

- 1) Wächtershäuser, G. (2007) *Chem. Biodivers.*, 4, 584–602.
- 2) Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., & Johnson, M.K. (2005) *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 247–281.
- 3) Lill, R. (2009) *Nature*, 460, 831–838.
- 4) Dey, A., Jenney, F.E., Jr., Adams, M.W., Babini, E., Takahashi, Y., Fukuyama, K., Hodgson, K.O., Hedman, B., & Solomon, E.I. (2007) *Science*, 318, 1464–1468.
- 5) Takahashi, Y., Mitsui, A., Hase, T., & Matsubara, H. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 2434–2437.
- 6) Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., & Dean, D.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 13264–13272.
- 7) Nakamura, M., Saeki, K., & Takahashi, Y. (1999) *J. Biochem.*, 126, 10–18.
- 8) Takahashi, Y. & Tokumoto, U. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 28380–28383.
- 9) Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K., & Takahashi, Y. (2004) *J. Biochem.*, 136, 199–209.
- 10) Giel, J.L., Rodionov, D., Liu, M., Blattner, F.R., & Kiley, P.J. (2006) *Mol. Microbiol.*, 60, 1058–1075.
- 11) Mihara, H. & Esaki, N. (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 12–23.
- 12) Kakuta, Y., Horio, T., Takahashi, Y., & Fukuyama, K. (2001) *Biochemistry*, 40, 11007–11012.
- 13) Shimomura, Y., Kamikubo, H., Nishi, Y., Masako, T., Kataoka, M., Kobayashi, Y., Fukuyama, K., & Takahashi, Y. (2007) *J. Biochem.*, 142, 577–586.
- 14) Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., & Takahashi, Y. (2008) *J. Mol. Biol.*, 383, 133–143.
- 15) Wada, K., Sumi, N., Nagai, R., Iwasaki, K., Sato, T., Suzuki, K., Hasegawa, Y., Kitaoka, S., Minami, Y., Outten, F.W., Takahashi, Y., & Fukuyama, K. (2009) *J. Mol. Biol.*, 387, 245–258.

高橋 康弘¹, 和田 啓², 福山 恵一²

(¹ 埼玉大学大学院理工学研究科分子生物学領域)

(² 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻)

Biogenesis of iron-sulfur clusters mediated by complex machineries

Yasuhiro Takahashi¹, Kei Wada², and Keiichi Fukuyama²
 (¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, 255 Shimo-Okubo, Sakura-ku, Saitama City 338-8570, Japan; ²Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan)

ゲノム DNA の核内配置と遺伝子発現制御

1. はじめに

細胞核には、核小体、promyelocytic leukemia (PML) ボディー、核スペckルなどのいわゆる核ボディーをはじめとした種々の構造物に加え、いうまでもなくゲノム DNA が収納されている。これら核を構成する構造物の核内での配置、いわば核構造は分化、組織特異的機能など細胞の状態と密接に関連していることが分かりつつある^{1,2)}。特に、ゲノム DNA はヒトでは全長2メートルにもおよぶ巨大な構造物であり、これを直径10ミクロンほどの細胞核にどのように収納するかというのは生物にとって非常に重要な問題であるといえる。単一のゲノム DNA 配列から発生、分化、恒常性維持など異なる生命現象の局面に応じて異なる遺伝子群を発現する機構として、近年 DNA メチル化、ヒストン修飾などのエピジェネティック修飾が注目されている。このエピジェネティック修飾制御とゲノム DNA の核内配置が密接に関連することで遺伝子発現調節を行っているとする報告が散見されつつある³⁾。本稿では、徐々に明らかになりつつあるゲノム DNA の核内配置と機能との関連に関する最新の知見を紹介するとともに、我々の研究についても言及したい。

