

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660269

研究課題名(和文) 昆虫細胞における遺伝情報の収納と発現

研究課題名(英文) Expression and storage of genetic information in insect cells

研究代表者

日下部 宜宏 (Kusakabe, Takahiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30253595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムの高次構造は厳密に制御されており、その核内収納は転写制御と密接に関係している。本研究では、昆虫細胞におけるDNAメチル化機構とその制御について、カイコDNAメチル基転移酵素群の諸性質を明らかにし、DNAメチル化により制御を受ける遺伝子を同定した。また、染色体のループ形成に関与し、染色体を別々のドメインに分割することで、ループ外からのエンハンサー作用や、ヘテロクロマチンの無秩序な広がりを抑えるカイコインシュレーター遺伝子群を同定し、その構造と機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：High-ordered chromatin structure plays important roles in expression and storage of genetic information. In this study, we analyzed the molecular mechanisms of DNA methylation and its regulation in insect cells. DNA methylation-related genes were cloned from silkworm cells and their biochemical activities are characterized in detail. All together silkworm genes whose expression profiles were affected by DNA methylation were identified. Also the genes for insulator proteins blocking the effect of distant enhancers and spread of heterochromatin formation beyond chromatin loops were identified from silkworm cells and their structures and molecular functions were analyzed.

研究分野：昆虫分子遺伝学

キーワード：クロマチン構造 インシュレーター DNAメチル化 昆虫

1. 研究開始当初の背景

クロマチン構造のダイナミクスを理解には、その構造基盤の理解が不可欠である。クロマチン構造には階層性があり、一般的な遺伝子コード領域においても、DNAの化学修飾、ヒストンの翻訳後修飾、高次クロマチン構造、ループドメインの形成、染色体構造変換の順により複雑な制御機構が存在する。局在型動原体染色体においては、これらの各階層の制御とその機能についての一定の関連づけがなされているが、チョウ目分散型動原体染色体については、報告例が少ない。

本研究では、DNAの化学修飾の変化がカイコゲノム遺伝子の転写に及ぼす影響を特に転写のオン-オフとスプライシング制御に着目して網羅的に解析し、チョウ目分散型動原体染色体において、DNAの化学修飾は生理的な意義を持つのか否か、また、意義があるのであれば、それは何であるのかを転写という視点から明らかにする。ループドメインの形成については、クロマチンの核膜への結合を阻害することにより、クロマチンの境界を消去し、本来であれば境界で遮断されていたエピジェネティックな情報が、境界点を越えて近隣のループドメインにもたらされた場合の転写に及ぼす影響を解析し、チョウ目分散型動原体染色体における核マトリクスによるクロマチン動態制御に関する基盤情報を取得する。

動原体形成と高次クロマチンの形成は密接に関連しており、その本質的メカニズムの理解は、基礎生物学の最重要課題の一つである。チョウ目昆虫の分散型動原体染色体はその構造特性に起因する特異性があり、これを局在型動原体染色体で既に得られている研究成果と比較解析することにより、本来、遺伝子の格納容器である染色体におけるクロマチンダイナミクスの基本原理を理解する上での突破口を提供できると確信している。

2. 研究の目的

染色体構造の物理的な基盤を構成するクロマチンは、細胞周期を通じて、厳密な動態制御を受けている。この動態制御は、クロマチン上で生じるあらゆるDNA代謝に関与しているが、その制御基盤の詳細については未開明の部分が多い。特に、チョウ目昆虫に代表される分散型動原体という特殊な構造を有する染色体におけるクロマチン制御は、ほとんど手つかずの領域である。本研究では、カイコを材料に、分散型動原体におけるクロマチンの動態変化が遺伝子発現に与える影響を、細胞生物学、生化学的解析および、次世代シーケンサを用いた解析により明らかにし、遺伝子組換え昆虫における遺伝子発現制御の技術基盤を確立するための基盤情報を獲得するとともに、その結果を一般的な局在型動原体染色体と比較することにより、クロマチン動態制御の持つ生物学的なエッセンスの抽出を試みる。

