

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430169

研究課題名(和文) ゲノム機能の適正な発現を担うインスレーターと非コードDNAの物理的特性

研究課題名(英文) Physical property of non-coding DNA that is responsible for proper expression of genomic function

研究代表者

坂本 尚昭 (Sakamoto, Naoaki)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00332338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムの非コードDNA中のインスレーターが隣接する遺伝子間の干渉を防ぐことは、ゲノムの適正な機能発現に重要である。本研究では、バフンウニで同定されたArsインスレーターの活性にはDNAの物理的特性が重要であることが明らかになった。また、人工合成したトリヌクレオチドリピートの物理的特性を解析し、ATTリピートの特性がArsインスレーターの特性と類似していることが明らかになり、ヒトゲノムChIP-seqデータの数理的な解析からAATリピートの周辺部には整列したヌクレオソームが配置されることも示唆された。本研究の過程ではさらに、塩基配列に依存した構造を反映したDNAの弾性ネットワークモデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：Boundary sequences within non-coding region of genomes are important elements to ensure the proper gene structure and expressions by blocking inappropriate interactions between neighboring genes. In this research, we showed that physical properties of DNA molecule play an important role in the activity of the Ars insulator, which was identified in sea urchin arylsulfatase gene. In analyses of DNA physical properties of artificially synthesized trinucleotide repeats revealed that the property of AAT repeat is similar to that of the Ars insulator. Furthermore, mathematical analysis of ChIP-seq data suggested that surrounding sequence of AAT repeats may have regularly spaced array of nucleosomes. Moreover, during the process of this research, we constructed simple elastic network models for exhaustive analysis of long double-stranded DNA dynamics with sequence geometry dependence.

研究分野：分子生物学

キーワード：非コードDNA インスレーター

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノムの非コード DNA 中のインスレーターが隣接する遺伝子間の干渉を防ぐことは、ゲノムの適正な構成と機能発現に重要な要素である。また、非コード DNA には様々な反復配列が存在しており、そのほとんどは機能未知である。また、Repeat Expansion Disease に見られるように、反復配列の異常な振舞いが疾患を引き起こす例も数多く知られている。(CCGNN)<sub>n</sub> や (A)<sub>n</sub> の反復配列については、ヌクレオソームを排除する性質とインスレーター活性の両方を有するという報告もある。我々は、バフンウニで同定された *Ars* インスレーターの作用機構を解析してきた。これまでに解析により、*Ars* インスレーターのコア領域がヌクレオソームを排除する性質をもつことを明らかにしていた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、*Ars* インスレーターや様々な反復配列についてヌクレオソーム形成を含めた物理的特性を解析し、それらの物理的特性とインスレーター活性との相関を調べることにより、非コード DNA によるゲノム区画化の本質的機構を理解することを目的とする。

### 3. 研究の方法

インスレーター活性(エンハンサー遮断活性)を測定するために、HeLa 細胞を用いて、SV40 エンハンサー/プロモーターによるルシフェラーゼ発現系を利用した。各種反復配列の物理的特性およびインスレーター活性を解析するために、様々な物理的特性をもつトリヌクレオチドリピートを人工合成した。これらの反復配列および *Ars* インスレーターについて、その特性を実験的および数理的に解析した。また、*Ars* インスレーターについては、ウニ胚からの核抽出液を用いたゲルシフト分析により結合タンパク質の解析を行った。

### 4. 研究成果

HeLa 細胞でエンハンサー遮断活性を測定するために、SV40 エンハンサー/プロモーターによるルシフェラーゼ発現系を作製し、エンハンサー/プロモーターの間に目的の DNA 断片を挿入した。解析の過程で、SV40 エンハンサー/プロモーター間の距離が近いと正確な活性測定が出来ないことが明らかとなったため、両者の距離を約 2kb 離すことにより安定な活性測定系を作製した。この新しい活性測定系でも、*Ars* インスレーターのコア配列は高いエンハンサー遮断活性を有することが確認された。

ゲルシフト分析により *Ars* インスレータ

ーに結合するタンパク質の解析を行ったところ、*Ars* インスレーターに特異的に結合するタンパク質は検出された(図1)。この結合タンパク質を同定するために、バフンウニ胚核抽出液を用いたアフィニティークロマトグラフィーおよび質量分析を行ったところ、その有力な候補として heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q-like が同定された。現在、さらに詳細な解析を進めている。

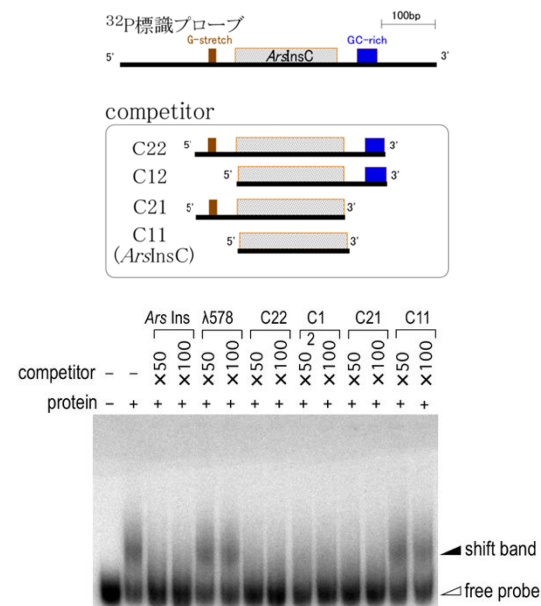


図1. *Ars* インスレーターをプローブとしたゲルシフト分析

*Ars* インスレーターへの特異的な結合タンパク質は検出されたが、競合実験の結果、その結合領域はコア配列の外側に存在する G ストレッチ(あるいは GC-rich 配列)であり、コア領域へのタンパク質結合は検出されなかった(図1)。*Ars* インスレーターのコア領域は単独でも十分なインスレーター活性を示すことから、コア領域 DNA の物理的特性がインスレーター活性に重要であることが示唆される。

そこでコア領域 DNA の物理的特性(柔軟性)を数理的に解析したところ、*Ars* インスレーターのコア領域は他の領域と比較して DNA の柔軟性が低いことが示された。

さらに、ヌクレオソームを排除する性質を有することがすでに知られている (CCGNN)<sub>n</sub> リピートのエンハンサー遮断活性を上記の HeLa 細胞による実験系で測定したところ、このリピートもエンハンサー遮断活性を示した。また、類似の配列についても解析したところ、(CCGNN)<sub>n</sub> と (CCANN)<sub>n</sub> では配列が長くなる程エンハンサー遮断活性が強くなる傾向が見られたが、(CAGNN)<sub>n</sub> に関しては、長さが短い方がエンハンサー遮断活性は強くなっていた。これらの配列の物理的特性とインスレーター活性との相関については、今なお検討中である。

また、人工合成した反復配列を伸長する実

験系を開発して、10種類のトリヌクレオチドリピート(57リピート)を作製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた物理的特性の解析を行った。その結果、各リピートはそれぞれ異なる挙動を示し、中でも AAT リピートの物理的特性がArsインスレーターと類似していることが示された(図2)。各リピートの物理的特性とインスレーター活性との相関についても、今なお解析中である。

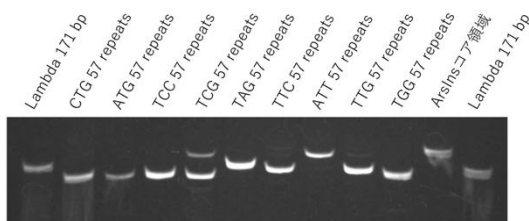


図2. トリヌクレオチドリピートのポリアクリルアミドゲル電気泳動解析

さらに、ヒト細胞を用いた ChIP-seq のデータベースを利用して、ヒトゲノム中における各種反復配列のクロマチン構造に及ぼす影響について検討した。その結果、Arsインスレーターと類似の特性をもつ AAT リピートがヌクレオソームを形成しにくい性質をもつこと、また AAT リピートの周辺部には整列したヌクレオソームが配置される傾向があることなどが明らかになった(図3)。

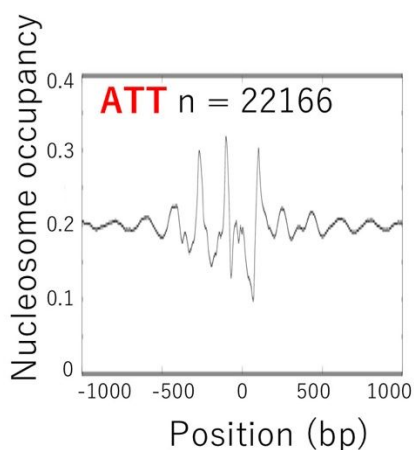


図3. ヒトゲノム中の AAT リピート周辺におけるヌクレオソーム配置の解析

また本研究の過程で、塩基配列に依存した構造を反映した DNA の弾性ネットワークモデルを構築した。

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2件)

Shuhei Isami, Naoaki Sakamoto, Hiraku Nishimori and Akinori Awazu  
Simple Elastic Network Models for Exhaustive Analysis of Long Double-Stranded DNA Dynamics with Sequence Geometry Dependence, PLoS One, 査読有, Vol.221(4), 2015, pp.775-784  
DOI: 10.1371/journal.pone.0143760

坂本尚昭, 粟津暁紀  
インスレーターとクロマチン構造, 生体の科学・特集『生命動態システム科学』, 査読無, Vol.65(5), 2015, pp.412-413

[学会発表](計17件)

亀田健, 勇修平, 西森拓, 坂本尚昭, 粟津暁紀「弾性ネットワークモデルを用いたゲノムの動態と機能の解析」日本物理学会年会, 東北大学(宮城:2016年3月19-22日)

