

立教大学学術推進特別重点資金 (立教 S F R)
 個人研究費
 2006 年度研究成果報告書

研究代表者	所属・職名	氏名
	理学部 生命理学科・教授	小野 雅夫 印
研究課題	脊椎動物遺伝子の転写制御領域が協同してクロマチン構造の変換を引き起こす機構の解明	
研究期間	2006 年度	
研究経費	500,000 円	

研究の概要 (200~300 字で記入、図・グラフは使用しないこと)

脊椎動物の細胞型特異的に発現する遺伝子の転写開始に先立ち、当該遺伝子および周辺領域のクロマチン構造は活性型に変換される。この変換に関与する DNA 領域ならびにメカニズムは不明である。私達は抗原受容体の構成成分であるニワトリ Ig- β をコードする遺伝子の B リンパ球に特異的な転写をモデルにして、クロマチン構造の変換に関与する可能性が高い領域を、脊椎動物細胞では起りにくい相同組換えを高頻度に起こす DT40 細胞を用いて欠失することにより、クロマチン構造の変換を介した細胞型特異的な転写機構を調べた。その結果、散在する制御領域の協同作業によって、クロマチン構造が不活性型から活性型へ変換されるという、新しい制御機構を示唆する知見が得られた。

キーワード (研究内容をよく表しているものを 3 項目以内で記入。)

[脊椎動物] [遺伝子スイッチ] [クロマチン]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

カンブリア紀を境として出現した 3 胚葉性の多細胞動物の進化の過程で、個体を形成する多種の細胞を作り出すメカニズムとして、精妙な転写機構が必要になった。これに対処するために、生物はゲノム情報を増大させ、制御領域の分散化(最近では制御領域が隣接遺伝子の内部に存在する例さえ報告され始めている)と組合せによる転写制御を自然選択により獲得したと推定されている。細胞分化の過程で、これまで転写されていなかった細胞型特異的に発現する遺伝子のスイッチを「ON」にするには、当該遺伝子および周辺領域のクロマチンを不活性型から活性型に変換するとともに、プロモーターに RNA ポリメラーゼ、転写基本因子、メディエーター、転写因子などで構成される転写開始複合体を形成する必要がある。

近年のクロマチン研究の進展に伴い、脊椎動物の細胞型特異的に転写されている遺伝子とその周辺の活性型クロマチンは以下の特徴を持つことが示された。

- (1) 膵臓由来の消化酵素である DNase I 処理に対して感受性になる。これはクロマチンが凝縮状態から弛緩状態への変化とみなされている。
- (2) 遺伝子の内部や周辺に発現細胞に特異的な DNase I 高感受性部位 (DNase I Hypersensitive Site: DHS) を持つ。
- (3) コアヒストンの主にアミノ末端が、活性クロマチンに特徴的なアセチル化やメチル化などの化学修飾を受ける。

これらの知見に基づいて、散在する制御領域のうちどこが、これらのパラメーターを不活性型から活性型に変換するのに関与するかを突き止めようとする試みがなされてきた。細胞型特異的な DHS は、プロモーターやエンハンサーに対応するだけでなく、活性クロマチンへの変換および維持に関与する制御領域である可能性がある。細胞型特異的な DHS は、転写されている遺伝子の近傍や内部のみならず、隣接する遺伝子内をも含む上流および下流のかなり離れた場所に散在して見出されるが、これらの領域がどのようにして細胞型特異的な転写に関与しているかは不明な点が多い。発現細胞に特異的な DHS を欠失すると、転写されている遺伝子とその周辺のコアヒストンのアセチル化の状態が不活性型に変換する報告はあるものの、DHS の欠失によりクロマチンを DNase I 抵抗性に変換する[クロマチンを弛緩状態から凝縮状態にする]例はこれまで知られていなかった。

in vivo における DHS が果たす役割を明確にするためには、トランスジェニック法やノックアウト法などの遺伝学的手法が有用である。トランスジェニック・マウスの系では、ゲノム DNA に組み込まれる位置による影響をより少なくするために、BAC や P1 ベクターなどでクローニングした長い領域を用いた研究が展開されている。しかしながら、トランスジェニック法は本来のコンテクストでの改変でないために、結果の説明には常に批判が伴う。ノックアウト・マウスは良いシステムだが、如何せん手間、ひま、お金がかかりすぎる。DT40 細胞はニワトリ B リンパ腫由来の培養細胞で、高頻度に生ずる相同組換えを利用して、細胞レベルで遺伝子破壊をすることが出来る。したがって、B リンパ球で特異的に転写されている遺伝子の転写調節領域は発現細胞に特異的な DHS だと想定し、本来のコンテクストで DHS を改変するプロジェクトを開始した。

B リンパ球特異的に転写される遺伝子として Ig- β を選んだ。B リンパ球分化の初期段階から以降の分化過程で特異的に発現する Ig- β は、膜結合性免疫グロブリン(mIg)や Ig- α とともに、膜結合性抗原受容体複合体の構成成分である 1 回膜貫通型の膜タンパクで、免疫グロブリンスーパーファミリーの一員である。哺乳動物では、Ig- β 遺伝子上流には骨格筋特異的に転写されるナトリウム・チャンネル遺伝子が、下流には脳下垂体特異的な成長ホルモン遺伝子が存在することをわれわれは示してきたが、研究を開始した 2000 年の時点ではニワトリ Ig- β 遺伝子は知られていなかったもので、まずニワトリ Ig- β cDNA の構造を明らかにし、DT40 細胞が Ig- β 遺伝子を発現することを確認した。

研究成果の概要 (つづき)

つぎに、ニワトリ Ig- β 遺伝子の周辺の遺伝子構成も哺乳動物と類似していることを示した。Ig- β 遺伝子の転写開始点の上流 19 kb から下流 21 kb までの 40 kb にわたる領域の、DT40 細胞に特異的な DHS を調べた結果、Na チャネル遺伝子内に 3 ヶ所、Na チャネル遺伝子と Ig- β 遺伝子の間に 3 ヶ所、Ig- β 遺伝子の第 1 イントロン中に 1 ヶ所、Ig- β 遺伝子と成長ホルモン遺伝子の間に 4 ヶ所の DHS を見いだした。トランジェント・トランスフェクション法により、転写促進活性を調べたところ、Na チャネル遺伝子の 2 ヶ所と、Ig- β 遺伝子のイントロン中の DHS にエンハンシング活性があることが判明した。さらに、Ig- β 遺伝子が転写されている際の Ig- β ローカスのクロマチンの状態を、H3, H4 ヒストンのアセチル化の程度を指標にして明らかにした。これらの結果をふまえて、Ig- β ローカスに見出された DT40 細胞特異的な 11 ヶ所の DHS を 4 グループに分けて欠失した結果、これらの領域単独の欠失は Ig- β 遺伝子の転写に劇的な影響を及ぼさないことをまず報告した。つぎに、4 グループを系統的に組合せて欠失した。その結果、(1) 4 領域すべてを欠失すると、Ig- β 遺伝子の発現は転写段階で劇的に低下したことから、これらの領域は、Ig- β 遺伝子の転写に際して、多数の領域を組合せた場合に劇的な効果を示すという、これまでに報告されていなかったタイプの制御機構に関与することが示された。(2) 4 領域すべてを欠失した細胞細胞では、Ig- β 遺伝子のクロマチンが凝縮状態に変換していたことから、これらの制御領域はクロマチンの凝縮状態から弛緩状態への変換に関与することが示された。(3) 4 領域は協調して Ig- β プロモーター近傍の H3, H4 ヒストンのアセチル化に影響を及ぼすが、H3K4 のジメチル化には影響を及ぼさなかった。(4) 4 領域すべてを欠失しても Ig- β プロモーターの CG メチル化には大きな変化が見られなかったことから、Ig- β 遺伝子のクロマチンが凝縮状態になったり、プロモーター近傍で H3, H4 ヒストンがアセチル化されることがプロモーター領域の CG の脱メチル化の原因でないことが示された。(5) 以上の結果にもとづいて、脊椎動物遺伝子の細胞型特異的な転写に先立って、散在する制御領域の協同作業によって、不活性型から活性型へクロマチン構造が変換されるモデルを構築した。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

①原著論文

Shimada, N., Matsudo, H., Osano, K., Arakawa, H., Buerstedde, J-M.,
Matsumoto, Y., Chayahara, K., Torihata, A. and Masao Ono, M.
Activation of the chicken Ig- β locus by the collaboration of scattered
regulatory regions through chromatin conversion.
Nucleic Acids Res. 34:3794-3802 (2006)

②学会発表

(1) Ono, M., Shimada, N., Mastudo, N., Osano, K., Chayahara, K. and Torihata,
A. Chicken Ig- β locus is activated by the collaboration of scattered regulatory
regions through stepwise chromatin conversion.

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and
11th FAOBMO Congress. 2P-A-069 Abstract p244 June 18-23 2006, Kyoto, Japan.

(2) 小野雅夫、島田奈緒子、松本康之、茶屋原梢、鳥畑厚志 (立大・理・生命理学)

ニワトリ Ig- β ローカスのクロマチン構造は散在する制御領域の協同作業により活性化
される。

2006 分子生物学会フォーラム 2006年12月 名古屋