

2007年1月24日
独立行政法人 理化学研究所

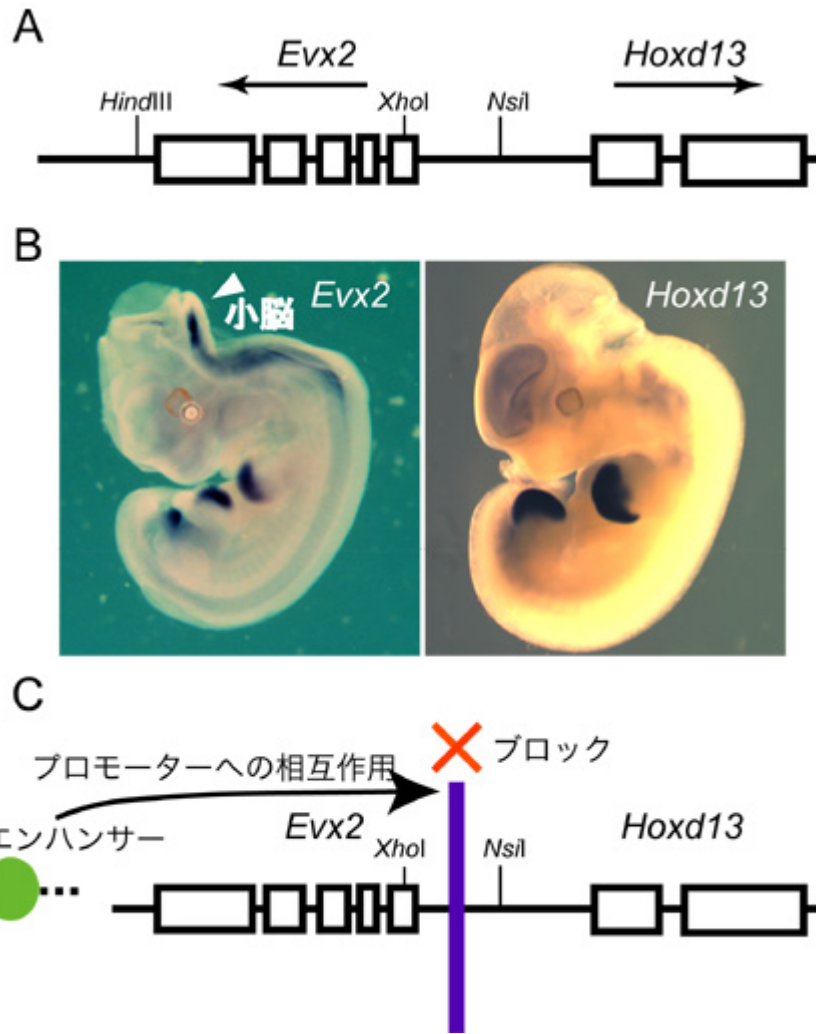
染色体上の遺伝子発現をコントロールする領域を発見

- 遺伝子治療など必要な遺伝子を安定的に発現させることが可能に -

私たちの体を作る設計図である遺伝子の多くは、生命活動の中で、正しい時期に正しい場所で発現し、その機能を発揮します。万が一、遺伝子が発現する場所や時期に誤りが生じた場合、体の形成がうまくいかなかったり、病気を引き起こすなど、さまざまな障害が起こることが知られています。このように私たちが生きていく上でとても重要な染色体上における遺伝子発現調節ですが、そのメカニズムの詳細は、今まで謎のままでした。

理研脳科学総合研究センターの近藤研究ユニットは、モデル動物であるマウスを用いて、染色体上にある目的とした場所だけで遺伝子を発現させ、他の部位での遺伝子が発現を妨げる領域（DNA配列）があることを突き止めました。この領域は、染色体構造を機能領域（ユニット構造）ごとに区分する“バウンダリー”と呼ばれるものであり、哺乳動物では初めての発見です。

このバウンダリーは、新たな遺伝子を染色体上に組み込んで、機能を持たせる際、組み込んだ先の遺伝子発現調節機構の干渉を防ぐことができるため、安定的に目的とした遺伝子を発現することができます。この技術を応用すると、遺伝子治療や動物細胞を用いた創薬など物質生産が、効果的／効率的に行うことができるようになると期待されます。



(図)脳で遺伝子の発現を促す命令は”バウンダリー”と呼ばれる領域でブロックされる

2007年1月24日
独立行政法人 理化学研究所

染色体上の遺伝子発現をコントロールする領域を発見

- 遺伝子治療など必要な遺伝子を安定的に発現させることが可能に -

◇ポイント◇

- ・ 近接する二つの遺伝子の発現を制御・抑制するために必要な DNA 配列を同定
- ・ 染色体構造を機能領域ごとに区分する“バウンダリー”を哺乳類で初めて確認
- ・ 遺伝子工学への応用につながる遺伝子発現をブロックする DNA 配列（領域）

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、モデル動物であるマウスを用いて、染色体上にある目的とした場所だけの遺伝子を発現させ、他の部位で遺伝子が発現することを妨げる領域（DNA配列）を突き止めました。この領域は、染色体構造を機能領域（ユニット構造）ごとに区分する“バウンダリー”と呼ばれるものであり、哺乳動物では初めての発見です。理研脳科学総合研究センター（甘利俊一センター長）近藤研究ユニットの近藤隆ユニットリーダーらによる研究成果です。

生命活動において、多くの遺伝子発現は、特定の時期に、特定の部位で行われています。遺伝子発現の調節が正確に行われることにより正常な生命活動が維持され、発現調節に支障が生じた場合には、形態の異常や病気等のさまざまな障害が生じます。

特定の細胞で遺伝子が発現するメカニズムは、メッセンジャーRNA（mRNA）の転写の開始点を定めているプロモーターと呼ばれているDNA配列（領域）と、遺伝子の転写を調節している転写調節領域（エンハンサー）と呼ばれるDNA配列（領域）の組み合わせにより働きます。しかしながら遺伝子は、膨大なDNA塩基で構成された染色体上に存在しており、プロモーターとエンハンサーとの間が非常に離れている場合（数百キロベース [kb]）もあり、目的とした遺伝子だけを発現させる仕組み、つまり染色体構造と遺伝子調節機構との関係についてはほとんどわかっていません。

研究チームは、染色体上で、大変近い位置（8kb）にありながら、異なる発現の調節を受けている二つの遺伝子に着目しました。マウスのES細胞を用いて、エンハンサーにより、目的とした遺伝子が発現すると、発現した部位が緑色に染色されるタンパク質を組み込み、組み込む断片の組み合わせによって、発現のパターンがどのように変わるか観察しました。その結果、二つの遺伝子の間にある特定のDNA配列（領域）が、一方の遺伝子だけを発現させ、他方の遺伝子の発現をブロックする機能を持っていることが明らかになりました。さらに、この機能は、生体外から遺伝子を導入した際、近接した遺伝子の発現を促進するエンハンサーとの干渉を防ぐことができ、安定的に目的とした遺伝子を発現させることができます。この成果は、遺伝子治療や創薬など安定的な物質生産への応用が期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『PLoS ONE』^{※1}（1月24日付け・オンライン）に掲載されます。

1. 背景

生物を形作る多くの遺伝子は、その生物の生命活動の中で、特定の時期に、特定の部位で発現し、その機能を発揮します。遺伝子の発現では、プロモーターと転写を促進する DNA 領域である転写調節領域（エンハンサー）との組み合わせが重要であることが知られています。これらの DNA 領域は、染色体と呼ばれる非常にたくさんの DNA 塩基で構成されている巨大分子上に存在しており、その染色体上には、無数のエンハンサー、あるいはプロモーターとして機能する DNA 配列がひしめいています。また、近年の遺伝学の発展により、転写調節領域とプロモーターの距離が数百キロベース (kb) から 1 メガベース (Mb) に及んでいる場合もあることがわかってきました。遺伝子が正しい時期、あるいは部位特異的に発現するためには、染色体上において、プロモーターが正しい転写調節領域と相互作用する必要があります。ところがこれまでの研究では、染色体上における転写調節領域とプロモーターの相互作用の選択、転写調節領域が、その調節下に置くことができる範囲の解明など、染色体構造と遺伝子の発現の相関性についてはほとんどわかっていませんでした。

2. 研究手法

研究チームでは、染色体上で近接した二つの遺伝子、“*Evx2*^{*2}”と“*Hoxd13*^{*3}”に注目して実験を行いました (図 1A)。二つの遺伝子は、共にホメオボックス^{*4}を持つ転写調節因子で、染色体上において 8kb の距離にあります。これら二つの遺伝子は、肢芽 (四肢ができるふくらみ)、外性器等の共通の発現領域を持ちながら、*Evx2* は、発生段階において脳において発現し、*Hoxd13* は脳では発現をしません (図 1B)。つまり、両遺伝子の間には、脳での発現を促すエンハンサーが作用した際、その情報が、*Hoxd13* に作用することをブロックする DNA 配列 (領域) があることを示唆しています (図 1C)。

このような領域の存在を確かめ、プロモーターとエンハンサーとの関係を探るため、研究チームでは、マウスの ES 細胞を用いて、標識となる遺伝子 (リポーター遺伝子) を挿入し、発生過程において遺伝子が発現するパターン (表現系) を観察する実験を行いました。具体的には、*Hoxd13* の下流に位置し、*Hoxd13* と同様に、肢芽及び外性器等の共通の発現領域を持ちながら、発生段階において脳で発現しない遺伝子“*Hoxd9*^{*5}”に、遺伝子が発現すると緑色に染色されるタンパク質と、二つの遺伝子 (*Evx2* と *Hoxd13*) の間に存在する DNA 配列を、特定の位置で分断して組み入れた DNA 断片 (外来 DNA 断片) を数パターンつくりました。この外来 DNA 断片を組み込んだリポーター遺伝子を、染色体上の特定の部位に挿入したマウスを、ES 細胞からそれぞれ作製し、それらのマウスの遺伝子発現パターンを観察することにより、外来 DNA 断片ごとの遺伝子発現のパターン及びその機能がどのように変化するか観察しました (図 2)。

Hoxd9 は、これまでの研究チームによる研究から、*Evx* の 3 末端 (3') 側 (*Hoxd13* の反対側) に組み込むと、脳での発現を促すエンハンサーと相互作用を起こし、本来発現しない脳での発現が確かめられています。また、ES 細胞を用いてマウスを作製するのは、外来 DNA 断片を目的の位置に挿入し、表現系を観察することが容易なためです。

3. 研究成果

(1) 遺伝子の発現をブロックする領域を発見

まず初めに *Evx2* と *Hoxd13* の間にある DNA 配列（領域）すべてを含んだリポーター遺伝子を、脳での発現を促すエンハンサーと相互作用を起こすことがわかっている *Evx* の 3'側を導入し、遺伝子の発現パターンを調べました。すると、*Hoxd9* は、脳で発現しませんでした。このことから、*Evx2* と *Hoxd13* の間にある DNA 配列（領域）内に、脳での発現を促すエンハンサーが作用する際、その情報をブロックする領域があることが確かめられました（図 2）。

(2) ブロックする領域に秘められた 2 つの機能

次に、ES 細胞を用いた同様の手法により、*Evx2* と *Hoxd13* の間にある DNA 配列（領域）の半分を含む領域をリポーター遺伝子と組み合わせて、遺伝子の発現パターンを観察しました。すると、この領域の前半部分（5 末端側）を含む 2.5kb を組み合わせた場合には、*Hoxd9* の脳での発現は起こりませんでした。さらに、この 2.5kb の DNA は、肢芽、外性器での発現も阻害することから、すべてのエンハンサー（転写調節領域）とプロモーターの相互作用を阻害していることがわかりました。

さらに、後半部分（3 末端側）の DNA 断片、2.5kb を共存させたところ、肢芽、外性器での発現が起こり、脳での発現だけが見られませんでした。このことから、後半の断片には、エンハンサーとの相互作用により、遺伝子の発現領域を部位特異的に調節する機能を持っていることもわかりました（図 3）。

(3) 哺乳動物で初めて明らかになったバウンダリー

染色体構造を機能ごとに区分する DNA 領域（ユニット構造）は、“バウンダリー（境界）”と呼ばれ、ショウジョウバエなどでその存在が提唱されています。このバウンダリーにより染色体は、比較的小さなユニット構造に分割されると考えられています。バウンダリーの両端に存在する DNA 領域は、構造的につながってはいても、バウンダリーの作用により独立したユニットを形成し、相互作用をしないと考えられています。

今回の研究で明らかになった 2.5kb のブロック領域の DNA 配列は、エンハンサーとプロモーターの相互作用を阻害するのみならず、遺伝子発現抑制に関しても阻害する可能性があり、バウンダリーとしての定義を満たしていると考えられます。そこで、その DNA 断片を、蛍光タンパク質を発現させる遺伝子の両端につなぎ、動物細胞へ導入し、その発現の維持について観察しました。動物細胞において外来遺伝子が挿入された際に、挿入部位の周辺領域の影響による抑制をしばしば受けることは知られています。

本実験において、今回発見した DNA 配列を持たない外来遺伝子は、1 年間の培養で、挿入した部位の周りからの遺伝子調節機構の影響を受け、ほとんど蛍光を失ってしまいました。しかしながら、当該 DNA 配列で挟み込んだ遺伝子の場合には、1 年間の培養の後においても蛍光タンパク質の発現を良く維持しました（図 4）。この結果は、この DNA 断片がバウンダリーとして働き、導入遺伝子の発現を挿入位置の周辺領域の影響による抑制から守っているということをサポートするものです。

4. 今後の期待

今回、哺乳動物において初めて染色体をユニット構造に分割するバウンダリーと呼ばれる DNA 配列を同定しました。今後、この領域に作用するタンパク質を同定することにより、染色体構造と遺伝子の発現調節に関する機構解明がさらに進展すると考えられます。

また、外来遺伝子を動物や細胞に導入した際、挿入位置の周辺の影響による影響で、肝心の遺伝子が過剰発現する場合や、発現抑制が生じることが多く見られます。バウンダリーの活性は、染色体をユニットに分割するということであり、導入遺伝子を挿入環境から独立したユニットにしてしまう活性が期待されます。そのため、導入遺伝子にバウンダリーを組み合わせることで、挿入位置の周辺領域における発現調節機構に影響を受けることなく、導入された遺伝子のプロモーター本来の活性でのみ、発現の調節が行われるようになることが予測されます。これらの成果は、遺伝子治療、動物細胞を用いた創薬などの物質生産などへの応用が期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター 近藤研究ユニット

ユニットリーダー 近藤 隆

Tel : 048-467-6729 / Fax : 048-467-6729

脳科学研究推進部

嶋田 庸嗣

Tel : 048-467-9596 / Fax : 048-462-4914

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 PLoS ONE

PLoS シリーズは、アメリカの Public Library of Science (PloS) が発行しているオンライン雑誌。Nature、Cell などの編集に携わってきた編集者達が発起人となって 2003 年にまず PLoS Biology の刊行が開始された。PLoS ONE は、科学分野・医学分野の査読付きオープンアクセス誌として創刊された。オンライン上で論文に関するフォーラムが開設され、掲載論文に関してウェブ上で討議することができ、その討議を通じて、より論文の質を高めることができる。

※2 *Evx2* 遺伝子

ヒト及びマウスにおいて、2番染色体上に存在するホメオボックスを持つ転写調節因子の一つ。脳、脊髄、肢芽、外性器等に発現が見られる。

※3 *Hoxd13* 遺伝子

動物において、体幹の前後軸における特異性を決定する因子である、*Hox* 遺伝子群の一つ。ヒト、及びマウスにおいて2番染色体上に存在するホメオボックスを持つ転写調節因子。体軸上の後末端での発現、肢芽、外性器で発現及びそれらの領域の形成に機能が見られる。

※4 ホメオボックス

体のある一部の組織や器官が別の組織や器官になるという変化を起すホメオティック遺伝子に含まれている、180塩基対からなるDNA配列。DNA結合領域を形成していると考えられており、これを持つ遺伝子は転写調節因子であると考えられている。

※5 *Hoxd9* 遺伝子

動物において、体幹の前後軸における特異性を決定する因子である、*Hox* 遺伝子群の一つ。ヒト、及びマウスにおいて2番染色体上に存在するホメオボックスを持つ転写調節因子。

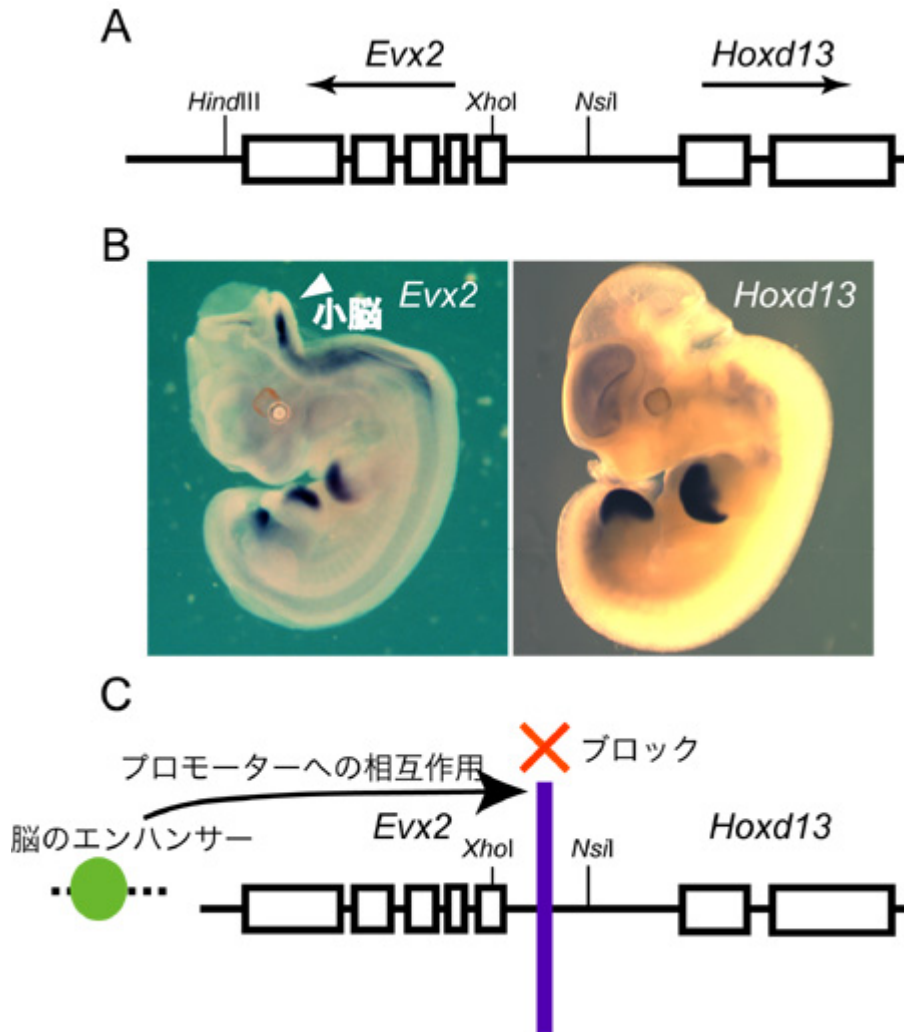


図1 Evx2 遺伝子及び Hoxd13 遺伝子周辺の染色体構造(A)と遺伝子発現(B)

(A) Evx2 と Hoxd13 は 8kb の距離で向かい合う形で逆向きにコードされている。

(B) 両遺伝子共に肢芽、外性器での発現が見られるが、それに加えて Evx2 でのみ脳での発現が見られる。

(C) 発現調節における仮説。Evx2 側、遠位に存在するエンハンサーの相互作用が、Evx2、Hoxd13 の間にある配列に阻害されることで、Hoxd13 では脳での発現が生じない。

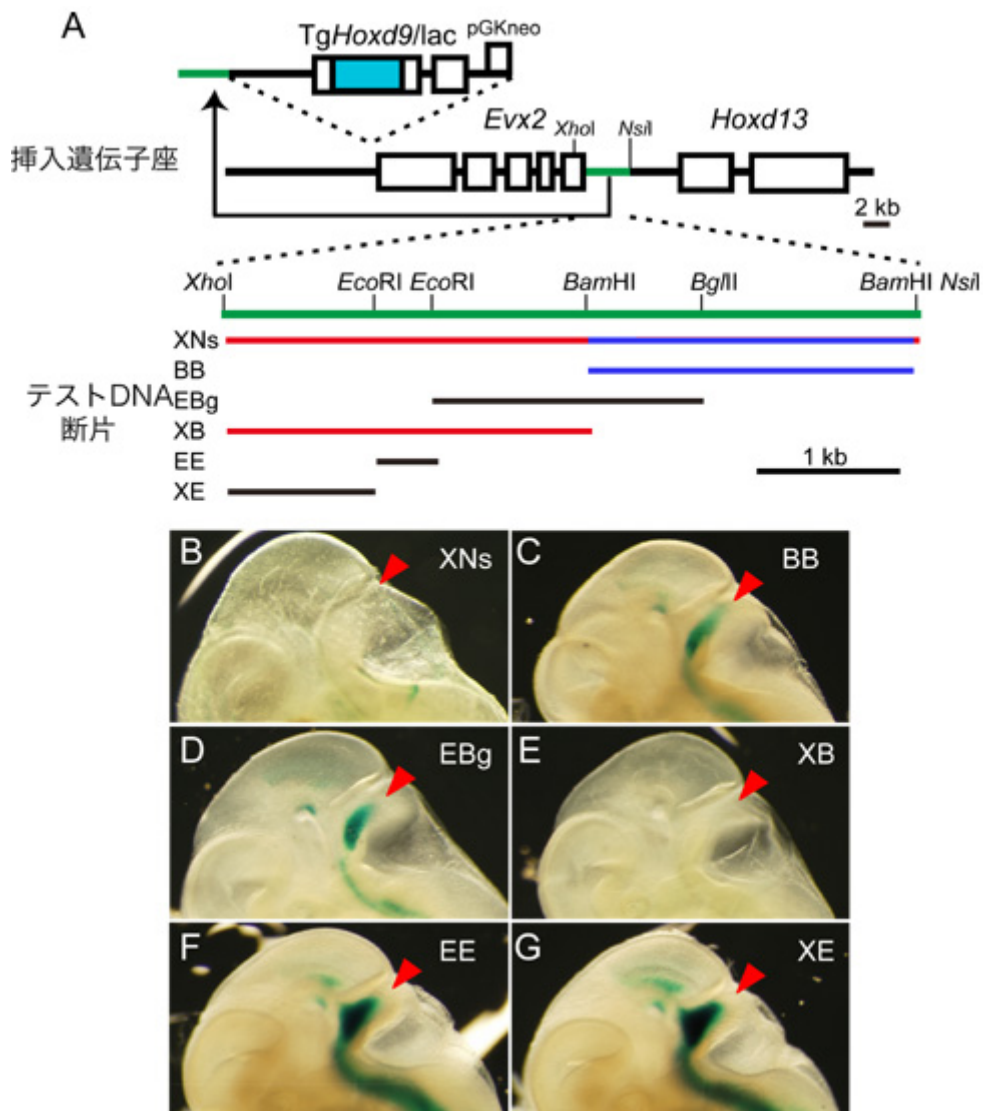


図2 作製したマウスの染色体構造(A)と挿入した外来遺伝子の発現パターン(B-G)

