

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23日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22770008

研究課題名（和文）ヘテロクロマチン領域で転写を維持する核内テリトリーとクロマチン構造の多角的解析

研究課題名（英文）Chromatin structure and nuclear territories of the intergenic region between inactivated and escape genes on human inactive X chromosome.

研究代表者

後藤 友二 (GOTO YUJI)

中部大学・生命健康科学部・助手

研究者番号：70362522

研究成果の概要（和文）：

本研究では、哺乳類のX染色体上で不活性化を免れる遺伝子 *EIF2S3* と近傍で不活性化される遺伝子 *KLHL15* の遺伝子間領域で不活性化を免れ転写を維持する機構に迫った。

その結果、1) 2つの遺伝子間領域にあるMatrix attachment region (MAR)が核マトリクスに結合し、2つの遺伝子を別ループに配置していること、2) 不活性化を免れる遺伝子領域ではユークロマチンに特徴的な、不活性化される遺伝子領域ではヘテロクロマチンに特徴的なヒストン修飾が見られた、3) *SATB1*遺伝子が上記2つの現象に深く関わっていることを示した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I clarified the structure and mechanism of chromatin boundary between the inactivated *KLHL15* and an escape gene, *EIF2S3* by using human-mouse hybrid cells carrying either active or inactive human X chromosome in mouse background. Main findings are as follows;

- 1) Three matrix attachment regions (MAR) located between *KLHL15* and *EIF2S3* in the inactive X-chromosome have been exclusively associated to nuclear matrix.
- 2) Acetylation of histone H3K9 and methylation of histone H3K4 have been enriched at the escape gene, *EIF2S3*, and their flanking region. Tri-methylation of histone H3K27 and H3K9, on the other hand, have been enriched at the inactivated, *KLHL15*. These modifications were separated at MAR.
- 3) Knockdown of *SATB1*, which is the member of MAR associated protein complex, led to the disruption of MAR and nuclear matrix pairing and histone modification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム機能・発現

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現は、(1)核内テリトリーによる染色体レベルの制御、(2)テリトリー内でのクロマチン構造変換による制御、そして、(3)転写開始複合体が DNA を鋳型に転写を行う分子制御と、様々な研究がなされ、多くの知見が蓄積されてきた。今後は、これらの知見を有機的に結びつけ細胞核という構造体での遺伝子発現を統合的に理解することが重要である。哺乳類では雌雄間の X 染色体量を補正するため、雌で 2 本の X 染色体の一方を不活性化する。不活性 X はヘテロクロマチン化され、ほぼ全ての遺伝子発現が抑制されるが、ヒトでは不活性化を免れ、転写を維持する遺伝子 (escape gene) が存在する。

従って escape gene 近傍では、X 染色体上のほぼ全ての遺伝子の転写を抑制する強力なヘテロクロマチン化を遮断し、真正クロマチン構造と転写を維持する機構が存在するはずであり、B の仮説を検証する優れた実験モデルと考える。

2. 研究の目的

遺伝子発現は、(1) 転写開始複合体の結合に始まる DNA レベルでの制御、(2) クロマチン構造変換によって複合体の結合を調節するクロマチンレベルの制御、さらに(3) 核内におけるクロマチンと核内構造体の相対位置関係によるマクロな制御など多次元で複雑な機構によって制御される。

本研究では、ヒト不活性 X 染色体上で不活性化を免れる遺伝子をモデルに染色体全体が不活性化されるマクロな制御、不活性なクロマチンテリトリー内で転写を維持するクロマチン構造とその核内配置を解明し、(1)~(3) を有機的に結合した核における統合的な転写制御機構の理解を目指す。

3. 研究の方法

A. 不活性 X 染色体と活性 X 染色体、及び転写に関連する機能構造体の核内イメージング
正常雌細胞における不活性、活性 X 染色体の核内テリトリー、及び様々な核内機能構造体の局在をイメージング解析し、それぞれの相対位置関係を明らかにした。

B. 不活性 X テリトリー内(外)における escape domain の局在解析

Escape domain が真正クロマチン構造を維持するために不活性 X テリトリー内 (あるいは外) で特別な領域に局在している可能性をイメージングや 3C アッセイ法などを用いて検討した。

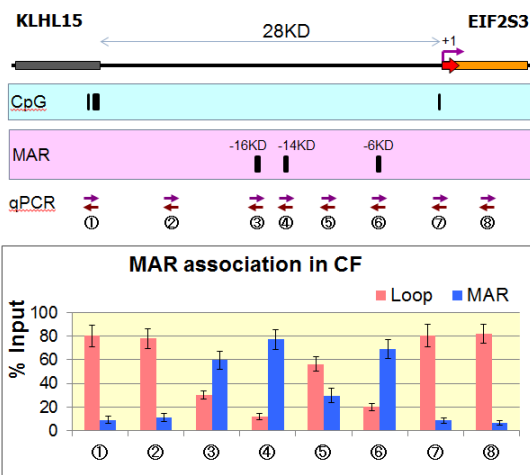
C. escape domain のクロマチン構造の維持、及び局在位置を固定するメカニズムの解析
核マトリクスと結合するクロマチン領域の探索などから、Escape domain がテリトリー内