2. 染色体の核内相対的配置

細胞周期の間期における染色体は、通常イメージされる凝縮した X 字型ではなく、ある特定の領域を占め他の染色体とは混じり合わない塊として存在する (図 1A)。この間期細胞核において個々の染色体が占有する固有の領域は染色体テリトリー (chromosome territory) と定義される。各染色体特異的プローブによる蛍光 *in situ* hybridization (FISH) いわゆる染色体ペインティング法の開発により各染色体を区別して可視化できるようになり、染色体テリトリーの核内配置にはある規則性が存在する、すなわちノンランダムであることが分かっている²⁾。

異なる染色体間の距離は細胞種特異的であることが知られている。例えば、マウス肝細胞では染色体5番と6番は、12番と15番よりも高い確率で隣接しているが、リンパ球ではこれとは逆の傾向が認められる⁴⁾。ヒトの脂肪細胞では、分化に伴い染色体12番と16番とが隣接する頻度

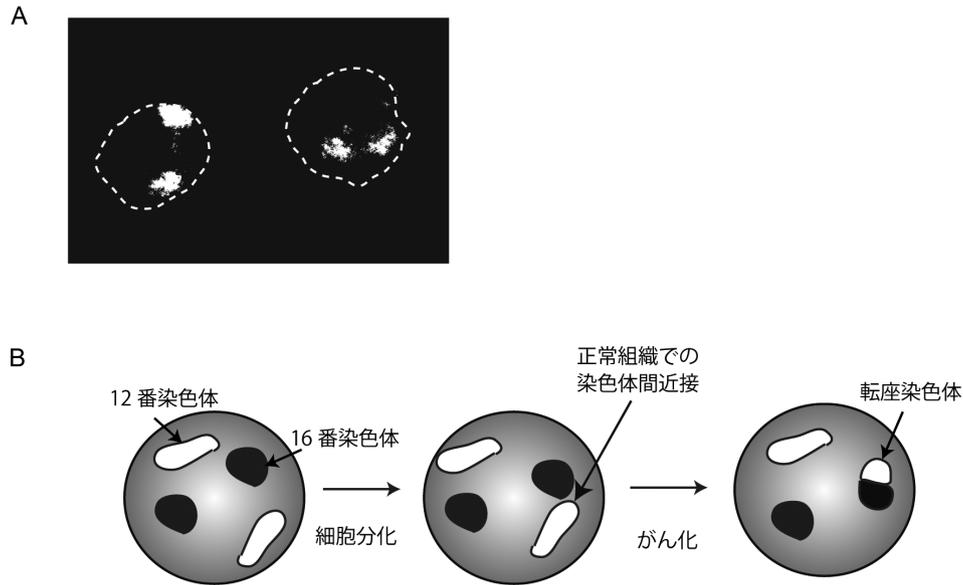


図1 間期細胞核における染色体配置

- A. マウス2番の染色体テリトリー。間期細胞核では、染色体は図のような塊状の構造物として存在する。点線は核の輪郭。
- B. 脂肪細胞分化における染色体隣接と転座。脂肪細胞分化に伴い正常細胞においても12番と16番の染色体は有意に近接している。脂肪肉腫では、12番と16番の染色体転座が高頻度に認められる。

が高くなる³⁾。ここで興味深いのはそれぞれの正常組織における染色体隣接の頻度と腫瘍細胞でみられる染色体転座の頻度に関連がみられることである。すなわち、肝細胞がんでは染色体転座t(5;6)、リンパ腫ではt(12;15)、脂肪肉腫ではt(12;16)が、高頻度に認められる(図1B)。この正常組織での相対的染色体配置と腫瘍組織での染色体転座頻度の密接な関連を支持するように、ほ乳類細胞では二重鎖切断された断片の動きがきわめて制限されていることが報告されている⁶⁾。すなわち、染色体転座は二重鎖切断の誤った修復結果であるが、ほ乳類細胞では二重鎖切断の断端は核内を激しく動き回ることではないため、近接する染色体との染色体転座が必然的に高くなると考えられる。

