

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650125

研究課題名(和文) 遺伝子間領域による長大遺伝子の発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of gene expressions by juxtaposed long intergenic regions

研究代表者

宮地 まり (Miyaji, Mary)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50349255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の発達した脊椎動物では長大な遺伝子が多数存在する。長大遺伝子は、AT-richなゲノム環境に位置しており、隣接する遺伝子間領域も長い。これらの長大遺伝子は神経細胞で特異的に発現し、自閉症や統合失調症との関連が示唆されている。私たちは、長大遺伝子とその遺伝子の置かれたゲノム環境により発現制御されるモデルを提唱、検証している。本研究では、トポII、hnRNPU/SAF-A/SP120が発現制御に関与する可能性が高いことを示した。ラット脳幹由来のRN33B細胞株が神経細胞終末分化のモデル培養細胞系として使用可能であることを示した。ゲノム編集技術を用いてこの系でモデルを検証する予定である。

研究成果の概要(英文)：Vertebrate genomes contain a higher proportion of long genes compared to other organisms. Long genes are often located in AT-rich genomic environments and juxtaposed to long intergenic regions. Long genes are enriched in neuronal genes that are often mutated in psychic disorders like autism and schizophrenia. We hypothesized that the genomic environment of long genes are important for transcriptional regulation of long genes. In this study, we showed that topoisomerase IIbeta, in association with its partner protein (hnRNPU/SAF-A/SP120) is likely to be involved in the regulation of long gene expression. To test our model we utilized an immortalized neuronal cell line, RN33B, that is derived from brain stem raphe and transformed in vitro with a temperature-sensitive mutant of SV40 large T antigen. We obtained promising results indicating that this system is worthy of further analysis using genome-editing techniques.

研究分野：分子生物学

キーワード：核内構造 神経細胞分化 長大遺伝子 遺伝子間領域 ゲノム環境

1. 研究開始当初の背景

DNA トポイソメラーゼ(トポ)II は、DNA の切断と再結合により DNA の高次構造を変換する酵素である。脊椎動物のトポ II には、と の 2 つアイソフォームが存在する。トポ II が分裂細胞特異的に発現するのに対し、トポ II は最終分裂を終え終末分化過程にある神経細胞でも発現している。私たちはトポ II が一群の神経特異的遺伝子の発現を誘導することを報告した。トポ II が発現誘導する遺伝子群は、遺伝子長が長く隣接する遺伝子間領域も長い AT-rich なゲノム環境にあるという共通性がある。これらの遺伝子には、遺伝子上だけでなく隣接する遺伝子間領域にも多数のトポ II 作用点が存在することから、遺伝子とその近傍領域からなる広大なゲノムドメインをトポ II が構造変換し、遺伝子発現を誘導する機構が示唆された。長大な遺伝子は、神経特異的に発現する遺伝子が多数含まれており、実際、近年のゲノムワイドな解析から自閉症や統合失調症などの精神・神経疾患に関連する遺伝子として多数報告があることから、その発現機構解明は、これら疾患の病態理解につながる事が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、「AT-rich なゲノム環境にある長大遺伝子がトポ II による広大なゲノムドメインの構造変換によって発現制御される」というモデルを提唱し、検証することを目的とする。

3. 研究の方法

3.1 終末分化している神経細胞を多量に含むラット小脳組織でトポ II 標的配列を同定し、トポ II 相互作用因子 hnRNP/SAF-A/SP120 (以後 SP120) の関与を調べた。

3.1.1 生後 10 日目のラット小脳を材料に、eTIP (etoposide-mediated topoisomerase immunoprecipitation) 法によりトポ II が作用するゲノム領域を精製し、ショットガンクローニング後、末端配列を決定した。同定した配列をゲノムにマッピングすることにより、ゲノム上でトポ II が作用する部位を決定した。ゲノム上に占める領域、および配列に共通する特徴の抽出解析を行った。

3.1.2 トポ II と RNA 依存的に複合体を形成し、その活性を制御する SP120 のトポ II 標的配列に対する選択的結合活性を competitive EMSA により定量した。

3.1.3 SP120 が終末分化過程にあるラット小

脳で核マトリックス画分に存在する主要タンパク質であるため、トポ II 標的配列が核マトリックスに結合する (MAR) 活性を定量した。

3.2 ゲノム編集により、長大遺伝子の発現制御に必要なゲノム環境領域を同定するには、神経細胞終末分化系のモデルとなる株化培養細胞分化系が必要である。ラット脳幹由来の RN33B 細胞株がモデル系として使用可能かを検証した。

