

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：24710217
研究課題名(和文)クロマチンインスレーターによるエピゲノム制御機構

研究課題名(英文)Epigenome regulation by chromatin insulators

研究代表者

石原 宏 (Ishihara, Ko)

熊本大学・大学院先端機構・准教授

研究者番号：90398230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：クロマチンインスレーターは、制御配列が働く遺伝子と働かない遺伝子を区分し、組織・時期特異的な遺伝子発現パターンを可能にする。哺乳類ではCTCFタンパク質がインスレーターに結合し、その機能を担っている。ゲノム上には数万のCTCF結合領域が存在するが、その一部だけが細胞・時期特異的に働いている。本研究ではHOXA遺伝子を研究対象とし、ゲノム編集によるインスレーター配列の欠損細胞の作成と解析を行い、インスレーターがクロマチン高次構造形成と正常な遺伝子発現に必要であることを明らかにした。さらに、機能的インスレーターに特異的に結合する因子の候補の同定と解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Chromatin insulators partition the genome into functional units to control cell type- and developmental stage-specific gene expression. The CCCTC-binding factor (CTCF) is an insulator-binding protein that functions in transcriptional regulation and higher-order chromatin formation. CTCF is enriched at several tens of thousands of sites on the human genome. However, only a part of the sites can function as insulators in cell type- and developmental stage-specific manner. In this study, to know the role of insulators at the human HOXA gene locus, we generated insulator-targeted cells by genome editing with engineered ZFNs. Our results showed that insulator is responsible for higher-order chromatin formation and proper gene expression. Additionally, we characterized a candidate for a novel transcriptional factor that binds to the functional insulator site in the human HOXA gene locus.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチンインスレーター 転写 クロマチン高次構造 CTCF HOX遺伝子 ゲノム編集

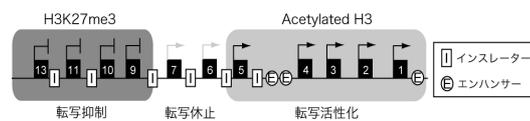
1. 研究開始当初の背景

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。インスレーターがクロマチンループ形成などクロマチン高次構造の構築に関与することも示唆されているが、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。哺乳類では、CTCF(CCCTC-binding factor)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。異なるインスレーターに結合した2つもしくはそれ以上のCTCFタンパク質が相互作用し、核小体、核膜などの細胞内構造物を足場としてクロマチンループ形成に働いているモデルが提唱されている。これまでに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は様々な生命現象に重要な役割を果たしている(参考文献1)。我々は新規インスレーターの候補を同定する目的でCTCF抗体を用いたChIP-on-chip解析を実施し、ヒト癌細胞株において1万以上のインスレーターの候補配列を同定した。さらに、これらの多くがコヒーシオン複合体と共局在し、協同してインスレーター活性に関与することを明らかにした(参考文献2)。

2. 研究の目的

我々はこれまでにAPO遺伝子領域、HOXA遺伝子領域、p15/ARF/p16遺伝子領域、TNF/LT遺伝子領域に焦点を当て、これらの領域におけるCTCFインスレーターの同定・解析を行い、様々な生命現象におけるクロマチンインスレーターによる高次クロマチン構造の構築と、その構造変換により遺伝子発現が調節される機構を明らかにしている(参考文献3-5)。さらに、これらの結果から、ゲノム上のCTCF結合部位(インスレーター)はすべてが同様の機能を持ち、働いているわけではないことが予想された。例えば、HOXA遺伝子領域には少なくとも6つのインスレーターが存在する(下図)。Embryonal carcinoma(EC)細胞にレチノイ