3. 研究の方法

DNAの化学修飾については、カイコ維持メチル化酵素のホモログである DNMT1と2を、ループドメイン形成については、核マトリクス/インシュレーター構成タンパク質である CP190とCTCF を単離し、RNAi を利用した各遺伝子の機能阻害を行った。解析は、組換え酵素の諸性質の生化学的解析、タンパク質間相互作用や局在動態解析、および次世代シーケンサを用いた RNA-Seq 解析により行い、分散型動原体染色体におけるクロマチン動態の階層性とその制御の特性の一部を明らかにした。DNMT1と2については既にクローニングを完了しており、RNAi 誘導条件の設定と細胞に与える影響を解析した。dsRNA添加後のDNMT1と2の消長をRNAi誘導のタイムコースを同定した。同時に、各タイムポイントでの細胞周期解析と生存率の測定を行い、細胞に与える影響を解析した。これらの結果を基に、RNA-Seq解析に用いるサンプルの調整

を行った。前述のように、昆虫におけるDNAメチル化に生物学的意義については、スプライシング制御である可能性が示唆されているため、RNA-Seq解析では、スプライシングバリエーションの網羅的解析を行う必要がある。今回使用予定のカイコ BmN4 細胞においては、デフォルト状態でのスプライシング多型についての情報が少ないため、初年度は、BmN4を含む数種のカイコ由来の培養細胞についてRNA-Seq解析を行い、スプライシングバリエーションのカタログ化を終了した。

また、前述のように、カイコゲノムには新生メチル化酵素のホモログが存在しない。維持メチル化酵素の非存在下では、両鎖にあったメチル化修飾が、DNA複製によりヘミメチル化となり、次の複製では一個のヘミメチル化細胞と非メチル化細胞が生じる。長期間の維持メチル化酵素阻害によりほとんどの細胞が非メチル化となるはずがある。そこで、維持メチル化酵素を阻害した後、RNAi誘導を中絶することにより失われたDNAメチル化が回復するか否かを解析した。

ループドメイン形成:

RNAi誘導の標的遺伝子として核マトリクス/インシュレーター構成タンパク質を利用した。間期の染色体は核膜に包まれた状態で浮遊しているのではなく、約100 Mbpくらいの単位で核膜に結合し、ループドメインを形成している。同一ループ内の遺伝子群は基本的には同じ制御を受けている。すなわち、ヘテロクロマチンの拡散や、エンハンサーの効果などは近接するループドメインに伝達されることはなく核マトリクス結合領域でブロックされる。そのため、核マトリクス結合領域は機能的には、インシュレーターとして認識されることが多い。核マトリクス/インシュレーター構成タンパク質についても、DNAメチル化酵素と同様に、遺伝子の同定、機能阻害実験、細胞内動態解析を行い、合わせて、機能阻害細胞のRNA-Seq解析を行った。

4. 研究成果

カイコ DNMT1 と 2 については、バキュロウイルス発現系を用いた組換えタンパク質を発現・精製した。その結果、カイコ DNMT1 が、ヘミメチル化 DNA に対する強いメチル基転移活性を持つが、非メチル化 DNA に対しては活性を示さないことを明らかにした。また、カイコ DNMT1 は、メチル基供与体の有無に関わらず、DNA と多様な複合体を形成すること、メチル基供与体依存的な複合体形成は、亜鉛やマンガンなどの重金属イオンにより促進されることを見出した。一方、カイコ DNMT2 については活性を確認できなかった。また、DNMT 遺伝子を阻害したカイコ培養細胞の RNA-Seq データを詳細に解析した結果、カイコ apterous 遺伝子の発現制御、もしくは、スプライシングが影響を受けている可能性が示唆された。

