

添付 4

題名	Molecular Characterization of a Human Matrix Attachment Region Epigenetic Regulator
雑誌	PLOS ONE: November 14, 2013
著者	Salina Arope, Niamh Harraghy, Milos Pjanic, Nicolas Mermoud*
所属組織	Laboratory of Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, University of Lausanne, and Center for Biotechnology UNIL-EPFL, Lausanne, Switzerland
要旨	<p>MAR は一般的にエピジェネティック調節エレメントとして遺伝子発現増強に関与する。 その詳細なメカニズムは不明であるが、役割は染色体にループ形成ドメインを配置することにある。 本研究ではヒト MAR1-68 の転写増強および抗遺伝子抑制作用に関して、AT リッチコア領域とそれに隣接する転写因子結合モチーフを含む 5'-および 3'-フランキング配列の貢献度を評価した。 結果概要は以下の通り；</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) MAR 1-68 部分配列の抗遺伝子抑制効果および転写亢進活性に関しては、単独で、完全長 MAR に匹敵するものはなく、ただ拡張 AT リッチコア配列（拡張コア配列と略す）が抗遺伝子抑制効果において同等以上であった。 2) この拡張コア配列と 3'フランキング配列の組み合わせは、上記両活性で完全長 MAR を凌駕した。 フランキング配列に含まれる 5 種の転写因子結合配列の組み合わせ試験から、より短い配列で完全長 3'フランキング配列を代替できる可能性を示めた。 3) MAR 1-68 の導入遺伝子組み込みコピー数増加作用を明らかにした。 拡張 AT リッチコア配列が主に抗遺伝子抑制と導入遺伝子コピー数増加に寄与し、転写増強活性はフランキング配列を必要とする。 4) ChIP 解析のデータベースを用いたバイオインフォマティクス解析で、MAR の AT リッチコア配列は、ヌクレオソーム欠失領域、RNA-polymerase II 結合と CTCF が豊富に存在するという際立った特徴のクロマチン景観を形成しており、活性プロモータとはかなり異なるものであった。

【分野背景・研究目的】

哺乳動物細胞における遺伝子発現は、厳密に制御されると同時に柔軟性も併せ持っている。この柔軟性はクロマチン構造の変化に由来し、細胞内部の生理的要求や外部刺激に応じた遺伝子発現の調整を可能にしている[1-3]。導入遺伝子も同様に、遺伝子抑制など組み込まれ部位の環境に依存したクロマチン構造の変化を起こす。継続的かつ適切に調節された導入遺伝子発現のため、組み込み部位の環境から導入遺伝子を遮断する技術の確立は、バイオ工学や遺伝子治療の将来にとって大きな関心事である。 Scaffold/Matrix attachment region (MAR)などの遺伝子境界エレメント (genetic boundary element) によりクロマチンがトポロジカルに拘束されたドメイン群に区画化されているらしいという発見はこれらの調節エレメントを組み込んだ発現ベクター開発の端緒となった [4-10]。これまで報告されたMARの機能、性状は以下の通り；

- 1) ヘテロクロマチンに関連の遺伝子抑制から導入遺伝子を遮断、保護する (**anti-silencing effect ; 抗遺伝子抑制効果**) [13-19]。
- 2) 不活性プロモータの**転写再活性化作用**を示した (MAR1-68) [20]。
- 3) 導入遺伝子**発現増強効果**[13,16,17,19,21,22]。この作用はMARの以下の活性に関連する。(i) 転写開始の促進、(ii) ゲノムへの組み込みコピー数の増加、そして/あるいは (iii) 導入遺伝子の組み込みを転写に有利な部位に誘導[11,22,23]。
- 4) MARは、一般に長さ数百bpのATリッチエレメント、あるいは分散した短いATリッチパッチの領域 (**ATリッチコア配列**) を含む。このATリッチ領域は、巻き戻され易く、**超らせん負荷で塩基対解離のポテンシャルが大**。この性質は、**核基質への結合能と折れ曲がり構造**を取る傾向と併せて重要[22,24-26]。また、**chicken lysozyme MAR**の解析から、核基質への結合能だけでは発現増強には十分でなく、ある程度、コピー数に依存[19,22]。しかし、コピー数と発現亢進を規定するエレメントの特定はできていない[27]。進化的にMAR機能は保存されているが、その機能を、単に配列に求める試みは成功してない。
- 5) ATリッチコア配列および転写因子結合モチーフを多く含むフランキンギング配列など幾つかの特異的構成要素のバイオインフォマティクス手法による解析で強力な活性を持つ新規のMAR 1-68およびX-29を特定した[22,28]。

MARエレメントの使用に当たってのひとつの制約はそのサイズにあり、例えば、遺伝子(細胞)治療用ベクター構築など適用分野によっては制限がある。転写増強と抗遺伝子抑制効果に必須なエレメントを特定し、より短いエレメントを構築することは関心事である。本研究では、MARの機能的エレメントの特定とクロマチン構造への分子的作用機序の評価を試みた。

【結果と考察】

1. MAR 1-68は、遺伝子抑制細胞の出現頻度を減じかつ高発現細胞のそれを増加させる

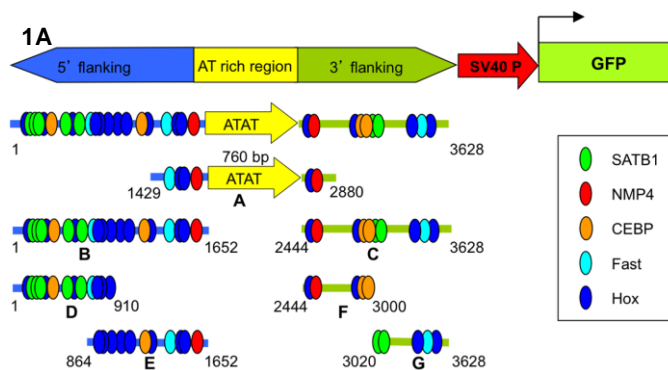
【被験配列】本研究で用いた

MAR1-68 (3,628bp) と部分配列

(A~G) の位置関係を図 1 Aに示す。

MAR 1-68は3つの領域からなる: ATリッチ領域 (A)、その5'フランキンク配列 (B) と 3'フランキンク配列 (C)。推定転写因子結合部位は楕円で配列上に位置を示した (転写因子; SATB1, NMP4, CEBP, Fast および Hox)。

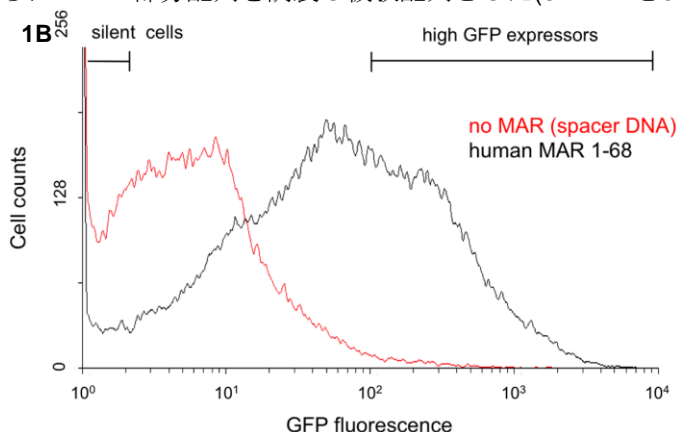
各フランキンク配列については、さらに二つの部分配列を調製し被験配列とした(5'のD,Eと3'のF,G)。



【試験】MAR1-68含有ベクター(ス

ペーサ対照ベクター)をネオマイシン耐性プラスミッドとともに CHO DG44株に安定的導入をした。ネオマイシン選択培地での 2 wk培養後、 10^5 個の細胞のGFP蛍光強度をフローサイトメータで測定した (図 1 B)。尚、相対蛍光強度10以下は遺伝子導入をしなかった細胞と同じレベルの、バックグラウンド (陰性) 領域。

スペーサ対照の主な集団がここに属しており、 $10 \sim 100$ の低発現、中等度発現領域に陽性集団が僅かに認められた。一方、MAR は中央値が中等度発現亜集団で、高発現亜集団が 30%以上を占めている (図 1 B、数値化したのが図 2 の上の 2 項目)。相対蛍光強度 10 以下の陰性亜集団は 20% 強であった。



細胞集団	スペーサ対照	MAR 1-68
高度発現細胞亜集団	約 2 %	32 %
遺伝子抑制細胞亜集団	62 %	23 %

2. MAR 1-68 部分配列の抗遺伝子抑制効果および転写亢進活性

1) 各部分配列 (正逆方向の 2 種) 単独の活性: SV40 プロモータ+EGFP の 5'上流に被験部分配列を配置したベクターを作成、CHO への安定的導入により EGFP 発現への効果を調べた。その他の 実験条件は MAR1-68 での試験と同じ。3 回の独立した試験の結果から平均値および標準偏差を求め表記した (図 2)。有意性検定は、それぞれのスペーサ対照との比較で行った。(*) (スチューデント t 検定、 $P < 0.05$)

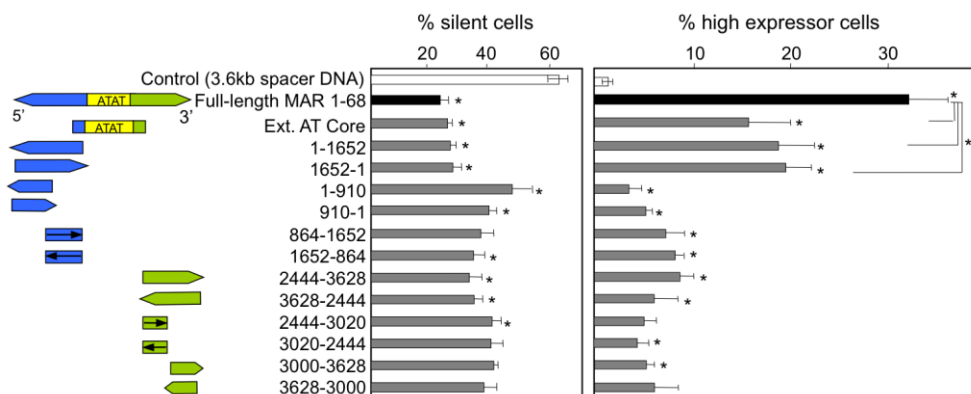


図2 MAR 1-68 の部分配列の抗遺伝子抑制効果および転写亢進活性

【結果】完全長 MAR に匹敵する抗遺伝子抑制を示した部分配列は**拡張 AT コア配列**[AT コアに 5' と 3'の一部フランキング配列が付加] と**両方向の 5'フランキング配列**であった。一方、発現亢進活性においてもこれらの部分配列は、他の配列に比べ高い活性を示したが、完全長 MAR1-68 の半分程度の活性にとどまっていた。他の部分配列も、活性レベルは低い、有意な抗遺伝子抑制と発現亢進の活性を示しており、完全長 MAR の活性に部分的に貢献していることが示された。

2) 単離したATリッチコア配列の活性： 結果の図3Aは省略。まとめると下表の通り。

MAR	コア配列の性状 (被験物サイズ)	抗遺伝子抑制	転写亢進
1-68	一つのらせんに、A,T と C がもつばら存在。(760bp)	No	No
X-29[22]	稀にある G、C で長い(AT)n のクラスターが分断される。(220bp と 3 量体 660bp)	弱い有意； 3 量体 > 単量体	弱い有意； 3 量体 > 単量体

3) 拡張 AT コア配列にその他の部分配列を付加した配列群の活性 (図 3)： 試験は、被験配列をコア配列と GFP プロモータの間に挿入し、上述の方法に準じて行った。抗遺伝子抑制活性に関しては、全ての組み合わせが拡張 AT コア配列/完全長 MAR レベルに比べ、若干弱いか強いかほぼ同等の活性を示した。特に、完全長 3' と 5'-フランキング配列は、完全長 MAR1-68、拡張コア配列の双方を凌駕する活性を示した。両完全長フランキング配列は、転写活性亢進についても同様に完全長 MAR と同程度 (5'-) か凌駕(3'-)していた。

