

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310133

研究課題名(和文) 遠隔ゲノム部位間の相互作用におけるII型DNAトポイソメラーゼの役割

研究課題名(英文) Roles of type II DNA topoisomerase in the interaction of distant genomic sites

研究代表者

筒井 研 (TSUTSUI, KEN)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・名誉教授

研究者番号：70108158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,700,000円、(間接経費) 4,710,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経細胞の終末分化過程でトポイソメラーゼII (トポII) とSP120が標的とするゲノム部位を、新世代シーケンサーで網羅的に同定することによって、この時期に特徴的な遺伝子発現の調節機構を探り、以下の結果を得た。トポII は一群の遺伝子の転写を、促進と抑制の両方向に調節している。トポII が制御する遺伝子は特徴あるゲノムポジションを占めている。トポII の作用点の一つ(Ts3)は終末分化における遺伝子発現で重要な役割を持つことが示唆された。Ts3と重なるSP120結合サイトは核内の共局在部位としても同定された。Ts3はトポII を介する遠隔相互作用部位そのものである。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the characteristic gene regulation mechanism in terminally differentiating neuronal cells by identifying the genomic region targeted by DNA topoisomerase IIbeta (topo IIb) and its partner protein SP120/hnRNP U through massive sequencing on new generation sequencers. Results are summarized as follows: 1) Topo IIb regulates the transcription of groups of genes in both directions (up- and down-regulation). 2) Genes controlled by topo IIb are positioned non-randomly on the genome. 3) Analysis of the topo IIb action sites (toposites) suggested that the toposite enriched in intergenic regions (termed Ts3) has an important role in the gene expression of terminal differentiation. 4) The SP120-binding sites overlapping with Ts3 toposites appear to be the target of topo IIb-SP120 complex, which was also demonstrated by cytological methods as nuclear colocalization spots. 5) Ts3 toposites represent the topo IIb-mediated distant interaction sites involved.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：遺伝子 ゲノム 酵素 発現制御 発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞核に収納されているゲノム DNA には一定の三次元的秩序が存在する。一次配列上は遠く離れたゲノム部位の間に特異的な相互作用が起こり、これが遺伝子発現の調節にも関わっている。我々は DNA トポイソメラーゼ II 分子 (トポ II) が遠隔ゲノム部位に対して同時に作用し、神経細胞の終末分化に必要な一群の遺伝子を転写に導くとの間接的証拠を得ていた。

(2) DNA/RNA 結合タンパク質 hnRNP U (SP120) が RNA 依存的にトポ II と複合体を形成し、その活性を調節すると共にトポ II の安定化にも寄与していることを見いだした。SP120 はトポ II が核内で働くためには必須であり、トポ II の作用点 (トポサイト) の決定にも直接的に関わっている可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

(1) 新しく開発した方法により、相互作用を行っているために近接関係にある遠隔ゲノム部位にトポ II が作用しているとの直接的証拠を得る。

(2) トポ II の作用点と SP120 の結合部位を個別に網羅的にマッピングし、その重なりを検出することによりトポ II と SP120 が複合体として作用するゲノム部位を特定する。

(3) これらの結果を総合して、遺伝子の発現制御におけるトポ II の役割を明らかにし、精神疾患や癌などの診断・治療に応用可能な基礎的知見を得る。

## 3. 研究の方法

(1) 主としてラット小脳顆粒神経細胞の初代培養系における終末分化の解析を行った。新世代シーケンサーを用いた大規模シーケンシング

を基本的方法論として以下に列挙する部位のゲノムワイドなマッピングを行い、ゲノムブラウザー上に同軸表示した。すなわち、トポ II に依存して発現誘導を受ける遺伝子群 (mRNA-seq)、トポ II 作用点 (eTIP-seq)、トポ II を介する遠隔相互作用 (eTIP-PES)、SP120 の結合部位 (ChIP-seq) である。eTIP-PES は本研究において新たに開発した方法で、新世代シーケンサーのペアエンド解析機能を利用している。