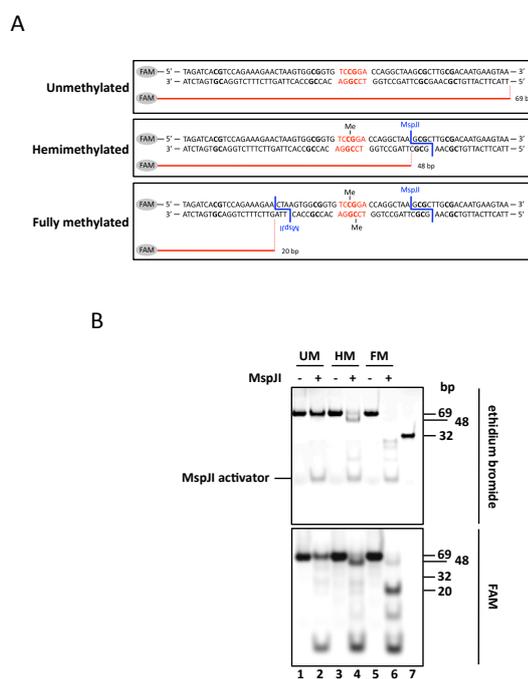
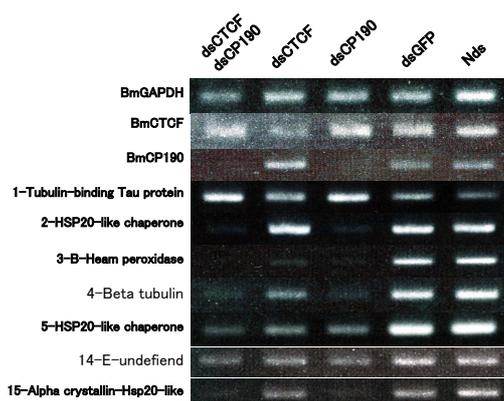


図1. カイコDnmt1は維持メチル化酵素である。(A)メチル化解析に用いた基質DNA。(B)組換えカイコDnmt1の活性

カイコインシュレーター候補である CTCF、CP190 について Insect-two-hybrid system を用いて相互作用解析を行ったところ、CTCF、CP190 間の相互作用が確認された。また、CP190 同士での相互作用も見られた。さ

らに蛍光タンパク質を付加したCTCFとCP190のカイコ培養細胞内での局在を調べたところ、両タンパク質は核内で共局在していることが確認された。また、CP190のN側のBTBドメインのみを有する遺伝子を発現させたところ、CP190、CTCF両方の局在が大きく変化した。CP190のC側のドメインはインシュレーターの局在の調節に重要だと推察できる。また、両遺伝子を阻害したカイコ培養細胞



胞のRNA-Seqを行った結果、いくつかの遺伝子において mRNA の発現量の有意な変化が見られた。

図2. BmCTCF, BmCP190機能阻害細胞を用いて行ったRNAseqで有意な遺伝子発現変化のあった遺伝子(CP190:21遺伝子、CTCF:6遺伝子)

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 1 件)

Mitsudome, T., Mon, H., Xu, J., Li, Z., Lee, J., Patil, A.A., Masuda, A., Iiyama, K., Morokuma, D., and Kusakabe, T. (2015) Biochemical characterization of maintenance DNA methyltransferase DNMT-1 from silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 58, 55-65.

[学会発表] (計 1 件)

DNA methyltransferase DNMT-1 from *Bombyx mori*
Masato Hino, Takumi Mitsudome, Hiroaki Mon, Masanao Sato, Yoshitaka Suetsugu, Kimiko Yamamoto, Zhiqing Li, Jian Xu, Li Zhu, JaeMan Lee,

Takahiro Kusakabe: International Symposium on Basic and Applied Research on Sericulture and Insect Sciences (Daegu Korea) 2015.04.20-21

[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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日下部 宜宏 (KUSAKABE, Takahiro) 九州大学・大学院農学研究院・教授 研究者番号: 30253595

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし