

令和元年5月27日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07196

研究課題名(和文) LINE1配列のストランド特異的分布とMARを介したクロマチン制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of strand specific distribution of LINE1 sequence in chromatin regulation

研究代表者

堀家 慎一 (Horike, Shin-ichi)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：40448311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はCRISPR/Cas9システムを用いてSatb1の欠損細胞株を樹立した。Satb1欠損F12細胞にて、15q11-q13領域のクロマチン脱凝集状態を解析した所、正常細胞株と比較し脱凝集が小さくなっていることが明らかとなった。一方、Satb1を強制発現させたF12細胞では、クロマチン脱凝集状態が正常に比べ大きく広がっていることを見出した。このことから、15q11-q13領域のクロマチン脱凝集の構築には、Satb1が大きく関わっていることが明らかとなった。また、Satb1の欠損細胞株において、15q11-q13領域のMAGEL2/NDNの発現が低下していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高等生物における複雑さが非コードDNAに起因することは疑う余地がない。しかしながら、非コードDNAの大部分がレトロトランスポゾン由来の反復配列であり、それらがいかに高等生物の複雑さを規定しているかについて未だ明らかにされていない。本研究結果であるSatb1がクロマチンの凝集状態をダイナミックに制御することで遺伝子発現をコントロールしている知見は、高等生物の複雑さを規定する遺伝子発現制御機構を提唱できるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：We established Satb1 deficient cell line using the CRISPR / Cas9 system. Analysis of chromatin disaggregation in the 15q11-q13 region of Satb1-deficient F12 cells revealed smaller disaggregation compared to normal cell lines. On the other hand, in F12 cells in which Satb1 was forcibly expressed, it was found that the chromatin disaggregation state spreads more than normal. From this, it became clear that Satb1 is greatly involved in the construction of chromatin disaggregation in the 15q11-q13 region. In addition, it was revealed that the expression of MAGEL2 / NDN in the 15q11-q13 region is reduced in the Satb1 deficient cell line.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：クロマチン 核マトリクス ノンコーディングRNA インプリンティング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一般に、長い DNA の鎖は組織的・時期特異的に遺伝子発現を制御するため、小さく折りたたまれてクロマチンとして存在し、さらにいくつものループを形成して秩序正しく核内に納まっている。このループ構造をつなぎ止める楔となるのが核マトリクス結合領域(MAR)であり、非コード DNA 領域に刻まれた高等生物の複雑さを規定する重要な鍵となる。本研究課題の海外共同研究者である Dr. Kohwi-Shigematsu は、20 年前から MAR 結合タンパク質の一つである SATB1 の機能解析を精力的に行っており、その研究過程で、SATB1 がヒトゲノムの約 20% を占める LINE1 配列に結合する事を見出している。(de Belle I *et al.*, 1998) LINE1 は、ヒトゲノムに約 50 万コピー存在するレトロトランスポゾンであり、そのほとんどは、変異やエピジェネティックな抑制により不活化しているが、最近の研究で「がらくた」と思われた LINE1 配列から転写された LINE1 RNA がシスに染色体ドメインをコーティングするように細胞核内で局在していることが明らかとなった。(Hall LL *et al.*, 2014)。そこで、我々は LINE1 RNA が細胞核内の足場(核マトリクス)として機能することでゲノムを三次元的に組織化し、染色体ドメインレベルの遺伝子発現制御に寄与しているのではないかと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

15q11-q13 のインプリンティング領域では、LINE1 配列が DNA スtrand 特異的高密度分布をとることが見出されており、その特徴的分布は近傍のクロマチン構造に何らかの影響を与えていることが予想された。(Bowers CW *et al.*, 2007) 【図 1 上】我々は、この LINE1 配列のストランド特異的高密度分布を示す領域の BAC をプローブに DNA-FISH 解析を行った結果、神経細胞でのみ父片アレル特異的にクロマチンが大きく広がった脱凝集構造をとることを見出した。【図 1 下】また、LINE1 配列のストランド特異的高密度分布を示す領域内の MAR (PWS-IC) を欠失させると、本来凝集している母方アレルにおいてもクロマチン脱凝集構造が出現するなど、LINE1 配列が MAR を介した染色体ドメインレベルのクロマチン構造に寄与している可能性が示唆された。そこで本研究では、LINE1 配列のストランド特異的高密度分布を呈する領域のクロマチン動態が MAR 結合タンパク質や核マトリクスによってどのようなメカニズムで制御されているのか明らかにする。