一般的に、ほ乳類細胞では相同染色体同士の会合はまれであり、特殊な場合に限定されている。機能的意義が最も解析されている相同染色体間での会合の一例としてX染色体の会合が挙げられる。ほ乳類の雌細胞では、2本あるX染色体のうち一方は不活性化され凝縮しているが、この不活性化の過程においてはX染色体が2本あることを確認し片方のみ不活性化するいわゆるカウンティングが必要なことが知られている。この相同染色体を感知する機構に、X染色体同士の一時的な会合が関与している⁷⁾。また

最近、その機構に胎生幹細胞(ES細胞)の未分化性維持に寄与しているOct4とCCCTC結合因子(CTCF)が重要な役割を果たしていることが明らかにされている⁸⁾。さらに、父、母どちらか一方由来のアレルのみ特異的に発現する現象である常染色体上遺伝子のインプリンティングにおいても、相同領域の会合がCTCF依存的に起こることが報告されており、相同染色体間あるいは領域間の会合が、片アレル発現を制御する共通のメカニズムとして機能している可能性が示唆される⁹⁾。

3. 異なる遺伝子間での会合

異なる遺伝子間の会合が遺伝子発現調節機構に関与している例が多く報告されている^{1,2)}(図2A)。RNAポリメラーゼII(RNAPII)は、核内では複数の分子が集合し数百個のフォーカスを形成しているが、Osborneら¹⁰⁾は、マウス染色体7番上で25~40 Mb離れた位置にコードされる四つの遺伝子が組織特異的に転写される際、高頻度で同一のRNAPIIフォーカス上に共局在することを示した(図2A)。ウイルス感染に応答したNF-κB依存性のインターフェロンβ(IFN-β)転写誘導は、NF-κB結合配列を有する他の遺伝子との会合が必要であることが報告されている。特殊

