

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770007

研究課題名(和文)クロマチンインスレーター複合体による HOX 遺伝子群の発現調節機構

研究課題名(英文)Function of a chromatin insulator complex in the HOX genes regulation .

研究代表者

石原 宏 (ISHIHARA KO)

熊本大学・大学院先端機構・特定事業教員

研究者番号：90398230

研究成果の概要：生物の形態形成に重要な役割をもつ HOXA 遺伝子群の発現調節機構を明らかにする目的で、この遺伝子領域のクロマチンインスレーターの同定と解析を行った。クロマチンインスレーターは異なる制御を受ける遺伝子間に存在し、互いに干渉しないように染色体上に境界を形成する役割を持つと考えられている。HOXA 遺伝子領域においてクロマチンインスレーターがクロマチンループ構造を形成し、この領域の転写制御に働く事が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：クロマチン、HOX 遺伝子、インスレーター、CTCF、クロマチンループ

1. 研究開始当初の背景

高等生物のゲノムは、細胞核および染色体全体というグローバルな制御を受けるとともに、各々の間期染色体は数 10～数 100 kb のローカルな機能ドメインを形成している。例えば、ゲノムインプリンティングを受ける遺伝子領域、グロビン遺伝子領域、HOX 遺伝子領域や T 細胞レセプター遺伝子領域などが機能ドメインを形成していると考えられ、ドメイン単位の制御が正常な発生・分化に不可欠である。このドメイン構造が存在することで、ドメイン内の遺伝子は特定のエンハンサーやサイレンサー、LCR(locus control

region)などによって特異的発現制御を受ける。隣接するドメイン間には構造的および機能的な境界を規定する DNA 配列(インスレーター)が存在し、ドメインの範囲を越えて互いに影響することを阻止している。つまり、インスレーターはドメイン外のエンハンサー等による不必要な転写の活性化やヘテロクロマチンの拡張等による遺伝子の不活性化をブロックする活性を持つと考えられている。しかし、インスレーターによる染色体ドメインの形成機構、インスレーター領域のクロマチン構造、インスレーターの本質的な分子機構の詳細は未だ不明である。インスレ

ーターの研究はショウジョウバエで比較的に進んでいるが、主にインスレーター配列と結合タンパク質の同定に重点があり、インスレーターの機能の本質に至っていない。哺乳類では、CTCF タンパク質がインスレーターに結合し、その活性を担う分子として理解されている。現在までに CTCF はゲノムインプリンティングの制御、X 染色体の不活性化、グロビン遺伝子ドメイン構築などに関与していることが示されており、CTCF は様々な発生現象に重要な役割を果たしている。

2. 研究の目的

哺乳類のゲノム上の個々の遺伝子はプロモーター・エンハンサー等の制御配列および転写調節因子、ヒストン修飾等のクロマチンで制御されている。しかし、組織特異性の異なる遺伝子群が隣接する場合でもそれらの特異的調節機構は互いに干渉しない。このことは染色体の機能ドメインの形成や高次の遺伝子発現制御の存在を示唆する。クロマチンインスレーターは、染色体上に機能的な境界をつくり、エンハンサーなどの制御配列が働く遺伝子と働かない遺伝子を区分している。その結果、組織・時期特異的な遺伝子発現パターンを可能にする転写機能ドメインが染色体上に構築される。そのような機能ドメインを構築していると予想される遺伝子領域として HOX 遺伝子領域が挙げられる。この遺伝子領域では、隣接した遺伝子が時空間的に制御され、厳密な発現様式が確立・維持されている。PcG タンパク質群や trx タンパク質群による制御に加え、時期・組織特異的エンハンサーが複数同定されており、それらは特定の遺伝子だけに作用するように調節されていることから、そこにはインスレーターによる制御の関与が強く示唆される。本研究では HOX 遺伝子領域をモデルとし、この領域のインスレーターの同定と高次クロマチン構造の解析を行い、HOX 遺伝子調節におけるインスレーターの分子機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

