

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Genomic regions targeted by DNA topoisomerase II β frequently interact with a nuclear scaffold/matrix protein hnRNP U/SAF-A/SP120

(DNA トポイソメラーゼ II β の標的ゲノム領域は、核スカフォールド/マトリックスタンパク質 hnRNP U/SAF-A/SP120 と高頻度に相互作用する)

宮地まり、古田良平、佐野訓明、筒井公子、筒井 研

Journal of Cellular Biochemistry (掲載予定)

副 論 文

Nuclear dynamics of topoisomerase II β reflects its catalytic activity that is regulated by binding of RNA to the C-terminal domain

(トポイソメラーゼ II β の C 末端ドメインへ RNA が結合することにより酵素の核内動態と酵素活性が制御されている)

小野田彰久、細谷 修、佐野訓明、木山和子、木村 宏、河野真二、古田良平、宮地まり、筒井 研、筒井公子

Nucleic Acids Research 42(14): 9005-9020, 2014

主 論 文

Genomic regions targeted by DNA topoisomerase II β frequently interact with a nuclear scaffold/matrix protein hnRNP U/SAF-A/SP120

(DNA トポイソメラーゼ II β の標的ゲノム領域は、核スカフォールド/マトリックスタンパク質 hnRNP U/SAF-A/SP120 と高頻度に相互作用する)

[緒言]

II 型の DNA トポイソメラーゼ (トポ II) は二本鎖 DNA の切断・再結合反応を繰り返すことにより、細胞核内の DNA の絡まりを解消する酵素である。高等真核生物には 2 種類のアイソフォーム (α 、 β) が存在する。トポ II α は増殖細胞での染色体分離過程で必須の働きをするのに対して、トポ II β は分化過程にある神経細胞などで転写制御に関わっている。

ラットの小脳顆粒細胞は、生後約 10 日目に小脳皮質の最外層 (EGL) で最終分裂を終え、顆粒層 (GL) に移動して分化を続ける。顆粒細胞のトポ II β の発現は EGL で始まり、顆粒細胞が GL に達した時に最盛期を迎える。

これまでに、トポ II が作用するゲノム領域は、核スカフォールド/マトリックス結合領域 (S/MAR) に近接しているとの報告がなされているが、この事実がどの程度まで一般化できるのかについては未だ明らかになっていない。

本研究では、生後 10 日目のラットの小脳組織切片を、ゲノム DNA にトポ II を特異的に架橋する薬剤であるエトポシドで処理した後に、免疫沈降法でトポ II β が標的とするゲノム領域を濃縮した。DNA を精製してからクローニングし、核から調製した核スカフォールド/マトリックス画分 (NS/M) および NS/M の構成タンパク質の一つ、hnRNP U/SAF-A/SP120 との相互作用を *in vitro* 結合反応で調べた。その結果、クローニングされたトポ II β 作用部位 DNA は AT に富み、NS/M と SP120 どちらにもよく結合するが、両者との結合能の間には相関関係がなかった。これにより、NS/M との結合には SP120 以外の因子も関わっている可能性が示唆された。

標的クローンは A または T の連続配列モチーフ (A/T-patch と命名) にも富んでおり、A/T-patch のカバレッジと NS/M への結合能との間に正の相関があった。また、トポ II β /SP120 相互作用部位は S/MAR 近傍に限らず、染色体ループ領域にも多く存在することが明らかになった。

[材料と方法]

トポ II β 標的ゲノム断片の分離

生後 10 日目の Wistar ラットから取り出した小脳から厚さ 1 mm の組織切片を切り出し、100 μ M のエトポシドを含む培地中で 2 時間インキュベートした (37°C の CO₂ インキュベーター内)。その組織を 3 ml の 1% sarkosyl 中でホモジナイズした後、終濃度 0.5 M になるように CsCl を加え、超音波処理をおこない、遠心分離で不溶性画分を取り除いた。可溶性画分をトポ II β 特異的モノクローナル抗体で免疫沈降し、沈降物に含まれる DNA を精製した。

