

領域融合レビュー, 4, e002 (2015)
DOI: 10.7875/leading.author.4.e002
2015年1月14日公開

染色体の高次構造を介した遺伝子の発現制御とその破綻に起因する発生の異常および疾患

Gene regulation mediated by higher-order chromosome structure and its implications for the pathogenesis of human diseases

武藤 彰彦
Akihiko Muto

広島大学大学院理学研究科 生物科学専攻発生生物学研究室

要 約

遺伝子発現の適切な制御は細胞の運命決定や機能制御において重要であり、その破綻は発生の異常や疾患などの原因になる。時期や組織など特定の状況のもとで遺伝子発現を制御する特異的なエンハンサーは、その多くが標的となるプロモーターから離れており、このエンハンサーとプロモーターとの長距離の相互作用には染色体の高次構造のダイナミックな変化が必要である。最近の研究から、コヒーレンスやその機能制御タンパク質である NIPBL が染色体においてループ構造の形成および維持に関与することが示され、染色体の高次構造を介した遺伝子発現の制御機構の実態が徐々に明らかにされてきた。このレビューでは、コヒーレンスおよび NIPBL による染色体の高次構造および遺伝子発現の制御機構に関する最近の知見、および、その機能の欠損とともに発生の異常や疾患の分子機構について、おもに四肢の発生への影響を中心に、筆者らによる最近の成果をmajestic 解説する。

はじめに

遺伝子の発現制御とは狭義には転写制御をさし、遺伝子の機能を適切に發揮するために重要な段階である。時期あるいは組織に特異的な遺伝子の発現制御はさまざまな細胞に個性と秩序をもたらし、多細胞生物としての生命の機能を維持するために必須である。転写制御の分子機構を単純化すれば、プロモーターにおけるエンハンサーと結合した転写因子による RNA ポリメラーゼの活性化、ということができる。四半世紀ほどまえには、関連する転写因子の発現の有無および組合せが、時期や組織に応じた遺伝子

発現を説明するおもな（唯一の）手段であった。しかし、エピジェネティクスによる制御の発見や染色体の構造に対する理解の深まりにより、その考え方は一変した。いわゆるエピジェネティック制御とよばれるヒストンや DNA の修飾はクロマチンの構造を変化させ、転写制御にかかわるタンパク質の結合や活性化の状態に影響を及ぼす。転写にかかわるタンパク質としては、古典的な基本転写因子やエンハンサーなどに結合する転写因子にくわえ、ヒストン修飾酵素やクロマチンリモデリングタンパク質、転写伸長因子など、さまざまな転写共役因子がみつかっている。また、非コード RNA のはたらきも重要であることが示唆されている。こうしたさまざまな制御機構のなかで、筆者らは現在、染色体の高次構造の役割に興味をもち研究している。

染色体はけして静的なものではなく、その構造はダイナミックに変化する。その最たるものは分裂期の染色体の凝縮であろう。しかし、間期の核においても染色体はランダムに分布しているわけではなく、状況に応じて適切な配置あるいは高次構造をとるよう制御されている。間期における染色体の動態を直接的に可視化することは現在でもまだむずかしい。しかし、近年の生化学的あるいは分子生物学的な解析技術の進歩により、その構造を推測するに足るだけの多くの情報が提供されるようになってきた。染色体の高次構造の解析は、かつては蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる特定の（少数の）遺伝子座を標的とした解析が主流であったが、染色体構造捕獲（chromosome conformation capture : 3C）法の登場とその応用法の実現によりゲノムワイドかつ高解像度な解析が可能になった。その結果、染色体は直線的な単なる“ひも”ではなく、無数の長距離の相互作用を介した複雑かつ秩序だった構造

体であることが明らかになってきた。また、クロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation : ChIP) 法の発展により、染色体の高次構造の形成に関するタンパク質の実態が解明されてきた。このような解析と従来からの遺伝学的あるいは発生生物学的な機能解析との組合せにより、染色体の高次構造の制御の生理的な意義が明らかにされつつある。

1. 間期の核における染色体の高次構造

染色体の高次構造は階層的に制御されている (図 1)。それぞれの染色体は基本的に核において独立した空間にコンパクトに収められており、隣接する染色体とは領域を共有しない。これを染色体テリトリーとよぶ¹⁾。染色体テリトリーの内部の染色体は機能的に独立した Mb サイズの領域に区分けられており、トポロジカルドメインと名づけられている²⁾。トポロジカルドメインのあいだの境界領域には、インスレーター結合タンパク質である CCCTC 結合因子や tRNA 遺伝子、ハウスキーピング遺伝子など、インスレーター (境界) としての機能をもつ因子が高密度に局在しており、隣接するトポロジカルドメインのあいだの物理的な相互作用を抑制し機能的な独立性を維持している。一方、染色体構造捕獲法の応用法を用いた解析から、トポロジカルドメインの内部にはより小規模な相互作用があり多数のループ構造が存在することが明らかになった³⁾。トポロジカルドメインは生物種や細胞種などをこえて安定であり、染色体の高次構造をささえる基盤になっていると考えられている。これに対し、ループ構造には細胞種における特異性などの可塑性が認められること、また、その足場としてプロモーターやエンハンサーなどを含む領域が高頻度に使われていることなどから、ループ構造が時期あるいは組織に特異的な遺伝子の発現制御に重要で