- (1) HOX 遺伝子領域のインスレーターの同定：クロマチン免疫沈降とジーンチップを用いた ChIP-on-chip 解析により、染色体上の CTCF タンパク質の結合領域を同定する。
- (2) CTCF 結合領域のインスレーター活性の検討：エンハンサーによって活性化されるルシフェラーゼ遺伝子をもつレポーターベクターのエンハンサーとプロモーターの間にインスレーターの候補配列を挿入し、その配列がエンハンサーの働きを防ぐ活性（インスレーター活性）を持つか評価する。
- (3) 遺伝子ノックダウンによる HOX 遺伝子の発現変化の解析：合成 2 本鎖 RNA (siRNA)

を培養細胞に導入し、CTCF 遺伝子の発現抑制を行い、HOX 遺伝子群の発現量を定量 PCR で解析する。

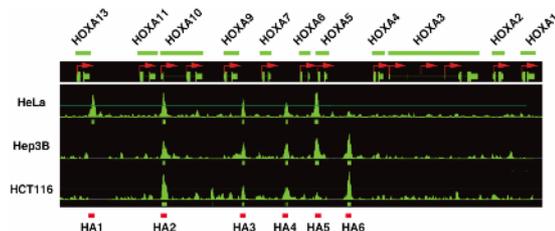
(4) DNA メチル化によるインスレーター制御の解析：CTCF はその標的配列がメチル化を受けると結合が阻害される事が知られている。異なる培養細胞間で CTCF の結合様式が異なる場合に、DNA のメチル化が関与するのかを Bisulfite 法を用いて解析する。

(5) HOX 遺伝子領域のクロマチン構造解析：インスレーターによるクロマチン高次構造形成を明らかにするため、3C(Chromosome conformation capture)解析をおこなう。細胞核内で、離れた染色体領域間の相互作用を調べる事が出来る。

(6) 進化的に保存されたインスレーター配列の同定：ヒトの培養細胞で同定したインスレーターが、マウスにも存在するか塩基配列比較とマウス細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により解析する。

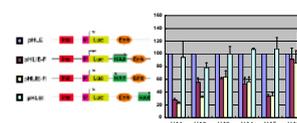
4. 研究成果

(1) HOX 遺伝子領域のインスレーターの同定：HeLa 細胞(子宮頸癌) HCT116 細胞(大腸癌)および Hep3B 細胞(肝臓癌)を用いて CTCF の ChIP-on-chip 解析を行った(下図)。



HOXA 遺伝子領域に少なくとも 6 カ所の CTCF 結合領域 (HA1-6) が存在する事を明らかにした。さらに、ゲルシフト解析により、in vitro での結合と詳細な結合部位を確認している。

(2) CTCF 結合領域のインスレーター活性の検討：Hep3B 細胞と下図のレポーターベクターを用いて解析を行った。

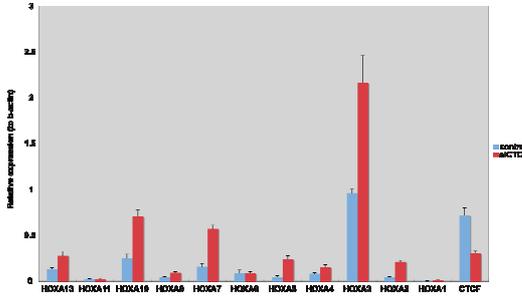


Hep3B cells

pHLE のルシフェラーゼ活性を 100 とし、HA1-HA6 の断片をエンハンサーと遺伝子間に挿入したもの (pHLIE-F, pHLE-R) のルシフェラーゼ活性を測定し、エンハンサーとプロモーターの相互作用を妨げる活性を持つか調べた。また pHLEI により HA 断片の

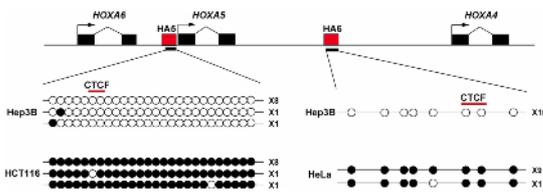
サイレンサー活性を調べた。解析の結果、HA1-HA5 はインスレーター活性を持つ事が示されたが、HA6 には見られなかった。

(3) 遺伝子ノックダウンによる HOX 遺伝子の発現変化の解析：Hep3B 細胞に siRNA を導入し、4 日後に RNA を抽出し、逆転写反応後に定量 PCR 解析を行った。