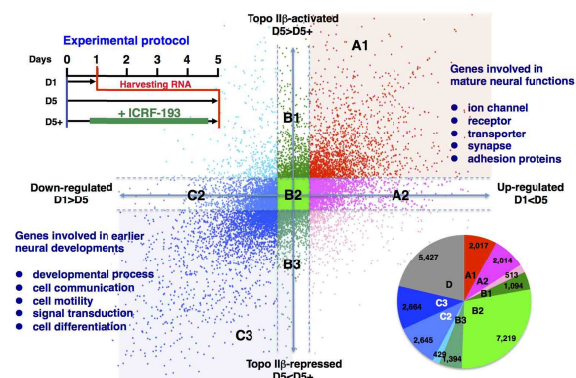
(2) 細胞化学的方法を用いてトポ II の核内動態を解析した。また、上記マッピングから判明した遠隔相互作用部位に対応する Bac クローンをプローブとした二色 FISH 法によって、これらのサイトの核内局在と空間距離を調べた。さらに、トポ II と SP120 が共局在する核内部位を PLA と呼ばれる方法で同定し、PLA-FISH 法でトポ II と SP120 の共局在部位に対応するゲノム部位を同定した。

## 4. 研究成果

(1) トポ II の核内動態: 培養株細胞を用いた解析から、分裂間期の核内でトポ II は核小体領域に濃縮されているが、培地の温度を下げるかトポ II 阻害剤で処理すると、急速に核質のクロマチン領域に移動した。逆に細胞内 ATP 濃度を低下させると、もっぱら核小体に局在するようになり、活性状態に応じて核質と核小体の間を可逆的にシャトルすることが明らかになった。また、終末分化の過程では、トポ II 活性に依存して凝縮と脱凝縮を含むクロマチン高次構造の再編成が起こった。

(2) 発現グループ: 神経細胞が終末分化して成熟する過程で多くの遺伝子の転写が誘導される。ニューロンの初代培養系とトポ II 阻害剤

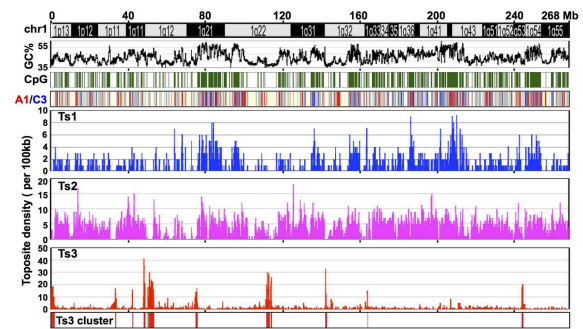
(ICRF-193)を用いてトランスクリプトーム解析を行い(mRNA-seq) 分化過程で転写が促進/抑制される遺伝子群、トポII に依存して促進/抑制される遺伝子群に分類した。その結果、多数の発現レベルが変わらないハウスキープ遺伝子(B2)に加え、トポII 活性に依存して転写が促進される遺伝子群(A1)と、逆に抑制される遺伝子群(C3)の存在が明らかになった(下図参照)。



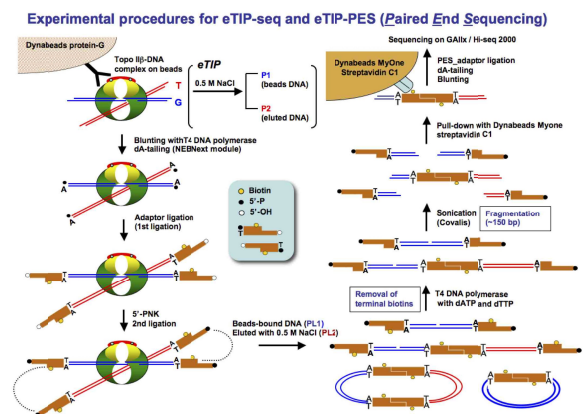
ジーンオントロジー(GO解析)を用いて発現グループごとに機能を調べると、A1 遺伝子は成熟神経細胞で、C3 遺伝子は初期の神経分化過程で働く遺伝子が有意に多く、トポII が終末分化において一群の遺伝子の発現を合理的に両方向に制御していることが分かった。これらの遺伝子が占めるゲノムポジションについても、A1 と C3 はそれぞれで近くに集まるが、互いに相手を排除する傾向があるという特徴が認められた。さらに、A1 遺伝子は他のグループに比べると有意に長い遺伝子が多く、長い遺伝子間領域に隣接することが多いことも明らかになった。

(3)トポII 作用部位(トポサイト): 細胞をトポII 阻害剤(エトポシド)で処理してから細胞抽出液をトポII 抗体で免疫沈降(IP)し、IP画分に結合したDNAをさらにP1とP2に分画して新世代シーケンサーで解析した