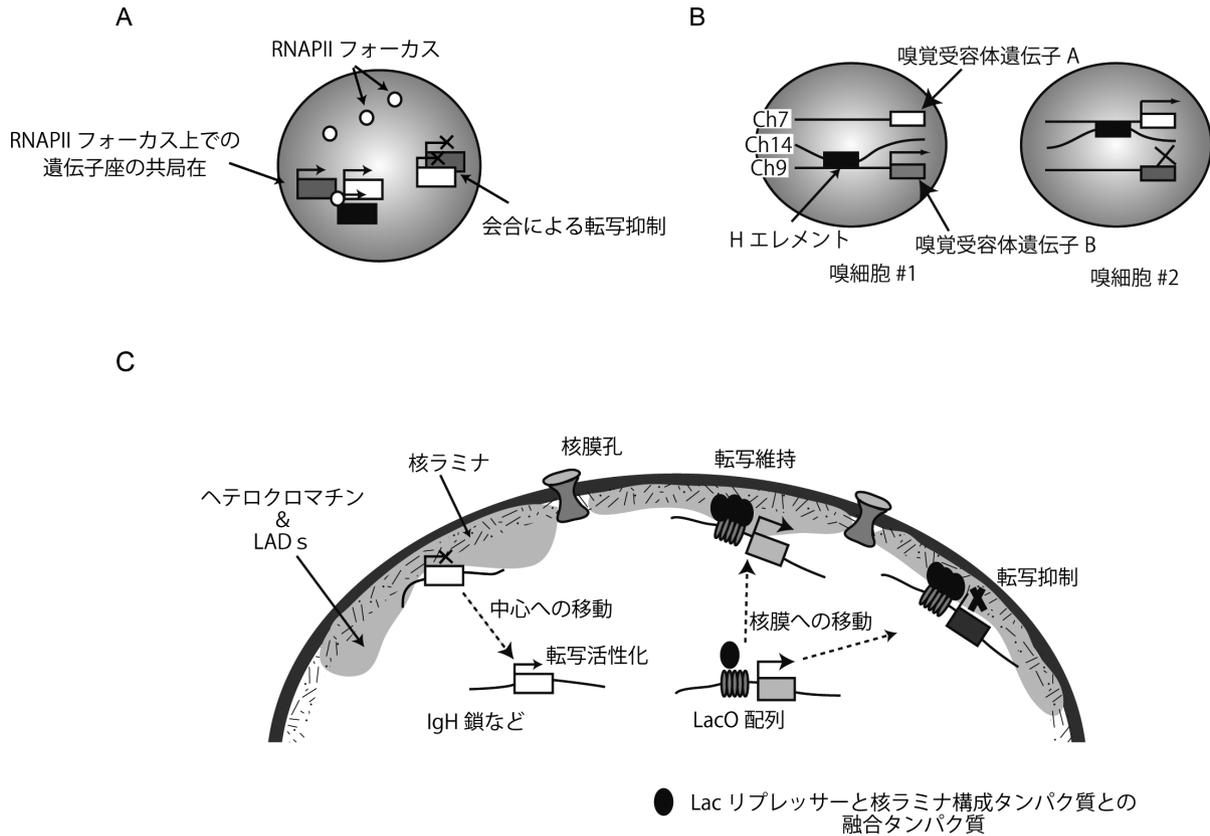


図2 遺伝子座の核内配置

- A. 遺伝子座会合による転写調節. RNA ポリメラーゼ II (RNAP II) は、核内で数百個のフォーカスを形成しているが、組織特異的遺伝子が高頻度に同一の RNAP II フォーカス上に共局在し、転写されることが報告されている。一方、遺伝子間の会合は転写抑制とも関連があることが知られている。
- B. 嗅覚受容体遺伝子の遺伝子間会合による転写誘導のモデル. ゲノム上に2箇所のみ存在する H エlement と標的嗅覚受容体遺伝子が会合することで、多数の遺伝子から一つの遺伝子が選択され発現誘導されると提唱されている。
- C. 核膜上での転写調節. 核膜周辺には核ラミナが存在しヘテロクロマチンや lamina-associated domains (LADs) と称される領域が集積している。IgH 鎖などの遺伝子は、転写抑制状態では核膜に存在し、発現誘導に伴い核中心部へと移動することが報告されている。一方、LacO 配列と Lac リプレッサーと核ラミナ構成タンパク質との融合タンパク質を用いて、人工的に染色体の一部を核膜へ移動させると、転写抑制がみられる一方、転写が維持される遺伝子も存在する。

な例では、ほ乳類のゲノム上に千余り存在する嗅覚受容体遺伝子から単一の遺伝子座を活性化する機構として、ゲノム上に2箇所のみ存在する H エlement が標的嗅覚受容体遺伝子座と会合することが重要であることが示されている (図 2B)。このように、異なる遺伝子座間での会合は転写活性化機構と関連していることが示されている一方、転写抑制にも関与していることが示唆されている。T リンパ球のサブセットである Th1 細胞と Th2 細胞は共通の前駆細胞から分化し、それぞれ特異的に IFN- γ とインターロイキン-4 (IL-4) を発現するが、両遺伝子が発現抑制されている前駆細胞では IFN- γ と IL-4 の遺伝子座が高頻度で会

合しているのに対し、細胞分化に伴い、それぞれの遺伝子を発現するようになるとその頻度が減少する。すなわち、IFN- γ と IL-4 の会合と両者の転写抑制状態に関連があると考えられる (図 2A)。

多くの遺伝子座間での物理的相互作用が報告されるようになった背景に、クロマチン間のクロスリンクと PCR を組み合わせて隣接するクロマチンを検出する手法である chromosome conformation capture (3C) 法の開発が挙げられる。網羅的解析を可能とするため本法に改良を加えた circular 3C (4C) 法や carbon-copy 3C (5C) 法が開発されており、今後これらの手法を利用してさらに多くの遺伝子

間相互作用が報告されると思われる。そして、多くの例が報告されるのに伴い遺伝子間相互作用の分子基盤も更に分明になっていくと期待される。

4. ゲノム DNA の放射状配置

細胞核内で最もシンプルなゲノム配置解析に、細胞核の半径に比した核中心部からの距離（放射状配置）の測定がある。染色体テリトリーの放射状配置では、大きい染色体は核膜周辺部に、小さな染色体は中心部に位置することが知られている。また、大きさが近い染色体の場合、遺伝子密度の高い染色体が中心部付近に、低い染色体は核膜周辺部に存在している²⁾。