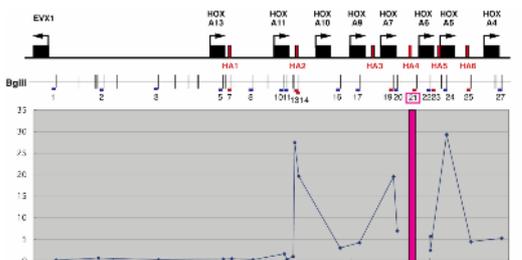
CTCF のノックダウンにより多くの HOXA 遺伝子群で発現の上昇が見られた。この結果は CTCF が HOXA 遺伝子群の発現調節に関与する事を示す。

(4) DNA メチル化によるインスレーター制御の解析：ChIP-on-chip 解析の結果、HeLa 細胞では HA6 に CTCF の結合が無く、HCT116 細胞では HA5 に結合が見られなかった。そこで、HA5 と HA6 の DNA メチル化状態を Bisulfite 法により解析した。



Sodium bisulfite でゲノム DNA を処理後、HA5, HA6 領域を PCR で増幅し、クローニングを行った。それぞれ 10 クローンをシーケンス解析した。Hep3B 細胞は HA5, HA6 とともに低メチル化（白丸）であったが、HCT116 細胞では HA5 が高度にメチル化（黒丸）されており、HeLa 細胞では HA6 が高度にメチル化を受けていた。この結果は CTCF の結合に DNA のメチル化による制御が働く可能性を示唆する。

(5) HOX 遺伝子領域のクロマチン構造解析：Hep3B 細胞を用いて 3C 解析を行った。HA4 との相互作用を見た結果を下図に示す。



HA4 は HA2 と HA3 の領域と細胞核内で近

接して存在し、クロマチンループを形成する事が示唆された。

(6) 進化的に保存されたインスレーター配列の同定: HOXA 遺伝子領域の CTCF 結合領域 HA1-HA6 についてヒト-マウス間で塩基配列比較を行った。その結果、マウスにも相同配列が存在する事が分かった。さらに、マウス ES 細胞, EC 細胞を用いたクロマチン免疫沈降の結果、それら保存配列に CTCF が結合する事が分かった。ゲルシフト法により in vitro での結合も確認している。HA1-HA6 が進化的に保存されているという事はこれらの配列が重要な役割を持つ事を示唆する。

クロマチンインスレーターが介するクロマチン高次構造変換による遺伝子発現制御の研究は国内外において先駆的な研究であり、今後転写研究において重要なものになると予想される。本研究では HOXA 遺伝子領域のインスレーターを同定し、遺伝子発現制御に関与する事、クロマチン高次構造形成に関与する事を明らかにしたが、今後この遺伝子群の発現制御とクロマチン高次構造変換の関係を明らかにしていく必要がある。発生段階、異なる組織間でのクロマチン高次構造の違いを調べていきたい。また、本研究でマウスにおいても HOXA 領域のインスレーター配列の存在が明らかとなったので、インスレーター配列の欠損細胞や個体を用いてその機能を調べたい。

本研究対象の HOX 遺伝子は、細胞の位置情報の記憶に関与していると考えられている。iPS 細胞作製時の細胞の初期化によって、細胞の位置情報の消去、すなわち HOX 遺伝子の発現も消去される事が分かっている。また、ES 細胞を in vitro で様々な細胞に分化させる事が出来るが、位置情報を決める HOX 遺伝子群の発現の調節までは出来ていない。将来、iPS や ES 細胞から組織・臓器を形成する際に HOX 遺伝子群の発現調節が必要になると予想され、再生医学の分野の研究にも寄与できると思われる。

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)

[学会発表](計 2 件)

石原宏、中尾光善、CTCF による HOX 遺伝子群の発現調節機構、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会合同大会、2008 年 12 月 12 日、神戸市

石原宏、中尾光善、CTCF による HOX 遺伝子群の発現調節機構、第 2 回日本エピジェネティクス研究会年会、2008 年 5 月 9~10 日、三島市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石原 宏 (ISHIHARA KO)

熊本大学・大学院先導機構・特定事業教員

研究者番号：90398230

(2)研究分担者

(3)連携研究者