(A) 相互作用を阻害する候補の領域をマーカー遺伝子である *Hoxd9/lacZ* トランスジェーンとともに *Evx2* 下流に挿入する。

(B) 阻害活性があれば脳での発現が消失する。XNs (阻害領域全体)、XB 断片では脳での発現が消失。

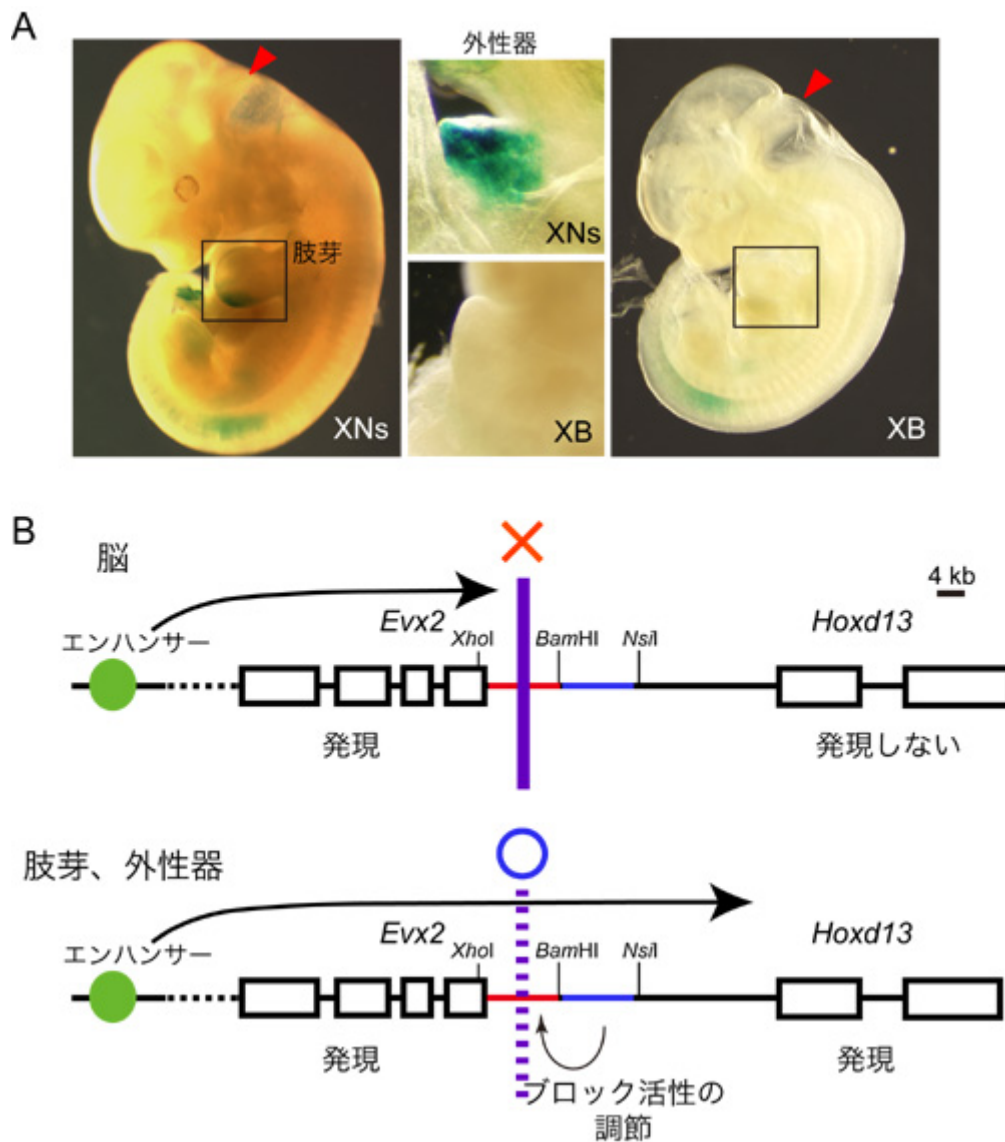


図3 XNs 及び XB の詳細な比較

- (A) XNs では、肢芽、外性器での発現が見られるが、XB では、肢芽、外性器での発現も消失する。
- (B) 遺伝子発現をコントロールする仕組みの仮説。XB 断片は全てのエンハンサー活性の相互作用を阻害するが、それを BNs 断片が調節することにより、肢芽、外性器では阻害機能が働かない。