あることが示唆された。最近の研究では、ループ構造の形成とそれを介した遺伝子の発現制御にコヒーレンスやその関連タンパク質の関与することが明らかになってきた^{3,4)}。

2. コヒーレンスと疾患

コヒーレンスは 4 つのサブユニット、SMC1, SMC3, RAD21, SA1/SA2 からなるリング状のタンパク質複合体である (図 2)。細胞分裂のときに姉妹染色分体をリングの内側に束ねる機能をもつと考えられており、複製された染色体が娘細胞に均等に分配されるよう制御している。コヒーレンスの染色体への結合はコヒーレンスローダーとよばれる、NIPBL/Scc2 と MAU2/Scc4 とのタンパク質複合体により制御されている (図 2)。いずれも生物種のあいだで高度に保存されており、細胞分裂において必須のはたらきをしている。コヒーレンスの機能の欠損による細胞増殖の異常ががんの発症に関与するとの指摘があり、いくつかのがん細胞においてコヒーレンスのサブユニットをコードする遺伝子や NIPBL 遺伝子に変異や発現量の変化がみつかっている⁵⁾。コヒーレンスの機能不全とともに染色体の不安定性が一因であるという説があるが⁶⁾、染色体の異数性をともなわないケースもみつかっており⁵⁾、その要因は明らかではない。

NIPBL 遺伝子やコヒーレンスサブユニットの遺伝子は遺伝子の発現制御にも関与しており、これが発生の過程において重要であることが明らかになってきている。ショウジョウワバエの *Nipped* 変異体は *cut* 遺伝子の発現の低下により翅の形態異常をひき起こすが、その原因遺伝子として同定された *Nipped-B* 遺伝子は *NIPBL* 遺伝子のショウジョウワバエにおけるホモログである⁷⁾。転写制御の機能は脊椎動物においても保存されており、NIPBL やコヒーレンスサブユニットの機能の欠損によりひき起こされる、コヒー

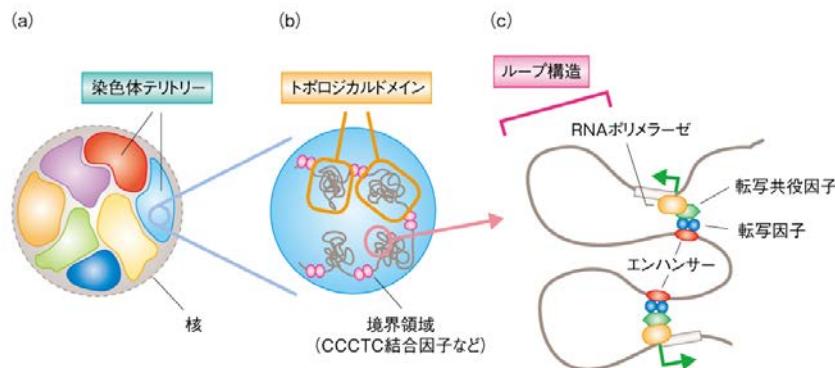


図 1 間期の核における染色体の高次構造

- 間期の核の内部では、それぞれの染色体は互いに混ざりあわず、染色体テリトリーとよばれる固有の領域に収まっている。
- 染色体はインスレーター配列などに富んだ境界領域により Mb サイズの領域に仕切られています。これはトポロジカルドメインとよばれる。染色体の領域のあいだの相互作用はトポロジカルドメインの内部に制限されています。
- トポロジカルドメインの内部には多数のループ構造がみられます。これらの多くはエンハンサーやプロモーターの相互作用により形成されており、遺伝子発現に重要な構造と考えられています。

ン病とよばれるいくつかの先天性疾患ではそれらの遺伝子の発現に異常が認められている⁸⁾. 代表的なコヒーシン病である Cornelia de Lange 症候群は、NIPBL 遺伝子のハプロ不全変異（一部の軽症の患者では、コヒーシンサブユニットやコヒーシン制御タンパク質をコードする遺伝子の変異）に起因する疾患で、新生児 1 万人に約 1 人の割合で発症するといわれている. 心臓、消化器官、四肢などさまざまな器官における形態的あるいは機能的な異常、成長阻害、精神遅滞など多岐にわたる症状を呈する^{9,10)}. 患者に由来する細胞ではさまざまな遺伝子の発現量が変化しているが、姉妹染色分体の接着には顕著な異常が認められない. 同様の結果は、筆者らが作製した、Cornelia de Lange 症候群のモデル生物である *Nipbl* 遺伝子ヘテロ変異マウス、および、*Nipbl* の発現をアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドの導入によりノックダウンしたゼブラフィッシュの胚においても再現され、Cornelia de Lange 症候群においてみられるさまざまな遺伝子の発現の変化や多様な表現型が、すべて NIPBL の部分的な機能の欠損により生じることが証明された¹¹⁻¹³⁾. では、NIPBL あるいはコヒーシンはどのようにして遺伝子発現を制御しているのだろうか？

3. NIPBL あるいはコヒーシンによる遺伝子発現の制御機構

NIPBL やコヒーシンによる遺伝子発現の制御機構については諸説があり、いまだはつきりとしていない. これまでのさまざまな知見からは、複数の異なる分子機構の存在が示唆されている.

もっともはじめに提唱されたのは、染色体の高次構造を介した制御機構である. さきに述べた、ショウジョウバエの翅の発生に重要な *cut* 遺伝子の発現は、その約 85 kb 上流にある翅に特異的なエンハンサーにより制御されており、Nipped-B はこのエンハンサーとプロモーターとの長距離の相互作用において重要であることが示された⁷⁾. 哺乳動物の細胞においては、グロビン¹⁴⁾ やプロトカドヘリン¹⁵⁾などの遺伝子の発現やその遺伝子座の周辺の高次構

造の形成にコヒーシンに対する依存性のあることが報告されている.

NIPBL やコヒーシンの染色体の高次構造の制御への関与は、インスレーター結合タンパク質である CCCTC 結合因子や転写共役因子であるメディエーター複合体などとの協調的な作用によっても支持されている. クロマチン免疫沈降法によるゲノムワイドな解析により、NIPBL およびコヒーシンとも染色体にランダムに結合しているわけではなく、活発に転写される遺伝子の転写開始点の近傍など、特定の領域に濃縮される傾向が認められた. コヒーシンの結合パターンは CCCTC 結合因子のゲノムにおける局在と類似しており、生化学的な解析の結果とあわせて、コヒーシンと CCCTC 結合因子とが染色体において高頻度に共局在し相互作用していることが示された^{16,17)}. この相互作用は機能的であり、コヒーシン（によるループ構造の形成）がインスレーター活性の実態を担うこと、コヒーシンは CCCTC 結合因子との相互作用をとおしてインスレーター活性を発揮すべき適切な場所に配置されること、などが明らかにされた（図 3a）. また ES 細胞を用いた解析により、メディエーター複合体がコヒーシン、NIPBL、RNA ポリメラーゼ II などとプロモーターやエンハンサーにおいて共局在し、ループ構造の形成を介して ES 細胞の未分化性の維持にかかる遺伝子の発現を制御していることが報告された¹⁸⁾（図 3b）. のちに述べるように、メディエーター複合体との相互作用は、ES 細胞のみならず、個体の発生の過程における組織に特異的な遺伝子の発現制御において重要な役割をはたしていると考えられる¹³⁾.

こうした染色体における共局在や相互作用が明らかにされる一方、これらのタンパク質の役割は必ずしも重複していないことが示唆されている. コヒーシンの局在と CCCTC 結合因子の局在はゲノムの広い領域において重複しているが、遺伝子発現や染色体の領域のあいだの相互作用におけるはたらきには違いが認められる. その機能差はトポジカルドメインの形成においてとくに顕著で、どちらもトポジカルドメインの境界部分に結合するにも

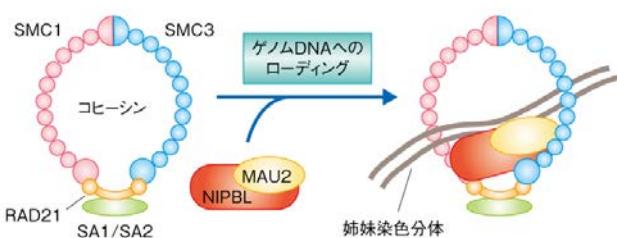


図 2 コヒーシンおよびコヒーシンローダー

コヒーシンは 4 つのサブユニットからなるリング状の構造をもつ. 複製された姉妹染色分体をリングの内部に束ねることにより、その接着を分裂期まで維持すると考えられている. コヒーシンの DNA との結合にはコヒーシンローダーとよばれる NIPBL-MAU2 複合体の機能が必要である.

かかわらず、境界の形成には CCCTC 結合因子のみが関与している¹⁹⁾。また、コヒーシン、メディエーター、NIPBL の共局在の領域が、コヒーシンと CCCTC 結合因子の共局在の領域とは大きく異なっていること¹⁸⁾、NIPBL がコヒーシンに非依存的に染色体との結合や遺伝子の発現制御を行うことなども報告されている²⁰⁾。これらの結果は、NIPBL やコヒーシンを含む複数の（機能的に）異なる転写制御複合体が存在し、それらが状況に応じて使い分けられている可能性を示唆する。NIPBL の変異による病態とコヒーシンの変異による病態が必ずしも一致しないことも関係があるのかもしれない。

さらに最近では、新たな転写制御機構への関与も明らかになってきた。ショウジョウバエを用いた解析では、コヒーシンが結合する遺伝子の多くで RNA ポリメラーゼ II による転写伸長の一時停止が認められており、この一時停止の解除にはコヒーシンが必要である²¹⁾（図 3c）。また、酵母では SWI-SNF クロマチンリモデリング複合体による、転写制御にかかる領域に高頻度に認められるヌクレオソームのない領域の形成や遺伝子の発現制御に、

Scc2-Scc4 コヒーシンローダーとの相互作用が必要であることが示された²²⁾（図 3d）。RNA ポリメラーゼ II の一時停止や SWI-SNF 複合体によるクロマチンのリモデリングは生物種のあいだで広く利用される転写制御機構であるが、Nipbl やコヒーシンの関与が脊椎動物においても保存されているかどうかは今後の研究を待たなくてはならない。

