

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710216

研究課題名（和文）核マトリクスタンパク質SP120による神経細胞核内構造の制御機構

研究課題名（英文）Regulation of nuclear architecture of neuronal cells by nuclear matrix protein SP120

研究代表者

宮地 まり (MIYAJI MARI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50349255

研究成果の概要（和文）：

神経特異的な遺伝子群は、発現しにくいゲノム環境に位置するものが多く、その発現に先だって核内構造の変化が必要と考えられる。私たちは、この過程に核マトリクスタンパク質hnRNP U/SAF-A/SP120とDNAトポイソメラーゼIIβの複合体が関与するとの仮説を立て、検証を行ってきた。本研究課題では、SP120のDNA認識機構の解明に焦点を当て解析し、これまで、RNA結合に重要だと考えられていたC末端のアルギニンとグリシンに富んだ領域（RGドメイン）が核マトリクス付着領域（MAR）DNAの結合に重要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Several neuron-specific genes placed in the AT-rich genomic environment are regulated by DNA topoisomerase (topo) IIβ. We have identified hnRNP U/SAF-A/SP120 as a protein associated with topo IIβ in differentiating cerebellar neurons. SP120 is a multifunctional nuclear protein that directly binds to DNA and RNA. SP120 specifically and cooperatively binds AT-rich matrix attachment regions (MAR). It was reported that the N-terminal domain termed SAF-box was required for DNA binding and the C-terminal domain called RGG-box was essential for the interaction with RNA. We showed that a C-terminal domain enriched with Arg-Gly (RG domain) encompassing the RGG-box was important for the MAR-specific binding activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：神経細胞、核内構造、AT-rich DNA、核マトリクス

細胞分化過程における遺伝子発現制御には、局所的なクロマチン構造だけでなく、より高次の核内構造も関係しており、この構造の分子基盤を明らかにすることが、重要と考えた。

私達は、核マトリクスタンパク質の1つ、hnRNP U/ SAF-A/ SP120 (以後 SP120) に着目した。SP120 は、N 末に SAF-box、C 末に RGG-box をもつ DNA にも RNA にも結合する核タンパク質で、SP120 遺伝子のノックアウトマウス作成の報告はないが、発現量が低下したマウスは発育不全を示し、胚性致死となる。胚性致死を示す原因は明らかでない。SP120 は、転写制御、転写産物のプロセッシングと安定性制御、Xist RNA の不活性型 X 染色体への局在化など、DNA と RNA が関わる様々な核内反応に参与する多機能性タンパク質である。

協同研究者らの解析から、神経細胞の分化に伴い SP120 の発現量が増加すること、神経細胞から調製した核マトリクスに SP120 が高濃度に濃縮されること (未発表データ)、神経細胞分化過程で一群の神経特異的遺伝子の発現誘導に重要な働きを担うトポ II β と RNA 依存的複合体を形成することが明らかになった。SP120 は、トポ II β タンパク質の安定な発現に必要であり、SP120 のノックダウンにより、トポ II β の発現も低下する。

2. 研究の目的

SP120 の MAR 特異的 DNA 認識機構を決定する DNA 配列要素とタンパク質ドメインの決定、および SP120 の MAR 特異的 DNA 結合が神経細胞分化に果たす役割の解明。これらの2点を明確にし、SP120 の MAR 特異的 DNA 結合の生物学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

① SP120 の *in vitro* での定量的 DNA 結合解析

(1) SP120 の DNA 結合活性の定量的測定法の構築

1.1 Competitive agarose gel EMSA による簡便な特異的 DNA 結合活性の測定法の構築

1.2 On-beads での Competitive DNA 結合活性の測定法の構築

(2) SP120 の MAR 特異的結合ドメインの決定

2.1 SP120 は、約 800 アミノ酸で構成される大きなタンパク質のため、はじめに3分割し、N、M、C 領域とした。

2.2 N、M、C、3つの領域から1つを欠失させた ΔN 、 ΔC 、NC (ΔM) を作成し、Competitive agarose gel EMSA 法により、

活性に必要なドメインを絞り込む。

2.3 活性に必要なドメインの配列、既知の機能や構造から、さらに領域を絞り込む。

② ChIP-seq による SP120 の *in vivo* での結合サイトの同定

(1) ChIP-seq による *in vivo* 結合サイトの同定

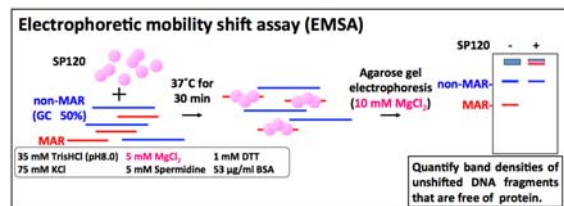
1. 終末分化過程にあるラット神経細胞を材料に抗 SP120 抗体で ChIP を行い、次世代シーケンサーによる網羅的シーケンスを行う。

2. SP120 の結合サイトを同定し、その結合領域から、コンセンサス配列を同定する。

4. 研究成果

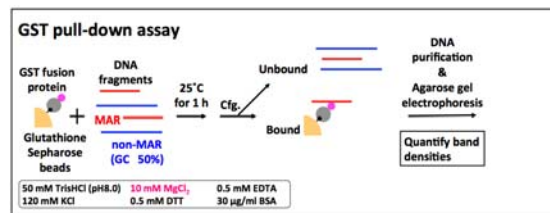
(1) Competitive agarose gel EMSA 法

結合を調べたい DNA 断片を plasmid にクローニングし、制限酵素で insert を切り出すことにより、mol 比 1:1 の基質を調製する。SP120 と DNA を結合させ、Mg²⁺ 含有の agarose gel で泳動する。SP120 と結合した DNA は、大きな複合体を形成し、泳動されないことから、結合しない DNA のみが泳動される。plasmid DNA に比べ、SP120 は、MAR DNA に特異的に結合した。



(2) GST-pull down による Competitive DNA-binding assay 法

Competitive agarose gel EMSA 同様、調べたい DNA と plasmid vector が mol 比 1:1 の基質 DNA を調製する。SP120 の変異体を GST 融合タンパク質として調製し、sepharose beads に結合させる。一定量の beads に対して、結合させるタンパク質量を変化させることにより、ビーズ表面に結合したタンパク質の密度を変化させ、基質 DNA との結合を調べることにより、その影響を調べた。



(3) EMSA 法で、 ΔN 、 ΔC は、ともに野生体より MAR 結合活性が低かったが、NC 変異体は、野生体と同程度の活性を示した。よ

って、M領域は、MAR 特異的結合に必須でないことが分かった。

- (4) N末には、SAF-box, C末には、RG ドメインがあることから、それぞれを欠損した変異体を作成した。SAF-box, RG ドメインいずれも、MAR 特異的 DNA 結合に関与するが、RG ドメインの欠損により、結合活性が大きく失われたことから、RG ドメインがより重要な働きをしていることが示された。
- (5) SAF-box, RG ドメインの GST 融合体を作成し、その MAR 結合活性を調べた。その結果、いずれのドメインにも MAR 特異的結合活性が認められたが、RG ドメインは、より低濃度で活性を示すのに対し、SAF-box は、beads 上の表面密度が高くなるにつれて急激に MAR 結合活性が上昇した。
- (6) RG ドメインのアルギニン残基をすべてリジンに置換した変異体では、DNA 結合活性が大きく低下した。
- (7) RG ドメインの中でも特に重要なアルギニン残基として、グリシンにとんだスペーサー配列を挟んでその両端に RG があることが重要であることを同定した。
- (8) 終末分化過程にある神経細胞を用いて ChIP-seq を行った結果、その結合は、ゲノムのかなり広範な領域に及んでおり、現時点で特異的な領域の同定には至っていない。一方、いくつかの repeat 領域に着目して、IP された DNA 配列を調べた結果、satellite I, telomere, LINE, CA repeat が、input に対し IP で濃縮が認められた。

