

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18101007

研究課題名 (和文) ゲノム学的手法による染色体構築原理の解明

研究課題名 (英文) A Novel Genomic Approach for the Understanding of the Structure and Function of Chromosomes

研究代表者

白髭 克彦 (SHIRAHIGE KATSUHIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：90273854

研究成果の概要 (和文)：

出芽酵母、分裂酵母を用いた解析により、基本的な染色体情報解析システムのパイプラインは構築され、染色体の基本的な構造、染色体機能の制御、そしてその連携機構についていくつもの新しい発見があった。特に、本研究が契機となりひと染色体構造の解析技術を構築できた意義は大きい。興味深い発見につながったものとして、1) ヒトに於いて、ChIP-chip 解析が可能となったこと、および、2) ヒトコヒーシンの ChIP-chip 解析から明らかとなったコヒーシンの転写に於ける機能の発見、があげられる。当初、本研究を開始した時点では、ヒト染色体で ChIP-chip 解析を行うことは、ゲノムの5割を超える繰り返し配列が PCR で増幅する際のバイアスとなるため不可能であった。そこで、この増幅法の検討を重ね、DNA を *in vitro* transcription により、RNA として直線的に増幅し、リピート配列によるバイアスを抑制することで、ヒト染色体構造も ChIP-chip 解析可能な系を構築することが出来た。さらに、この技術を用いて、コヒーシンについて、効率の良い染色体免疫沈降が可能な抗体を取得し、ヒト染色体上における局在解析を行った。その結果、染色体分配に必須の役割を持つコヒーシンがヒトではその機能とは独立にインシュレーターとして転写制御に機能していることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

We have built up the system for the efficient analysis of chromosome structure of yeast species. Based on this system, we have identified many cross talks between chromosome functions and newly developed the new system to analyze chromosome structure of higher eukaryotes. The key method is to use *in vitro* transcription instead of PCR for the amplification of genomic fragment from higher eukaryotes that contain many and various classes of repetitive sequences, to avoid biased amplification of repeat. Using the system we unexpectedly found that cohesion, the protein complex essential for holding sister chromatids together until the onset of M-phase, co-localizes with CTCF, the protein essential for transcriptional insulation. Our data suggest that the cohesion complex itself is required for transcriptional insulation and CTCF is required for proper localization of cohesion complexes on chromosome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	14,000,000	4,200,000	18,200,000
2007年度	20,500,000	6,150,000	26,650,000
2008年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
2009年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
2010年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
総計	79,600,000	23,880,000	103,480,000

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：染色体構築、ChIP-chip、ChIP-seq、コヒーシン

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た。

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たる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した。

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した。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た。

4. 研究成果

出芽酵母、分裂酵母を用いた解析により、基本的な染色体情報解析システムのパイプラインは構築され、染色体の基本的な構造、染色体機能の制御、そしてその連携機構についていくつもの新しい発見があった。これらは当初、姉妹染色分体間接着因子や複製の終結について、我々が設定したいくつかの課題を単に解決するに留まらず、新たな知見をもたらし、さらなる発展へとつながっている。

さらに、本研究で予想外の進展があり、興味深い発見につながったものとして、1) ヒトに於いて、ChIP-chip 解析が可能となったこと、および、2) ヒトコヒーシンの ChIP-chip 解析から明らかとなったコヒーシンの転写に於ける機能の発見、があげられる。ここで、は主としてこの二点について述べる。

当初、本研究を開始した時点では、ヒト染色体で ChIP-chip 解析を行うことは、ゲノムの 5 割を超える種々の繰り返し配列が、DNA を PCR で増幅する際のバイアスとなり（DNA チップにハイブリダイゼーションするためには、染色体免疫沈降で得られる DNA を増幅するステップが必須である）、不安定かつ過剰に増幅されてしまうため不可能であった。そこで、この増幅法の検討を重ね、染色体免疫沈降で得られる微量の DNA を *in vitro* transcription により、RNA として直線的に増幅し、リピート配列によるバイアスを抑制することで、ヒト染色体構造も ChIP-chip 解析可能な系を構築することが出来た。