4. 四肢の発生の過程と遺伝子の発現制御

培養細胞を用いた生化学的あるいは分子生物学的な解析は、NIPBL やコヒーシンによる遺伝子の発現制御の分子機構について多大な知見をもたらした。しかし、Cornelia de Lange 症候群にみられるように個体レベルへの影響は多様であり、実際の発生の異常においてどのような遺伝子が関与しているのか、また、その制御においてどのようなタンパク質と相互作用するのか、などについては多くの点が明らかにされていない。一方、筆者らは、NIPBL のノックダウンによる個体レベルでの表現型と、そこで影響をうける遺伝子との因果関係に着目し、モデル

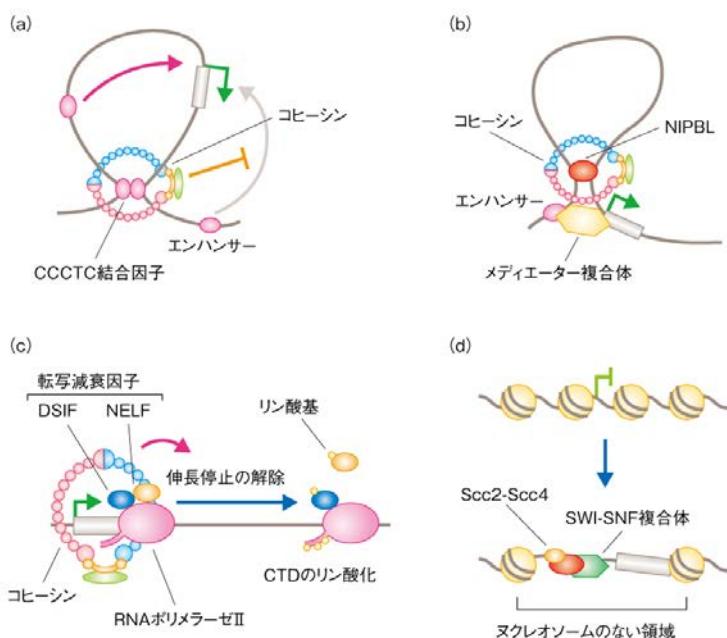


図 3 NIPBL およびコヒーシンによる遺伝子の発現制御

- (a) コヒーシンは CCCTC 結合因子とともにインスレーター機能を発揮する。ループ構造の内部にある遺伝子は、その内部にある制御領域の影響により転写が制御される。一方、隣接する領域からの影響は制限され、転写制御の特異性が維持される。
- (b) NIPBL、コヒーシン、メディエーター複合体は、エンハンサーとプロモーターとの長距離の相互作用の形成を支持し、転写の活性化に寄与する。
- (c) 発生に関与する遺伝子には、転写開始の直後に RNA ポリメラーゼ II の伸長抑制（一時停止）の起こるもののがみつかっているが、これには DSIF や NELF などの転写減衰因子が関与している。遺伝子発現を活性化する刺激により転写減衰因子や RNA ポリメラーゼ II の C 末端ドメイン（CTD）がリン酸化され、転写の活性化した状態へと推移する。ショウジョウバエにおいては、この伸長停止の解除におけるコヒーシンの関与が示されている。
- (d) 酵母においては、コヒーシンローダー Scc2-Scc4 複合体が SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体とともにヌクレオソームのない領域の形成を促進し、転写制御に関与することが示されている。

生物の個体を用い解析してきた¹¹⁻¹³.これらの知見を組み合わせることにより, NIPBL およびコヒーリンによる発生の制御機構の実態が分子レベルにおいて少しづつ明らかにされてきている.以下, 最近, 筆者らが研究している四肢の発生を例として解説する.

脊椎動物の四肢の発生は発生生物学や進化生物学の分野において古くから研究されており, その分子機構に関しては膨大な知見が蓄積している.また, 魚類および両生類は高い再生能をもつことから, 最近では, 再生の研究の有用なモデルになるなどふたび脚光をあびている.陸上の四足動物である哺乳類や鳥類の手(翼)および足(脚)と魚類の対鰭(左右1対のヒレで, 胸ヒレと腹ヒレ)とは, 形態的には大きく異なるが進化的には共通の起源をもつ.このことは, 分子レベルの解析において明確に示され, とくに, 発生の初期における肢芽(四肢やヒレの原基)の形成の過程は, その制御機構も含め非常によく似ている²³.四肢の異常は Cornelia de Lange 症候群のもっとも顕著な症状のひとつであり, 患者の多くは生まれながらに腕, 足, 指など四肢になんらかの欠損をもつ.症状の程度は患者によりさまざまであるが, とくに NIPBL に変異をもつ患者の一部では腕の遠位部を大きく欠損するような重篤な症状も認められる.同様の異常は, 筆者らが Cornelia de Lange 症候群のモデルとして作製した Nipbl をノックダウンしたゼブラフィッシュの胚においても認められており¹³, 生物種をこえて保存された四肢の発生の制御機構

に NIPBL が重要な役割をはたしていることが示唆される.

