

DNAトポイソメラーゼII β による神経関連遺伝子の活性化機構

佐野 訓明^{a*}, 宮地 まり^a, 筒井 公子^a, 筒井 研^b

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a神経ゲノム学, ^b遺伝情報動態学

キーワード: DNAトポイソメラーゼII β (DNA topoisomerase II beta), 神経細胞分化 (neuronal differentiation), 遺伝子発現 (gene expression), 神経関連遺伝子 (neuronal gene), クロマチン (chromatin)

DNA topoisomerase II β activates a subset of neuronal genes

Kuniaki Sano^{a*}, Mary Miyaji^a, Kimiko M. Tsutsui^a, Ken Tsutsui^b

Departments of ^aNeurogenomics, ^bGenome Dynamics, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

DNAトポイソメラーゼII (トポII) は二本鎖DNAを切断・再結合することで, DNAの捻れや絡まりを解消する酵素である。この反応の前後でDNAの化学構造は変化しないが, DNAの高次構造(位相幾何学的構造)が変換される。また, トポIIは細菌から高等脊椎動物まで普遍的に存在しており, 哺乳動物では α と β の2種類のアイソザイムが存在する。トポII α は細菌や酵母などのトポIIと同様に分裂期の染色体分離に必須な酵素であり, 抗腫瘍剤開発の対象として発見当初から多くの研究が行われてきた。一方, トポII β は, HeLa細胞のような株化細胞では細胞周期によらず構成的に発現していることから, DNA修復などの過程に関与しているのではないかと推測されていた

が, 長い間明確な機能は不明であった。我々の研究グループは, トポII β の発見以前から成熟過程にある脳の神経細胞に強いトポIIの活性が存在することを見いだしており, 長年, 中枢神経系におけるトポII β の機能の解析を行ってきた。

本稿では, 我々がこれまでに行ってきた研究成果を中心に他のグループの知見なども含めて, 中枢神経系の形成過程におけるトポII β による遺伝子発現制御について述べる。

DNAトポイソメラーゼIIの反応機構

真核生物のトポIIは, 分子量160~180kDaであり, 二量体を形成し機能する。図1にトポIIの酵素反応サイクルを示す^{1,2)}。まず, 開いているN末端側のゲートからDNA鎖(Gセグメント)を取り込み結合する。次に別のDNA鎖(Tセグメント)を取り込んでN末端ゲートを閉じる。ゲートの閉鎖と連動してGセグメントの切断が起こる。切断されたGセグメントの5'端はトポIIの活性中心にあるチロシン残基とホスホジエステル結合し, クリーバブル複合体と呼ばれる反応中

平成21年9月受理

*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7097 FAX: 086-235-7103

E-mail: kuniaki@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



佐野 訓明

昭和44年9月14日生

平成4年3月 岡山大学薬学部卒業

平成9年3月 岡山大学大学院自然科学研究科博士課程 修了

平成9年4月 岡山大学医学部 解剖学第三教室 助手

平成15年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 神経機能構造学分野 助手

平成17年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 神経機能構造学分野 助手

平成19年4月 助手は助教となった

平成20年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 神経ゲノム学分野 助教
現在に至る

間体を形成する。Tセグメントが、切断で生じたGセグメントのギャップを通過すると、Gセグメントが再結合され、C末端側のゲートが開いてTセグメントが放出される。N末端領域に結合したATPが加水分解され、トポIIのコンフォメーションが変化して、Gセグメントが解放されることで、一連のサイクルが終結する。抗腫瘍剤として用いられるエトポシドなどのトポ毒は、クリーバブル複合体を安定化することでトポIIの活性を阻害する³⁾(図1)のために、増殖中の細胞でDNAの二本鎖切断を誘発し細胞死を引き起こす。一方、ICRF-193などのタイプの阻害剤はATPの分解を阻害する結果、コンフォメーションの変化を抑制し、次の反応サイクルへの移行を阻止する⁴⁾。

トポIIの機能の重要性がもっとも分かりやすいのは環状染色体が分離される場合である。環状DNAの複製が終わったときには、生じた2つの娘DNA分子は連環を形成している。連環を解除するには、脱連環(デカテネーション、図2A)活性が必要である。線状DNAは位相幾何学的な連環は生じないが、大きな線状染色体の場合は核内構造により自由度が制約されているため、局所的に生じた絡まりは連環構造と等価である。その為に、真核生物の染色体分離においても脱連環活性は必須である。また、トポIIは超らせんDNAを弛緩(リラクゼーション、図2B)させる活性も有している。この活性は分子内反応であり、転写や複製の進行によって生じる超らせん構造を解消して反応を継続させる働きをもっている。ただし、この弛緩反応はト

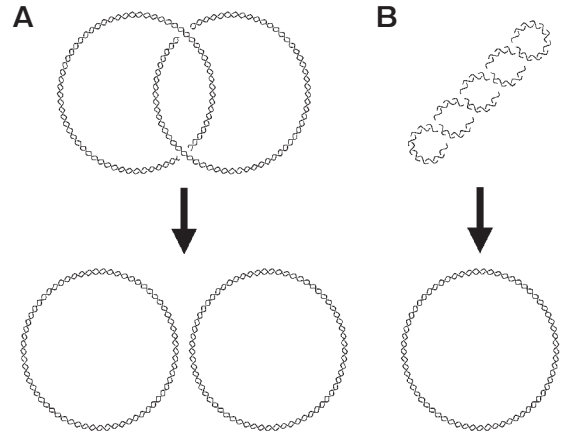


図2 DNAトポイソメラーゼIIが触媒する反応
A. 脱連環(デカテネーション)反応
B. 弛緩(リラクゼーション)反応

ポIなどの他のトポイソメラーゼでも代償可能である。トポII β はトポII α と同様に脱連環反応や弛緩反応を行うことができ、両者の酵素学的性質にはほとんど差異はない。

DNAトポイソメラーゼII β の発見

先に述べたように、細菌や酵母などのトポIIや脊椎動物のトポII α は染色体分離に必要な酵素であり、その量は細胞周期に同調して変化し、分裂期に最も多く、細胞分裂が完了すると速やかに分解される。したがって、分裂を停止した神経細胞などの最終分化細胞ではトポII α の発現量は少ない。その為に、トポII β が発見される以前は、トポIIは分裂している細胞にのみ存在していると考えられていた⁵⁾。そのような状況下で、筒井らは増殖能を失った成熟した神経細胞の核に強いトポII活性が存在することを初めて示した⁶⁾。そしてラット脳からcDNAをクローニングすることで、神経細胞で発現しているのは従来のトポII(現在のトポII α)ではなく、1987年に発見された新規のアイフォーム⁷⁾、トポII β であることを報告した⁸⁾。トポII β は、トポII α とは別の遺伝子にコードされており⁹⁾、トポII α と異なり分裂増殖している株化細胞では細胞周期による量的変動は示さなかった¹⁰⁾。そのため、トポII β はDNA修復など、より一般的なプロセスに関与しているのではないかと、当初は考えられていた。

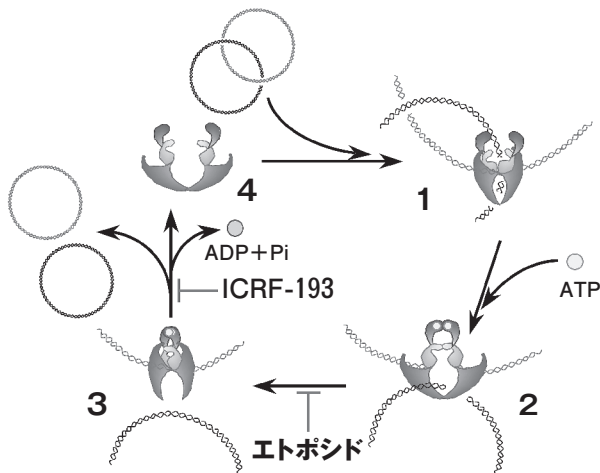


図1 DNAトポイソメラーゼIIの反応サイクル
1. 結合, 2. 切断, 3. 再結合, 4. 解離
また、エトポシドとICRF-193の阻害部位を示す

DNAトポイソメラーゼII β の生理機能

我々のグループは、当初からトポII β が成熟過程の脳で多く発現していることに注目しており、小脳の神経細胞分化におけるトポII β の機能を解析していた。発生過程の小脳での両アイソザイムの発現を調べたところ、分裂増殖している神経前駆細胞ではトポII α が強く発現しており、分裂を終えて神経細胞へと最終分化を開始するとその発現が止まり、代わりにトポII β が発現するようになる^{8,11}。神経細胞の分化時期に一致してトポII β の発現量は増加し、分化の終結とともに酵素活性は低下し、トポII β は核小体へ移行する¹²。この小脳の発生過程では、様々な遺伝子の発現動態がダイナミックに変化することが知られており、我々はこれらの遺伝子の発現制御にトポII β が関与している可能性を検討した。そして、小脳顆粒細胞の初代培養系とトポIIの特異的阻害剤を用いた解析から、終末分化過程にある神経細胞で発現が誘導される遺伝子の一部の転写を活性化するのにトポII β が必要であることが明らかになった¹³。他のグループが作製したトポII β 欠損マウスの解析でも、新生児の神経筋接合部での末梢神経機能不全¹⁴や胎生期の脳皮質での層形成不全¹⁵などが認められ、それらの現象を直接引き起こす責任遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになった。これらの結果から、トポII β の生体内での主要な生理機能が分化過程にある神経細胞における遺伝子の発現制御であることが示唆された。

DNAトポイソメラーゼII β に制御される遺伝子群の同定

トポII β により制御される遺伝子群の全体像をつかむ為に、我々は小脳顆粒細胞の分化過程における遺伝子発現をマイクロアレイで解析した¹⁶。分化前のサンプルとして培養1日目(D1)、分化後のサンプルとして培養5日目(D5)、特異的阻害剤ICRF-193で処理してトポII β の機能を阻害した培養5日目(D5+)の細胞からRNAを調製し、発現解析を行った(図3)。培養経時的な発現誘導(D5/D1)を横軸に、トポII β の阻害による発現変化(D5+/D5)を縦軸にした散布図を作製し、発現動態により9つの遺伝子群(A1~C3)に分類した。この結果から、トポII β の阻害が転写自体や誘導される全ての遺伝子の発現に影響する訳でないことが明らかである。培養経時的に誘導され、かつ、トポII β の阻害でその誘導が抑制される一群の遺伝子(A1遺伝子と呼ぶ)は、トポII β に依存して誘導を受ける遺伝子群であり、最も注目すべきものである。GO解析(※1)から、A1遺伝子にはイオンチャンネル、輸送担体、神経伝達物質受容体などの神経機能に関連した膜に局在するタンパク質が有意に多く、機能的な偏りが有ることが分った。これに対して、トポII β 非依存的誘導を示すA2遺伝子ではこれらの機能の偏在は認められず、全く異なる機能の遺伝子群であった。

トポII β による発現制御機構を解明するには、A1遺伝子と他の遺伝子群の発現制御機構の違いを明らかに

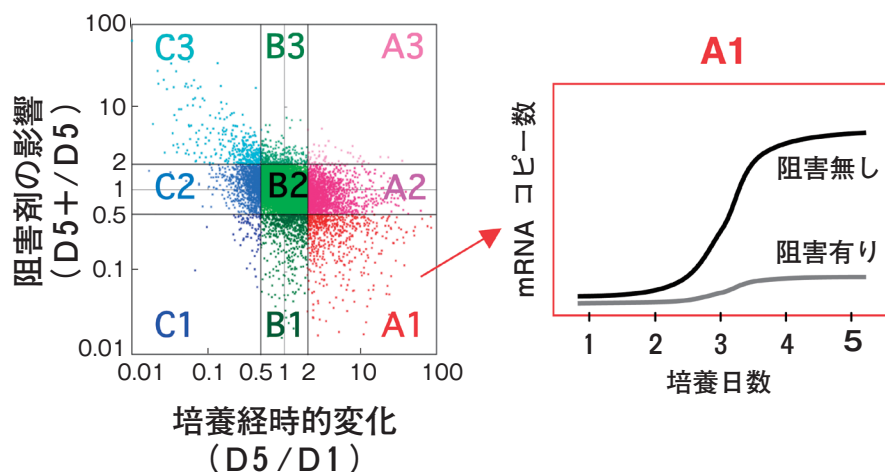


図3 DNAトポイソメラーゼII β で制御される遺伝子の同定

する必要がある。そこでまず、A1 遺伝子と他の遺伝子群とが位置するゲノム領域の比較を試みた。それぞれの遺伝子群をゲノムブラウザ（※2）で表示させると、A1 遺伝子は長く AT に富む遺伝子間領域に隣接し、遺伝子自体も長く AT に富むものが多いことに気づく。そこで、そのような遺伝子間領域を LAIR (Long and AT-rich Intergenic Region), 遺伝子を LA 遺伝子として分類・定義した（分類の詳細に関しては文献¹⁶⁾を参照のこと）。A1 遺伝子の約2割は LA 遺伝子であり、他の遺伝子群に比べて有意に多かった ($P < 10^{-15}$)。LA 遺伝子の多くが神経関連遺伝子であり、A1 遺伝子とも機能的に類似していることが GO 解析で明らかになった。また、LA 遺伝子のうちどのくらいのものがトポII β で制御されているのかを検討する為に、発現動態が不明な LA 遺伝子のうち小脳の発生過程で発現が誘導される遺伝子を選択し、逆転写定量 PCR で阻害剤感受性を調べた。その結果、候補遺伝子のうち8割（4/5）がA1 遺伝子としての動態を示した。つまり、トポII β によって発現が活性化される遺伝子は、そのゲノム上の位置によって特徴づけられていることが明らかとなった。

DNAトポイソメラーゼII β の作用部位の特徴

トポII β が制御しているA1 遺伝子が同定され、それらの遺伝子が位置するゲノム上の特徴が分ってきた。そこで次に、A1 遺伝子が活性化される時にトポII β が作用しているゲノム領域（トポサイトと呼ぶ）を明らかにするため、トポII β が作用している DNA をGセグメントとTセグメントに区別する方法（eTIP 法：Etoposide-mediated Topoisomerase Immunoprecipitation 法）を開発した¹⁶⁾。培養後2日目の小脳顆粒細胞から eTIP 法で DNA 画分を回収し、少なくとも1個のA1 遺伝子を含む7カ所、合計79メガベースのゲノム領域を網羅したオリゴ DNA タイピングアレイを作成して解析した。統計的に有意なシグナル強度と、プローブ近傍のGC含量を用いてクラスター解析を行うと、トポサイトは2種類のクラス（c1とc2）に区別された。両者をゲノム上へマッピングしたところ、分布のパターンはトポサイトのGC含量と強い相関を示し、c1サイトはGCに富む領域、c2サイトはATに富む領域に多く見いだされた。特に、c2トポサイトは、LA 遺伝子上に有意に濃縮されており、LAIR に隣接したA1 遺伝子ではその転写開始部位付近に集中

していた。これは、トポII β が直接的にA1 遺伝子の転写誘導に関わっていることを強く示唆している。

おわりに

長らく明確な機能が不明であったトポII β が、成熟過程にある神経細胞における遺伝子発現で重要な役割を果たすことが確実となり、トポII β による新たな遺伝子発現制御の分子機構の一端が示された。特に、神経細胞の成熟や活動に不可欠な遺伝子が染色体上の一定の場所に集中して存在し（LA 遺伝子）、それらの遺伝子の一部の活性化をトポII β が行っている可能性が示されたことは意義深い。統合失調症や自閉症などの精神疾患などと関連が強く示唆されている遺伝子では、LA 遺伝子の割合が40~50%と非常に高く、強い相関関係が認められている（未発表）。トポII β の機能の解明が、これらの疾患の研究・治療についても新たな展開をもたらすことが期待される。

追 悼

本総説を作成中の2009年8月28日に神経ゲノム学分野の前身である第三解剖学教室の初代教授を務められました新見嘉兵衛博士が急逝されました。新見博士のご逝去に接し、ご生前のご功績を偲び、謹んで哀悼の意を表するとともに、心よりご冥福をお祈りいたします。

用 語

※1 GO (gene ontology, 遺伝子オントロジー) 解析

マイクロアレイなどで抽出された遺伝子群と統計的に関連のある生物学的概念（生理作用、細胞構成要素、分子機能）を探索する解析法。全遺伝子中に占める GO 用語の遺伝子の割合と抽出した遺伝子リストに占める GO 用語の遺伝子の割合についての有意差を検定する。

※2 ゲノムブラウザ (genome browser)

ヒトや他の生物のゲノム情報を基に作製した塩基配列地図に様々なアノテーション（遺伝子構造、予測遺伝子、反復配列など）を付加した統合データベース、または、それを閲覧・利用する為のウェブサイトのこと。以下に例を示す。

Genome Browser (UCSC)

<http://genome.ucsc.edu/>

Ensembl (EBI & Sanger Institute)

<http://www.ensembl.org/>

Map Viewer (NCBI)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>

文 献

- 1) Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC: Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. Nature