

令和元年6月12日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06898

研究課題名(和文) 遺伝子砂漠に近接した神経関連遺伝子の発現制御に関わる機能性RNA分子群の同定

研究課題名(英文) Identification of RNA molecules that regulates expression of neural genes close to gene desert

研究代表者

佐野 訓明 (Sano, Kuniaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00294405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子砂漠に近接した神経関連遺伝子座からの発現を制御しているDNAトポイソメラーゼII (トポII) の分子機構の解明を目指すために、その機構に関わっている機能性RNA分子の同定を試み以下の結果を得た。RNA分子と結合する制御ドメイン(CRD)のリジンに変異を入れると核内局在が変化した。遺伝子砂漠に隣接したモデル領域からの遺伝子発現がトポII によるクロマチン構造変化後に起きること、トポII の阻害によりその変化が完全に抑制されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、神経細胞が成熟する過程において神経関連遺伝子の発現誘導に関係するDNAトポイソメラーゼII (トポII) の核内の局在や活性を調節する機構の解明に取り組んだ。トポII の制御している神経関連遺伝子には自閉症などの神経精神疾患に関連した遺伝子が多く含まれおり、トポII の調節機構の解明が進むことが、それらの疾患の発症機構や治療のための一助となることが期待される。

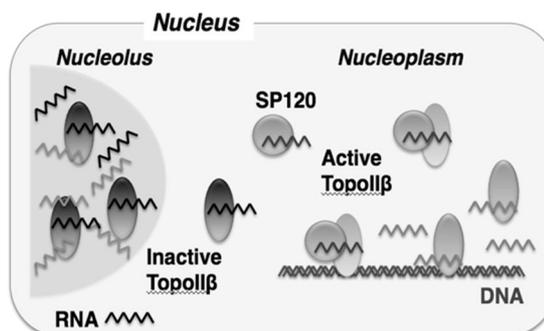
研究成果の概要(英文)：In this study, we try to identify RNA molecules that regulates DNA topoisomerase II involved in expression of neural genes close to gene desert. Mutation of the lysine in the regulatory domain (CRD) of Topo II that binds to RNA molecules altered the nuclear localization. We showed that gene expression from a model gene region (rrad gene region in rat chromosome 19) adjacent to the gene desert occurs after chromatin structure change by topo II, and the changes are completely suppressed by ICRF-193, specific inhibitor of topo II.

研究分野：ゲノム科学・分子生物学

キーワード：遺伝子発現 神経関連遺伝子 DNAトポイソメラーゼ 核内局在 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロジェクトの進行とともに、機能不明な“ジャンク DNA”で占められている“遺伝子砂漠”にも様々な機能が潜んでいることが分かってきた。遺伝子砂漠周辺の遺伝子が組織特異的な発現動態を示す事は以前から知られていたが、それらは数百 kb を超える長大な遺伝子 (Long AT-rich gene、LA 遺伝子) で、また神経伝達物質受容体やイオンチャネルなどの神経関連遺伝子であることが多いことに申請者らは注目して解析を行ってきた。そして、遺伝子砂漠に近接している LA 遺伝子の発現誘導に、二本鎖 DNA を切断・再結合する事で DNA の高次構造を変化させる DNA トポイソメラーゼ II (トポ II) が必要であることを示した。トポ II には 2 つのアイソザイムが存在し、M 期にコンデンシンなどと協働して染色体凝縮および分配に関わるトポ II が最初に発見された。トポ II は、株化細胞ではその発現量が少なく細胞周期を通していってであるためその機能が分かっていなかったが、申請者らを含めた複数のグループが脳形成時の分化途上の神経細胞における遺伝子発現を制御している事を示した。分化途上の神経細胞では最終分裂後にトポ II が急速に分解され、入れ代わるようにトポ II が誘導されてくる。完全に成熟した神経細胞では、トポ II は核小体に偏在し酵素活性を消失している様に見られた (シーケストレーション)。トポ II が核内を自由に動き回っていることが分かっているが、LA 遺伝子やその近傍に局在させる機構は依然として分かっていない。最近、トポ II の C 末端ドメイン (CTD) に存在する制御ドメイン (CRD) に RNA が結合する事で DNA 弛緩活性が抑制され、核小体に偏在することが分かった。また、核マトリックスの構成因子である SP120/hnRNP U が RNA によるトポ II の活性阻害を解消すること、両者からなる安定複合体形成に RNA が必要であることも申請者らの研究グループが明らかにしている。