3.2.1 RN33B の分化誘導により長大遺伝子が発現するかを調べた。

3.2.2 RN33B の分化誘導過程におけるトポ II および のタンパク質量の経時変化を調べた。

4. 研究成果

4.1 ラット小脳組織でのトポ II が標的とする配列は、A または T が 2-5 個連続する A/T-patch 配列を多く含み、長くて AT-rich な遺伝子間領域に有意に多く分布していた。トポ II 標的配列は SP120 と選択的に結合し、核マトリックスとも選択的に結合した。核マトリックスとの結合強度は、A/T-patch のカバレッジと弱い相関関係があり、A/T-patch が核マトリックスとの結合強度決定に重要であることが示された。以上の結果から、SP120 が長くて AT-rich な遺伝子間領域とトポ II を核マトリックス上へ集積させ、効率的にトポ II を働かせるモデルが支持された。

4.1.1 トポ II 標的配列は、A/T-patch 配列を有意に多く含んでいた(図 1)。また、長い遺伝子間領域に有意に多く存在し(図 2)、トポ II 標的配列が存在する長くて AT-rich な遺伝子間領域は、神経細胞で発現する遺伝子に隣接する頻度が有意に高かった(図 3)。

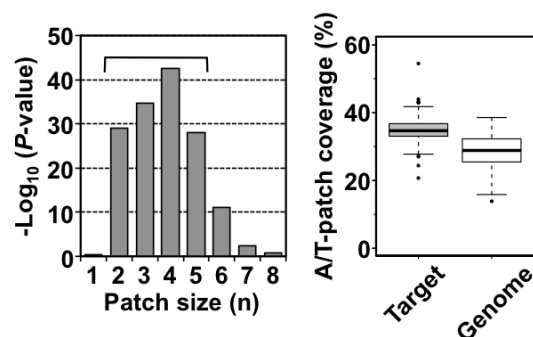


図 1: トポ II 標的配列 (Target) は、A/T-patch を有意に多く含む

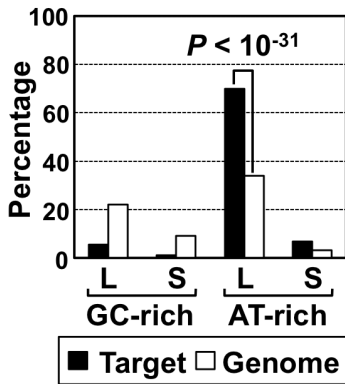


図2: トポII 標的配列は長くてAT-richな遺伝子間領域に有意に多い

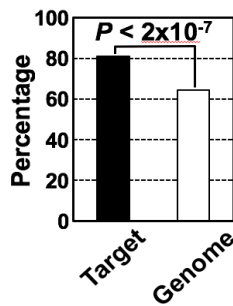


図3: トポII 標的配列が存在する長くてAT-richな遺伝子間領域は、神経特異的な遺伝子に隣接する頻度が高い

4.1.2 トポII 標的配列とプラスミドDNAとのcompetitive EMSAによりSP120とトポII 標的配列の結合を調べた結果、いずれのトポII 標的配列もSP120に選択的に結合した。

4.1.3 トポII 標的配列は、選択的に核マトリックスに結合するMAR活性を有していた。結合強度は10-80%と幅があり配列中のA/T-patchカバレッジ(%)とMAR活性には弱い相関があった(図4)。

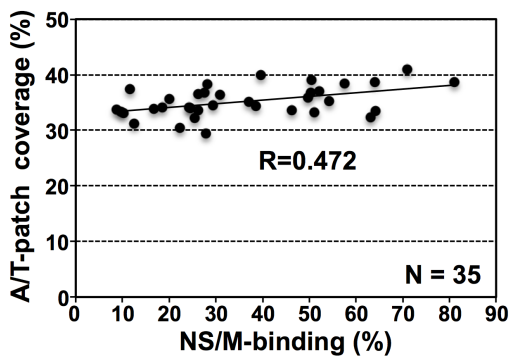


図4: MAR活性とA/T-patchカバレッジの相関(各点は、それぞれのトポII 標的配列を表す)

4.2 長大遺伝子のトポII による発現制御機構を解析するための神経細胞分化系モデルとしてラット脳幹由来の培養細胞RN33Bが使用可能かを検証した。モデル系として使用す

るためには、1. 長大遺伝子が分化に伴い誘導発現すること、2. トポII 依存性を検証できることが必要である。この2点を検証した。その結果、RN33B細胞は、分化に伴い複数の長大遺伝子が発現誘導されたが、最も簡単なトポII 依存性を検証法であるトポII 阻害剤ICRF-193を用いる方法は使用できないことが分かった。今後、トポII をノックアウトして長大遺伝子の発現誘導に対するトポII 依存性を調べる必要がある。