トポ II β 標的ゲノム断片のクローニングと配列決定

エトポシド処理をした小脳組織切片からのトポ II β 免疫沈降で得られた DNA をプラスミド (pZEr0-2.1) に直接クローニングして、400 クローンのライブラリを作成した。ベクタープライマーによる PCR でインサート配列を増幅し、両端の配列を決定し、UCSC rat genome (rn3) の Blat search を用いてゲノムポジションと内部配列を推定した。ユニークにゲノムにマップされた 279 クローンを解析に用いた (以下、標的クローン)。そのうち、48 クローンのインサート全配列をシーケンシングして確認し、調製した NS/M、精製した SP120 との *in vitro* 結合反応に用いた。

トポ II β 標的クローンと核スカフォールド/マトリックスの結合親和性の定量的評価

LIS (Lithium diiodosalicylate) 法に基づき NS/M を調製し、標的クローンとの *in vitro* 結合反応をおこなった。標的クローンに制限酵素 (*EcoRI*, *XhoI*) 処理をしてインサートを切り出した後、³²P で末端を標識し、超音波処理で断片化した大腸菌 DNA とプラスミド pUC18 を 20:1 の割合で混合した非標識 competitor 存在下で NS/M と反応させた。NS/M と結合した DNA 断片を遠心分離で分画し、精製した後、ポリアクリルアミドゲルで展開し、オートラジオグラフィでバンドを検出した。370 bp のマウスの Ig κ 遺伝子の S/MAR を含むプラスミド (pAR1) をコントロールとした。NS/M への相対的親和性は、パイロット実験で決定した 0.4 mg/ml の非ラベル competitor 存在下・非存在下での、NS/M に結合した DNA 断片のバンド密度の比から算出した。

マトリックス・ループ分配法 (matrix-loop partitioning assay) では、まず、精製した細胞核から LIS 法で核ハローを調製した。次に核ハローを制限酵素 (*EcoRI*, *HindIII*, *PstI*) 処理し、DNA をマトリックス結合画分 (M) とループ DNA 画分 (L) に分離した。それぞれから精製した DNA を鋳型とし、標的クローン特異的プライマーを用いて PCR をおこなった。10、15、20、25、30 サイクル終了後の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で展開し、相対的なコピー数をバンドのデンストメトリーで決定した。

組換え体 His-Myc-SP120 の調製

pColdII-Myc-SP120 は、Myc SP120 の cDNA を pCMV-Myc-SP120 から PCR で増幅し、pColdII 発現ベクターにサブクローニングして構築した。構築したプラスミドで大腸菌 (JM109) をトランスフォームし、1 mM IPTG 存在下で 15°C のコールドショックを与えて His-Myc-SP120 を発現させた。発現タンパク質は、Ni-NTA アガロースビーズ (Qiagen) を用いて精製した。精製は 0.5 M NaCl 存在下でおこなった。

組換え体 SP120 とトポ II β 標的クローンを使った結合反応

DNA 結合反応では、磁気ビーズ (Dynabeads protein G) 上に抗 SP120 抗体を介して固定化した His-Myc-SP120 と、制限酵素処理によりインサートがベクターから切り出された状態の標的クローンを攪拌しながら反応させ、タンパク質に結合した DNA と結合しなかった DNA を磁石で分離した。ビーズ画分のタンパク質をプロテイナーゼ K で消化し、DNA をアガロースゲル電気泳動で展開し、エチジウムブロマイドで染色し、DNA バンドをデンストメトリーで

定量した。

蛍光 DNA 結合反応では、まず 5 末端が FITC でラベルされた M13-primer で標的クローンからインサート DNA を増幅した後、QIAquick(Qiagen)で精製した。蛍光ラベルされた DNA を、モル比で 10 倍量のラベルされていない線状 pUC18 (competitor) 存在下で、磁気ビーズ上に固定した His-Myc-SP120 と攪拌しながら反応させた。反応後、プロテイナーゼ K 処理をおこない、10 mM の NaOH で希釈した後、ビーズを磁石で分離し、マイクロプレート蛍光光度計 (Genios, TECAN) で結合した DNA 量を蛍光測定した。

[結果]

トポ II β 標的ゲノム断片の分離

生後約 10 日目のラットでは、小脳皮質を構成する主要な神経細胞である顆粒細胞が顆粒層 (GL) への移動を終え、その場でトポ II β の発現が最盛期を迎える。そこで、生後 10 日目のラットの脳組織切片を 100 μ M のエトポシドで処理してトポ II β をその時点で作用対象となっているゲノム DNA に架橋させた後、トポ II β 特異的抗体で免疫沈降をおこなった。得られた DNA 断片をプラスミドに直接クローニングし、トポ II β 標的クローンのライブラリを作成した (標的クローン)。ライブラリからランダムに選びだして配列を決定し、*in vitro* 結合反応に使用した。

トポ II β 標的ゲノム断片は AT-rich であり、A/T-patch にも富んでいる

標的クローンと全ゲノムの GC 含量の分布を比較したところ、標的クローンの配列は著しく AT-rich であった。標的クローンには A または T の連続配列モチーフ (A/T-patch) が頻繁に見受けられたので、ラットのゲノムからランダムに選んだ配列と比較したところ、A/T-patch のカバレッジは標的クローンでは常に高く、patch の長さが 2 から 5 の間にある時、全ゲノムとの差は特に有意だった。そこで、A/T-patch の長さを 2-5 と定義して標的クローンの配列での A/T-patch カバレッジの分布を全ゲノムでのそれと比較すると、高度な統計的有意性をもって標的クローンが高かった。

トポ II β 標的ゲノム断片はゲノム上の AT-rich で遺伝子が少ない領域に位置する

標的クローンのゲノム上での位置を調べたところ、ランダムに選んだゲノム領域と比べて遺伝子間領域に位置する傾向が強かった。更に、ラットゲノムの遺伝子間領域を、長さや GC 含量に基づき分類したところ、標的クローンは長くて AT-rich な遺伝子間領域 (LAIR) に位置する傾向が見られた。LAIR は、しばしばトポ II β に誘導される神経関連遺伝子に隣接しており、このことが遺伝子発現制御に重要であることが示唆されている。また、これらの遺伝子には、遺伝子長が長く AT-rich であるものが多い (LA 遺伝子)。そこで、標的クローンを含む LAIR に着目したところ、これらは高頻度に LA 遺伝子に隣接していた。

トポ II β 標的ゲノム断片と核スカフォールド/マトリックスとの会合

分離核から調製した NS/M に対する標的クローンの結合能を定量的に評価するため、非特異的な competitor 存在下での *in vitro* 結合反応をおこなった。標的クローンから制限酵素で

インサートを切り出し、³²P で標識し、NS/M と反応させ、NS/M と結合した DNA 断片をオートラジオグラフィで検出した。NS/M に結合した断片の量は、NS/M への親和性を反映する。

まず、無作為に標的クローンを選んでパイロット実験をおこない、至適な competitor 量を 0.4 mg/ml と決定した。次に、この量の competitor 存在下で 37 個の標的クローンと NS/M との結合反応をおこなった。NS/M への親和性を input との比較で評価したところ、標的クローンは概して NS/M によく結合したが、親和性の程度はクローン間でかなり異なることから、標的クローンは NS/M への親和性が異なる集団で構成されていることが明らかになった。結合反応に用いた標的クローンの A/T-patch カバレッジと NS/M への親和性を両軸にプロットすると、中程度に有意な正の相関が見られた。

さらに、標的クローンの NS/M への分配比をマトリックス・ループ分配法で調べた。それぞれの標的クローンに特異的なプライマーを設計し、マトリックス画分 (M) 対ループ画分 (L) の分配比 (M/L 比) を PCR で決定した。次に、M/L 比をマトリックス画分への DNA 結合の割合に変換し、上に述べた NS/M 結合反応の結果に対してプロットしたところ、これら 2 つの実験結果は高度な相関関係にあった。

トポ II β 標的ゲノム断片と hnRNP U/SAF-A/SP120 との結合

NS/M タンパク質 SP120 の標的クローンへの結合能を試験管内 DNA 結合反応で調べた。磁気ビーズ上に固定した SP120 と、制限酵素でインサートを切り出した状態の標的クローンを反応させ、ビーズに結合した DNA を磁石で分離し、分離した DNA と input DNA をアガロースゲル電気泳動で展開して比較した。切り出されたベクターは competitor の役割を果たす。古典的な S/MAR である Fushitarazu は SP120 とよく結合したが、インサートが S/MAR ではない様々な種類のコントロールプラスミドではインサートの結合はみられず、その代わりにベクター断片が結合した。このベクターとインサートとの間の相互排他的な結合は、SP120 が S/MAR と非 S/MAR を高い感度で区別していることを意味する。標的クローンで同様の実験をおこなったところ、すべてのクローンでインサートへの結合が見られた。

さらなる定量的な解析のため、標的クローンのインサートを FITC 標識されたプライマーで増幅し、標識されていない competitor (線状 pUC18) 存在下で、磁気ビーズ上に固定した SP120 との結合反応をおこなったところ、ほとんどの標的クローンは input の 20-30% が結合されるという高い結合能をもち、NS/M との結合とは異なり狭い親和性分布を示した。

[考察]

本研究ではまず、生後 10 日目のラットの脳組織切片から、トポ II β が作用する DNA 領域をクローニングした (標的クローン)。標的クローンの配列は極めて AT-rich であるだけでなく、A または T の連続配列モチーフ (A/T-patch) に富んでおり、patch の長さが 2 から 5 の時、全ゲノム配列とのカバレッジの差が特に有意であった。従って、この程度の短い配列モチーフが特別な機能をもっていることが示唆された。

標的クローンは、ゲノム上の遺伝子砂漠と呼ばれる、AT-rich で長い遺伝子間領域 (LAIR) に位置する傾向があった。このトポ II β が標的とする LAIR は、我々が以前報告した LA 遺伝子と高頻度に隣接しており、本研究で同定されたトポ II β の標的 LAIR のほとんど (21 個中

20 個) が、この時期 (生後 7 日目から 14 日目) のマウス小脳で発現する LA 遺伝子と隣接していた。したがって、この作用部位が実際に隣接遺伝子の発現調節に関与していることが考えられる。

これまでにトポ II の作用部位と核スカフォールド/マトリックス結合領域 (S/MAR) が近接していることが報告されている。そこで、標的クローンと核スカフォールド/マトリックス (NS/M) との結合を *in vitro* 結合反応で調べたところ、概してよく結合するものの、その親和性は広い範囲に分布した。標的クローンの A/T-patch のカバレッジと NS/M への結合能をプロットしたところ、正の相関が見られたことから、トポ II β 標的クローンの NS/M への結合にも A/T-patch 構造が関わっていることが明らかになった。

マトリックス・ループ分配法により算出した標的クローンの NS/M への分配比を NS/M への結合割合 (%) に変換し、*in vitro* NS/M 結合反応の結果とプロットしたところ、強い正の相関が見られた。この独立した 2 つの実験から得られた結果の相関関係は、トポ II β 標的サイトと S/MAR の相対的な距離は一定ではないことを明確に示し、これまでの報告で示されているような、トポ II の作用部位が常に NS/M に近接しているとの印象とはかなり異なる概念を提示する。

NS/M の構成タンパク質の一つ、hnRNP-U/SP120 とトポ II β 標的クローンとの結合を *in vitro* 結合反応で調べたところ、いずれの標的クローンも SP120 とよく結合し、NS/M への結合と異なり、クローン間で結合能の違いは少なかった。この結果は、トポ II β の標的ゲノム部位が常に SP120 結合サイトの近くに存在することを示す。

SP120 と DNA との結合様式は勝者総取り方式 (winner take all) であった。これは SP120 をビーズの表面上に固定することにより促進された協同作用 (cooperativity) によるものと考えられる。トポ II β 標的領域を含む LAIR には、SP120 と協同的な相互作用をおこなう複数のサイトが存在するのかもしれない。

近年、NS/M の動的な性質が着目されている。本研究で明らかになった、トポ II β と SP120 が相互作用する領域の NS/M への親和性は NS/M のダイナミックな性質を反映しており、A/T-patch がこの挙動を制御する因子のひとつではないかと考えられる。

[結論]

クローニングした *in vivo* のトポ II β 標的 DNA は AT-rich であるだけでなく、A または T の連続配列モチーフ (A/T-patch) に富んでおり、核スカフォールド/マトリックス、核スカフォールド/マトリックスタンパク質 hnRNP-U/SP120 とよく結合した。核スカフォールド/マトリックスとの親和性の広範な分布は、この核内構造のダイナミックな挙動を反映しており、その挙動に A/T-patch が大きく関わっていることが示唆された。