この技術を用いて、コヒーシンについて、効率の良い染色体免疫沈降が可能な抗体を取得し、ヒト染色体上における局在解析を行った。コヒーシンは名前の示す通り S 期で DNA 複製された結果生じた姉妹染色分体を束ねて接着させ、染色体を正確に分配するために必須の役割を持つ蛋白質複合体である。その構造と必須機能は、酵母からヒトまで広く保存されている。コヒーシンは染色体分配以外にも組換え、修復、転写において重要な役割を担うことが近年の研究から示唆されている。面白いことに、マウスの神経細胞など、分化した（増殖しない）細胞でもコヒーシンの存在は確認されること、さらに、コヒーシンサブユニットの変異やコヒーシンローダー Scc2 の変異が重篤な発生分化異常を伴う CdLS（コルネリア・デ・ランゲ症候群）と呼ばれる疾患をヒトで引き起こすことから、より直接的にコヒーシンが転写に機能しているのではないかと考えられた。ChIP-chip 法をもちい、ヒトのコヒーシンの局在を解析を行ったところ、ヒトの全ゲノム（我々のアルゴリズムでは繰り返し配列は計算から除外するので、およそヒトゲノムの 4 割の領域が対象）から 8811 カ所の有意なコヒーシン局在部位が同定された。場所の内訳は、49%が遺伝子間、35%がイントロンの中、13%が遺伝子から 5kb 以内に存在した。特に、遺伝子の上流あるいは下流の 5kb 以内に、有意に二倍（タンパクがランダムに配置すると仮定した場合に比べて）コヒーシンが濃縮して局在

していた。これらの局在は、siRNA でコヒーシンのサブユニットをノックダウンした場合、消失または低下するため、コヒーシン特異的であることが示された。

これらの解析過程において、コヒーシン局在部位のいくつかは、既に転写のインシュレーター結合蛋白質 CTCF (CCCTC-binding factor) の結合領域として報告されていることに気付いた。そこで、CTCF 結合部位をゲノムワイドに解析したところ、驚くべきことに、90%のコヒーシン局在部位が CTCF と一致した。コヒーシンと CTCF の局在の相互依存性を調べたところ、CTCF を siRNA でノックダウンした細胞では、コヒーシンの特異的な局在は顕著に減少した、一方でコヒーシンのクロマチン結合量そのものには変化は見出されなかった。このことは、CTCF はコヒーシンがヒトゲノム上の特定の場所に局在するために必要であるが、コヒーシンの結合そのものには関係ないことを示している。逆に CTCF は局在も結合もコヒーシンに対する依存性は低い。コヒーシンが、実際にインシュレーター機能を担っているかを調べるために、コヒーシンと CTCF のノックダウン後のゲノムワイドな転写変化をそれぞれ、ヒト転写解析用チップを用いて解析した。その結果、CTCF ノックダウンを行った場合もコヒーシンノックダウンを行った場合も、それぞれのタンパクの局在部位から 25kb 以内にある遺伝子は、転写が増加する傾向が見られた。さらに、コヒーシンが実際にインシュレーター機能にも関与するかを、ニワトリ beta-globin の locus control region (LCR) 由来の HS4 インシュレーターを用いたレポーターシステムにより解析した。その結果、CTCF およびコヒーシンが HS4 インシュレーターの機能にも関与することが示された。さらに、コヒーシンが結合するいくつかの領域は、ゲノムインプリンティングを制御している場所であるため、コヒーシンがインプリンティングに関与しているか否かを調べたところ、H19/IGF2 遺伝子座において、コヒーシンがインプリンティングに関与していることが判明した。現在、DNA チップの限界 (ユニークな配列のみアクセス可能。クロスハイブリダイゼーションの可能性は排除できない。プローブ長が解析精度の限界を決めている) を乗り越えるべく、タンパクプロファイル解析を次世代シーケンサーを導入して行い、繰り返し配列も含め、真にゲノム全体を解析できる染色体情報解析システムの構築を開始するとともに、当初以上にヒト、マウスといった高等真核生物の染色体構造と動態の解析に焦点を当て始めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 31 件)