2. 研究の目的

本研究では、遺伝子砂漠に近接した神経関連遺伝子座からの発現を制御しているトポ II の分子機構の解明を目指すために、その機構に関わっている機能性 RNA 分子の同定を試みることにした。具体的には、(1) トポ II の CRD に結合し DNA 弛緩活性を抑制し、核小体への偏在化、(2) SP120 との複合体形成、(3) 標的ゲノム領域への局在の 3 つの機能に関連した RNA 分子の同定とそれによる制御機構を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) トポ II の DNA 弛緩活性を抑制する CRD に結合する機能性 RNA 分子の同定

トポ II の CRD (1201-1251) による制御機構の解明するために、そこに結合する RNA を同定を試みる。ナノ磁性微粒子 FG-beads (多摩川精機社製) に N 末端にシステインをもった CRD タンパク質を固定化して、RNA の In vitro 結合スクリーニングを行う。唯一懸念されるのは標的 RNA と考えているのが rRNA である点で、大量に存在する rRNA との結合が非特異的結合でないことを示す為に詳細な結合 RNA 領域の同定と証明実験が必要である。標的 RNA 配列を in vitro で転写し、精製タンパク質を用いた DNA 弛緩活性系に加える事でその阻害効果を確認する。

(2) トポII のCRDの変異体の核内局在の解析

cDNAクローニングしたラット由来トポII に対してsite-directed mutagenesis法で変異の導入を行い、CRDの領域のどの変異が核内局在に変化を及ぼすのかを明らかにする。変異はトポII のCRD領域に存在する16個のリジン、アルギニン残基に変異を導入して、アラニンなどに置換する。トポII の核内局在がリン酸化などによって制御されている可能性を考えて、セリン、スレオニン、チロシン残基などにも変異の導入を行う。変異型トポII の局在は、C末端に融合させたEGFPの蛍光を指標に観察する。

(3) 遺伝子砂漠に隣接する遺伝子群の発現に対するトポII の関与の解析

これまでの我々の研究から明らかになっているトポII 制御下にある遺伝子群の中から、遺伝子砂漠に隣接している遺伝子領域を選び出し、モデル領域としてトポII の制御に関して解析を行う。具体的にはこの領域のクロマチン構造に起きている変化をDNaseI感受性を指標に解析する。

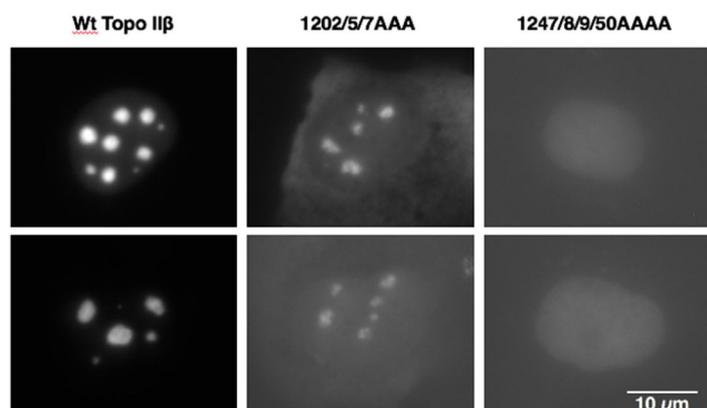
4. 研究成果

(1) トポII のDNA弛緩活性を抑制するCRDに結合する機能性RNA分子の同定

これまでにCRDに結合するRNAはポリA(-)画分に含まれることが分かっていたが、残念ながらCRDに特異的に結合するRNAの同定には至っていない。CRDタンパク質を用いたIn vitro結合スクリーニング、培養細胞にタグを結合したCRDタンパク質を強制発現してのプルダウンアッセイでも特異的な結合を示す結果は得られていない。しかし、トポII の機能解析に行っていくのに機能制御に関わっているRNA分子の同定は必須であり、今回の結果を参考にして継続していく。