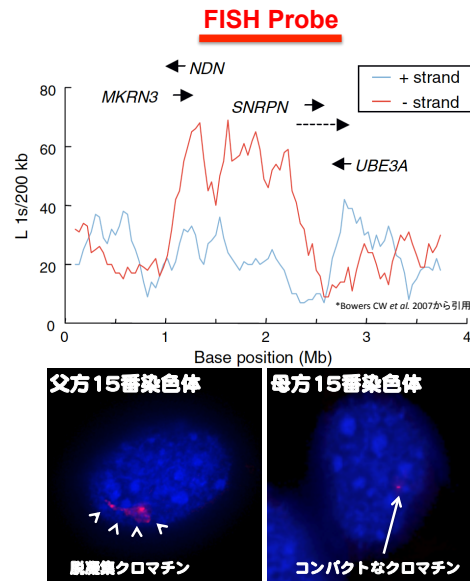


図1 LINE1配列のDNAストランド特異的高密度分布とクロマチン脱凝集

### 3. 研究の方法

我々は親由来の明らかなヒト 15 番染色体を 1 本保持したマウスニューロン様細胞株 F12 を樹立し、15q11-q13 領域のゲノムインプリンティング制御メカニズムの解明に取り組んできた。本研究で、我々は MAR 結合タンパク質として SATB1/2 に着目し、各々の欠損 F12 細胞株を CRISPR/Cas9 システムを用いて樹立することで母方の凝集したクロマチン形成における MAR 結合タンパク質の役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

我々は、親由来の明らかなヒト 15 番染色体を 1 本保持したマウスニューロン様細胞株 F12 を樹立し、15q11-q13 領域のゲノムインプリンティング制御メカニズムの解明に取り組んできた。興味深いことに、15q11-q13 領域に関しては LINE1 配列が DNA スtrand 特異的高密度分布をとることが見出されている。そこで、我々はこの LINE1 配列のストランド特異的高密度分布を示す領域の BAC をプローブに DNA-FISH 解析を行った結

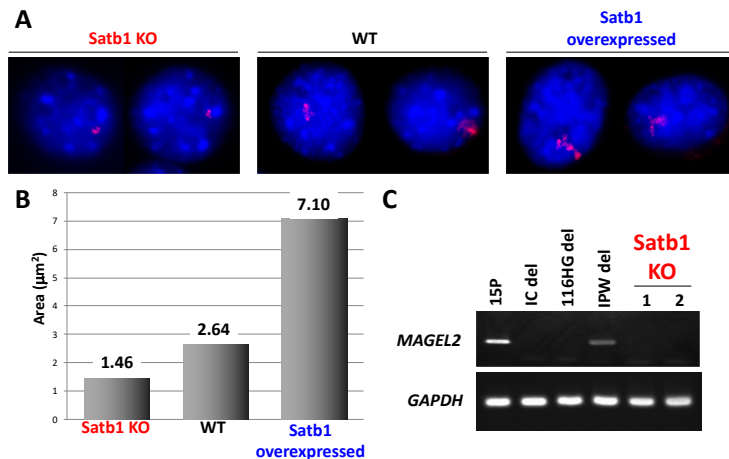


図2 Satb1は、父方15q11-q13領域にクロマチン脱凝集の形成に重要である。

果，神経細胞でのみ父方アレル特異的にクロマチンが大きく広がった脱凝集構造をとることを見出した。また，LINE1 配列のストランド特異的高密度分布を示す領域内の MAR (PWS-IC) を欠失させると，本来凝集している母方アレルにおいてもクロマチン脱凝集構造が出現するなど，LINE1 配列が MAR を介した染色体ドメインレベルのクロマチン構造形成に寄与している可能性が示唆された。そこで，本研究で我々は CRISPR/Cas9 システムを用いて MAR 結合タンパク質，Satb1 の欠損細胞株を樹立した。Satb1 欠損 F12 細胞にて，15q11-q13 領域のクロマチン脱凝集状態を解析した所，正常細胞株と比較し脱凝集が小さくなっていることが明らかとなった。一方，Satb1 を強制発現させた F12 細胞では，クロマチン脱凝集状態が正常に比べ大きく広がっていることを見出した。【図 2A, B】このことから，15q11-q13 領域のクロマチン脱凝集の構築には，MAR 結合タンパク質，Satb1 が大きく関わっていることが明らかとなった。また，興味深いことに，Satb1 の欠損細胞株において，15q11-q13 領域の MAGEL2/NDN の発現が低下していることが明らかとなった。【図 2C】現在我々は，クロマチン脱凝集の縮小が，染色体ドメインレベルの遺伝子発現制御に影響を与えている可能性を考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① 目黒牧子，堀家慎一「プラダー・ウィリー/アンジェルマン症候群責任遺伝子座におけるノンコーディング RNA」遺伝子医学，8 巻 1 号 (通巻 26 号) 93-97，2018 年 10 月 1 日発行，査読なし
- ② 堀家慎一，目黒牧子「自閉症罹患遺伝子座の動的クロマチンダイナミクス」細胞，49 巻 8 号，35-36，(2017) 2017 年 7 月 20 日発行，査読なし
- ③ Lopez SJ, Dunaway K, Islam MS, Mordaunt C, Vogel Ciernia A, Meguro-Horike M, Horike SI, Segal DJ, LaSalle JM. (2017) “UBE3A-mediated regulation of imprinted genes and epigenome-wide marks in human neurons.” *Epigenetics*, 12(11) 982-990. 査読有 DOI:10.1080/15592294.2017.1376151
- ④ Dunaway, K., Islam, S., Coulson, J., Lopez, R., Ciernia, A.V., Chu, R., Yasui, D., Pessah, I., Lott, P., Mordaunt, C., Meguro-Horike, M., Horike, S., Korf, I., LaSalle, J.M. (2016) “Cumulative impact of large chromosomal duplications and polychlorinated biphenyl exposure on DNA methylation, chromatin, and expression of autism candidate gene” *Cell Reports*, 17(11)3035-3048. 査読有 DOI: 10.1016/j.celrep.2016.11.058
- ⑤ 目黒牧子，堀家慎一「lncRNA によるエピジェネティック制御の作用機序」DOJIN BIOSCIENCE SRIES 25 ノンコーディング RNA，化学同人，233-244，2016 年 7 月 15 日発行，査読なし

