

## ゲノム学的手法による染色体構築原理の解明

A Novel Genomic Approach for the Understanding of  
the Structure and Function of Chromosomes

白髭 克彦 (Shirahige Katsuhiko)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授



### 研究の概要

本申請では、染色体の各機能領域（姉妹染色分体間接着部位、複製開始点、セントロメア、ヘテロクロマチン、ユークロマチン、テロメア等）の分子構築及び、各染色体機能の分子的連携機構を理解するためのシステム構築を狙う。そのため、細胞周期の中でも特に動的な過程である複製と分配に焦点を当て、染色体の複製から分配へといった動態をゲノム学的手法（ChIP-chip法）を用いて明らかにする。具体的には、出芽酵母および、分裂酵母の全染色体（14Mb）を対象に、S期からM期の細胞周期進行に従う、および、各種ストレスによって誘導される染色体結合蛋白の動態を解析する。蛋白の機能分化、より複雑な染色体構造の分子的基盤の解明という点で、分裂酵母を用いた解析は重要である。数十の染色体結合タンパクの動態を解析し、その上で、個々のタンパクの動態プロファイルの相関性から、染色体動態を体系的に理解するための新たな情報処理技術の開発を行う。開発したシステムを用いて、複製および分配を司る染色体上の機能領域の特異性とその連携に焦点を当て、蛋白複合体、蛋白機能、機能部位、機能的連携を予測し、実験的検証を行う。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：染色体構造、ChIP-chip、ChIP-seq、コヒーシ

### 1. 研究開始当初の背景

染色体は遺伝情報の本体であり、染色体代謝異常は癌化、老化をはじめ、種々の疾病の原因となる。染色体代謝（転写、分配、組換え、修復、複製）研究は日本が世界をリードしてきたが、個々の染色体機能に関する研究は、現在、より機能間の連携を意識した方向で進めることが必須となっている。すなわち、染色体を一つの機能装置（蛋白-DNA複合体の集積物）として詳細に丸ごと解析し、染色体という機能的統合体の中で個々の機能を洗い直す、ゲノム学的視点に立った新たな研究の展開が要求されている。

### 2. 研究の目的

本申請では、染色体の各機能領域（姉妹染色分体間接着部位、複製開始点、セントロメア、ヘテロクロマチン、ユークロマチン、テロメア等）の分子構築及び、各染色体機能の分子的連携機構を理解するためのシステム構築を狙う。そのため、細胞周期の中でも特に動的な過程である複製と分配に焦点を当て、染色体の複製から分配へといった動態をゲノム学的手法（ChIP-chip法）を用いて明らかにする。一連の解析の中で、繰り返し配列や、塩基配列のバイアスが高い、より複雑なゲノム構造を持つ生物への応用、という現行のChIP-chip法の

問題点についても解決を目指す。

### 3. 研究の方法

出芽酵母および、分裂酵母の全染色体（14Mb）を対象に、S期からM期の細胞周期進行に従う、および、各種ストレスによって誘導される染色体結合蛋白の動態を解析する。数十の染色体結合タンパクの動態を解析し、その上で、個々のタンパクの動態プロファイルの相関性から、染色体動態を体系的に理解するための新たな情報処理技術の開発を行う。これと平行して、ヒト染色体についてもChIP-chip法の構築、染色体情報解析システムの構築を試みる。

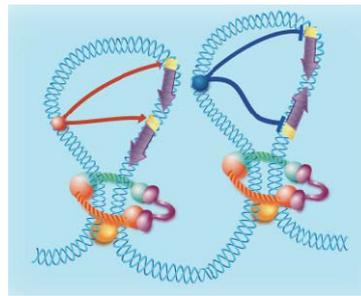
### 4. これまでの成果

出芽酵母および分裂酵母の約30の染色体結合タンパクの細胞周期動態をChIP-chip法により解析し、その解析データを元に、個々のタンパクの動態プロファイルを可視化するための情報パイプラインを構築した。情報パイプラインの構築にあたっては、チップ上の塩基配列より、繰り返し配列を全てマスクし、最終的な情報解析から除去する、また、実際のデータから、ノイズの原因となる配列を明らかにし、それを計算から除去する等の処理を行い、徹底的にバックグラウンドノイズを排除した結果、S/N比を従来以上に改善したタンパク結合プロファイルを得ることを可能にした。このようにしてChIP-chipデータの可

