

平成23年 5月 20日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710197

研究課題名 (和文) 核マトリクス付着領域予測プログラムMARcode法の開発

研究課題名 (英文) MARcode: a prediction program for nuclear matrix attachment regions

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)：

MARcode 法開発のため、DNA トポイソメラーゼ (トポ) II β と複合体を形成し、神経細胞分化過程で働くと考えられる核マトリクスタンパク質 SP120 に着目した。SP120 が AT-rich なトポ II β 作用点に特異的に結合することを示した。SP120 の MAR 結合ドメインを解析し、新たに RG ドメインが活性を持つことを見出した。SP120 が A または T が 3 つ以上連続する配列 (AT-patch) に直接結合することを示した。網羅的解析により、多数の in vivo SP120 結合領域を同定した。今後、同定配列を評価し、MARcode 法完成を目指す。

研究成果の概要 (英文)：

We focused on SP120, one of the nuclear matrix-associated proteins to develop MARcode, a prediction program for matrix attachment regions (MAR). It is suggested that SP120 is involved in the neuronal differentiation through its binding to DNA topoisomerase (topo) II β . We showed that SP120 specifically bound to AT-rich topoII β action sites. We performed a domain analysis for MAR-binding activity of SP120 and found that RG-domain had the activity. We showed the evidence that SP120 directly bound to AT patches (short stretches of consecutive A and T bases). We performed a genome-wide analysis to identify in vivo SP120 binding sites. We will further analyze the identified regions to develop the MARcode program.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			0
年度			
年度			
総計	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：核内構造, 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

DNA トポイソメラーゼ (トポ) II は、核マトリクス(NM)と相互作用し、MAR 結合タンパク質である SP120/ SAF-A/ hnRNP-U とも複合体を形成することが当研究室で示されている。トポ II には、 α と β の 2 つのアイソザイムが存在する。トポ II α は増殖細胞で特異的に発現しているのに対し、トポ II β は神経細胞分化過程で高発現し、この時期に誘導される一部の神経特異的遺伝子群(以下トポ II β 制御下遺伝子群) の発現に必要である。私達はこれまで神経細胞分化過程でのトポ II β の働きを明らかにする目的でその標的配列の網羅的解析を行った。その結果、トポ II β の作用点が GC-rich 領域と AT-rich 領域という GC 含量の偏った 2 つのグループに分類できること、AT-rich トポ II β 作用点は遺伝子間領域に多く存在していることを明らかにした。MAR もまた AT-rich な遺伝子間領域やイントロン領域に多く見つかっており、それらが実際オーバーラップしていることをいくつかのケースで確認している。以上の結果から同定された AT-rich なトポ II β 作用点には MAR が存在する可能性が高い。MAR を予測するプログラムは複数開発されているが、いずれのプログラムでも報告された 165 個の MAR のうち、約 2 割にしか MAR の存在を予測できない上、ランダムに選んだ (従っておそらく MAR を含まない) 200 個のゲノム配列の 1 割に MAR を予測してしまうことから、より精度が高い MAR 予測プログラムの開発が必要とされている。

2. 研究の目的

核マトリクスタンパク質の 1 つである SP120 に着目し、このタンパク質が示す MAR 特異的 DNA 結合の機構を明らかにすることにより、MAR DNA の持つ一般的な性質を抽出し、それを活用して MAR を予測するプログラム MARcode を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) AT-rich なトポ II β 作用点に SP120 が特異的に結合するかの検証

(2) MAR 特異的 DNA 結合を示す SP120 のドメイン解析

(3) 制限酵素 protection assay を用いた SP120 直接結合配列の同定

(4) ChIP-seq 法を用いた in vivo SP120 結合領域の網羅的同定

4. 研究成果

(1) AT-rich なトポ II β 作用点としてクローニングした 26 個の DNA 断片に MAR 活性があることが既に共同研究者らにより示されていたので、それらの DNA 断片に SP120 が結合するかを調べた。その結果、調べた 26 個のクローンすべてが、試験管内で SP120 に特異的に結合した。しかし、それらの配列中にコンセンサス配列は見出せなかった。

(2) MAR 特異的 DNA 結合に関与する SP120 のドメインを解析した結果、これまでに報告のある SAF-box のみでなく、RG ドメインも AT-rich MAR 結合に必須であることが分かった。少なくとも 2 つの DNA 結合領域が協同的に働くことにより MAR 特異的結合が生じることが分かった。

(3) 制限酵素 SspI を用いて protection assay を行った結果、SP120 は、AT-patch 近傍の SspI 切断を特異的に抑制した。以上の結果は、SP120 が直接 AT-patch に結合していることを示している。

(4) SP120 の ChIP-seq 解析の結果、予想に反して SP120 の結合領域として AT-rich な領域だけでなく、様々な DNA 断片が同定された。SP120 が多機能性であること、複数のタンパク質と複合体を形成していることが要因と

考えられる。今後、これらの配列を分類し、MAR機能を有する領域を抽出することによりMARcode完成を目指す。

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)

①河野真二、宮地まり、一安詳子、筒井公子、筒井研、Regulation of DNA topoisomerase II β through RNA-dependent association with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U), J. Biol. Chem., 査読有, Vol. 285, 2010, pp. 26451-26460.

②筒井 研, 筒井公子, 宮地まり, 佐野訓明, DNAトポイソメラーゼII β による神経関連遺伝子の発現制御, 蛋白質核酸酵素, 査読無, Vol. 54, 2009, pp. 1333-1343

[学会発表] (計 10 件)

①Mary Miyaji, From Topology to Topography: Regulation of Neuronal Genes by Targeted Action of DNA Topoisomerase II β , International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, 2011年1月25日、淡路島

②宮地 まり、DNAトポイソメラーゼII β の神経関連遺伝子へのターゲット機構、第33回分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸

③河野真二、DNAトポイソメラーゼII β -SP120 複合体形成におけるRNAの役割、第

33回分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸

④古田良平、DNAトポイソメラーゼII β の遠位通過部位マッピング法 (eTIP-HiC) の開発、第33回分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸

⑤宮地 まり、トポII β は、いかにして神経関連遺伝子の発現を誘導するか?、第9回核ダイナミクス研究会、2010年5月28日、修善寺

⑥宮地 まり、核マトリックスタンパク質SP120/SAF-A/hnRNP UのDNA認識機構、第32回分子生物学会年会、2009年12月11日、横浜

⑦河野真二、トポイソメラーゼII β とSP120/hnRNP U/SAF-Aの複合体形成機構、第32回分子生物学会年会、2009年12月9日、横浜

⑧河野真二、DNAトポイソメラーゼII β とSP120/hnRNP U/SAF-Aの複合体形成が酵素活性に及ぼす影響、第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸

⑨佐野訓明、DNAトポイソメラーゼII β による神経関連遺伝子の発現制御機構、第32回日本神経科学大会、2009年9月16日、名古屋

⑩山口(宮地)まり、トポII β による神経関連遺伝子の発現制御におけるSP120/hnRNP U/SAF-Aの役割、第8回核ダイナミクス研究会、2009年6月19日、修善寺

[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