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① 堀家慎一，赤木佐千代，岡田源作，Dag H. Yasui, Janine M. LaSalle, 目黒牧子「The spliced lncRNA SNORD116HG is essential for the high order chromatin dynamics of the MAGEL2 and NDN locus over long distance.」JAJ RNA 2018，北海道大学，札幌 2018 年 11 月 5～7 日
- ② 堀家慎一，赤木佐千代，岡田源作，Dag H. Yasui, Janine M. LaSalle, 目黒牧子「The spliced lncRNA SNORD116HG is essential for the high order chromatin dynamics of the MAGEL2 and NDN locus over long distance.」The American Society of Human Genetics annual meeting 2018, San Diego, CA, USA 2018 年 10 月 16～20 日
- ③ 堀家慎一，赤木佐千代，岡田源作，Dag H. Yasui, Janine M. LaSalle, 目黒牧子「The spliced lncRNA SNORD116HG is essential for the high order chromatin dynamics of the MAGEL2 and NDN locus over long distance.」日本遺伝学会第 90 回大会，奈良先端科学技術大学院大学，2018 年 9 月 19～21 日
- ④ 堀家慎一，赤木佐千代，岡田源作，Dag H. Yasui, Janine M. LaSalle, 目黒牧子「プラダー・ウィリー症候群の発症機序における SNORD116HG の役割」第 41 回日本神経科学大会，神戸コンベンションセンター，2018 年 7 月 26～29 日
- ⑤ 目黒牧子，赤木佐千代，岡田源作，Janine M. LaSalle, 堀家慎一「核内足場クロマチン構造を介した ncRNA, SNORD116HG の作動機序の解明」第 12 回日本エピジェネティクス研究会，かでの 2・7，北海道，2018 年 5 月 24～25 日
- ⑥ 目黒牧子，堀家慎一「The spliced lncRNA SNORD116HG is essential for the high order chromatin dynamics of the MAGEL2 and NDN locus over long distance.」HOKURIKU RNA CLUB，金沢，2017 年 12 月 18 日
- ⑦ Shin-ichi Horike, Sachiyo Akagi, Gensaku Okada, Dag H. Yasui, Janine M. LaSalle, Makiko Meguro-Horike “The spliced lncRNA SNORD116HG is essential for the high order chromatin dynamics of the MAGEL2 and NDN locus over long distance.” 12th Asian Epigenomics Meeting 2017, Tomakomai, 2017 年 9 月 12 日～9 月 13 日
- ⑧ 堀家慎一，Yasui DH, LaSalle JM, 目黒牧子「The SNORD116 Host-Gene transcript is essential for the high order chromatin dynamics of the NDN & MAGEL2 genes locus over long distance」RNA 2016, Kyoto, 2016 年 6 月 28 日～7 月 2 日

- ⑨ 目黒牧子, 堀家慎一「脱凝集クロマチンを介した long non-coding RNA, SNORD116HG による遺伝子発現制御メカニズムの解明」第10回日本エピジェネティクス研究会, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪, 2016年5月19~20日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：目黒 牧子

ローマ字氏名：(Meguro Makiko)

研究協力者氏名：Janine M. LaSalle

ローマ字氏名：(Janine M. LaSalle)

研究協力者氏名：Terumi Kohwi-Shigematsu

ローマ字氏名：(Terumi Kohwi-Shigematsu)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。