(2) トポII のCRDの変異体の核内局在の解析

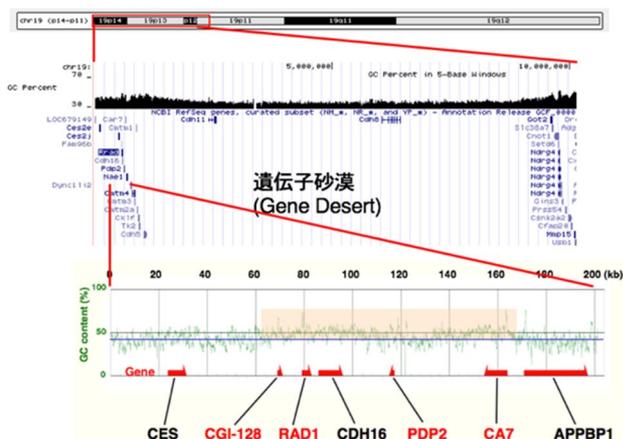
CRD変異トポII をラット線維芽細胞(Rat-1)に発現させて核内局在を観察した。CRDの領域の1202、1205、1207番目のリジンをアラニンに変異させると、核小体への局在が減少することに加えて細胞質にも局在が認められるようになった。また1247~1250番目4つのリジンをアラニンに変異させると核小体の偏在が全く認められなくなり、核質が全体の局在が見られた。今後は、これらのリジン残基がどのようなRNA分子との結合に関与している子を今後明らかにしたい。



(3) 遺伝子砂漠に隣接する遺伝子群の発現に対するトポII の関与

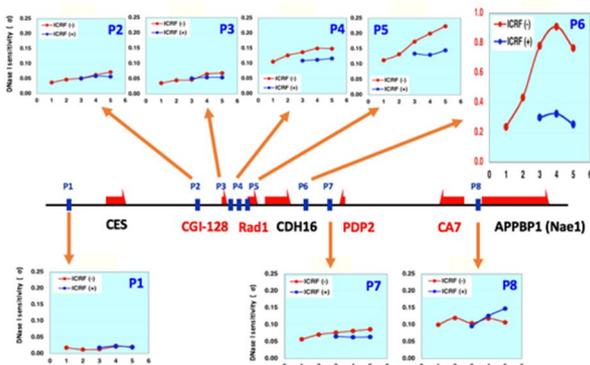
ラットの19番染色体の短腕側には、テロメアと8 Mbに及ぶ遺伝子砂漠に挟まれた約600kbの範囲に15の遺伝子が存在する領域が存在する。この領域には、CGI-128、Rrad (rad-1)、PDP2、CA7の4つの転写誘導にトポII が必要な遺伝子(図中の赤色)が密集していることが明らかになっている。この領域のクロマチン構造の変化をDNaseI感受性で調べると、トポII 依存的に培養継時的に発現が誘導される遺伝子の近傍でクロマチンの脱凝縮が起きていることが明らかになった。さらに、これらの遺伝子の

Rat 19番染色体の短腕側末端のRrad領域



の近傍でクロマチンの脱凝縮が起きていることが明らかになった。さらに、これらの遺伝子の

Rrad領域のDNaseI感受性変化



間に、他の領域の変化に先んじて5倍以上変化率の大きな領域を見出すことに成功した。そして、この変化はトポIIの特異的阻害剤ICRF-193処理で完全に抑制された。これらの遺伝子砂漠に隣接した遺伝子群の発現をトポII が制御していること、その制御にはクロマチンの脱凝縮反応が関与していることが明らかになった。今度これらの遺伝子発現制御機構とトポII を制御する

RNA分子による核内局在やターゲッティング、活性調節などとの統合を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Kang, J., Yamasaki, K., Sano, K., Tsutsui, K., Tsutsui, K.M. and Tateno, M. Simulated annealing-extended sampling for multicomponent decomposition of spectral data of DNA complexed with peptide. J. Phys. Soc. Jpn., 査読有、86巻、2017、p014802、 DOI: 10.7566/JPSJ.86.014802

Kawano, S., Kato, Y., Okada, N., Sano, K., Tsutsui, K., Tsutsui, K.M., Ikeda, S. DNA-binding activity of rat DNA topoisomerase II C-terminal domain contributes to efficient DNA catenation in vitro. J. Biochem., 査読有、159巻、2016、pp363-369、DOI: 10.1093/jb/mvv110

〔学会発表〕（計4件）

宮地まり，古田良平，細谷 修，佐野訓明，筒井公子，筒井 研
トポイソメラーゼII は神経細胞終末分化において遠隔ゲノム部位の相同配列間に働きクロマチン脱凝縮を誘導する、
第36回染色体ワークショップ・第17回核ダイナミクス研究会、2019年

宮地まり，古田良平，細谷 修，佐野訓明，姜 志始，舘野 賢，筒井公子，筒井 研、
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

宮地まり，細谷修，古田良平，佐野訓明，筒井公子，筒井研、
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化。
第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会、2015年

古田良平，宮地まり，佐野訓明，細谷修，姜志始，舘野賢，筒井公子，筒井研、
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合同大会、2015年

〔その他〕

ホームページ

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

6．研究組織

(1) 研究代表者

なし

(2) 研究協力者

なし