4.2.1 RN33Bを試験管内で分化させ、分化前後の細胞からRNAを抽出し、リアルタイムRT-qPCRで遺伝子の発現変化を調べた。小脳の初代培養神経細胞で、すでにトポII の制御を受けることが判明している長大遺伝子に加え、小脳では発現しないため解析できなかった長大遺伝子もRN33B細胞では分化に伴い発現誘導された。脳では、部位や時期特異的に遺伝子の発現が制御されることから、RN33Bを用いることにより新たなトポII の標的が同定できると期待される。

4.2.2 長大遺伝子の発現誘導に対するトポII 依存性を調べるには、トポII 活性を選択的に消失させる必要がある。初代培養神経細胞では、培養開始後、24時間以内に最終分裂を行った後、終末分化を始める。トポII は、最終分裂後すみやかに分解されるため終末分化過程では、トポII のみ発現するので、とを区別しないトポII 阻害剤ICRF-193を用いて、簡便にトポII 依存的な発現変化を観察することができた。RN33Bでも同様にICRF-193が使用可能かを調べるため、分化開始後のトポII の発現を調べた。その結果、トポII の発現は、分化開始後一過的に増加した後、緩やかに減少し、初代培養細胞のようなすみやかな消失は見られなかった。一方トポII は、分化開始後緩やかに増加した。以上の結果から、分化誘導開始直後のトポII の遺伝子発現に対する働きをトポII 阻害剤ICRF-193で調べることは困難であることが分かった。

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 3件)

— Mary Miyaji, Kuniaki Sano, Ryohei Furuta, Osamu Hosoya, Kimiko M. Tsutsui, Ken Tsutsui., 精神・神経疾患に關与する長大遺伝子のゲノム環境による発現制御機構, 月刊細胞, 査読無, 47号5巻, 2015, 25-27.

— Mary Miyaji, Ryohei Furuta, Kuniaki Sano, Kimiko M. Tsutsui, Ken Tsutsui., Genomic regions targeted by DNA topoisomerase II frequently

interact with a nuclear scaffold/matrix protein hnRNP U/SAF-A/SP120., Journal of Cellular Biochemistry, 査読有, 116号4巻, 2015, 677-685.

- Akihisa Onoda, Osamu Hosoya, Kuniaki Sano, Kazuko Kiyama, Hiroshi Kimura, Shinji Kawano, Ryohei Furuta, Mary Miyaji, Ken Tsutsui, Kimiko M. Tsutsui., Nuclear dynamics of topoisomerase II reflects its catalytic activity that is regulated by binding of RNA to the C-terminal domain. Nucleic Acids Research, 査読有, 42号14巻, 2014, 9005-9020.

〔学会発表〕(計 9件)

宮地まり、神経細胞終末分化過程でのDNAトポイソメラーゼIIによるグローバルなクロマチン構造変換を介した遺伝子発現制御機構、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、2016年1月13日、松島一の坊(宮城県宮城郡松島)

宮地まり、hnRNPU/SAF-A/SP120とDNAトポイソメラーゼII複合体による神経細胞核のグローバルなクロマチン構造変換、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

古田良平、DNAトポイソメラーゼIIは遺伝子間領域に作用し遠隔ゲノム部位間の相互作用を媒介する、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

宮地まり、神経細胞核の3次元DNA配置と遺伝子発現制、バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ2015、2015年6月18日、九州大学病院(福岡県福岡市)

秋元義弘、レチノイン酸によるラット胎仔表皮の粘膜上皮への分化転換、日本顕微鏡学会第71回学術講演会、2015年5月14日、国立京都国際会館(京都府京都市)

小野田彰久、トポイソメラーゼIIの酵素活性と核内動態はC末端ドメインへのRNAの結合によって制御されている、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、2014年12月16

日、安芸グランドホテル(広島県廿日市市)

筒井公子、DNAトポイソメラーゼIIの細胞核内ダイナミクスと酵素活性を制御する新規ドメインはRNA結合により機能している、第37回日本分子生物学会年会、11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

古田良平、DNAトポイソメラーゼIIによる核内構造変化と遺伝子発現制御、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Kimiko M. Tsutsui, RNA regulates nuclear dynamics and catalytic activity of topoisomerase II by binding to a novel domain of the enzyme, Regulatory RNA 2014, 2014年10月20日、Berkeley (U.S.A.)

〔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
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/mnb/Top.html>

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
なし

(3)連携研究者
なし