肢芽は側板中胚葉由来する間葉系の組織とそれをおおう外胚葉性の上皮からなる器官で, 体幹部からのレチノイン酸シグナルにより分化が誘導される.四肢形成の初期の段階では間葉系細胞の増殖により外側にむかって伸長するが, その増殖は外胚葉性頂堤とよばれる先端部の上皮組織からの Fgf シグナルに依存している(図 4a).一方, 外胚葉性頂堤における *fgr* 遺伝子の発現は間葉系細胞からの SHH シグナルや FGF10 シグナルにより誘導されているが, これらの遺伝子や, その発現制御をつかさどる HOXD や TBX5 などの転写因子も肢芽の発生には重要である(図 4b).

HoxD 遺伝子群や *Shh* 遺伝子は肢芽のほかさまざまな部位においても発現しているが, 肢芽に特異的な発現はそれらの遺伝子から離れた領域にあるエンハンサーにより制御されていることが知られている.*Hox* 遺伝子群は染色体においてクラスターを形成しており(図 5a), すべての遺伝子は同一の方向に転写される²⁴.クラスターの上流側に位置する遺伝子を 5'-*hox* 遺伝子, 下流側に位置する遺伝子を 3'-*hox* 遺伝子とよび, 5'側に近い遺伝子ほど大きな番号がつけられている(たとえば, マウスの *HoxD* クラスターでは, もっとも上流(5'側)に *Hoxd13* 遺伝子, もっとも下流(3'側)に *Hoxd1* 遺伝子が位置する).共通の祖先遺伝子からゲノムの倍化により複数の遺伝子クラスターが形成されたと考えられており²⁵, 哺乳動物では

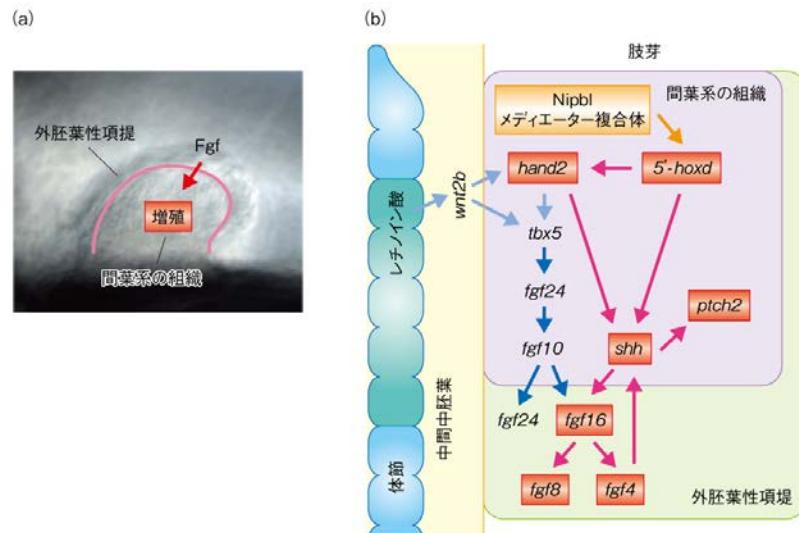


図 4 ゼブラフィッシュにおける肢芽の発生の制御

(a) ゼブラフィッシュの胸ヒレの肢芽. 外胚葉性頂堤からの Fgf シグナルにより間葉系細胞の増殖が促進され肢芽が成長する. 受精後 42 時間ににおいて, 側方からみたところ.

(b) ゼブラフィッシュにおいて肢芽の発生にかかる遺伝子カスケード. 体節形成期において前方部の体節からのレチノイン酸シグナルにより肢芽の分化が誘導される. 哺乳動物と同様に, 間葉系細胞からの Fgf10 シグナルや Shh シグナルにより外胚葉性頂堤における *fgr* 遺伝子の発現が誘導される. Nipbl やメディエーター複合体は, おもに 5'-*hoxd* 遺伝子の発現制御を介して肢芽の発生に関連するさまざまな遺伝子の発現を制御していると予想される. Nipbl あるいはメディエーター複合体のサブユニットである Med12 をノックダウンした胚において影響される遺伝子を赤色で示した.

HoxA～*HoxD*の4種類、ゼブラフィッシュなどの硬骨魚類では7種類（ゼブラフィッシュでは、*HoxD*が1つ、それ以外がすべて2組）の遺伝子クラスターが存在する。クラスターのすべての遺伝子はエンハンサーの共有により連携して（非独立的に）制御されており、遺伝子の相対的な位置と発現の時間的および空間的なパターンとのあいだにみられる相関性が前後軸や四肢のパターン形成に重要である。*Hox*遺伝子群の肢芽に特異的な発現は、遺伝子クラスターに隣接した遺伝子の密度の低い領域に存在するエンハンサーとのループ構造を介した遠距離の相互作用により制御されている。これに対し、体幹部（神経系の組織）における発現に関与するエンハンサーは、遺伝子クラスターの内部の遺伝子の近傍に局在することが知られている（図5b）。*Hox*遺伝子群の組織の特異的な発現の制御機構の詳細については多くの総説があるので、そちらを参照されたい^{24,26}。