このようなゲノム DNA の放射状配置を決定している機構は何であろうか。その基盤をなす核構造物として核膜が挙げられる。特に核膜の内側を裏打ちしている核ラミナにはヘテロクロマチン構成タンパク質である HP1 やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が会合することが知られ、電子顕微鏡による観察でも密度の高いクロマチンの集積を認めることなどから、ほ乳類細胞の核膜周辺のクロマチンは転写抑制性でありヘテロクロマチン化していると考えられている。これと一致するように、免疫グロブリン H (IgH) 鎖、 β グロビン、*Mash-1* 遺伝子など組織特異的に発現される遺伝子は、発現していない未分化な細胞では核膜に近接して位置するものの、分化に伴う発現誘導に一致して核の中心近くへと位置を変えることが示されている (図 2C)。また、核膜内側の裏打ち構造である核ラミナに局在するゲノム領域の解析によると、ラミナ会合領域すなわち lamina-associated domains (LADs) は、ヒトゲノム上に 1,000 箇所以上存在し、遺伝子密度が低く AT 含量が高く一般的に遺伝子発現活性の低い領域であり¹¹⁾、核膜周辺が転写抑制性であるという上記の見解と一致するものであった。真核生物ゲノムに lac オペレーター (lacO) 配列を人工的に挿入し、lac リプレッサーと目的タンパク質との融合タンパク質を発現させると、その融合タンパク質を lacO 配列に集積させることができる。この技術を用いて、lacO 配列を挿入したほ乳類細胞に、核ラミナ構成タンパク質と lac リプレッサーとの融合タンパク質を発現させると、数回の細胞分裂を経て lacO 挿入部位を核ラミナすなわち核膜周辺に人工的に移動することができる¹²⁾。このようにして人工的にゲノムの配置を変換し、その一部を核膜に繫留しその部位の転写活性を検討した報告では、転写抑制される遺伝子とされない遺伝子が認められ、核膜近傍に遺伝子が存在するだけでは転写抑制には不十分であること

が確認された¹²⁾ (図 2C)。このことは、核膜が必ずしも一様な構造物として転写抑制性に機能する訳ではないことを示している。特に核膜における転写制御の多様性に寄与しうる因子として核膜孔が挙げられる。核膜孔は酵母では転写活性化やゲノムの活性領域を分けるバウンダリーエレメント形成に関与しており、ほ乳類細胞でも遺伝子プロモーター領域の核膜孔への局在が報告されている。今後、ほ乳類細胞での核膜孔の転写制御への関与解明が期待される。

5. 核中心部付近での GFAP 遺伝子座の核内放射状配置

核周辺部には転写制御に関わる因子が集積していることから、遺伝子座が核膜周辺部に存在することと遺伝子の転写状態とは関連があると考えられるが、核膜を離れて中心付近に存在する場合はどうであろうか。中心付近に存在する場合でも、放射状配置と転写活性に関連が認められるであろうか。これに関し最近我々は、神経膠細胞であるアストロサイト特異的に発現する遺伝子、グリア線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein: GFAP) の核内放射状配置とその転写活性に関連があることを示すデータを得たのでここに紹介したい。

脳を構成する主要な細胞種であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのうち最も細胞数が多いのがアストロサイトである。我々は、これまでに脳発生期に神経幹細胞からアストロサイトが分化する過程において、アストロサイト特異的遺伝子 GFAP のプロモーター領域の特異的転写因子結合配列中に存在する CpG のシトシンが脱メチル化されることがアストロサイトの分化時期の調節に決定的な役割を果たしていることを明らかにした¹³⁾。この神経幹細胞からのアストロサイト分化過程で、GFAP 遺伝子の発現が変化するのに伴いその遺伝子座の核内配置がどのように変化するかを調べる際に、初代培養アストロサイトにおいて GFAP 遺伝子が主に片アレルから発現していることを見いだした¹⁴⁾。片アレル発現している遺伝子に一般的に認められる特徴として、S 期の複製時期がアレル間でシンクロナイズしていない、すなわち片方のアレルが S 期の早期に、もう一方のアレルが後期に複製されることが知られている。GFAP 遺伝子座の複製時期もアレル間で異なっており片アレル発現を支持する結果であった。さらに、GFAP プロモーター制御下に β -ガラクトシダーゼを発現するノックインマウス¹⁵⁾ と野生型マウスを掛け合わせたヘテロ接合型マウス由来のアストロサイトを用いて、タンパク質レベルで GFAP が片アレル発現していること、またそのアレル選択は父型、母型由来アレルが混在

