

平成21年 6月10日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19710161

研究課題名(和文) コヒーシンによるヒト染色体の構造形成と遺伝子発現制御

研究課題名(英文) Regulation of gene expression and chromosome structure by cohesin

研究代表者

坂東 優篤 (BANDO MASASHIGE)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・助教

研究者番号：90360627

研究成果の概要：

ヒトコヒーシンは、姉妹染色体間の接着以外の機能として遺伝子発現の調節に寄与することがいわれてきたが詳細は不明であった。本研究での ChIP-chip 解析より、コヒーシンがインシュレーター因子 CTCF と染色体上で共局在すること、さらにインシュレーター活性にコヒーシンが必要であることを明らかにした。また、コヒーシン関連の遺伝病患者由来の B 細胞を用いたコヒーシンの ChIP-chip 解析や転写解析から、コヒーシンの転写因子としての役割を担っている可能性の結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム構造・ゲノム発現

1. 研究開始当初の背景

(1) 膨大な遺伝情報を保持しているゲノムは、クロマチン構造を形成し、細胞核内におさめられており、遺伝子発現は、核内で時間及び空間的に制御されている。ゲノム構造の維持に関わる因子の一つであるコヒーシンは、姉妹染色分体間接着(コヒージョン形成)という必須の機能をもち、酵母からヒトまで広く保存されている。しかし、コヒーシン関連の遺伝病患者(コルネリア・デ・ランゲ症候群、ロバーツ症候群)の症状やハエの変異体解析から、ヒトなどの高等真核生物のコヒ

ーシンは、コヒージョン形成以外の機能、遺伝子発現の調節に関わることが示唆されていたが、詳細な機構については不明であった。

(2) 申請者が所属する研究室で、ヒト培養細胞を使ったコヒーシンの ChIP-chip 解析(クロマチン免疫沈降法-DNA チップ解析)から、コヒーシンが染色体上でインシュレーター因子 CTCF の結合領域として知られる領域に局在することを明らかにした。

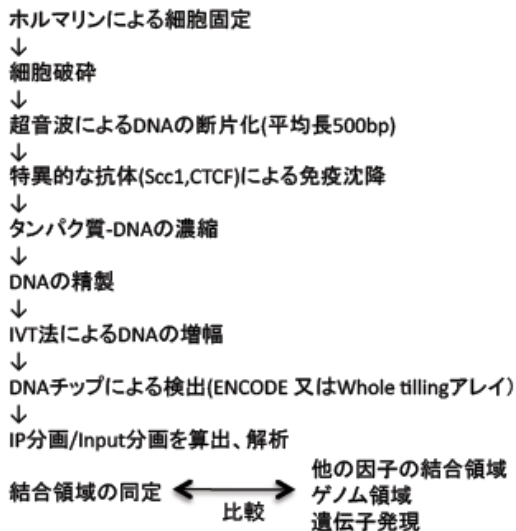
2. 研究の目的

CTCFは、インシュレーター因子（遺伝子領域の遠位に存在する制御配列の影響を遮断する機能やヘテロクロマチン領域やユークロマチン領域などの境界を作る機能）として働くことが知られ、インシュレーター機能の発揮に染色体高次構造の形成関わるということが報告されているが、未だ詳細な機構は明らかでない。新たに見いだしたコヒーシンとCTCFの染色体上で共局在するという結果から、コヒーシンもCTCFと同様にインシュレーターとして機能し、コヒーシンが染色体高次構造形成因子として転写を始めとする機能に広く関わるということが予想された。そこで、コヒーシンと転写との関係を明らかにし、コヒーシンの高等真核生物特異的な染色体代謝に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞周期でのコヒーシン及びCTCFの染色体上の動態を解析する。ダブルチミジンブロックやノコダゾールといった薬剤によりHeLa細胞を同調し(G1期、S期、M期)、ChIP-chip解析を行った。DNAタイリングアレイは、ゲノムの約1%をカバーしたENCODEアレイと全染色体をカバーしたWhole genomeアレイ(約50%カバー)を使用した。

ChIP-chip解析の流れ



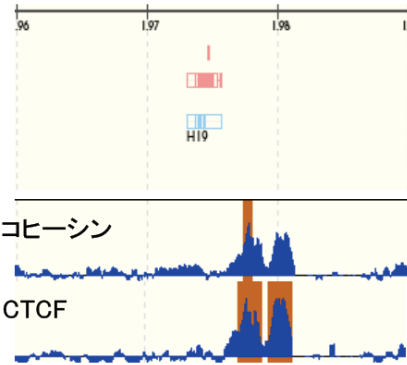
(2) コヒーシン、CTCFの相互関係を解析した。RNAi手法によりコヒーシン若しくはCTCFノックダウン細胞を用いて、それぞれの因子の挙動を抗体免疫染色法やウェスタンブロット法、また染色体上の局在を

ChIP-chip解析やChIP-qPCR解析により行った。

(3) コヒーシンやCTCFの遺伝子発現に対する影響を、エクソンアレイを用いて解析した。コヒーシンもしくはCTCFのノックダウン細胞から全RNAを抽出、使用した。

(4) HeLa細胞以外でのコヒーシンの局在や遺伝子発現を観察した。EBV不死化B細胞株(正常、コヒーシン関連遺伝病患者(CdLS)由来)ヒト網膜上皮細胞株RPE細胞を用いたChIP-chip(qPCR)解析、DNAチップによる転写解析を行った。