Shuhei Isami, Naoaki Sakamoto, Hiraku Nishimori and Akinori Awazu 「Simple elastic network models for exhaustive analysis of long double-stranded DNA dynamics with sequence geometry dependence.」 The 7th Taiwan-Japan Joint Workshop for Young Scholar in Applied Mathematics, National Cheng Kung Univ. (Taiwan) (2016年2月27-29日)

池谷淳, 亀田健, 勇修平, 山本卓, 粟津暁紀, 坂本尚昭 「Arsインスレーターにおける作用メカニズムの解析」第33回染色体ワークショップ第14回核ダイナミクス研究会, 松島一の坊(宮城:2016年1月12-14日)

松下将也, 落合博, 山本卓, 粟津暁紀, 坂本尚昭 「バフンウニ初期発生における初期型ヒストン遺伝子動態の解析」第33回染色体ワークショップ第14回核ダイナミクス研究会, 松島一の坊(宮城:2016年1月12-14日)

勇修平, 西森拓, 坂本尚昭, 粟津暁紀 「弾性ネットワークモデルによる DNA 配列依存的な力学特性と機能の網羅的解析」第33回染色体ワークショップ第14回核ダイナミクス研究会, 松島一の坊(宮城:2016年1月12-14日)

亀田健, 勇修平, 池谷淳, 西森拓, 坂本尚昭, 粟津暁紀「粗視化モデルを用いた DNA の塩基配列の特性と塩基配列に依存した構造・運動・機能・の関係の解析」第 33 回染色体ワークショップ第 14 回核ダイナミクス研究会, 松島一の坊(宮城:2016 年 1 月 12-14 日)

Shuhei Isami, Atsushi Ikegaya, Naoaki Sakamoto, Hiraku Nishimori, Akinori Awazu 「Simple elastic network models for exhaustive analysis of long double-stranded DNA dynamics with sequence geometry dependence.」4th International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics, JMS Aster PLAZA. (広島:2015 年 12 月 7-9 日)

Shuhei Isami, Sayuri Tatemoto, Atsushi Ikegaya, Hiraku Nishimori, Naoaki Sakamoto, Akinori Awazu 「Analysis of the relationship among sequences, structures, motions and the functions of DNA by elastic network models.」日本生物物理学会年会 金沢大学(金沢:2015 年 9 月 13-15 日)

勇修平, 立本小百合, 池谷淳, 西森拓, 坂本尚昭, 粟津暁紀「弾性ネットワークモデルによる DNA の配列・構造・運動と機能の関係の考察」生命動態の分子メカニズムと数理, 京都大(京都:2015 年 3 月)

勇修平, 立本小百合, 池谷淳, 西森拓, 坂本尚昭, 粟津暁紀「DNA の配列・構造・運動と機能の関係の考察」日本物理学会第 70 回年次大会, 早稲田大(東京:2015 年 3 月 23 日)

勇修平, 立本小百合, 池谷淳, 坂本尚昭, 西森拓, 粟津暁紀「DNA の粗視化モデルによる Ars インスレーターの力学的特性の考察」第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会, 安芸グランドホテル(広島:2014 年 12 月)

Shuhei Isami, Sayuri Tatemoto, Atsushi Ikegaya, Naoaki Sakamoto, Hiraku Nishimori, Akinori Awazu 「Analysis of dynamic characteristics of Ars-insulator by coarse-grained DNA models」The 4D Nucleome 2014, 安芸グランドホテル(広島:2014 年 12 月)

Shuhei Isami, Sayuri Tatemoto, Hiraku Nishimori, Naoaki Sakamoto, Akinori

Awazu 「Analysis of dynamic characteristics of Ars-insulator by coarse-grained models」第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター(北海道:2014 年 9 月 27 日)

勇修平, 立本小百合, 西森拓, 坂本尚昭, 粟津暁紀「粗視化モデルを用いた Ars インスレーターの力学的特性の考察」日本物理学会 2014 年秋季大会, 中部大(愛知:2014 年 9 月 8 日)

勇修平, 立本小百合, 西森拓, 坂本尚昭, 粟津暁紀「分子動力学法を用いた DNA の塩基配列に依存した力学的特性の考察」日本生物物理学会第 6 回中国四国支部大会, とりぎん文化会館(鳥取:2014 年 5 月 17 日)

山本佳典, 立本小百合, 西森拓, 坂本尚昭, 粟津暁紀「DNA の粗子化モデルによる Ars インスレーターの運動性と機能性の解析」日本物理学会 2013 年秋季大会, 徳島大常三島キャンパス(徳島:2013 年 9 月 28 日)

山本佳典, 立本小百合, 坂本尚昭, 粟津暁紀「DNA の粗子化モデルによる Ars インスレーターの運動性と機能性の解析」第 51 回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館(京都:2013 年 10 月 29 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
坂本 尚昭(SAKAMOTO, Naoaki)  
広島大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号:00332338

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし