

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770005

研究課題名（和文） Arsインスレーター作用機構の解明

研究課題名（英文） Study of molecular mechanism of Ars insulator function

研究代表者

坂本 尚昭 (SAKAMOTO NAOAKI)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00332338

研究成果の概要： *Ars*インスレーターの作用機構を解明するために、*Ars*インスレーターにおけるDNA立体構造、クロマチン構造（ヌクレオソーム形成能）、インスレーター活性に必要なコア領域を解析したところ、それらには相関がみられた。したがって、*Ars*インスレーター中央部分における特殊なDNA立体構造がヌクレオソームの形成を阻害し、それによって生じる開かれたクロマチン構造が*Ars*インスレーターの活性に重要であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

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：インスレーター・クロマチン・DNA構造

## 1. 研究開始当初の背景

インスレーターは、隣接する染色体環境の影響を遮断し、その領域に挟まれた染色体DNAの転写調節の独立性を保障するDNA配列のことである。インスレーターは、エンハンサーとプロモーターの間に挿入されたときにエンハンサーの効果を遮断する活性（エンハンサー遮断効果）と、インスレーターで挟まれた導入遺伝子を挿入された染色体領域の環境から保護する活性（位置効果の抑制）の2つの活性により定義される。当研究室では、バフンウニのアリルスルファターゼ（*HpArs*）遺伝子の発現調節機構の研究の過

程で、この遺伝子の転写開始点から上流約2 kbの位置にインスレーター領域（*Ars*インスレーター）を同定した。また、*Ars*インスレーターは種を越えて機能することが明らかとなっており、遺伝子導入技術への応用が注目されているが、その作用機構については不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、*Ars*インスレーターの作用機構の解明を目的とし、*Ars*インスレーターのDNA立体構造やクロマチン形成能について解析を行った。



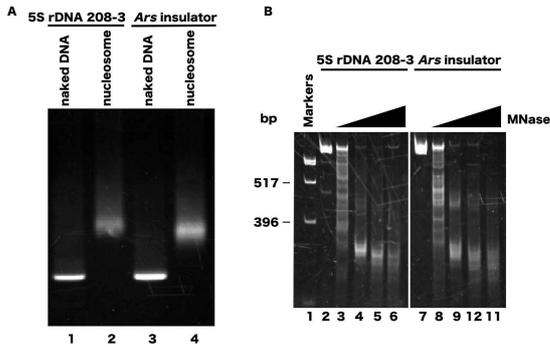


図2：クロマチン再構成形の確立

リコンビナントユニヒストンタンパク質を調製し、塩透析法により*Ars*インスレーターまたはLv-rDNA断片（ポジティブコントロール）上にヌクレオソームを再構成した。(A)バンドシフトによる再構成の確認。(B)マイクロコッカルヌクレアーゼ処理による再構成の確認。

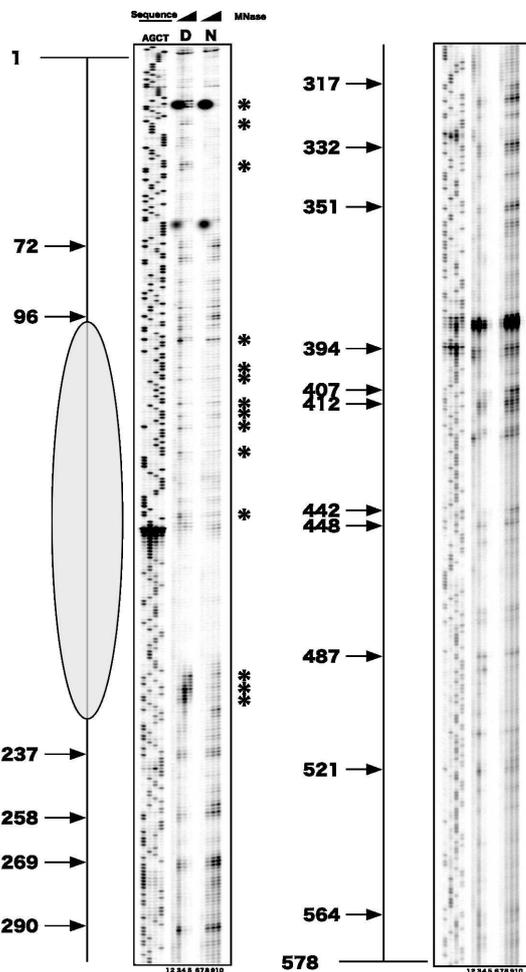


図3：ヌクレオソームポジショニングの解析

*Ars*インスレーター-DNA断片または再構成クロマチンをマイクロコッカルヌクレアーゼ処理し、その切断部位をプライマー伸長法により検出した。

*Ars*インスレーターの活性中心領域を検索するために、*Ars*インスレーターの欠失変異体を作製し、エンハンサーとプロモーターの間に挿入したレポーター遺伝子を構築した。これを用いて*Ars*インスレーター欠失変異体のインスレーター活性を測定したところ、*Ars*インスレーターの中央部付近にインスレーター活性に重要なコア領域が存在することが示唆された（図4）。

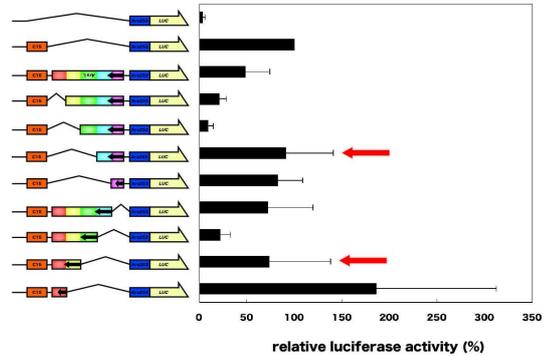


図4：*Ars*インスレーター活性コア領域の解析

*Ars*インスレーターの欠失変異体を作成し、ルシフェラーゼを用いたレポーター解析により、そのインスレーター活性を測定した。

以上の結果を総合的に解析すると、*Ars*インスレーターの DEPC 高感受性部位・DNA ポリメラーゼによる合成反応が停止しやすい部位・クロマチン構造によりヌクレアーゼ感受性を示す部位・*Ars*インスレーター活性に重要なコア領域には相関がみられた。したがって、*Ars*インスレーター中央部分の DNA 立体構造がヌクレオソームのポジショニングを排除しており、その結果として生じた開かれたクロマチン構造が、*Ars*インスレーターの活性に重要であることが示唆された。

## 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3件）

- (1) Ochiai, H., Sakamoto, N., Suzuki, K., Akasaka, K., and Yamamoto T.  
The *Ars* insulator facilitates I-SceI meganuclease-mediated transgenesis in the sea urchin embryo.  
Developmental Dynamics  
査読あり, Vol.237, 2008, p2475-2482
- (2) Ochiai, H., Sakamoto, N., Momiyama, A., Akasaka, K., and Yamamoto T.  
Analysis of *cis*-regulatory elements controlling spatio-temporal expression of *T-br*

*ain* gene in sea urchin, *Hemicentrotus p  
ulcherrimus*.

Mechanism of Development

査読あり, Vol. 125, 2008, p2-17

- (3) Yamamoto, T., Kawamoto, R., Fujii, T.,  
Sakamoto, N., and Shibata T.  
DNA variations within the sea urchin *Ot  
x* gene enhancer.  
FEBS Letters  
査読あり, Vol. 581, 2007, p5234-5240

[学会発表] (計5件)

- (1) 岡光 憂佳  
「バフンウニ初期発生におけるDicerホモログ  
の機能解析」  
日本動物学会第79回大会  
2008年9月6日  
福岡大学七隈キャンパス
- (2) 住吉 範子  
「バフンウニ $vasa$  (HpVasa) 遺伝子の発現と  
機能」  
日本動物学会第79回大会  
2008年9月6日  
福岡大学七隈キャンパス
- (3) 坂本尚昭  
「*Ars*インスレーター機能の分子メカニ  
ズムの解析」  
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本  
生化学会大会合同大会  
2007年12月15日 (ワークショップ)  
パシフィコ横浜
- (4) 坂本尚昭  
「*Ars*インスレーター機能の分子メカニ  
ズムの解析」  
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本  
生化学会大会合同大会  
2007年12月12日 (ポスター)  
パシフィコ横浜
- (5) 稲井優太  
「クロマチン再構成系を用いた*Ars*イン  
スレーターの解析」  
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本  
生化学会大会合同大会  
2007年12月12日 (ポスター)  
パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 尚昭 (SAKAMOTO NAOAKI)  
広島大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 00332338

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者