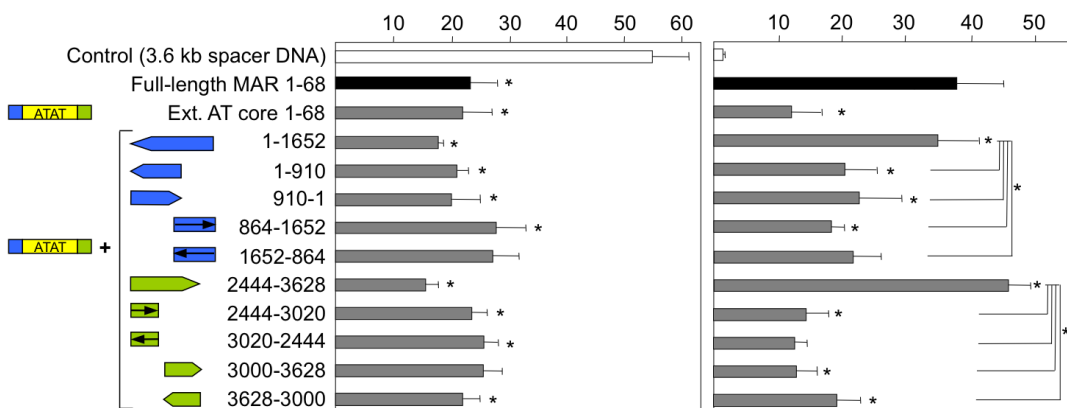
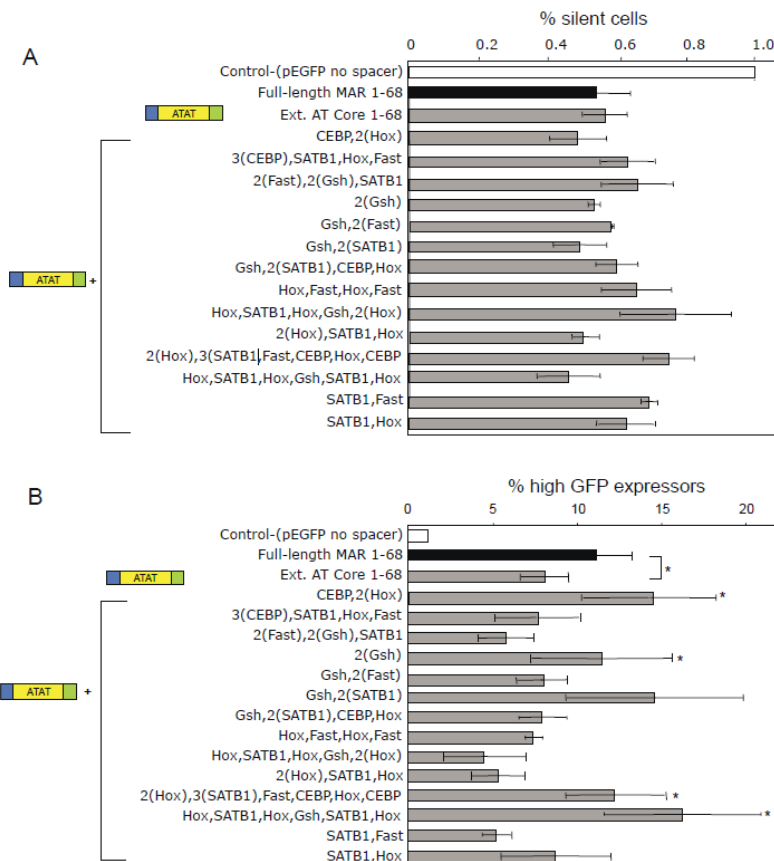


図3 拡張ATコア配列とその他の部分配列の組み合わせ効果

4) 転写因子結合部位の効果 (Online補遺データ、図S4)

ATリッチコア配列との組み合わせ最も活性の高かった3'フランキンング配列に多く含まれる5種の転写因子結合部位のオリゴヌクレオチドを合成し、その混合物をATリッチコア配列とプロモータ+GFPの間にランダムに挿入、上記実験と同様に活性を調べた。この予備試験で抗遺伝子抑制と転写亢進活性の双方に関して、完全長MARを凌駕する組み合わせが3種類認められ、最適組み合わせを得るための今後の大規模かつ組織的な研究開発の重要性が示唆された。



図S4 拡張ATコア配列と転写因子結合部位配列の組み合わせ効果

3. 導入遺伝子の組み込み数および転写活性に関するMAR部分配列の効果

以前の報告で、MAR1-68は、二つの指標となる活性のほか組み込み導入遺伝子数を増加させることが知られていた[20,23]。ここではどの部分配列がその活性を担うか検討した。

【試験】 安定的導入後のポリクローン性細胞集団の組み込み導入遺伝子数の定量PCRによる測定を行い、細胞集団の示すGFP平均蛍光強度との相関を調べた。スペーサ対照と比較。

【結果】 1) 完全長MARとその部分配列単独：

- 平均蛍光強度の増加はMAR1-68で12倍、MARX-29で17倍を示した(図4A)。
- 組み込み遺伝子コピー数は、完全長MAR1-68は対照に比べ有意に増加(約2.5倍)させたが、MARX-29では増加傾向に留まった。部分配列では拡張ATリッチコア(1.9copy)と5'-フランキンング配列(1.5copy)のみが有意な増加。

• 単位コピー数当りの平均蛍

光強度の増加比較では、

MAR1-68は4-5倍、MARX-29

は10倍を示し、前者の平均蛍

光強度の増加はある程度コピ

ー数依存であること、後者は主

に転写増強であることが示さ

れた。

2) 拡張ATリッチコア配列と

部分配列の組み合わせ: 付

加されたどの部分配列も拡張

ATリッチコア配列の組み

込みコピー数を有意に上げ

ることは出来なかったが、一

方平均GFP蛍光強度増強能

に関しては 5'-、3'-完全長

フランキング配列が完全長

MAR 1-68に匹敵あるいは凌駕した。

以上、MAR 1-68 では、拡張AT

リッチコア配列が主に抗遺伝子

抑制と導入遺伝子コピー数の増加に寄与し、転写増強活性はフランキング配列を必要とする

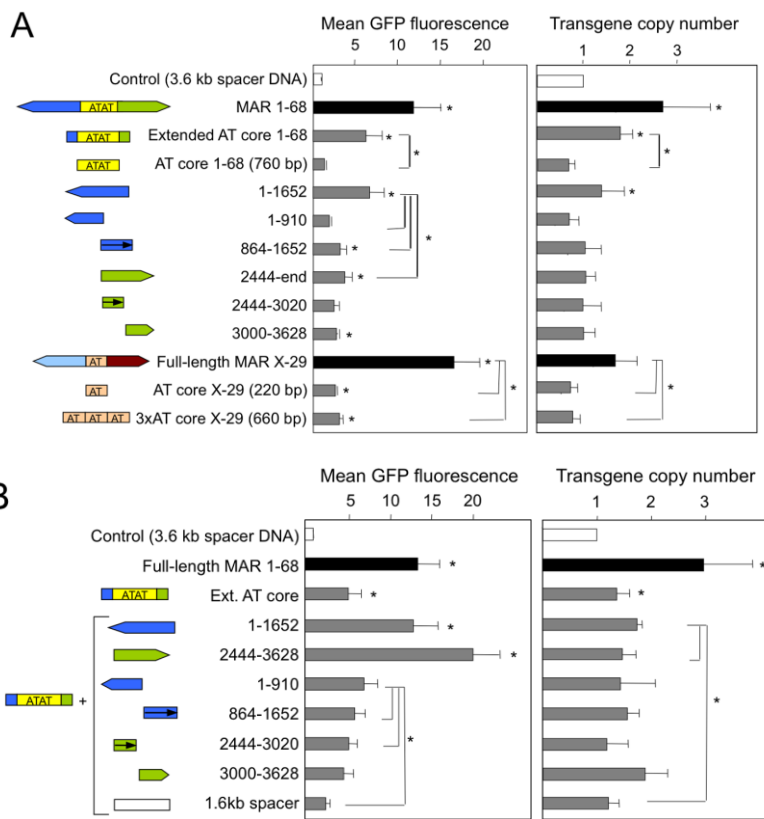


図4 MAR1-68、MARX-29 およびその派生物のGFP発現および組み込みコピー数への影響

4. MAR ATリッチコアは特異的なクロマチンの特徴を示す

転写開始因子複合体集合と特異的なクロマチン構造の変化への転写因子の影響は、沢山報告されている[29]。例えば、CTCFやNF1などの特別な調節因子とクロマチンドメインの境界の出現との関連性は、これらの転写因子の抗遺伝子抑制およびインシュレータ効果に結び付けられている[30–33]。しかしながら、MARのATリッチ配列のクロマチン構造への効果は依然充分には解明されていない。一つのあるいは僅かな数のゲノムエレメントの研究で導かれる不自然で偏った結果を避けるため、上記課題を、SMARScanで予測した約1,600の強力なMARエレメントについて評価した。尚、この方法は、既に転写活性のあるMARエレメントを同定できることが示されており[22]、ここで対象となるヒトのMARが出自を異にする様々な細胞群で類似の転写活性化能を持っている[22,23]。