4. 研究成果



CTCFの結合領域として知られるICRでのコヒーシンの結合(ChIP-chip解析結果)

(1) HeLa細胞をG2期に同調し、コヒーシン(scc1)とCTCFのChIP-chip解析(ENCODEアレイ)を行った結果(図1オレンジバーが結合領域として判定した領域)、Scc1とCTCFは、約9割で局在の一致が見られた。また、G1とG2期でコヒーシンの局在は、約80%の一致が見られた。一致が見られなかった領域においても、ChIP-qPCR解析で確認をおこなったところ、ほとんどの領域で結合していることが明らかとなった。

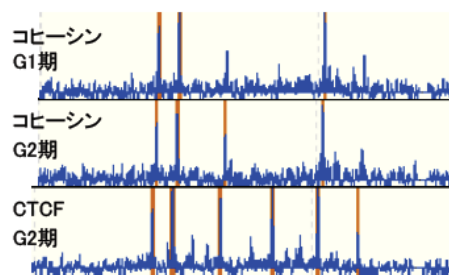


図1 コヒーシンとCTCFのChIP-chip解析

(2) CTCF とコヒーシン (Scc1) の RNAi した HeLa 細胞では、免疫抗体染色及びクロマチン分画アッセイから、クロマチンへのそれぞれの互いの因子の結合量の変化は見られなかった。ChIP-chip 解析から、コヒーシン及び CTCF の互いの局在 (結合数と結合の強さ) の減少が観察された。そこで、いくつかのコヒーシン結合領域を選び、ChIP-qPCR 解析により結合量の定量を行ったところ、それぞれの因子の減少が、互いの結合量を引き起こし、この減少は CTCF をノックダウンした細胞の方が顕著であった。このことから、コヒーシンは、CTCF と共にインシュレーターとして機能することが示唆された。実際、レポーター遺伝子を利用したインシュレーターアッセイ系によりコヒーシンがインシュレーター機能に関与することが示された。

(3) 全ゲノムタイリングアレイを使ったコヒーシンの ChIP-chip 解析結果から、コヒーシンは、ゲノム全体 (エクソン、イントロン、遺伝子上流、下流、遺伝子間) に結合していることが明らかとなった。さらに詳細にみると、コヒーシンは、遺伝子上流近傍に濃縮する傾向がみとめられ、遺伝子発現の調節に機能する可能性が考えられた。

(4) コヒーシン及び CTCF RNAi した G2 期 HeLa 細胞から RNA を抽出し、DNA チップを用いて転写解析を行った。その結果、両因子でのノックダウン細胞では、194 遺伝子で上昇、90 遺伝子で減少が観察された。その中で、上昇の認められた遺伝子上流の近傍には、コヒーシン結合領域が存在していることが明らかとなり、転写との関係が示唆された。

(5) RPE 細胞と EBV 不死化 B 細胞株 (染色体は正常であると思われる) でコヒーシン及び CTCF の ChIP-chip 解析を行った (図 2)。それぞれの細胞におけるコヒーシンと CTCF の共局在は、約 90% 以上で一致が認められた。また、HeLa 細胞、RPE 細胞、B 細胞でのコヒーシンの結合についても約 80% 前後で一致が認められた。ChIP-chip 解析結果の結合していない領域でもコヒーシンの結合は ChIP-qPCR で認められたが、詳細に見ると、実際に結合していない領域で転写活性の違いがある可能性が考えられる。今後、さらに詳細にコヒーシンと遺伝子発現の関係を明らかにする必要があると考えられる。

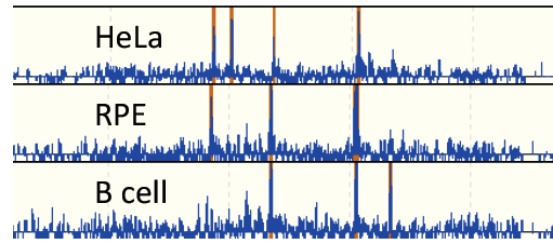


図2 コヒーシンのChIP-chip解析

(6) CdLS-B 細胞と正常細胞で、コヒーシンの ChIP-chip 解析及び転写解析を行った (図 3)。コヒーシンの結合領域が、CdLS 細胞では正常細胞に比べ約 30% 減少していた。遺伝子近傍でコヒーシンの結合が見られる領域では、遺伝子発現の増加が見られ、逆に CdLS 細胞において、コヒーシンの結合が減少している領域では遺伝子発現の減少が観察された。コヒーシンの転写因子として機能を有する可能性が示唆された。



図3 正常B細胞(上段)とCdLS-B細胞(下段)でのコヒーシンのChIP-chip解析

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) Kerstin S. Wendt, Keisuke Yoshida, Takehiko Itoh, Masashige Bando, Birgit Koch, Erika Schirghuber, Shuichi Tsutsumi, Genta Nagae, Ko Ishihara, Tsuyoshi Mishiro, Kazuhide Yahata, Fumio Imamoto, Hiroyuki Aburatani, Mitsuyoshi Nakao, Naoko Imamoto, Kazuhiro Maeshima, Katsuhiko Shirahige, Jan-Michael Peters, Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor 451 Nature 796-801 (2008) 査読 有

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂東 優篤 (BANDO MASASHIGE)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・助教

研究者番号：90360627

(2) 研究分担者

—

(3) 連携研究者

—