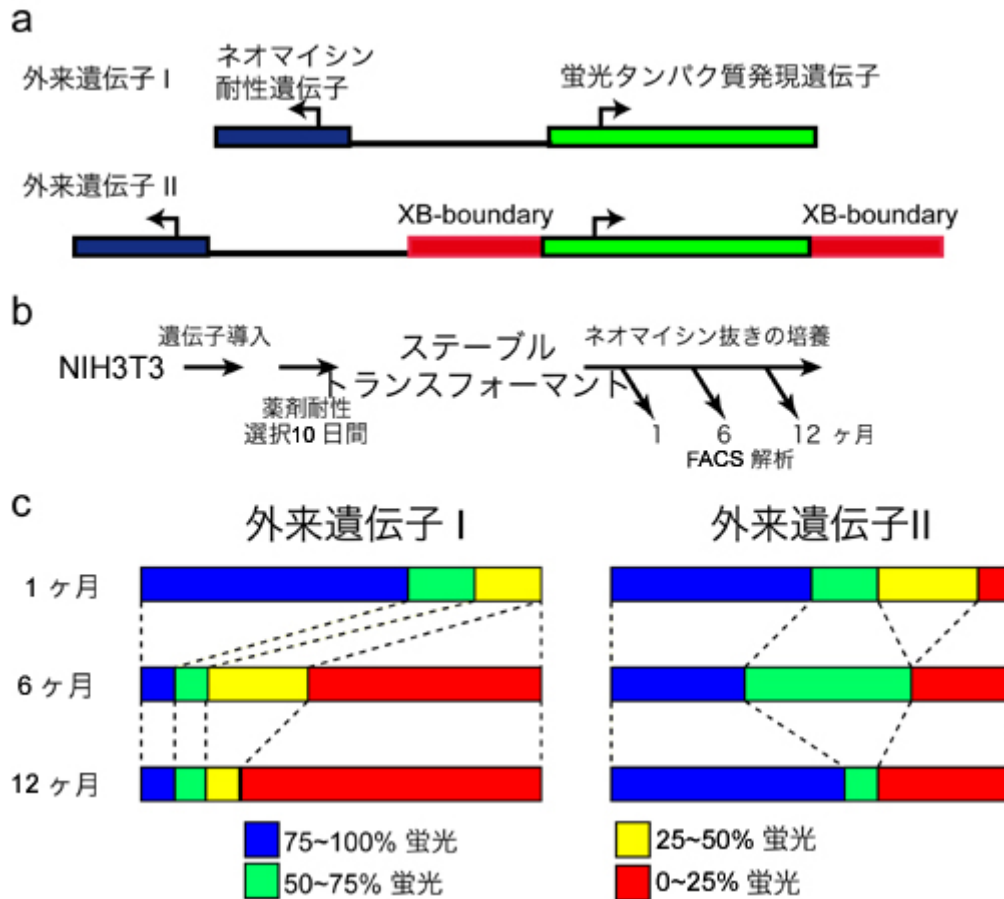


図4 XB断片による挿入遺伝子の発現の保護

- (A) 用いられた二種類の外来遺伝子。共に蛍光タンパク質を発現するが、一方はXB断片をつなげておらず、一方は蛍光タンパク質発現遺伝子の両端にXB断片が存在する。
- (B) 実験の概要。外来遺伝子が染色体上に挿入されたNIH3T3細胞をそれぞれ12株ずつ作製し、それを長期間飼育する。1ヶ月、6ヶ月、12ヶ月を経たところで、サンプリングし、蛍光をFACSで計測する。
- (C) XB断片を持たない遺伝子を挿入した細胞は、蛍光を失って行くが、XB断片を持った遺伝子は蛍光を維持する。