

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430188

研究課題名(和文) 転写量を定めるプロモーター領域のクロマチン構造の解明

研究課題名(英文) Chromatin structure as a determinant of transcriptional activity

研究代表者

石原 悟 (Ishihara, Satoru)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：00300723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：個々の遺伝子は厳密に決められた量のRNAを転写する。転写の量的調節に關与するクロマチン構造を明らかにする目的で、転写量の異なる3つのプロモーターから発現するCYP19遺伝子をモデルにSEVENS法でクロマチン構造を解析した。その結果、転写量の多いプロモーター領域ほどヌクレオソームの局所的密度が小さいopenクロマチンであった。さらに、SEVENS法で分画したクロマチンから得られたDNAを次世代シーケンサーで解読し、転写量とヌクレオソーム密度の関係をゲノムワイドに検証した。

研究成果の概要(英文)：A controlled amount of RNA is transcribed from an individual gene. To elucidate contribution of chromatin structure to this quantitative control, the CYP19 gene, which harbors three promoters with a different activity, was chosen as a model gene. The SEVENS assay revealed that local density of nucleosomes in the promoter regions was inversely correlated to transcriptional activity of each promoter of the CYP19 gene. Such correlation was confirmed by a whole genome analysis in which DNA recovered from the SEVENS fractions was sequenced using next generation sequencing technology.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチン ヌクレオソーム SEVENS法 転写 プロモーター CYP19 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の転写調節機構を理解することは、生体内で起こる現象全ての本質に迫る研究課題と考えられる。生体内の DNA はヌクレオソームなどのタンパク質成分と結合してクロマチンを構成しており、近年の転写研究では、遺伝子プロモーター領域でのクロマチンの構造変換による転写調節機構が注目を集めている。

クロマチン構造を解析するには、従来 DNase I などのヌクレアーゼが用いられ、この酵素により DNA が切断されると、クロマチン構造は open であると判別された。また、比較的最近開発された FAIRE 法では、ホルマリンで架橋したクロマチンをフェノールで抽出した際に水層に回収される DNA を、タンパク質成分の結合が乏しい領域、つまり open 領域として判別した。どちらにしろ、これらの方法は open クロマチンの観察に特化したものであり、そうでない領域は closed と間接的に解釈されてきた。

2010 年に、我々はシヨ糖密度勾配遠心を用いた新たなクロマチン構造の解析法を開発した (Ishihara et al. Nucleic Acids Res. 38, e124)。「SEVENS 法」と名付けたこの方法では、ヌクレオソームの局所的密度 (言い換えると混み合い具合) の違いでクロマチンを分画することができ、open クロマチンと closed クロマチンがそれぞれ回収される。したがって、クロマチンの open-closed 間の構造変換を理解する上で、SEVENS 法は有効な手段と考えられた。

2. 研究の目的

- (1) 多様な転写量を示すモデル遺伝子を SEVENS 法で解析して、転写量の違いを生ずるクロマチンの構造的基盤を理解する。
- (2) SEVENS 法で分画されるクロマチンに含まれる DNA を次世代シーケンサーでゲノムワイドに解析をして、前項(1)のモデル遺伝子で観察された転写量とクロマチン構造の相互関係の普遍性を検証する。
- (3) SEVENS 法でのクロマチン分画の信頼性を、FISH 法などの細胞学的アプローチで確認する。

3. 研究の方法

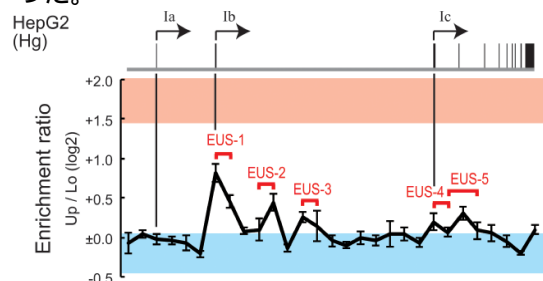
- (1) エストロゲン合成酵素アロマトラーゼをコードする CYP19 遺伝子は、複数のプロモーター (上流から Ia、Ib、Ic と呼ばれる) から転写されることが知られる。その転写量はプロモーター毎に異なっており、転写量を決めるクロマチン構造

を解析する上で適当なモデルになると考えられた。そこで、CYP19 遺伝子が発現するヒト肝細胞由来 HepG2 細胞とヒト卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞を用いて、各プロモーター領域のヌクレオソームの局所的密度を SEVENS 法で解析した。なお、解析データは、open クロマチンが集まる上部フラクションと closed クロマチンが集まる下部フラクションの比 (Up/Lo) で表し、特に上部フラクションに集まる領域を EUS (enrichment in upper fractions of the SEVENS assay) と名付けた。また、ヒストン H3 pan 抗体での ChIP 法をあわせて行い、ヌクレオソームの結合量も解析した。

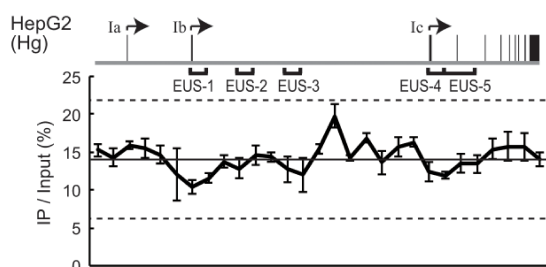
- (2) HepG2 細胞のクロマチンを、SEVENS 法で上部フラクションから下部フラクションにかけて 6 つに分画した。そして、全ゲノムにおけるヌクレオソームの局所的密度を明らかにするため、各フラクションから精製された DNA を次世代シーケンサーで解析した (SEVENS-Seq 法)。また、HepG2 細胞から mRNA を抽出して cDNA に逆転写後、次世代シーケンサーで解読した (RNA-Seq 法)。そして、全遺伝子プロモーター領域のクロマチン構造と転写量の関係、バイオインフォマティクス的手法を用いて解析した。
- (3) SEVENS 法で分画した open クロマチンと closed クロマチンから抽出した DNA を、LM-PCR 法で増幅して FISH 法に用いるプローブを作製した。そして、HepG2 細胞に対して FISH 法を実施し、それぞれのクロマチンの核内分布を観察した。ここで行った LM-PCR 法には、GC 含量による増幅バイアスが生じにくいアダプターを新たにデザインして用いた。

4. 研究成果

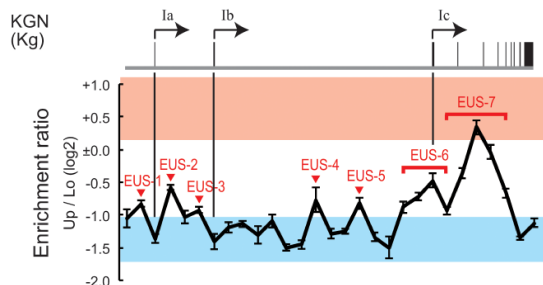
HepG2 細胞での CYP19 遺伝子は、Ib と Ic プロモーターから転写され、Ia プロモーターからは転写されない。そして、RT-qPCR 法の解析では、Ib 転写産物が Ic 転写産物より 10 倍多いことが分かった。SEVENS 法でヌクレオソームの局所的密度を解析すると、次図のように Ib と Ic プロモーター領域が EUS として観察された (図中の EUS-1 と EUS-4)。一方、Ia プロモーター領域には EUS は観察されなかった。



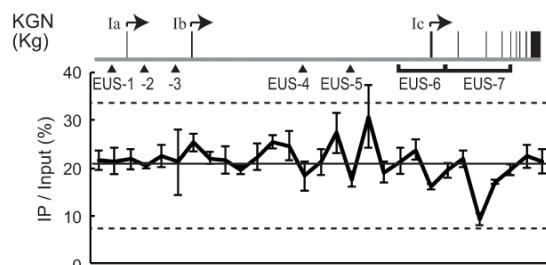
重要なこととして、EUS-1 が EUS-4 に比べて上部フラクションにより濃縮しているため、転写量の大きい lb プロモーターは、lc プロモーターに比べてヌクレオソーム密度が小さいと解釈された。一方、次図に示したように、ヌクレオソームの結合量は、lb と lc プロモーター領域で減少していた。その減少割合は前者の方が大きく、EUS のピークと逆相関していた。つまり、ヌクレオソーム密度の低下は結合しているヌクレオソーム量が減少したためと考えられた。



KGN 細胞では lc プロモーターからのみ転写が起こることが知られる。この細胞を SEVENS 法で解析すると、次図のように lc プロモーター領域のみに EUS が観察され (図中の EUS-6)、Ia と lb プロモーター領域はむしろ下部フラクションに濃縮するヌクレオソームの高密度状態であることが分かった。



そして、ChIP 法の解析では、次図のように lc プロモーター領域でのヌクレオソーム結合量が減少していた。したがって、HepG2 細胞と同様に、KGN 細胞の lc プロモーターでの EUS は、ヌクレオソームがその領域から除かれたことにより生じたと解釈された。



以上の CYP19 遺伝子に関する研究成果は、2015 年に米国の科学専門誌に掲載された (Kotomura et al., PLoS One 10, e0128282)。なお、これらの解析では、プロモーター以外の領域で多くの EUS を観察した。エンハンサーなどの転写調節に関与する領域と考えら

れるため、現在、その詳細について解析を継続している。興味深いことに、一部の EUS では、ヌクレオソーム結合量が減少する領域と一致しなかった (例えば KGN 細胞の EUS-2)。このような領域でのヌクレオソームの密度低下がどのような機構で生ずるのか、さらなる解析を行っている。

上述した CYP19 遺伝子で明らかにされたクロマチン構造と転写量の関係が、全遺伝子のプロモーター領域に普遍的に見られることを検証するため、SEVENS-Seq 法と RNA-Seq 法による HepG2 細胞の解析結果を比較した。その結果、RNA の存在が確認されたほとんど全ての遺伝子のプロモーター領域が、ヌクレオソームの局所的密度が小さい EUS として観察された。ただし、遺伝子によってプロモーター-EUS の範囲は様でなく、転写開始点との位置関係も異なっていた。現在、この多様な EUS のパターンと転写量との関係を明らかにするためにバイオインフォマティクス解析を行っており、その解析を待って論文として発表する予定である。

近年、核内ドメインの空間的制御が、クロマチンの構造変換に関与することが指摘されている。そこで、SEVENS 法で分画された open クロマチンと closed クロマチンより抽出した DNA をプローブに、FISH 法により両クロマチンの核内分布を明らかにした。このデータも併せて論文に加えることを計画している。

なお、FISH 法のプローブにはマイクログラムオーダーの多量な DNA が必要とされるが、SEVENS 法で回収されるクロマチンからの DNA 量では十分でなかった。そこで、DNA 断片の両端にアダプター (PCR プライマー配列をコードするオリゴヌクレオチド) を結合させて増幅させる LM-PCR 法で、十分量の DNA を得ることを計画した。従来の Y 字型アダプターを利用した方法では、基質 DNA の GC 含量によって増幅効率が大きく異なることが知られる。そこで、プライマー配列を背中合わせに並べたアダプター (BB アダプターと名付けた) を新規にデザインして、LM-PCR 法に応用した。その結果、GC 含量による影響が大きく軽減されて、FISH 法のプローブ作製に有効であることが分かった。この成果は、2017 年に方法論に特化した専門誌に掲載された (Ishihara et al., Anal. Biochem. 531, 37-44)。

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2件)

Ishihara, S., Kotomura N., Yamamoto, N., Ochiai, H. (2017) Ligation-mediated PCR with a back-to-back adapter reduces amplification bias resulting from variations in GC

content. Anal. Biochem. 531, 37-44.
DOI: 10.1016/j.ab.2017.05.011. 査読あり

Kotomura, N., Harada, N., Ishihara, S.
(2015) The proportion of chromatin graded between closed and open states determines the level of transcripts derived from distinct promoters in the CYP19 gene. PLoS One 10, e0128282. DOI: 10.1371/journal.pone.0128282. 査読あり

研究者番号：10404344

〔学会発表〕(計3件)

石原 悟, 琴村直恵, 山本直樹, 落合博.
An LM-PCR method capable of evenly amplifying DNA fragments with various GC content. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月30日~12月2日. 横浜・パシフィコ横浜.

石原 悟. SEVENS assay: a chromatin fractionation based on the local density of nucleosomes. 第53回日本生物物理学会年会. 2015年9月13日~15日. 金沢・金沢大学角間キャンパス自然科学本館.

石原 悟. SEVENS法: closed クロマチンと open クロマチンを生化学的に分離分画する新たな方法. 第7回定量生物学の会年会. 2015年1月11日~12日. 福岡・九州大学筑紫キャンパス筑紫ホールC-cube.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 悟 (ISHIHARA, SATORU)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：00300723

(2) 研究分担者

石原直恵(琴村直恵) (KOTOMURA, NAOE)
藤田保健衛生大学・医学部・研究員
研究者番号：50571791

(3) 研究分担者

原田信広 (HARADA, NOBUHIRO)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：00189705

(4) 連携研究者

二階堂愛 (NIKAIDO, ITOSHI)
独立行政法人理化学研究所・情報基盤センター・ユニットリーダー
研究者番号：00383290

(5) 連携研究者

笹川洋平 (SASAGAWA, YOHEI)
独立行政法人理化学研究所・情報基盤センター・上級センター研究員