一方、*Shh*遺伝子の肢芽における発現においても染色体の高次構造が関与している。*Shh*遺伝子の肢芽に特異的なエンハンサーは隣接する*Lmbr1*遺伝子のイントロンに存在するが、哺乳類の場合、その距離は約1Mbである。マウスの肢芽の細胞を用いた3次元の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析により、エンハンサーとプロモーターがループ構造を介して物理的に相互作用している

ことが示されている²⁷。

5. ゼブラフィッシュをモデルとした四肢の発生過程における Nipbl の機能の解析

四肢の欠損はCornelia de Lange症候群における代表的な症状のひとつであるが、その発症機構の詳細は明らかでなかった。筆者らは、ゼブラフィッシュをモデルとしてNipblによる四肢の発生の制御機構の解明を試みた¹³。ゼブラフィッシュにおいては前肢（胸ビレ）の発生の過程が分子レベルで詳細に解析されており²⁸、また、その制御機構も哺乳動物との共通性が高いことから、Nipblによる四肢の形成機構の解析に非常に有用である。

ゼブラフィッシュの胚では、肢芽の成長は受精後30時間ごろから観察され、受精後72時間ごろにはみた目にも明らかなヒレの形態をとるようになる。ほかの脊椎動物と同様に、肢芽の成長は間葉系細胞の増殖をともない、その制御には外胚葉性頂堤からのFgfシグナルが必要である。外胚葉性頂堤における $f\text{gf}$ 遺伝子の発現に必要な shh 遺伝子や $f\text{gf}10$ 遺伝子の発現は、異なる遺伝子カスケードの下流において制御されており、 shh 遺伝子の制御には $hand2$ 遺伝子や $hoxd$ 遺伝子が、 $f\text{gf}10$ 遺伝子の制御には $tbx5$ 遺伝子や $f\text{gf}24$ 遺伝子が関与する。Nipblをノックダウンした胚においては肢芽の成長にいちじるしい遅延が認めら

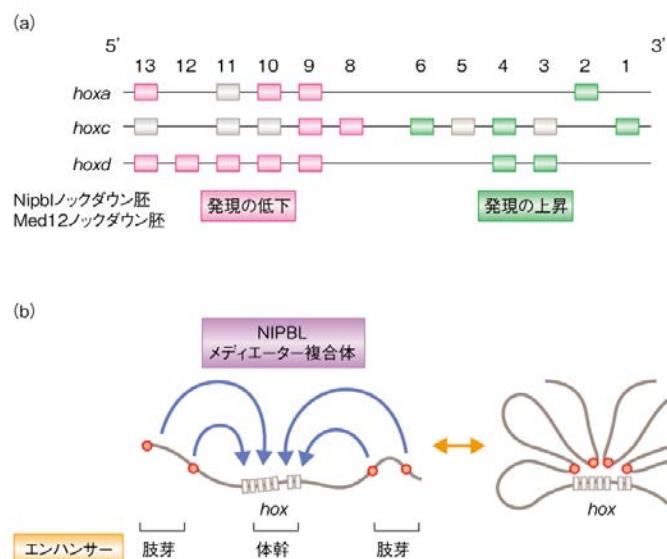


図5 NIPBL およびメディエーター複合体による *hox* 遺伝子群の発現制御

(a) Nipblあるいはメディエーター複合体のサブユニットであるMed12をノックダウンした胚の肢芽における*hox*遺伝子群の発現の変化。5'-*hox*遺伝子の発現はすべて低下したのに対し、3'-*hox*遺伝子の発現はすべて上昇した。灰色は未解析の遺伝子または発現のない遺伝子。

(b) NIPBLおよびメディエーター複合体による*hox*遺伝子座におけるループ構造の形成の促進。体幹部の発現に特異的なエンハンサーはクラスターの内部にあるのに対し、肢芽に特異的なエンハンサーはクラスターの外部の遺伝子の密度の低い領域に存在し、ループ構造を介して*hox*遺伝子群と長距離の相互作用をする。NIPBLやメディエーター複合体はループ構造の形成を介して肢芽に特異的な*hox*遺伝子群の発現に寄与すると考えられる。長距離の相互作用を必要としないと考えられる体幹部における*hox*遺伝子群の発現は、Nipblあるいはメディエーター複合体のサブユニットであるMed12をノックダウンした胚においては影響をうけない。

れ、間葉系細胞の増殖の低下とそれとともに細胞数の減少が観察された。既存の情報をもとに、さきに述べた肢芽の発生に関連する遺伝子の発現について解析したところ、間葉系細胞における *Hoxd*-*Hand2*-*Shh* 経路の遺伝子の発現、および、外胚葉性頂堤における *fgf* 遺伝子の発現が顕著に低下していた(図 4b)。*HoxD* 遺伝子群や *Shh* 遺伝子の肢芽における発現は *Nipbl* 変異マウスでも低下しており¹³⁾、また、*HoxD* 遺伝子群や *Shh* 遺伝子の変異マウスでは *Cornelia de Lange* 症候群のような四肢の短縮が認められたことから²⁹⁻³¹⁾、*Hoxd* 遺伝子群、*Hand2* 遺伝子、*Shh* 遺伝子などが *Cornelia de Lange* 症候群における肢芽の欠損にかかわる重要な制御点である可能性が示唆された。