視化ソフトを出芽酵母、分裂酵母について開発した。

これらの解析データを元に、各タンパクプロファイル間の相関解析を行い、結合プロファイルの類似性から、出芽酵母、分裂酵母染色体の構築、機能的連携について以下の成果を主たるものとして得た。1) Smc5/6 複合体が、DNA 二重鎖切断部位へ結合すること、および、その結合が Mre11、Rad53 に依存すること。さらに、同じ複合体が DNA 損傷の有無にかかわらず染色体に結合し、その結合密度が染色体の長さに依存すること。これら、非DNA 損傷時の Smc5/6 複合体の染色体への結合はセントロメアを含むコヒーシン結合部位と一致し、コヒーシンローダー Scc2 によって結合が促進されること (Mol. Cell, 2006)。2) DNA トポイソメラーゼ I および II のプロファイル解析を行い、TopI が複製フォークの近傍で、TopII は複製フォークおよび、S 期特異的に遺伝子のプロモータ領域に局在し、両者がフォークの伸長反応を協調的に促進すること。また、top2 の欠損が DNA 損傷を引き起こし、チェックポイントを活性化することを発見した (Genes and Development, 2007)。3) DNA チップを用いた遺伝学的相互作用のスクリーニング法を新たに確立し、姉妹染色分体間接着確立因子 Ecol と遺伝学的に相互作用する因子をスクリーニングした結果、Rad61、Pds5 を同定した。Rad61 の局在解析から、このタンパクが新規コヒーシンサブユニットであることを明らかにするとともに Ecol による接着確立分子機構の一端を明らかにした (Curr. Biol., 2009)。4) 姉妹染色分体間接着確立因子の相互依存性；姉妹染色分体間接着確立因子である Ctf4、Ctf18 の両者が複製フォーク構成因子の一部として機能しており、Ctf18 の結合が Ctf4 に依存していること、また、Ctf18 が PCNA をフォークにローディングするために機能することを発見した (Mol. Cell., 2006)。5) G2 期の DNA 損傷により一度解除された姉妹染色分体間接着が再確立すること、および長期にわたる DNA 損傷により損傷特異的にリクルートされるヒストン H2AX の局在が損傷部位を遥かに超え、時には染色体全体のヒストン H2A と置換されることを見いだした (Science, 2007)。6) 分裂酵母染色体の複製開始点の構成を明らかにした (Embo J, 2008)。これらの研究成果は最終年度に向けてデータベースとして、解析ソフトと共に公開していく予定である。

一方、本研究開始当初より、ChIP-chip 解析技術をよりゲノム構造のより複雑な高等真核生物に生かすべく試行錯誤を行い、最終的に、ヒト、マウスを含む高等真核生物でも精度の高いタンパク局在解析を行うことを可能にした (Methods in Enzymology, 2006, Genomics, 2007)。このブレイクスルーを得たことにより、ヒト染色体構造の解析も開始し、ヒトにおける



コヒーシンの局在解析を通じて、コヒーシンのタンパクの分配に於ける機能とは独立の新しい転写に於ける機能を発見した (Nature, 2008,

PLoS Biology, in press)。我々はコヒーシンが二本のクロマチンを束ねる分子であることを考慮した上で、図に示すようなループの形成にコヒーシンが CTCF (図ではオレンジの球) とともに関与していると考えている。このループは発現制御単位を反映しており、染色体上にはこのようにループ状に束ねられた単位が数多く存在していると考えられる。異なるループは核内では空間的に隔てられ、相互作用が不可能であると考えれば、コヒーシンのインスレーター機能を説明できる。また、このループにより、時には数メガも離れて存在するエンハンサーを、空間的にプロモーターの近傍に配置することが可能である。

#### 5. 今後の計画

今後は、酵母に加えヒト染色体の動態解析を通して、染色体情報解析システムの開発を引き続き行う。酵母の場合は、最終年度に向けてシステムの公開と現在までに蓄積した数百のタンパク結合プロファイルのデータベース化に重点を置く。酵母、ヒト共に、次世代シーケンサー SoLid の導入を視野にいれ、ChIP-chip 解析と ChIP-seq 解析を併用しながら、今まで以上に網羅性、汎用性の高い解析系を構築する。

最初の3年間に達成したいいくつかの発見のうち、特にコヒーシンの転写に於ける役割 (インスレーター機能) に焦点を当て、その分子機構を明らかにすべく、コヒーシン自身の修飾の動態解析も含め実施する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Liu, Z. Zhang, M. Bando, T. Itoh, M. A. Deardorff, D. Clark, M. Kaur, S. Tandy, T. Kondoh, E. Rappaport, N. B. Spinner, H. Vega, L. G. Jackson, **K. Shirahige**, I. D. Krantz Transcriptional Dysregulation in NIPBL and Cohesin Mutant Human Cells. **PLoS Biology**, 2009 in press
2. **T. Sutani**, T. Kawaguchi, R. Kanno, T. Itoh, and **K. Shirahige** Budding Yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 Complex Counteracts Sister Chromatid Cohesion- Establishing Reaction. *Curr. Biol.* 19, 492-497 (2009)
3. K.S. Wendt\*, K. Yoshida\*, T. Itoh\*, M. Bando, B. Koch, E. Schirghuber, S. Tsutsumi, G. Nagae, K. Ishihara, T. Mishiro, K. Yahata, F. Imamoto, H. Aburatani, M. Nakao, N. Imamoto, K. Maeshima, **K. Shirahige**+, J.M. Peters+-. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. **Nature**. 451, 796-801.(2008) (+shared corresponding authors) (\*equally contributed authors)

受賞

第五回日本学術振興会賞