で特定領域に局限し、真正クロマチン構造を維持するための仕組みを明らかにした

4. 研究成果

2010 年度は、最初に不活性 X 染色体の核内局在を三次元 FISH 法により解析した。その結果、不活性 X 染色体が核膜近傍の外周部に局在する一方、不活性化を免れる遺伝子領域は不活性 X のテリトリーの外側に局在することが分かった。これらのクロマチン領域の局在変化には染色体を核マトリクス (核内骨格) に固定する領域 Matrix attachment region (MAR) が重要である考え、不活性化を免れる遺伝子の 1 つ EIF2S3 とその近傍で不活性化を受ける遺伝子間の領域の MAR を探索したところ、EIF2S3 の 1kb、14Kb、16Kb 上流付近に 3 つの MAR 候補配列が検出された (図 1 の①、②、③)。これらの MAR 候補配列が、実際に核マトリクスに結合しているかどうかを調べたところ、3 カ所全ての MAR 配列が、不活性 X 特異的に核マトリクスに結合している事が分かった。

図 1. 不活性 X 染色体の MAR 領域の核マト



リクスへの結合状態の解析結果

(青い棒グラフが高い領域は核マトリクスと結合している事を示している。)

次に、この MAR 候補領域のヒストン修飾を調べた結果、1kb 上流の MAR 領域では H3K9、K27、および H4K20 のメチル化レベルが急激に変化していた (図 2)。

2011 年度は引き続き、不活性化を受ける EIF2S3 とその近傍で不活性化を免れる遺伝子 KLHL15 の遺伝子間領域におけるヒストン修飾に関して解析を行った。その結果、不活性化を免れる遺伝子を含むクロマチンループではユークロマチンに特徴的な H3K4 のメチル化や H3K9 のアセチル化などが検出される一方、不活性化される遺伝子を含むクロマチンループではヘテロクロマチンに特徴的

な H3K27 や H3K9 のトリメチル化が顕著に認められた (図 2)。

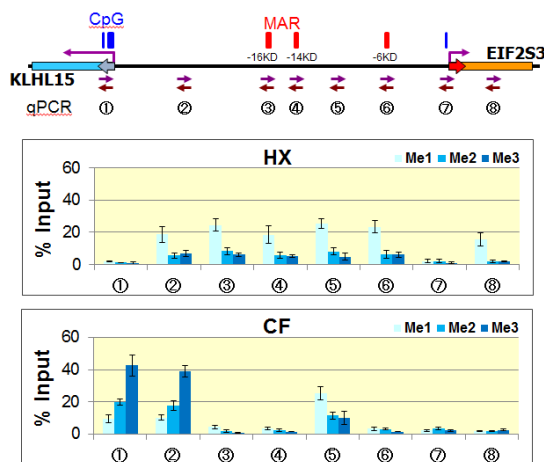


図 2. H3K9 のメチル化状態の解析結果 (青い棒グラフが高いところが、ヒストン H3 の 9 番リジンがメチル化されている領域)

さらにいずれのヒストン修飾も、核マトリクスに結合していると考えられる不活性 X 上の MAR 配列 (図 2 の ③、④、⑥) を境界として修飾レベルが劇的に変化していることから、核マトリクスに結合している MAR がクロマチン構造の境界領域を形成している可能性を考えた。そこで、MAR 配列と共に核マトリクスに結合することが知られているタンパク質である SATB1 の局在の有無をクロマチン免疫沈降法で検討した結果、核マトリクスに結合している MAR 配列近傍に SATB1 が結合している事が示された (図 3)

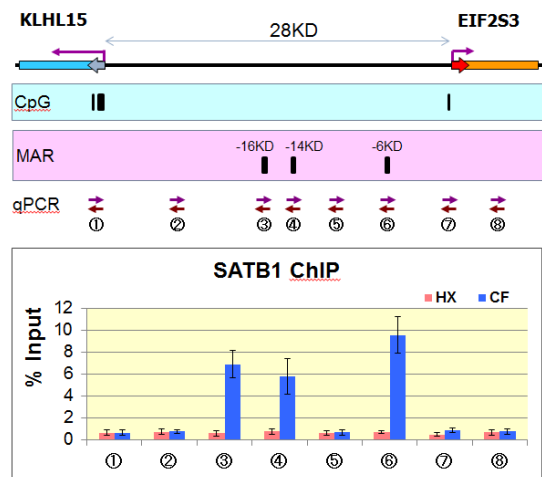


図 3. SATB1 の局在解析結果 (青い棒グラフが高いところに SATB1 が局在している事を示す)

以上の結果より、不活性化を免れる遺伝子は MAR により近傍の不活性化される遺伝子とは別のクロマチンループに配置され、それがヒストン修飾を含むクロマチン構造の境界となり、転写を維持する構造を形成している

