

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月22日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570006

研究課題名（和文）複数の転写因子によるクロマチン構造の二段階変化の解析

研究課題名（英文）Spatiotemporal alteration of chromatin structure at promoter regions

研究代表者

石原 直恵（琴村直恵）(ISHIHARA NAOE)

藤田保健衛生大学・医学部・研究員

研究者番号：50571791

研究成果の概要（和文）：複数のプロモーターを持つアロマターゼ遺伝子（CYP19A1）をモデルとして、プロモーターが選択的に活性化される機構とクロマチン構造の関係を解析した。プロモーター選択性の異なる細胞株を用いた解析により、複数のプロモーターの中で使われるプロモーターのみがオープンなクロマチン構造をしていることを明らかにした。また、プロモーターが使われない仕組みとして、転写にネガティブなヒストン修飾を伴う積極的な転写抑制機構が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We analyzed chromatin structure responsible to the alternative promoter usage of the aromatase gene (CYP19A1), which is transcribed from three major promoters. Our novel method using sedimentation velocity centrifugation revealed that working promoters were exclusively composed of open chromatin. In contrast, the recruitment of trimethylation of histone H3 lysine 27, which is known as a negative mark for transcription, was observed around unused promoters, suggesting that polycomb proteins repressed the promoters selectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：アロマターゼ、クロマチン、ヒストン、プロモーター、転写調節

1. 研究開始当初の背景

本研究課題は、もともとインターロイキン2遺伝子の転写誘導時におけるクロマチン構造の変化から立案された。興味深いことに、この遺伝子座では発現が高まるにつれて複数の転写因子が結合し、クロマチン構造が段

階的に変化することを見出した。時間軸に沿ったクロマチンの変化を明らかにしたことで、次に展開すべき研究課題として、空間軸におけるクロマチンの変化が挙げられた。そこで、後述するように、アロマターゼ遺伝子を研究対象にした。

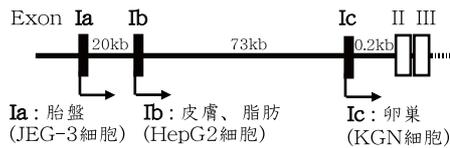


図1 ヒトCYP19遺伝子の組織特異的プロモーター

アロマターゼは、アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であり、胎盤、脂肪組織、卵巣など特定の組織で発現している。図1に示したように、アロマターゼ遺伝子には複数のプロモーターが存在する。それらプロモーターには組織特異性があり、転写活性も大幅に異なる。従ってアロマターゼ遺伝子の転写調節では、どの組織で発現させるかに加えて、どのプロモーターを選択するかが重要になる。このプロモーターの選択的活性化に関与する要因として、組織特異的な転写因子や特定のシグナルの活性化などが明らかになってきているが、アロマターゼ遺伝子側の要因の検討は少ない。

2. 研究の目的

複数存在するプロモーターの中から特定のプロモーターが選択的に活性化される仕組みを、シス要因である遺伝子自身のクロマチン構造に注目して明らかにする。

3. 研究の方法

アロマターゼ陽性細胞として、胎盤、肝臓、卵巣由来のヒト細胞株である JEG-3、HepG2 及び KGN を用いた。またアロマターゼ遺伝子を発現していないコントロールとしてヒト子宮由来の HeLa 細胞を用いた。これら細胞株について、アロマターゼ遺伝子のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) で、クロマチンの高次構造を SEVENS 法 (後述) で調べ、プロモーター選択とクロマチン構造の関係を検討した。

SEVENS 法は、研究分担者が最近開発したクロマチン構造解析法である (図2)。ホルマリンで固定した細胞を超音波処理すると、ヌクレオソームの局所的密度を反映して、クローズなクロマチンは大きな粒子に、オープンなクロマチンは小さな粒子に断片化される。この大きさの違う断片を、シヨ糖密度勾配遠