(eTIP-seq) シグナルのピークを決めた後、P1/P2 ピークの重なりからトポサイトを3つのクラスに分類した。Ts1 は転写開始部位近傍に、Ts2 は遺伝子領域に、Ts3 は遺伝子間領域に多く認められた(以下にラット1番染色体上のトポサイト分布を示す)。

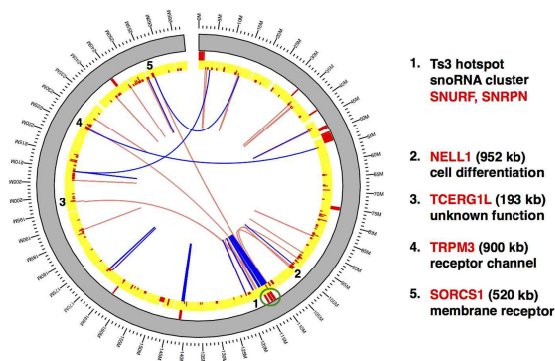


(4)遠隔相互作用部位:トポII 抗体によるIP画分に濃縮されるトポII 反応中間体分子に結合した2本のDNA鎖(遠隔相互作用部位に由来する断片を含む)にビオチン化アダプターを結合させ、さらにアダプター間のライゲーションによってキメラ断片を得る。アビジンビーズによって精製したキメラを新世代シーケンサーでペアエンド配列を決定して両端のゲノムポジションを同定する。eTIP-PESと呼ばれるこの方法は本研究で新たに開発された(以下のスキームを参照)。



eTIP-seqにより同定したトポサイトを基準点とし、eTIP-PES法で得たキメラの少なくとも一方

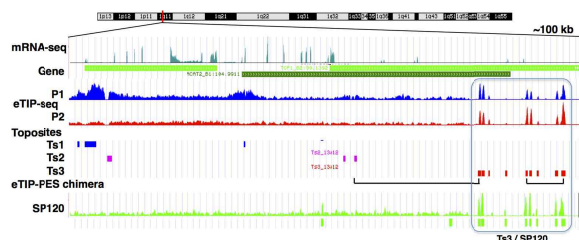
の端がトポサイトと一致するものを選択することによってノイズの低減を図った。染色体内で高頻度に相互作用をもつホットスポットがいくつか見付き、その多くは Ts3-Ts3 サイトであった（高度な統計的有意性あり）。また、1番染色体の snoRNA 遺伝子クラスター (Snord) は Ts3 サイトに富み、領域内ばかりでなく数 Mb 以上も離れた A1 遺伝子領域との相互作用も認められた。この結果により、Snord をハブとする遠隔相互作用によって、トポ II を介する A1 遺伝子の転写誘導が起こる可能性が示唆された。下図の円形マップ上で、Snord 領域と相互作用（赤線）が認められた A1 遺伝子名（赤字）を示す。



(5) トポ II と SP120 が同時に作用する核内部位の検出：我々は SP120 がトポ II と複合体を形成することを明らかにしているが、複合体の核内での挙動に関しては不明な点が多い。まずこれらのタンパク質が共局在する核内部位を PLA と呼ばれる方法で同定した。この共局在スポットはトポ II 阻害剤で有意に減少することから、トポ II の活性に依存した複合体形成を検出していると考えられた。さらに、Snord 領域に FISH プローブを設定し、PLA-FISH 法によってこの領域がトポ II -SP120 共局在スポットの 1 つであることを証明した。

(6) トポ II と SP120 が同時に作用するゲノム部位のマッピング：2つの細胞集団を用いて SP120 の ChIP-seq を行った（架橋反応の前にエトポシド処理を行うグループと、行わないグループ）。新世代シーケンサーで得られたそれぞれのリードを全ゲノム領域にマッピングし、エトポシド処理で有意に低下するピークを抽出した結果、約 2000 箇所が同定された。これらの部位ではトポ II と SP120 が共同して働いていると考えられる。

(7) 考察と展望：II 型トポイソメラーゼの試験管内反応メカニズムについては既によく理解されている。しかし、この酵素が基質とする 2本の DNA 鎖がゲノム上で遠く離れた部位に由来する可能性については直接的証拠が無かった。本研究で新たに開発した方法により、このような部位（Ts3 トポサイト）のゲノムポジションが明らかになった。Ts3 サイトが集積する部位にはノンコーディング RNA (ncRNA) の遺伝子やインプリントされた遺伝子が存在することが多いことも見出している（Snord 領域もその一つ）。このような領域では、Ts3 がトポ II と複合体を作る SP120 の作用点と重なっている。近年、SP120 と ncRNA を介して遠隔ゲノム部位が相互作用して遺伝子発現が制御される場合が報告されていることは、我々の研究に新たな展望を与えるものである。また、本研究で行われたマッピングの結果をすべて同軸表示したゲノムブラウザーは、今後の研究でも有用である。以下にその一部を示す。



## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計6件)

1. Kagawa N., Hori T., Hoki Y., Hosoya O., Tsutsui, K., Saga Y., Sado T. and Fukagawa T. : The CENP-O complex requirement varies among different cell types. *Chromosome Res.* (2014) Jan 31 (PMID:24481920) (DOI 10.1007/s10577-014-9404-1) 査読あり
2. Alamsi, Matsuo T., Hosoya O., Tsutsui K.M., Uchida T. : Behavior tests and immunohistochemical retinal response analyses in RCS rats with subretinal implantation of Okayama-University-type retinal prosthesis. *Journal of Artificial Organs.* (2013) 16, 343-351 (DOI 10.1007/s10047-013-0697-1). 査読あり
3. Wang D.H., Otsuki Y., Fujita H., Miyazaki M., Yie Q., Tsutsui K., Sano K., Masuoka N., Ogino K.: Resveratrol Inhibited Hydroquinone-induced Cytotoxicity in Mouse Primary Hepatocytes. *Int J Environ Res & Public Health* (2012) 9, 3354-3364 (DOI 10.3390/ijerph9093354) 査読あり
4. Tsutsui, K.M., Sano, K., Hosoya, O., Miyamoto, T., Tsutsui, K.: Nuclear protein LEDGF/p75 recognizes supercoiled DNA by a novel DNA-binding domain. *Nucleic Acids Res.* (2011) 39 (12), 5067-5081 査読あり

### [学会発表] (計30件)

1. 筒井 研: II型 DNA トポイソメラーゼの核内動態と遺伝子制御 (シンポジウム:細胞核内構造体の構築原理と高次生命機能) 第86回 日本生化学会大会 2013年09月11日~13日 パシフィコ横浜(横浜市)
2. 古田良平: DNA トポイソメラーゼ II による遺伝子制御と核構造 第36回 日本分子生物学会 2013年12月03日~06日 神戸ポートアイランド(神戸市)
3. Tsutsui, K.M.: Induced Expression of Neuroal Genes in Terminal Differentiation: Essential Roles of DNA Topoisomerase IIbeta. BIT's 3<sup>rd</sup> Annual World Congress of NeuroTalk-2012. (招待講演) 2012年5月20日 Beijing International Convention Center, Beijing, China
4. 筒井 研: DNA 高次構造と遺伝子発現制御 バイオメディカル研究部門セミナー 2012年12月26日 産業技術総合研究所(筑波)
5. 古田良平: DNA トポイソメラーゼ II による遠隔ゲノム部位間の相互作用と遺伝子発現制御 第35回 日本分子生物学会年会

2012年12月11日 マリンメッセ福岡(福岡県)

6. Tsutsui, K.M.: Transcriptional Induction of Neuronal Genes by Targeted Action of DNA Topoisomerase II $\beta$  (招待講演). *Advances in DNA Topoisomerase and Chromosome Dynamics.* 2011年10月12日~16日 Academia Sinica, Taipei, Taiwan
7. 古田良平: DNA トポイソメラーゼ II による遠隔ゲノム部位間の相互作用 第34回 日本分子生物学会年会 2011年12月13日~16日 パシフィコ横浜(横浜市)

### [産業財産権]

取得状況 (計1件)

名称: 負の超らせん DNA 結合ドメイン  
発明者: 筒井 研、他3名  
権利者: 国立大学法人 岡山大学  
種類: 特許  
番号: 特許第5371306号  
取得年月日: 25年9月27日  
国内外の別: 国内

### [その他]

ホームページ

<http://nbgp.med.okayama-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

筒井 研 (TSUTSUI, Ken)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・名誉教授、特命教授

研究者番号: 70108158

### (2)研究分担者

宮地まり (MIYAJI, Mary)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 50349255

細谷 修 (HOSOYA, Osamu)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 90304310

佐野訓明 (SANO, Kuniaki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 00294405

筒井公子 (TSUTSUI, Kimiko)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 70144748

### (3)連携研究者

桑野良三 (KUWANO, Ryoza)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 20111734