と結論した (図 4)。

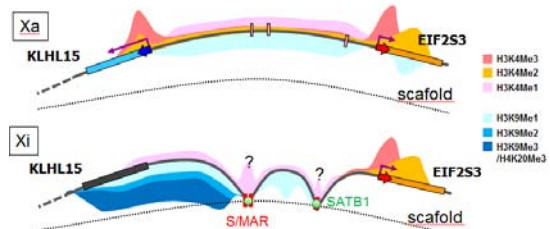


図 4. 不活性化を免れる遺伝子と不活性化される遺伝子近傍のクロマチン構造を解析した結果のまとめ

2012 年度は、不活性化を免れる遺伝子が不活性化を受ける遺伝子と異なるクロマチンループに配置されるのに重要であると考えられる SATB1 遺伝子を一時的にノックダウンすることで、不活性化を免れる遺伝子の挙動がどう変化するかを検討した。その結果、EIF2S3 と KLHL15 遺伝子間領域にある MAR 配列の核マトリクスへの結合が失われ、不活性化を免れる遺伝子 EIF2S3 領域でも H3K27 や H3K9 のトリメチル化が検出されるようになり、EIF2S3 の転写が有意に抑制される傾向が認められた。このような変化は雄の細胞では認められなかったことからヒト不活性 X 染色体上の変化であると断定した。

以上のような 3 年間に渡る研究結果から、不活性化を免れる遺伝子は、MAR 配列を介して不活性化を受ける遺伝子とは別のクロマチンループに配置される事で、ヘテロクロマチン化する不活性 X 染色体上で転写を維持していると結論づけた (図 4)。

本研究では、核マトリクスを介したクロマチンループ構造が X 染色体の不活性化に伴う転写制御に関わっている事を直接示した最初の報告であり、その重要性は極めて多い。今後は、他の不活性化を免れる遺伝子でも同様の制御がなされている事を示していければ、不活性化を免れる特殊な機構の全貌が明らかに出来ると期待される。

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 6 件)

- ① Ohgami N, Tamura H, Ohgami K, Iida M, Yajima I, Kumasaka MY, Goto Y, Sone M, Nakashima T, and Kato M. (2012). c-Ret-mediated hearing losses. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 5:23-8. 査読あり
- ② Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O, Iida M, Ohgami N, Tamura H, Kawamoto Y, and Kato M. (2012). 査読あり

RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy.

- ③ Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Iida M, Ohgami N, Tamura H, Yamanoshita O, Kawamoto Y, Furukawa K, and Kato M. (2011).
Molecular network associated with MITF in skin melanoma development and progression. Journal of skin cancer. doi:10.1155-2011-730170. 査読あり
- ④ Taguchi N, Uemura N, Goto Y, Sakura M, Hara K, Niwa M, Iida M, Yanagishita T, Watanabe D, and Kato M. (2011).
Antioxidative effects of cherry leaves extract on tert-butyl hydroperoxide-mediated cytotoxicity through regulation of thioredoxin-2 protein expression levels. J Toxicology and Environmental Health Part A. 74:1240-1247. 査読あり
- ⑤ Kato M, Iida M, Goto Y, Kondo T, and Yajima I. (2011).
Sunlight exposure-mediated DNA damage in young adults. Cancer Epidemiology and Biomarkers Preview. 20:1622-1688. 査読あり
- ⑥ Kato M, Kumasaka MY, Takeda K, Hossain K, Iida M, Yajima I, Goto Y, and Ohgami N. (2011).
L-cysteine as a regulator for arsenic-mediated cancer-promoting and anti-cancer effects. Toxicology In Vitro. 25:623-629. 査読あり

[学会発表] (計5件)

- ① 後藤友二、不活性化を免れる遺伝子と不活性化される遺伝子の境界領域のクロマチン構造、哺乳動物 X 染色体研究会 (北大、札幌)、2013年3月23日
- ② 後藤友二、不活性化を免れる遺伝子と不活性化される遺伝子の境界領域のクロマチン構造と転写制御、日本遺伝学会 第84回大会 (九大、福岡)、2012年9月25日
- ③ 後藤友二、加藤昌志、不活性化を免れる遺伝子 EIF2S3 上流にあるクロマチン構造の解析 II、日本遺伝学会 第83回大会 (京大、京都) 2011年9月20日
- ④ 後藤友二、加藤昌志、メラノーマ自然発症モデルマウスを用いた癌抑制遺伝子のスクリーニングと機能解析、日本分子生物学会 第33回大会 (ポートアイランド、神戸) 2010年12月8日
- ⑤ 後藤友二、加藤昌志、不活性化を免れる遺伝子 EIF2S3 上流にあるクロマチン構造の解析、日本遺伝学会 第82回大会 (北大、札幌)、2010年9月20日

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 友二 (GOTO YUJI)

中部大学・生命健康科学部・助手

研究者番号：70362522