ン酸処理を行うと3'側のHOXA遺伝子群(HOXA1~HOXA5)が活性化されるが、このときヒストンH3リジン27のトリメチル化(H3K27me3)による「転写抑制ドメイン」、ヒストンH3がアセチル化された「転写活性化ドメイン」、H3K27me3の抑制は解除されたがヒストンH3がアセチル化されない「転写休止ドメイン」が形成される(下図)。これらのドメイン間にはインスレーターが存在することから、ドメインの境界形成に働く事が予想された。つまり、1つはH3K27me3の境界として働き、もう1つはエンハンサーが作用するアセチル化H3の境界、さらに境界形成に働かないものが、近隣する複数のインスレーターの中に存在していた。さらに、HOXA遺伝子領域のH3K27me3の境界が細胞種によって異なることから、細胞種によって機能するインスレーターが異なることが考えられた。このようにCTCF結合領域は選択的に異なる機能を有して働いていると考えられた。このような機能選択の機構としてCTCFと相互作用する因子による調節が考えられるが、我々がこれまでに同定したCTCF相互作用因子であるクロマチンリモデリング因子CHD8(参考文献6)やコヒーシオン複合体(参考文献2)がインスレーターの選択性に関与するという結果は得られなかった。そこで本研究ではHOXA遺伝子領域のインスレーターを研究対象とし、1)機能的インスレーターの欠損細胞を作成し、遺伝子発現やクロマチン構造への影響を調べ、インスレーターによる遺伝子制御・クロマチン制御を明らかにする。次に、2)機能的に異なるインスレーターに結合する特異的タンパク質を同定し、その機能を明らかにする。最終的にインスレーターによるクロマチン高次構造変換を介したエピゲノム制御の詳細を明らかにすることを目的とする。



3. 研究の方法

本研究はHOXA遺伝子領域のクロマチンインスレーターを研究対象とし、インスレーター欠損細胞の作成・解析により、インスレーターによるクロマチン高次構造と遺伝子発現調節の詳細を明らかにする。Zinc finger nucleases (ZFNs)を使ったゲノム編集によりインスレーター配列の欠損細胞を作成し、HOXA遺伝子群の発現変化、ヒストン修飾状態の変化、クロマチン高次構造の変化をクロマチン免疫沈降法やChromosome conformation capture(3C)法を用いて明らかにする。さらに、インスレーターの特性を決定する因子の同定と解析を行う。CTCF複合体のプロテオーム解析、および新技術を用いたDNA上のタンパク質複合体の精製を試み、機能的に異なるインスレーターに結合する特異的タンパク質を同定し、その機能を明ら

かにする。得られた結果から、クロマチンインスレーターによるエピゲノム制御機構を考察する。

4. 研究成果

(1) インスレーター欠損細胞の作成と解析 NT2 細胞における HA6 インスレーターの解析

Embryonal carcinoma 細胞である NT2 細胞を用いて *HOXA* 遺伝子領域のインスレーターの破壊を試みた。図 1a に示すように、HA6 インスレーターの近傍に特異的に結合する 1 組の ZFNs(ZFN-6L5,ZFN-6R5)を作成し、ターゲティングベクターと共に NT2 細胞に導入することで、HA6 インスレーターの破壊を行った。G418 薬剤耐性細胞の PCR によるジェノタイピングにより 3 クローン(#6, #8, #10)のインスレーター破壊細胞が得られた(図 1b)。

得られたクローンは方アレルのみインスレーターが欠損していた。そこでアレル特異的なプライマー(図 1c: 3C-HA6, PGK-P5)を用いたアレル特異的 Chromosome conformation capture (3C)解析を行った結果、通常状態(WT)では、インスレーター間のクロマチン相互作用が観察されるが、インスレーター欠損細胞ではその相互作用が見られなくなった(図 1d)。この結果からクロマチン高次構造にクロマチンインスレーターが働いていることが示された。