1) ATリッチコアを中央にしてMARエレメント配列を並べ、報告されているデータセット[34,35]を用い決定した特異的なクロマチンマーカの出現頻度を縦軸にプロットした(図5A)。

(i) 特別なヒストンマーカは、MAR全体にわたって認められなかったが、ATコアには、ヒストンの相対的に少ない部位が認められた(図5A、図S6)。インシュレータたんぱく質CTCFがヌクレオソーム欠失領域全般に認められ、しかし他の転写因子STAT1は認められなかった(図S6)。ヌクレオソームの欠失は以前より活性プロモータにあることが報告されていた[29]。

(ii) RNA polymerase IIの出現頻度は、ATリッチドメインで非常に高いが、転写DNA領域のマーカであるH3K36me3は認められなかった(図5A)。

2) 転写開始点に対して向いた25,000のプロモータについても同様の解析を行い、相対的に多いヒストン欠失が転写開始領域にわたって認められ、一方、漸増的なH3K36me3の出現が転写DNAに見られた。(図5B) [29,34,35]。RNA polymerase IIのピークがプロモータ部位に見られるがMARの場合に比べ僅かであった。ポリメラーゼは、一時的な結合から下流に向かって移動することからピークの小ささは予想どおりであった[36]。プロモータ領域特異的なヒストンマーカH3K4me3があった、これはMAR配列では認められなかった。以上まとめると、MARのATリッチコアは、ヌクレオソーム欠失、RNA-polymerase IIとCTCFの集積という新規なクロマチン景観と関連しており、活性プロモータのそれとは全く異なるものであった(図5Aと5B)。

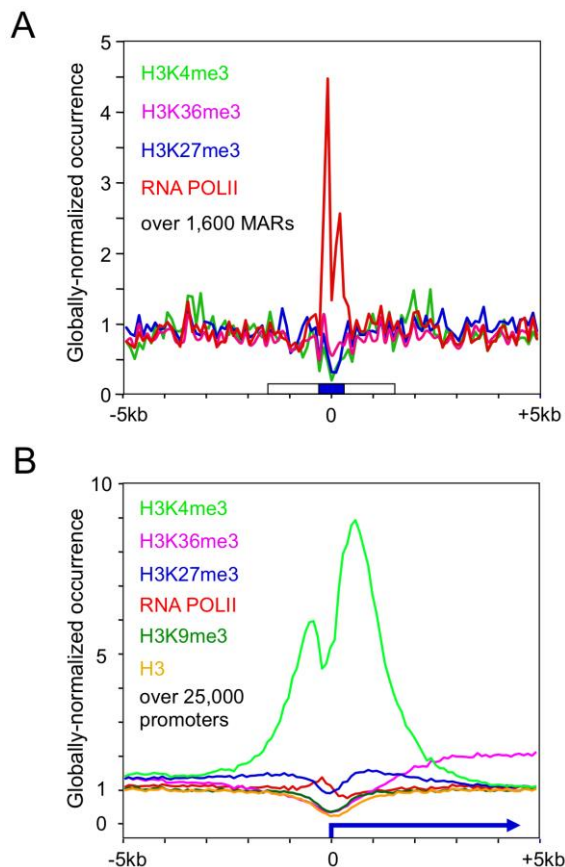


図5 特異的なクロマチンパターンとヒトMARの関連性 (A) 1,683個の予測されたMAR配列を、そのATリッチコアを真ん中に配置して並べた。ヒストン修飾 (H3K4me3, H3K27me3, H3K36me3) とRNA Polymerase II 結合のChIP-SeqプロファイルMARコレクション全部にわたり計算した。(B) 25,000個のRefSeqプロモータをそれぞれのTSS位置を基準に転写の向きに合わせ並べた。ヒストン修飾、RNA Pol IIのChIPSeqプロファイルを計算した。非沈降DNAプロファイルに比した倍数変化をGlobally normalized occurrenceとして表示した。