Nipbl をノックダウンした胚の肢芽においては *hoxd* 遺伝子群の発現が非常に特徴的な影響をうけていた¹³⁾(図 5a)。ゼブラフィッシュの *hoxd* クラスターに含まれる 7 つの遺伝子はすべて *Nipbl* の制御下にあった。*Nipbl* のノックダウンによる影響はクラスターにおける遺伝子の相対位置と関連しており、肢芽の発生に重要な 5'-*hoxd* 遺伝子(*hoxd9* 遺伝子～*hoxd13* 遺伝子)の発現がすべて低下していたのに対し、下流側に位置する 3'-*hoxd* 遺伝子(*hoxd3* 遺伝子および *hoxd4* 遺伝子)では発現の顕著な上昇が認められた。また、*Nipbl* のノックダウンの影響は肢芽に特異的であり、遺伝子クラスターの内部のエンハンサーにより制御される体幹部における発現には影響を及ぼさなかった。さらに、3 次元の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析により、*hoxd* クラスターの周辺の高次構造が *Nipbl* に依存していることをより直接的に証明することにも成功した¹³⁾。以上のすべての結果は、*Nipbl* がエンハンサーとプロモーターとのあいだの相互作用を介して遺伝子発現を制御するという仮説と一致した(図 5b)。興味深いことに、*hoxd* クラスターにおいてみられた 5'-*hox* 遺伝子の発現抑制と 3'-*hox* 遺伝子の発現上昇という位置に特異的な影響は、肢芽に発現する *hoxa* クラスターや *hoxc* クラスターにおいても認められた¹³⁾(図 5a)。これは、*Nipbl* による染色体の高次構造を介した発現制御機構が、異なる *hox* クラスターにも普遍的に保存された共通の機構である可能性を示唆した。いくつかの *hox* 遺伝子群の発現は *Shh* の下流においてフィードバックにより制御されることが示唆されており、*Nipbl* による *shh* 遺伝子の制御の可能性も考えられた。しかし、*Shh* シグナルの阻害剤により処理した胚における肢芽にかかる遺伝子の発現の変化は *Nipbl* をノックダウンした胚の結果とは異なっており、少なくとも、肢芽の発生への影響という点においては主要な標的ではないと予想された¹³⁾。

Nipbl はさまざまなタンパク質と協調して遺伝子発現を制御していることはすでに述べた。では、肢芽の発生や *hox* 遺伝子の発現制御においてはどのような分子機構が関与しているのだろうか？筆者らの研究では、少なくと

も、メディエーター複合体との協働作用が重要であることが明らかにされた¹³⁾。メディエーター複合体のサブユニットのひとつである *Med12* の発現をノックダウンしたゼブラフィッシュの胚では、*Nipbl* をノックダウンした胚と同様に、胸ビレの顕著な萎縮がみられた。肢芽の発生にかかわる遺伝子の発現への影響や、3 次元の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法による *hoxd* クラスターの周辺の高次構造の解析などは、すべて、*Nipbl* をノックダウンしたときと同様の結果を示した(図 4b, 図 5)。メディエーター複合体と *Nipbl* との相互作用は、ES 細胞では示されていたものの、個体においては明らかにされておらず、筆者らの研究が *in vivo* におけるはじめての証明になった。

一方、*Nipbl* のパートナーとしてもっとも有名なコヒーレンシであるが、そのサブユニットである *Rad21* をノックダウンしたところ、遺伝子発現への影響などは *Nipbl* あるいは *Med12* をノックダウンした胚の結果とは必ずしも一致しなかった¹³⁾。コヒーレンシの変異に起因するタイプの *Cornelia de Lange* 症候群は全体的に症状が軽く四肢に対する顕著な影響がみられないことが知られており、これとなんらかの関連があるのかもしれない。

おわりに

染色体の高次構造の制御は遺伝子の時期あるいは組織における特異的な発現を実現する重要な機構のひとつである。コヒーレンシとの関連づけによりその分子機構の理解が大きく進み、さらに、*Cornelia de Lange* 症候群のようなコヒーレンシ病の発症機構の解明にも一定の貢献があつたことは、ここ 10 年ほどの大きな成果であるといえる。その一方、染色体の領域のあいだの相互作用の形成やその特異性の決定に関する分子機構については、現時点でもほとんどわかっていない。染色体の特定の領域どうし、たとえば、エンハンサーとその標的となるプロモーターは、どのようにして互いを認識するのか？ダイナミックな染色体の高次構造の変化をささえる動力は何か？そこには当然、コヒーレンシや NIPBL なども関連してくるだろう。今後、1 細胞レベルでの解析技術や生細胞における染色体の可視化技術などの向上により、こうした分子機構がさらに明らかにされると予想される。まだまだ興味のつきない分野である。

文献

- 1) Cremer, T. & Cremer, M.: Chromosome territories. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2, a003889 (2010)
- 2) Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F. et al.: Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. Nature, 485, 376-380 (2012)
- 3) Dorsett, D. & Strom, L.: The ancient and evolving