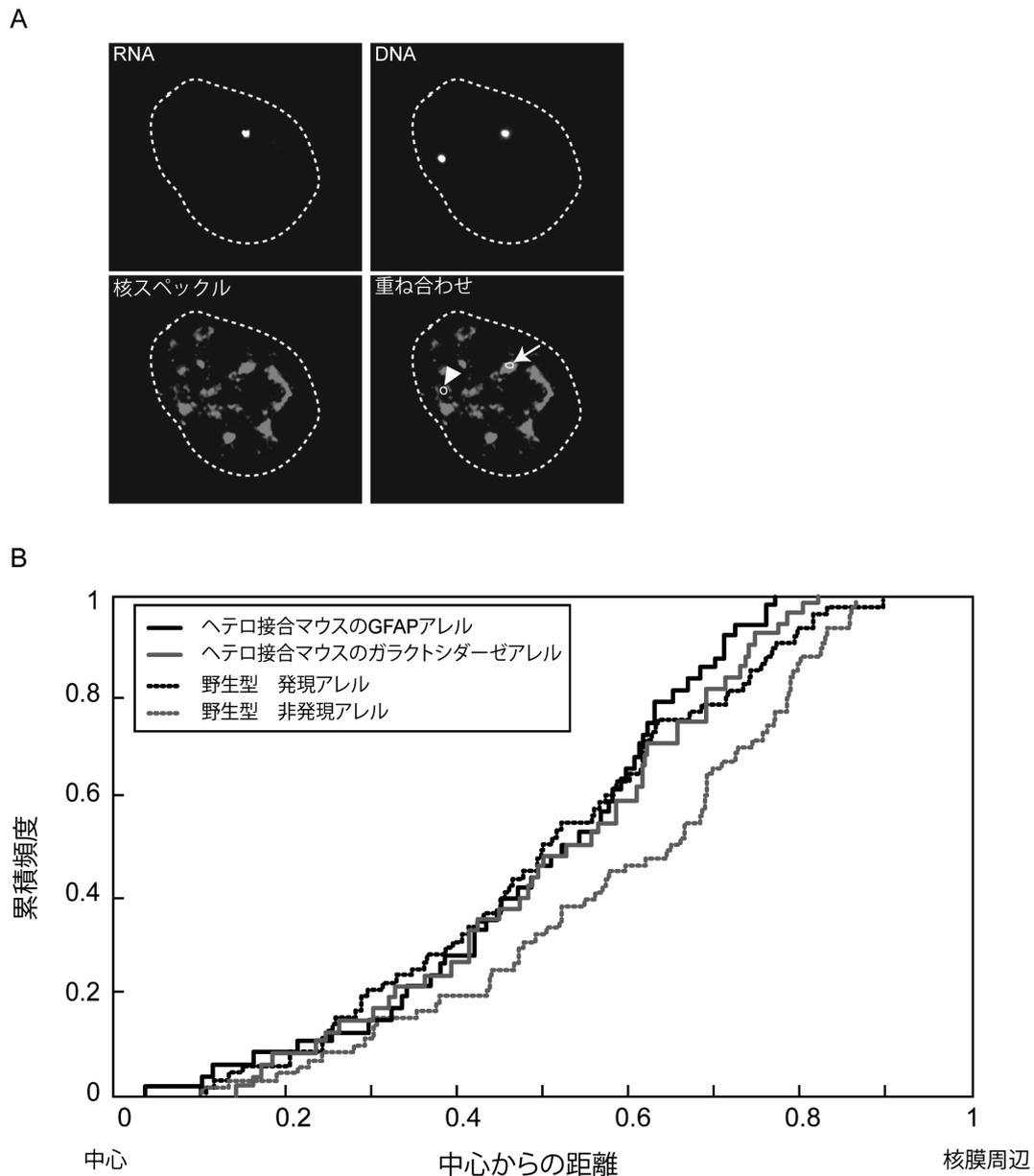


図3 GFAP 遺伝子座の核内配置

- A. GFAP の RNA FISH/DNA FISH および核スペックルの染色像. GFAP 遺伝子は, 培養アストロサイトにおいて片アレル発現しており, 発現アレル (RNA シグナル陽性) は核スペックルに局在していた. 点線は, 核の輪郭. 重ね合わせ画像内の白色円は GFAP 遺伝子座の位置. 矢印は発現アレル, 矢頭は非発現アレル.
- B. GFAP 遺伝子座の放射状配置. GFAP を片アレル発現している細胞において, 発現アレル (黒破線) は非発現アレル (灰色破線) に比べより核の中心近くに位置していた. GFAP の β -ガラクトシダーゼノックインマウスのヘテロ接合体由来アストロサイトにおいて, 両アレル発現している細胞の野生型アレル (GFAP アレル, 黒実線) とガラクトシダーゼアレル (灰色実線) の放射状配置は, 片アレル発現している細胞の発現アレル (黒破線) と同様であった. 縦軸は累積頻度, 横軸は中心から核膜までの相対的距離.

しておりインプリンティングではなく、いわゆるランダム片アレル発現 (random monoallelic expression) であることを確認した。クローン解析では、ほとんどのクローンにおいて分裂後も同じアレルから *GFAP* を発現しており、活性化アレルのパターンは細胞分裂を経ても保たれることが分かった。しかし、興味深いことに10%程度のクローンでは、細胞分裂により発現アレルが入れ替わっており、発現アレルの維持は緩やかな制御によると考えられた。

ここまでの検討から、筆者らは *GFAP* 遺伝子座が片アレル発現しているため転写の有無と核内配置を検討するよい対象となると考えた。すなわち、対立アレルは染色体のDNA配列上はほぼ同じ環境にあるため、片アレル発現している遺伝子座の対立アレル間での核内配置の差異を検討することで、転写活性と密接に関連した遺伝子座の核内配置が見いだせることが期待された。

