

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390055

研究課題名（和文）クロマチンインスレーターの多機能性と超ゲノム制御の解明

研究課題名（英文）Multifunction of chromatin insulator and epigenetic regulation

研究代表者

中尾 光善（NAKAO MITSUYOSHI）

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：00217663

研究成果の概要（和文）：クロマチンインスレーターは、ゲノム上の個々の遺伝子および遺伝子座を調節するための境界を形成している。インスレーター結合タンパク質 CTCF がクロマチン・ループを形成することで、エンハンサー、プロモーター、インスレーターの相互作用が規定されることを見出した。染色体コンフォメーション捕捉法を用いて、ヒト遺伝子座（炎症性サイトカイン TNF/LT、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 INK4/ARF）の高次構造を解析した。クロマチン・ループの形成とその動態が、炎症応答に働く TNF/LT 遺伝子座、細胞老化で働く INK4/ARF 遺伝子座の発現制御に不可欠であった。インスレーターの機能の観点から、超ゲノム（エピゲノム）による生命情報発現の機序のひとつを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Chromatin insulator is a boundary element that controls individual gene activity and gene cluster regions. We found that the insulator-binding protein CTCF forms chromatin loops and defines interactions between enhancer, promoter and insulator. Using chromosome conformation capture assay, we analyzed the higher-order epigenomic structure in the human tumor necrosis factor/lymphotoxin (TNF/LT), and INK4/ARF gene loci. The chromatin loop formation and its dynamics were required for expression of these gene clusters.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：遺伝子、転写、インスレーター、エンハンサー、CTCF

1. 研究開始当初の背景

哺乳類ゲノムにおいて、高次クロマチンレベルの制御が、組織・発生段階・状況特異的に特定の遺伝子群を選択的に発現することを可能にしている。この超ゲノム的にも表現できる機構には未知の点が多いが、遺伝子のプロモーター、エンハンサー、クロマチンイン

スレーターの時空間的な相互作用が重要な役割を果たすと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、インスレーター結合因子 CTCF (CCCTC結合因子) の多機能性に着目し、高次の遺伝情報制御機構を明らかにすることを目

的とした。具体的には、CTCFのタンパク質複合体の実体を解明するとともに、その転写調節、インスレーター（クロマチンの境界）、クロマチン・ループ形成等の多機能について、細胞機能と生命現象における意義を明確にすることが全体構想であった。CTCFタンパク質のネットワークの全体像に迫る、世界に先駆けたゲノム医化学の基盤研究を推進した。

3. 研究の方法

[1] CTCFタンパク質複合体に関する解析

1) CTCF複合体の相互作用因子の検討：CTCFの相互作用分子（CHD8、コヒーシンRAD21）について、RNA/タンパク質の発現とともに、特異的な抗体を用いた免疫沈降法、蛍光顕微鏡による免疫染色、クロマチン免疫沈降によって解析した。

[2] 遺伝子クラスター領域におけるCTCF複合体の解析

1) CTCFとコヒーシンの網羅的エピゲノム解析：各種の細胞株を用いて、CTCF等に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、結合部位およびインスレーターの候補部位を同定した。発生分化、疾患に関わる遺伝子クラスター等の領域を検討した。同様のクロマチン免疫沈降を行い、遺伝子クラスター内のCTCF結合部位におけるゲノム上の局在をリアルタイムPCR法で検討した。

2) CTCF複合体によるエンハンサー遮断効果、転写調節機能の解析：インスレーター機能を調べるために、遺伝子プロモーターとエンハンサー、CTCF結合配列を組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを作製した。エンハンサー遮断作用、サイレンサー作用等を調べた。

3) CTCFおよび相互作用因子のRNA干渉法によるノックダウン：CTCF、RAD21に対するsiRNAをヒト培養細胞に適用し、ノックダウン下での遺伝子クラスターの発現をリアルタイムRT-PCR法で検討した。

4) chromosome conformation capture (3C) アッセイ：上記のゲノム領域において、適当な制限酵素・ライゲーション反応を用いた3Cアッセイを行い、細胞内での立体的なクロマチン・ループ形成について検討した。

4. 研究成果

(1) CTCFとコヒーシンのゲノム上の結合部位を網羅的に明らかにした。これらのタンパク質は、ヒトゲノム上に10,000個以上の共在部位を認めたと、単独の集積部位や組合せの異なる集積部位があった。また、集積部位は遺伝子のプロモーター近傍、遺伝子のボディ、遺伝子間などに位置していた。

(2) CTCF複合体の細胞機能と生命現象における意義を明らかにするため、CTCFおよび相互作用分子のChIP-ChipまたはChIP-Seq（シーケンズ）解析に基づき、CTCFが関与する遺

伝子クラスター領域を分析した。

3C解析を用いて、INK4/ARF遺伝子座（p15/ARF/p16）では、線維芽細胞の老化時に、CTCFの発現低下によるクロマチン・ループ形成の解除と転写抑制能の減少がおり、INK4（p15/p16）遺伝子が発現誘導されることが判明した。また、炎症刺激を受けた肝癌細胞のTNF/LT遺伝子座（TNF/LT・/LT・）では、エンハンサー、プロモーター、インスレーターの相互作用が動的に変化することで、この3遺伝子が経時的に発現誘導がおこることが分かった。

このように、ヒト疾患・病態に関わる遺伝子クラスターに解析の焦点を当てることで、細胞機能と生命現象における意義が明確になった。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計11件、全て査読あり)

1. S. Hino, A. Sakamoto, K. Nagaoka, K. Anan, Y. Wang, S. Mimasu, T. Umehara, S. Yokoyama, K. Kosai, and M. Nakao. FAD-dependent lysine demethylase LSD1 regulates cellular energy expenditure. **Nature Commun.** 3: 758, 2012.

2. T. Watanabe, K. Ishihara, A. Hirose, S. Watanabe, S. Hino, H. Ojima, Y. Kanai, Y. Sasaki, and M. Nakao. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in human tumor necrosis factor/lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. **Mol. Cell. Biol.** 32: 1529-1541, 2012.

3. A. Hirose, K. Ishihara, K. Tokunaga, T. Watanabe, N. Saitoh, T. Chandra, M. Narita, M. Shinohara, and M. Nakao. Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells. **Aging Cell** 11: 553-556, 2012.

4. M. Taura, M.A. Suico, K. Koyama, K. Komatsu, R. Miyakita, C. Matsumoto, E. Kudo, R. Kariya, H. Goto, S. Kitajima, C. Takahashi, T. Shuto, M. Nakao, S. Okada, and H. Kai. Rb/E2F1 regulate innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells. **Mol. Cell. Biol.** 32: 1581-1590, 2012.

5. N. Saitoh, C. Sakamoto, M. Hagiwara, L.T. Agredano-Moreno, L.F. Jiménez-García, and M. Nakao. The distribution of

phosphorylated SR proteins and alternative splicing are regulated by RANBP2. **Mol. Biol. Cell** 23: 1115-1128, 2012.

6. A. Fournier, N. Sasai, M. Nakao and P. A. Defossez. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. **Brief Funct. Genomics** 11: 251-264, 2012.

7. Y. Xi, S. Watanabe, Y. Hino, C. Sakamoto, Y. Nakatsu, S. Okada, and M. Nakao. Hmgal is differentially expressed and mediates silencing of the Cd4/Cd8 loci in T cell lineages and leukemic cells. **Cancer Sci.** 103: 439-447, 2012.

8. S. Nagashima, T. Fukuda, Y. Kubota, A. Sugiura, M. Nakao, R. Inatome, and S. Yanagi. CRAG protects neuronal cells against cytotoxicity of expanded polyglutamine protein partially via c-Fos-dependent AP-1 activation. **J. Biol. Chem.** 286: 33879-33889, 2011.

9. N. Sasai, M. Nakao, and P. A. Defossez. Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. **Nucleic Acids Res.** 38: 5015-5022, 2010.

10. L-K. Chang, J-Y. Chuang, M. Nakao, S-T. Liu. MCAF1 and Synergistic activation of the transcription of Epstein-Barr virus lytic genes by Rta and Zta. **Nucleic Acids Res.** 38: 4687-4700, 2010.

11. J. Uwada, N. Tanaka, Y. Yamaguchi, Y. Uchimura, K. Shibahara, M. Nakao, and H. Saitoh. The p150 subunit of CAF-1 causes association of SUMO2/3 with the DNA replication foci. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 391: 407-413, 2010.

[学会発表] (計25件)

1. 中尾光善、石原宏、齊藤典子. 高次エピゲノム機構による細胞プログラムの制御. 第85回日本生化学会大会 (シンポジウム: 生命活動における高次エピゲノム制御の分子基盤) 平成24年12月15日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

2. 坂元顕久、日野信次朗、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、中尾光善. ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 による癌代謝制御. 第85回日本生化学会大会 (シンポジウム: ミトコ

ンドリア応答性から見る細胞機能解析: ミトコンドリア研究の新しい視点) 平成24年12月15日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

3. 日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、中尾光善. Epigenetic regulation of cellular energy flow by FAD-dependent LSD1. 第85回日本生化学会大会 (シンポジウム: Networks of transcription and metabolism: physiology, diseases, and structural basis) 平成24年12月15日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

4. 笹井信広、中尾光善. MCAF1/SETDB1 リジンメチル化酵素複合体の細胞老化における役割. 第35回日本分子生物学会年会 (ワークショップ: 分子修飾による転写とエピジェネティック制御のクロストーク) 平成24年12月13日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

5. 日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、中尾光善. 細胞のエネルギー戦略とエピジェネティクス. 第35回日本分子生物学会年会 (ワークショップ: 生命現象をエネルギー代謝から理解する) 平成24年12月12日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

6. 竹林慎一郎、中尾光善、David M. Gilbert. 核内クロマチン相互作用解析により明らかになったマウス ES 細胞分化過程で制御を受ける染色体ドメインの特殊なクロマチン折りたたみ原理. 第35回日本分子生物学会年会 (ワークショップ: 細胞核構造体によるエピゲノム制御機構) 平成24年12月12日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

7. 徳永和明、齊藤典子、Goldberg Ilya G、中尾光善. 細胞核形態の定量的解析によるiPS細胞の識別. 第35回日本分子生物学会年会 (ワークショップ: 核内構造ネットワーク: 分子構築と高次生命機能への寄与) 平成24年12月12日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

8. M. Nakao. Gene regulation and cell function mediated by epigenetic factors. 8th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair. November 27, 2012 (Awaji yumebutai international conference center)

9. 中尾光善、坂元顕久、日野信次朗. エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態. 日本人類遺伝学会第57回大会

(シンポジウム：エピジェネティクス研究の新展開) 平成 24 年 10 月 25 日, 京王プラザホテル

10. 齊藤典子、徳永和明、松森はるか、田代聡、中尾光善. 細胞核の画像定量解析による細胞状態の評価. 日本放射線影響学会第 55 回大会ワークショップ、平成 24 年 9 月 6 日、東北大学 (仙台市)

11. 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と病態. 第 35 回日本基礎老化学会 (特別講演) 平成 24 年 7 月 26 日、東邦大学習志野キャンパス

12. 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞病態と治療. 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会 (シンポジウム) 平成 24 年 6 月 29 日、ホテル熊本テルサ

13. 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と病態. 第 55 回日本腎臓学会 (教育講演) 平成 24 年 6 月 2 日、パシフィコ横浜

14. N. Saitoh, K. Tokunaga, S. Tomita, A. M. Osama, H. Matsumori, C. Sakamoto, and M. Nakao. Nucleocytoplasmic transport is involved in nuclear architecture regulation. 第 34 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) 平成 23 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜

15. 中尾光善、日野信次朗、石原宏. クロマチン因子によるエピジェネティックな細胞制御と病態. 第 34 回日本分子生物学会年会 (シンポジウム：エピゲノムの静と動 - 維持、形成、リプログラミング) 平成 23 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜

16. 日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、中尾光善. 脂肪細胞のエネルギー戦略に関わるエピジェネティクス機構. 第 32 回日本肥満学会 (シンポジウム：脂肪細胞生物学の最前線) 平成 23 年 9 月 23 日、淡路夢舞台国際会議場

17. 中尾光善、石原宏、日野信次朗. エピジェネティクス機構による細胞制御と病態. 第 84 回日本生化学会大会 (シンポジウム：クロマチンダイナミクスによるエピジェネティクスの分子機構) 平成 23 年 9 月 22 日、国立京都国際会館

18. 齊藤典子、徳永和明、富田さおり、齊藤寿仁、中尾光善. 細胞核内構造体に関わる SUMO 化とリン酸化修飾. 第 11 回日本蛋白質

科学会年会 (ワークショップ) 平成 23 年 6 月 8 日、ホテル阪急エキスポパーク

19. 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と老化. 第 11 回日本抗加齢医学会総会 (シンポジウム：加齢疾患とエピジェネティクス) 平成 23 年 5 月 27 日、国立京都国際会館

20. 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と病態. 第 65 回日本栄養・食糧学会大会サテライトシンポジウム (ネスレ栄養科学会議「栄養とエピジェネティクス」) 平成 23 年 5 月 14 日、お茶の水女子大学

21. 中尾光善、坂元顕久、長岡克弥、日野信次朗. 肥満におけるエネルギー代謝のエピジェネティック制御機構. 第 84 回日本内分泌学会学術集会 (シンポジウム：肝臓の糖代謝制御と転写調節) 平成 23 年 4 月 21 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場

22. 日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、中尾光善. 肥満におけるエネルギー代謝のエピジェネティック制御機構. 第 84 回日本内分泌学会学術集会 (ミニシンポジウム：内分泌学におけるエピジェネティクス) 平成 23 年 4 月 21 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場

23. N. Saitoh, K. Tokunaga, S. Tomita, C. Sakamoto, and M. Nakao. Nuclear sub-structure formation that is regulated by the Ran-RanBP2 system. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (シンポジウム：細胞核ダイナミクス研究と病態学研究的融合) 平成 22 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド

24. 日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、中尾光善. リジン脱メチル化酵素 LSD1 によるエネルギー恒常性の調節. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (ワークショップ：疾患エピジェネティクスの最前線) 平成 22 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド

25. 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と病態. 第 60 回体質医学会総会 平成 22 年 10 月 16 日、くまもと県民交流館パレア

〔図書〕 (計 13 件)

1. 富田さおり、藤原沙織、中尾光善. 乳癌のエピゲノム異常と診断・治療への応用、遺伝子医学 M00K25 号 (エピジェネティクスと病気) (佐々木裕之、中尾光善、中島欽一編)、メディカル・ドゥ (印刷中)

2. 齊藤典子、徳永和美、松森はるか、中尾光善. 核内ポディーの構造と機能、バイオサイエンスシリーズ 染色体と細胞核のダイナミクス (平岡泰・原口徳子 編)、化学同人 (印刷中)
3. 富田さおり、笹井信広、日野信次朗、中尾光善. エピゲノム修飾を標的とした癌治療ポテンシャル、日本臨床、70: 91-97, 2012.
4. 中尾光善. 基礎の基礎、3D-エピゲノムが生む新たな生命情報 (中尾光善 監修)、細胞工学、31: 858-862, 2012.
5. 齊藤典子、徳永和美、松森はるか、富田さおり、中尾光善. 細胞核内構造の計測・分類、3D-エピゲノムが生む新たな生命情報 (中尾光善 監修)、細胞工学、31: 870-876, 2012.
6. 日野信次朗、中尾光善. エピジェネティック制御、シグナル伝達キーワード事典 (山本雅、仙波憲太郎、山梨裕司 編集)、羊土社、327-334, 2012
7. 中尾光善、日野信次朗. エピジェネティクス機構による代謝制御と病態、栄養とエピジェネティクス—食による身体変化と生活習慣病の分子機構— (ネスレ栄養科学会議 監修)、建帛社、63-73, 2012.
8. 木下 聡、渡邊智佳子、中尾光善. 遺伝子調節とヒト疾患 (12章翻訳)、遺伝情報の発現制御—転写機構からエピジェネティクスまで (David S. Latchman 原著、五十嵐和彦、深水昭吉、山本雅之 監訳)、メディカル・サイエンス・インターナショナル、365-385, 2012
9. 中尾光善. 概論—エピジェネティック遺伝: 生命情報のメモリーに迫る、代謝エピジェネティクス (中尾光善 編)、実験医学、29: 2204-2210, 2011.
10. 坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、中尾光善、日野信次朗. 癌代謝とエピジェネティクス、代謝エピジェネティクス (中尾光善 編)、実験医学、29: 2231-2235, 2011.
11. 中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と病態、日本体質医学会雑誌、73: 47-49, 2011.
12. 城圭一郎、副島英伸、中尾光善. エピジェネティクスとヒト疾患 (23章翻訳)、エ

ピジェネティクス (C. David Allis, Thomas Jenuwein, Danny Reinberg 編、堀越正美 監訳)、培風館、269-290, 2010.

13. 笹井信広、中尾光善. DNA メチル化を介した転写制御機構、エピジェネティクスと疾患 (牛島俊和、塩田邦郎、田嶋正二、吉田稔 編)、実験医学、28: 53-59, 2010.

[産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)

名称: 誘導多能性幹細胞の識別方法
発明者: 中尾光善、齊藤典子、徳永和美、小林民代
権利者: オリンプス株式会社、熊本大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-091405
出願年月日: 2011 年 4 月 15 日
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ
<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp>
http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/medical_cell_biology/

6. 研究組織
(1) 研究代表者
中尾 光善 (NAKAO MITSUYOSHI)
熊本大学・発生医学研究所・教授
研究者番号: 00217663