- roles of cohesin in gene expression and DNA repair. *Curr. Biol.*, 22, R240-R250 (2012)
- 4) Remeseiro, S. & Losada, A.: Cohesin, a chromatin engagement ring. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 25, 63-71 (2013)
- 5) Losada, A.: Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond. *Nat. Rev. Cancer*, 14, 389-393 (2014)
- 6) Solomon, D. A., Kim, T., Diaz-Martinez, L. A. et al.: Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science*, 333, 1039-1043 (2011)
- 7) Rollins, R. A., Korom, M., Aulner, N. et al.: *Drosophila* Nipped-B protein supports sister chromatid cohesion and opposes the Stromalin/Scc3 cohesion factor to facilitate long-range activation of the *cut* gene. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 3100-3111 (2004)
- 8) Bose, T. & Gerton, J. L.: Cohesinopathies, gene expression, and chromatin organization. *J. Cell Biol.*, 189, 201-210 (2010)
- 9) Tonkin, E. T., Wang, T.-J., Lisgo, S. et al.: NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat. Genet.*, 36, 636-641 (2004)
- 10) Krantz, I. D., McCallum, J., DeScipio, C. et al.: Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat. Genet.*, 36, 631-635 (2004)
- 11) Kawauchi, S., Calof, A. L., Santos, R. et al.: Multiple organ system defects and transcriptional dysregulation in the *Nipbl^{fl/fl}* mouse, a model of Cornelia de Lange syndrome. *PLoS Genet.*, 5, e1000650 (2009)
- 12) Muto, A., Calof, A. L., Lander, A. D. et al.: Multifactorial origins of heart and gut defects in *nipbl*^{fl/fl} zebrafish, a model of Cornelia de Lange syndrome. *PLoS Biol.*, 9, e1001181 (2011)
- 13) Muto, A., Ikeda, S., Lopez-Burks, M. E. et al.: Nipbl and mediator cooperatively regulate gene expression to control limb development. *PLoS Genet.*, 10, e1004671 (2014)
- 14) Chien, R., Zeng, W., Kawauchi, S. et al.: Cohesin mediates chromatin interactions that regulate mammalian β -globin expression. *J. Biol. Chem.*, 286, 17870-17878 (2011)
- 15) Guo, Y., Monahan, K., Wu, H. et al.: CTCF/cohesin-mediated DNA looping is required for protocadherin α promoter choice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 21081-21086 (2012)
- 16) Wendt, K. S., Yoshida, K., Itoh, T. et al.: Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*, 451, 796-801 (2008)
- 17) Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M. et al.: Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell*, 132, 422-433 (2008)
- 18) Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S. et al.: Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, 467, 430-435 (2010)
- 19) Zuin, J., Dixon, J. R., van der Reijden, M. I. et al.: Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 996-1001 (2014)
- 20) Zuin, J., Franke, V., van Ijcken, W. F. et al.: A cohesin-independent role for NIPBL at promoters provides insights in CdLS. *PLoS Genet.*, 10, e1004153 (2014)
- 21) Schaaf, C. A., Kwak, H., Koenig, A. et al.: Genome-wide control of RNA polymerase II activity by cohesin. *PLoS Genet.*, 9, e1003382 (2013)
- 22) Lopez-Serra, L., Kelly, G., Patel, H. et al.: The Scc2-Scc4 complex acts in sister chromatid cohesion and transcriptional regulation by maintaining nucleosome-free regions. *Nat. Genet.*, 46, 1147-1151 (2014)
- 23) Mercader, N.: Early steps of paired fin development in zebrafish compared with tetrapod limb development. *Dev. Growth Differ.*, 49, 421-437 (2007)
- 24) Tschopp, P. & Duboule, D.: A genetic approach to the transcriptional regulation of *Hox* gene clusters. *Annu. Rev. Genet.*, 45, 145-166 (2011)
- 25) Lappin, T. R., Grier, D. G., Thompson, A. et al.: *HOX* genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med. J.*, 75, 23-31 (2006)
- 26) Spitz, F.: Control of vertebrate Hox clusters by remote and global *cis*-acting regulatory sequences. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 689, 63-78 (2010)
- 27) Amano, T., Sagai, T., Tanabe, H. et al.: Chromosomal dynamics at the *Shh* locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Dev. Cell*, 16, 47-57 (2009)
- 28) Mari-Beffa, M. & Murciano, C.: Dermoskeleton morphogenesis in zebrafish fins. *Dev. Dyn.*, 239, 2779-2794 (2010)
- 29) Kmita, M., Tarchini, B., Zakany, J. et al.: Early developmental arrest of mammalian limbs lacking *HoxA/HoxD* gene function. *Nature*, 435, 1113-1116 (2005)
- 30) Kraus, P., Fraidenraich, D. & Loomis, C. A.: Some

distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech. Dev.*, 100, 45-58 (2001)

31) Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M. P. et al.: Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev. Biol.*, 236, 421-435 (2001)

著者プロフィール

武藤 彰彦 (Akihiko Muto)

略歴：1995 年 東京大学大学院理学系研究科 修了，同年 東京大学医科学研究所 博士研究員，2007 年 米国 California 大学 Irvine 校 Project Scientist を経て，2013 年より 広島大学大学院理学研究科 特任助教。

研究テーマ：染色体の構造と遺伝子発現，および，それに 関連した疾患の発症の機構。

© 2015 武藤 彰彦 Licensed under a Creative Commons 表示 2.1 日本 License