一部の遺伝子において転写抑制状態では遺伝子座が構成的ヘテロクロマチンである傍セントロメアヘテロクロマチンと共局在することが報告されているが、*GFAP* 遺伝子座の発現、非発現アレルは共に、ヘテロクロマチンへの局在は認められなかった。また、*GFAP* がコードされる染色体(マウスでは11番染色体)の染色体ペインティングと *GFAP* に対するRNA/DNA FISHを同時に施行し染色体テリトリーに対する相対的配置を検討すると、両アレルとも染色体テリトリーの外側縁に位置しアレル間での差異はなかった。一方、核ボディーとの関連ではPMLボディー、核小体との局在はみられなかったが、核スペckルへの発現アレルの局在が認められた(図3A)。核スペckルは、転写、スプライシングに関与する因子を貯蔵、供給していると考えられている核ボディーの一つであり、イントロン依存性に、転写されている遺伝子が局在することが既に報告されている。では、放射状配置はどうであろうか。*GFAP* の遺伝子座はアストロサイト分化に伴い核の内側へと移動していた。また、アストロサイトでは両アレルとも核中心近くに位置するにもかかわらず、発現アレルと非発現アレルを比べると発現アレルの方がより中心に位置することが分かった¹⁴⁾(図3A, B)。興味深いことに、前述の *GFAP* ノックインマウスのヘテロ接合体では、約20%のアストロサイトが *GFAP* を両アレルから発現しているが、これらの細胞のアレル(内在性 *GFAP* 発現アレルおよびβ-ガラクトシダーゼ発現アレル)の放射状配置は、片アレル発現している細胞の発現アレルと同様であり、発現しているアレルは片アレル発現の有無にかかわらず、より内側へ配置していることが示された(図3B)。また、同様の傾向

は同じくランダムに片アレル発現していることが報告されている *IL-4* でも認められ、*GFAP* に限定された現象ではないことが分かった。

6. おわりに

GFAP で認められた細胞膜や核膜孔という転写制御装置がない核中心付近における放射状配置の差は何を意味するのであろうか。筆者らの見いだした発現アレルのより内側への配置も、一つ一つの細胞をみると非発現アレルが発現アレルよりも内側に位置する細胞も認められる。このことに加え、筆者らが検討した範囲内では *GFAP* の相同アレル間での会合は認められなかったため、アレル間で相互の位置を感知する機構は存在しにくいと考えられることから、内側に位置するアレルが選択され転写されるのではなく、転写されているアレルが内側に引き寄せられる機構が存在しているのではないかと考えている。実際に、転写活性化に伴いアクチン・ミオシン依存的に遺伝子座が移動することが報告されており、このような機構の存在を支持している。しかし、核内の遺伝子座配置を能動的に変動させる機構については、いまだコンセンサスが得られておらず、これを解き明かすことは大きな課題であるといえる。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、主に米国 National Institutes of Health の Tom Misteli 博士の下で行われた。本研究は、東京医科歯科大学 田賀哲也教授、および筆者の現所属研究室 中島欽一教授のもとでの研究を基礎としており、両教授および他の共同研究者の方々に改めて深謝いたします。

- 1) Takizawa, T., Meaburn, K.J., & Misteli, T. (2008) *Cell*, 135, 9–13.
- 2) Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., & Cremer, T. (2007) *Nat. Rev. Genet.*, 8, 104–115.
- 3) Takizawa, T. & Meshorer, E. (2008) *Trends Neurosci.*, 31, 343–352.
- 4) Parada, L.A., McQueen, P.G., & Misteli, T. (2004) *Genome Biol.*, 5, R44.
- 5) Kuroda, M., Tanabe, H., Yoshida, K., Oikawa, K., Saito, A., Kiyuna, T., Mizusawa, H., & Mukai, K. (2004) *J. Cell Sci.*, 117, 5897–5903.
- 6) Soutoglou, E., Dorn, J.F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G., & Misteli, T. (2007) *Nat. Cell Biol.*, 9, 675–682.
- 7) Chow, J. & Heard, E. (2009) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 21, 359–366.
- 8) Donohoe, M.E., Silva, S.S., Pinter, S.F., Xu, N., & Lee, J.T.

- |||||
- (2009) *Nature*, **460**, 128–132.
- 9) Phillips, J.E. & Corces, V.G. (2009) *Cell*, **137**, 1194–1211.
- 10) Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J.A., Lopes, S., Reik, W., & Fraser, P. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 1065–1071.
- 11) Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W., & van Steensel, B. (2008) *Nature*, **453**, 948–951.
- 12) Ruault, M., Dubarry, M., & Taddei, A. (2008) *Trends Genet.*, **24**, 574–581.
- 13) Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M., & Taga, T. (2001) *Dev. Cell*, **1**, 749–758.
- 14) Takizawa, T., Gudla, P.R., Guo, L., Lockett, S., & Misteli, T. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 489–498.
- 15) Gomi, H., Yokoyama, T., Fujimoto, K., Ikeda, T., Katoh, A., Itoh, T., & Itoharu, S. (1995) *Neuron*, **14**, 29–41.
- 滝沢 琢己, 高木 美智, 笹岡 寛敏
(奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科分子神経分化制御)
-
- Subnuclear organization of genomes and gene regulation in the interphase nucleus
Takumi Takizawa, Misato Takagi, and Hirotohi Sasaoka
(Molecular Neuroscience, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0192, Japan)