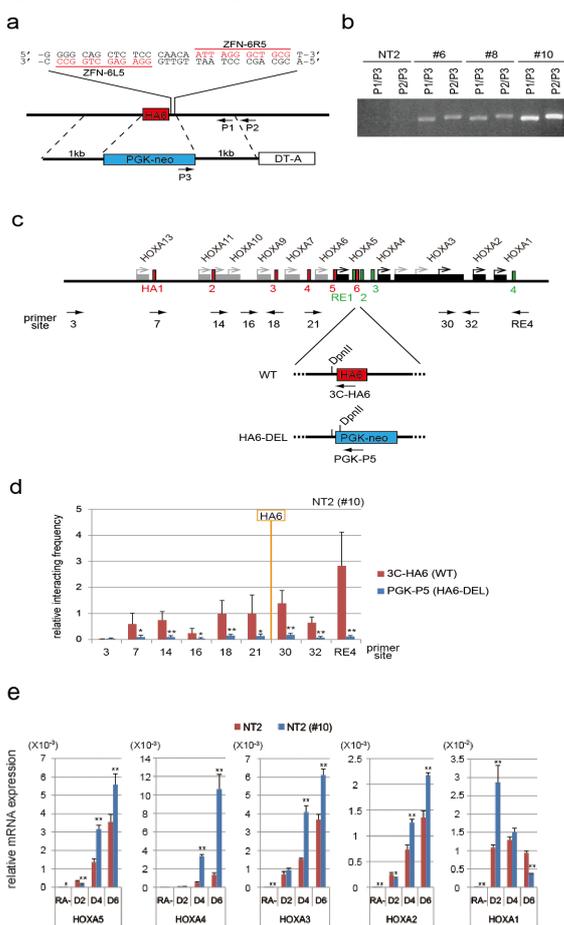


図 1 HA6 インスレーター欠損細胞の解析

次に、HA6 インスレーター欠損細胞における *HOXA* 遺伝子発現の解析を行ったところ、通常状態では異常な *HOXA* 遺伝子の発現変化は見られなかったが、レチノイン酸による発現誘導を行ったところ、インスレーター欠損細胞では発現上昇が観察された(図 1e)。この結果から、HA6 インスレーターが遺伝子発現調節に関与することが示唆され、抑制的なクロマチン高次構造形成により遺伝子の抑制に働いていることが予想された。

HepG2 細胞における HA4 インスレーターの解析

肝臓がん由来の細胞株である HepG2 細胞では *HOXA* 遺伝子領域に遺伝子が活性なドメインと遺伝子が不活性なドメインが存在する。遺伝子が不活性なドメインはヒストン H3K27me3 の修飾がみられる(図 2a)。この遺伝子活性化ドメインと不活性ドメインの境界部位に HA4 インスレーターが存在することから、この HA4 インスレーターの破壊を試みた。

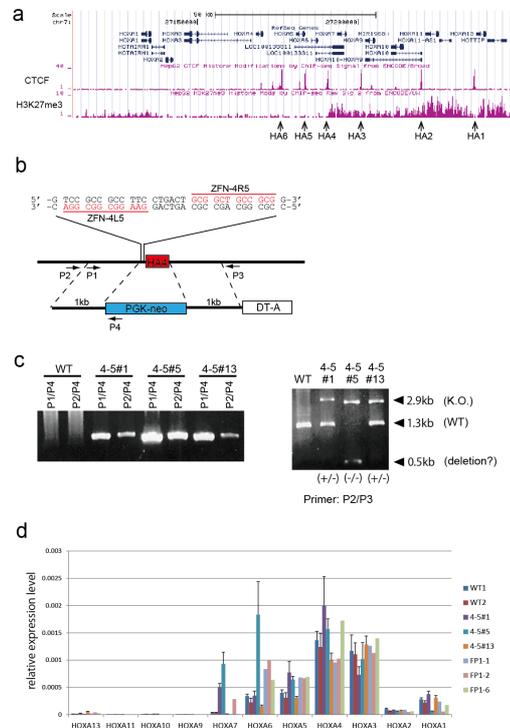


図 2 HA4 インスレーター欠損細胞の解析

図 2b に示すように、HA4 インスレーターの近傍に特異的に結合する 1 組の ZFNs(ZFN-4L5,ZFN-4R5)を作成し、ターゲティングベクターと共に HepG2 細胞に導入することで、HA4 インスレーターの破壊を行った。G418 薬剤耐性細胞の PCR によるジェノタイピングにより 3 クローン(4-5#1, #5, #13)のインスレーター破壊細胞が得られた(図 2c)。4-5#と #13 は正常アレル(WT)とインスレーター欠損アレル(K.O.)がみられ、#5 は一方のアレルは組み換えによるインスレーター欠損(K.O.)であったが、もう

一方のアレルは deletion がおこっていた。シーケンス解析の結果、deletion アレルは CTCF 結合部位は欠損していなかった。これらのクローンおよび、さらに 3 クローン (FP1-1,FP1-2,FP1-6) のインスレーター欠損細胞が得られたが、すべて方アレルのみのインスレーター欠損細胞であった。これらの細胞における *HOXA* 遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法で解析した結果、6 クローン中 3 クローンで *HOXA7* の異常な発現誘導が観察された。この結果は、HA4 インスレーターが失われることで遺伝子活性化ドメインが *HOXA7* 遺伝子まで広がり、遺伝子不活性ドメインの境界が HA4 から HA3 に変化した可能性を示唆する。

(2) インスレーターの特性を決定する因子の同定

HepG2 細胞では HA4 が H3K27me3 の境界として機能することが示唆されたが、他の HA 部位との違いをもたらす因子は不明である。そこで、HA4 に特異的に結合因子の同定を試みた。まず、iChIP 法を試行してみた(参考文献7)。ZFNs を用いて HA4 配列近傍に LexA 配列を挿入し、さらに LexA 結合タンパク質を発現する HepG2 細胞を作成した。この細胞を用いて iChIP 法を行ったが、プルダウンの効率が悪くうまくいかなかった。また、HA4 を含む DNA にピオチンを付加し、*in vitro* で核抽出物と混合し、アビジンを介して結合タンパク質を精製する実験も行ったが、バックグラウンドが高くコントロールとの違いを見出せなかった。次に、一般に公開されている転写因子の ChIP-seq データから、HA4 と共局在がみられる転写因子を検索したところ、FactorX が候補として見つかった。*HOXA* 遺伝子領域では、FactorX は HA4 と HA6 下流のエンハンサー領域に集積がみられた(図 3a)。

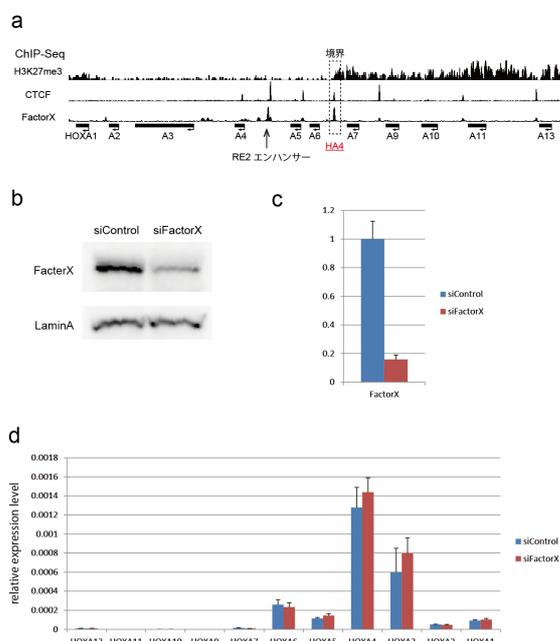


図3 FactorX の解析

FactorX が *HOXA* 遺伝子の発現調節に関与するか siRNA を用いたノックダウンの実験を行った。タンパク質レベル(図 3b) mRNA レベル(図 3c)で FactorX の減少は確認されたが、*HOXA* 遺伝子群の発現に大きな変化は見られなかった(図 3d)。しかし、ノックダウンの期間が 2 日と短いため、クロマチン構造変化を介した遺伝子発現変化をみる事ができなかった可能性もある。今後ゲノム編集による遺伝子破壊細胞を用いた解析も行う予定である。

<参考文献>

- J.E. Phillips and V.G. Corces Cell 137: 1194-1211, 2009.
K. S. Wendt, et al. Nature 451: 796-801, 2008.
T. Mishiro, et al. EMBO J. 28: 1234-1245, 2009.
T. Watanabe, et al. Mol Cell. Biol. 32: 1529-1541, 2012.
A. Hirose, et al. Aging Cell 11: 553-556, 2012.
K. Ishihara, et al. Mol. Cell 23: 733-742, 2006.
T. Fujita, et al. PloS One 6: e26109, 2011.

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「レチノイン酸受容体によるクロマチン高次構造変換を介した HOX 遺伝子制御」第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会、2014 年 5 月 25-26 日、東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)

石原宏「ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いた *HOXA* 遺伝子領域のインスレーター欠損細胞の作成と解析」第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会、2012 年 5 月 15 日、東京一ツ橋学術総合センター(東京都千代田)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 宏 (ISHIHARA, Ko)

熊本大学・大学院先端機構・准教授

研究者番号：90398230