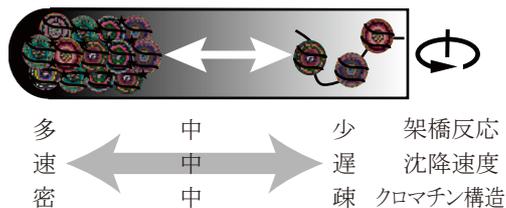


図2 SEVENS 法の原理

図中の星印はホルマリンによる架橋を表す。

心により分画することでクロマチンの高次構造を解析する方法である。

4. 研究成果

(1) 研究に供する細胞株のアロマターゼ発現パターンの検討

各細胞株のプロモーター選択性とアロマターゼ遺伝子の発現量を RT-PCR 法で検討した。その結果、JEG-3 細胞は Ia、HepG2 細胞は Ib、そして KGN 細胞は Ic プロモーターを主に使っており、発現量は JEG-3 細胞が最も多く、HepG2 細胞、KGN 細胞の順で少ないことを確認した (表1)。このことより、これら細胞株は、本研究に適した材料と判断した。

表1 各細胞株におけるアロマターゼの発現パターン

	Ia	Ib	Ic
JEG-3	+++	++	++
HepG2	-	++	+
KGN	-	-	+

(2) 各プロモーター領域のクロマチン構造と転写の関係の検討

① 上記3種の細胞株について、アロマターゼ遺伝子の転写活性に関連したヒストン修飾を検索するため、ChIP 法により Ia, Ib, Ic プロモーターのヒストン修飾を調べた。その結果、いずれの細胞株でもヒストン H3ac, H3K4me2/3, H3K9me3 の修飾は認められなかった。一方で、HepG2 細胞において、使われていないプロモーターである Ia には、転写抑制のマーカであるヒストン H3K27 のトリメチル化が、使われているプロモーターである Ib には、転写活性化のマーカであるヒストン H3K27 のアセチル化が確認された。

② 各プロモーターのクロマチン構造を SEVENS 法で検討したところ、いずれの細胞株も、使われているプロモーターはオープンなクロマチン構造をしているのに対し、使われていないプロモーターはクローズなクロマチン構造をしていることが明らかになった。

以上の結果より、アロマターゼ遺伝子に存在する複数のプロモーターは、ヒストンの修飾を伴うクロマチン構造の変換によって使い分けられている可能性が示唆された。

(3) アロマターゼ遺伝子全域のクロマチン構造と転写の関係の検討

アロマターゼ遺伝子の各プロモーターのクロマチン状態が決められる仕組みを探る糸口として、130kb に及ぶアロマターゼ遺伝子全域のクロマチン構造を SEVENS 法と ChIP 法で解析した。

① SEVENS 法による解析により、アロマターゼ遺伝子を発現しない HeLa 細胞では、この遺伝子座の全域に渡ってクローズ構造であ

ったが、Ic の 15kb 下流に局所的なオープン構造が見られた。興味深いことに、この場所のオープン構造は KGN 細胞でも見られ、活性を持つ Ic プロモーターと共に 2つのオープン構造のピークが観察された。HepG2 細胞では、活性を持つ Ib と Ic プロモーターに加え Ib から 20kb 下流域でオープン構造のピークが、また、全てのプロモーターが使われる JEG-3 細胞では、3つのプロモーター領域と共に Ib の 30kb 下流にオープン構造が見られた。重要なことに、これらのオープン構造の領域以外では比較的クローズな構造が見られるので、この遺伝子座のクロマチンのデフォルトはクローズ構造で、何らかの活性化機構がピンポイントでクロマチンをオープンにする可能性が考えられた。