以上の結果から、これまで RNA 結合に重要と考えられていた RGG-box を含むより広範な領域である RG ドメインが MAR 結合に重要であることを示した。RG ドメインの中でも、フレキシブルな構造であると考えられるグリシン残基に富んだ配列を挟む複数の RG 配列が重要であることを明らかにした。in vivo の結合 DNA 配列として、複数の repeat 配列を同定した。SP120 の MAR 結合では、DNA 配列も、それを認識するタンパク質ドメインも、特定のユニットが繰り返し使用されており、その組み合わせにより生じる多様性がこのタンパク質の多機能性を担保していること、そして、特定の機能を発揮するためには、協同する因子が重要であることが示唆された。今後、トポ IIβ を始めとするコファクターに着目し、神経細胞での働きを明らかにする予定である。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Akiko Obinata, Keitarou Osakabe, Mari Yamaguchi, Riyo Morimoto, Yoshihiro Akimoto, Tgm2/Gh, Gbx1 and TGF-beta are involved in retinoic acid-induced transdifferentiation from epidermis to mucosal epithelium., The international journal of developmental biology, 査読有, 55 巻, 2011, pp933-943

[学会発表] (計 12 件)

- ① 宮地 まり, II 型トポイソメラーゼによる核内構造変化と遺伝子発現制御, 染色体ワークショップ/核ダイナミクス研究会, 2012年12月21日, 淡路島市
- ② 古田良平, II型トポイソメラーゼによる遠隔ゲノム部位間の相互作用, 染色体ワークショップ/核ダイナミクス研究会, 2012年12月19日-21日, 淡路島市
- ③ 宮地 まり, SP120/SAF-A/hnRNP UのMAR認識機構とDNA構造変化, 日本分子生物学会, 2012年12月11日, 福岡市
- ④ 古田良平, DNAトポイソメラーゼIIbetaによる遠隔ゲノム部位間の相互作用と遺伝子発現制御, 日本分子生物学会, 2012年12月11日, 福岡市
- ⑤ Kimiko M. Tsutsui, Induced Expression of Neuronal Genes in Terminal Differentiation: Essential Roles of DNA Topoisomerase IIbeta. BIT, 2012年5月20日, Beijing, China
- ⑥ Mari Miyaji, RG-domain of hnRNP U/SAF-A/SP120 is essential for its MAR-specific DNA-binding activity. BIT, 2012年5月18日-20日, Beijing, China
- ⑦ Ryohei Furuta, DNA Topoisomerase IIβ Mediates Distal Genomic Interactions in Terminal Differentiation of Neurons. BIT, 2012年5月18日-20日, Beijing, China
- ⑧ 宮地 まり, 核マトリックスタンパク質 SP120/SAF-A/hnRNP Uの新たなMAR特異的DNA結合領域の同定, 日本分子生物学会, 2011年12月15日, 横浜市

- ⑨ 古田良平, DNAトポイソメラーゼII β による遠隔ゲノム部位間の相互作用, 日本分子生物学会, 2011年12月15日, 横浜市
- ⑩ 古田良平, トポイソメラーゼII β は離れたゲノム部位の間ではたらくか, 核ダイナミクス研究会, 2011年10月27日, 北広島市
- ⑪ Kimiko M. Tsutsui, Transcriptional Induction of Neuronal Genes by Targeted Action of DNA Topoisomerase II β . Advances in DNA Topoisomerase and Chromosome Dynamics, 2011年10月14日, Taipei, Taiwan
- ⑫ Kimiko M. Tsutsui, Regulatory roles of DNA topoisomerase II β in the developing cerebellar neurons. Fourth International Congress of the Society for Research on the Cerebellum, 2011年9月18日, 文京区

[その他]

ホームページ等

<http://nbgp.med.okayama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮地 まり (MIYAJI MARI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 50349255

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者