transporter 3 and organic anion transporting polypeptide 1 mediate perfluorooctanoic acid transport. *Journal of Health Science*, 53: 77-83 (2006) (査読あり)
- ⑩ Hibino Y., Usui T., Morita Y., Hirose N., Okazaki M., Sugano N. and Hiraga K., Molecular properties and intracellular localization of rat liver nuclear scaffold protein P130, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1759: 195-207 (2006) (査読あり)
- ⑪ Li F, Kato I, Kawaguchi H, Takasawa K, Hibino Y., and Hiraga K., The galectin-3 gene promoter binding proteins in the liver of rats 48-h post-treatment with CCl<sub>4</sub>. *Gene*, 367: 46-55 (2006) (査読あり)
- [学会発表] (計 11 件)
- ① 高血圧自然発症ラット腸管の酸化ストレスの変動とP-糖蛋白質の発現:深谷 睦、神内伸也、岡崎真理、日比野康英, 日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 京都
- ② 高血圧自然発症ラットの腸管における参加ストレスと P-糖蛋白質の発現: 深谷睦、神内伸也、岡崎真理、日比野康英, 第 31 回日本分子生物学会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 神戸
- ③ ラット腸管細胞における酸化ストレスに応答した P-糖蛋白質の発現調節: 神内伸也、高山 武、臼井達洋、岡崎真理、日比野康英, 第 31 回日本分子生物学会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 神戸
- ④ 高血圧自然発症ラットの酸化ストレスと腸管における P - 糖蛋白質の発現: 深谷睦、岡崎真理、神内伸也、日比野康英, 埼玉医療懇話会 第 27 回学術講演会 2008 年 5 月 埼玉
- ⑤ 高血圧自然発症ラットの腸管における P-糖蛋白質の発現と酸化ストレス: 深谷睦、神内伸也、岡崎真理、日比野康英, 日本薬学会第 128 年会 2008 年 3 月 横浜
- ⑥ ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット腸管における CYP3As の発現制御機構: 永田裕樹、神内 伸也、岡崎 真理、日比野康英, 日本薬学会第 128 年会 2008 年 3 月 横浜
- ⑦ ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット腸管での P-糖蛋白質 (P-gp) を介した薬物輸送: 岩淵麗、神内伸也、高山武、岡崎真理、日比野康英, 日本薬学会第 128 年会 2008 年 3 月 横浜
- ⑧ Analysis of gene expression of P-glycoprotein associated with oxidative stress: Shinya Kamiuchi, Takashi Takayama, Rei Iwabuchi, Tatsuhiro Usui, Mari Okazaki, Yasuhide Hibino, 第 30 回日本分子生物学会年会、

第80回日本生化学会大会 2007年12月  
横浜

- ⑨ Induction of intestinal CYP3As in streptozotocin-induced diabetic rats: Yuki Nagata, Tatsuhiro Usui, Takeshi Takayama, Mutsumi Fukaya, Mari Okazaki, Yasuhide Hibino, 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 2007年12月 横浜
- ⑩ 糖尿病ラット腸管のP-gp発現メカニズムにおける酸化ストレスの関与: 高山武、神内伸也、岡崎真理、岩渕麗、日比野康英, 日本薬学会第127年会 2007年3月、富山
- ⑪ Protein kinases for modulating phosphorylation status of P130/MAT3: Tatsuhiro Usui, Takeshi Takayama, Mitsutaka Urimoto, Mari Okazaki, Koichi Hiraga and Yasuhide Hibino 第79回日本生化学会大会、20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology & 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress 2006, 6 Kyoto

[図書] (計3件)

- ① Hibino Y., Usui T., and Hiraga K., Nuclear Dynamics: approaches from molecular biochemical and visual biology” Transcriptional modulation by nuclear matrix protein P130/MAT3 associated with MAR/SAR. K. Nagata & K. Takeyasu Eds. Springer-Verlag Tokyo 255-262, 2007
- ② 日比野康英: 「栄養科学イラストレイテッド生化学」(第8章 糖質の代謝 p73-p94、第14章 遺伝子発現とその制御 p154-p174) 園田 勝 編 羊土社 2007年
- ③ 日比野康英: 「栄養科学イラストレイテッド演習版生化学」(第8章 糖質の代謝 p64-p87、第14章 遺伝子発現とその制御 p145-p166) 園田 勝 編 羊土社 2007年

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比野 康英 (HIBINO YASUHIDE)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号: 10189805

(2) 研究分担者

岡崎 真理 (OKAZAKI MARI)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号: 50272901

神内 伸也 (KAMIUCHI SHINYA)

城西大学・薬学部・助手

研究者番号: 80433647

(3) 連携研究者