② 次に、先の実験で転写との関連が示唆されたヒストン H3K27 の修飾を、アロマターゼ遺伝子座全域について検討した。いずれの細胞株でも、転写にポジティブなマークであるヒストン H3K27 アセチル化のピークは、使われるプロモーター領域に存在した。一方、転写にネガティブなマークであるヒストン H3K27 トリメチル化は、一部の細胞株で、使用していないプロモーター及びその上流にピークが局在していた。これは、ヒストン H3K27 トリメチル化によりプロモーターが選択的に転写抑制されている可能性を示唆している。これを検証するため、ヒストン H3K27 トリメチル化酵素の阻害剤を添加し、RT-PCR で使われているプロモーターを確認したところ、通常使われないプロモーターからの転写が確認できた。更に、阻害剤添加により使われるようになったプロモーター領域では、ヒストン H3K27 トリメチル化が減少し、クロマチンがオープンになる傾向が認められた。以上の結果より、ヒストン H3K27 トリメチル化がアロマターゼ遺伝子のプロモーター選択性と活性に関わっていることが明らかになった。

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 4 件)

- ① Pandiyan, P., Yang, XP., Saravanamuthu, SS., Zheng, L., Ishihara, S., O' Shea, JJ., and Lenardo, MJ. (2012) The role of IL-15 in activating STAT5 and fine-tuning IL-17A production in CD4 T lymphocytes. *J. Immunol.* 189, 4237-4246. doi: 10.4049/jimmunol.1201476 査読あり
- ② Yang, L., Kotomura, N., Ho, YK., Zhi, H., Bixler, S., Schell, MJ., and Giam, CZ. (2011) Complex cell cycle abnor-

malities caused by human T-lymphotropic virus type 1 Tax. *J. Virol.* 85, 3001-3009. doi: 10.1128/JVI.00086-10 査読あり

- ③ Ishihara, S. and Schwartz, RH. (2011) Two-step binding of transcription factors causes sequential chromatin structural changes at the activated IL-2 promoter. *J. Immunol.* 187, 3292-3299. doi: 10.4049/jimmunol.1003173 査読あり
- ④ Ishihara, S., Varma, R., and Schwartz, RH. (2010) A new fractionation assay, based on the size of formaldehyde crosslinked, mildly sheared chromatin, delineates the chromatin structure at promoter regions. *Nucleic Acids Res.* 38, e124. doi: 10.1093/nar/gkq203 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- ① 琴村直恵, 原田信広, 石原悟. The chromatin structure responsible for the degree of the promoter activity. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012 年 12 月 11 日~14 日. 福岡.
- ② 石原悟, 琴村直恵, 原田信広. CYP19 遺伝子のプロモーター選択機構: 密なクロマチン構造でプロモーターを選択的に抑制する. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2012 年 05 月 14 日~15 日. 東京.
- ③ 琴村直恵, 原田信広, 石原悟. The contribution of histone modifications to alternative promoter usage of the human CYP19 gene. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011 年 12 月 13 日~16 日. 横浜.
- ④ 石原悟, 琴村直恵, 西芳寛, 野村政壽, 柳瀬敏彦, 原田信広. ヒストン H3K27 のトリメチル化によるアロマターゼ遺伝子プロモーターの選択的不活性化. 第 19 回日本ステロイドホルモン学会学術集会. 2011 年 11 月 26 日. 福岡.
- ⑤ 石原悟, 琴村直恵, 原田信広. Condensed Chromatin Marked by K27-Trimethylated Histone H3 Determines Alternative Promoter Usage of the CYP19 Gene. 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2011 年 5 月 19 日~20 日. 熊本.
- ⑥ Kotomura, N., Harada, N., Ishihara, S. Condensed chromatin marked by K27-trimethylated histone H3 determines alternative promoter usage of the CYP19 gene. CDB Symposium "Epigenetic landscape in development and disease". Mar. 14-15, 2011. Kobe, JAPAN.

- ⑦ Ishihara, S., Schwartz, RH. Sequential rearrangement and eviction of nucleosomes allow interleukin-2 transcription following T cell activation. The NIBB Conference “DYNAMICGENOME”. Oct.16, 2010. Okazaki, JAPAN.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 直恵 (琴村直恵)

(ISHIHARA NAOE)

藤田保健衛生大学・医学部・研究員

研究者番号：50571791

(2) 研究分担者

石原 悟 (ISHIHARA SATORU)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：00300723