1. 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#, and J.-M. Peters# Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* (article). 451, 796-801, (2008) (*equally contributed author) (#shared corresponding author) 査読有
2. H. Lou, M. Komata, Y. Katou, Z. Guan, C. C. Reis, M. Budd, K. Shirahige, J. L. Campbell1, Mre11 and DNA polymerase ϵ function together in linking DNA replication and the S phase checkpoint *Mol. Cell* 32, 106-117 (2008) 査読有
3. C. D'Ambrosio, C. K. Schmidt, Y. Katou, G. Kelly, T. Itoh, K. Shirahige, and F. Uhlmann Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes Dev.* 22, 2215-2227 (2008) 査読有
4. M. Sadaie, R. Kawaguchi, Y. Ohtani, F. Arisaka, K. Tanaka, K. Shirahige, J. Nakayama Balance between distinct HPI family proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. *Mol Cell Biol.* 28, 6973-6988 (2008) 査読有
5. K. Nakamura, A. Okamoto, Y. Katou, C. Yadani, T. Shitanda, C. Kaweeteerawat, T. S. Takahashi, T. Itoh, K. Shirahige, H. Masukata, and T. Nakagawa Rad51 suppresses gross chromosomal rearrangement at centromere in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 27, 3036-3046 (2008) 査読有
6. M. Nishizawa, T. Komai, Y. Katou, K. Shirahige, T. Itoh, and A. Toh-E Nutrient-regulated antisense and intragenic RNAs modulate a signal transduction pathway in yeast. *PLoS Biol.* 6, 2817-2830 (2008) 査読有
7. R. Bermejo, Y. Doksani, T. Capra, Y. M.

- Katou, H. Tanaka, K. Shirahige*, and M. Foiani* Top1- and Top2-mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation. *Genes Dev.* 21, 1921-1936 (2007) (*shared corresponding author). 査読有
8. K. Kasahara, K. Ohtsuki, S. Ki, K. Aoyama, H. Takahashi, T. Kobayashi, K. Shirahige, and T. Kokubo Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 27, 6686-6705 (2007) 査読有
 9. J. Gregan, C. G. Riedel, A. L. Pidoux, Y. Katou, C. Rumpf, A. Schleiffer, S. E. Kearsey, K. Shirahige, R. C. Allshire, and K. Nasmyth The Kinetochores Pcs1 and Mde4 and Heterochromatin Are Required to Prevent Merotelic Orientation. *Curr Biol* 17, 1190-200 (2007) 査読有
 10. L. Strom L, C. Karlsson, H. B. Lindroos, S. Wedahl, Y. Katou, K. Shirahige, and C. Sjogren Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break. *Science.* 317, 242-245 (2007) 査読有
 11. K. Kugou, H. Sasanuma, K. Matsumoto, K. Shirahige, and K. Ohta Mre11 mediates gene regulation in yeast spore development. *Genes Genet Syst.*, 82, 21-33 (2007) 査読有
 12. M. Terasawa, H. Ogawa, Y. Tsukamoto, M. Shinohara, K. Shirahige, N. Kleckner, and T. Ogawa Meiotic recombination-related DNA synthesis and its implications for cross-over and non-cross-over recombinant formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 5965-5970, (2007) 査読有
 13. M. Hayashi, Y. Katou, T. Itoh, M. Tazumi, Y. Yamada, T. Takahashi, T. Nakagawa, K. Shirahige, and H. Masukata Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast. *EMBO J.*, 26, 1327-1339 (2007) 査読有
 14. K. Takayama, K. Kaneshiro, S. Tsutsumi, K. Horie-Inoue, K. Ikeda, T. Urano, N. Ijichi, Y. Ouchi, K. Shirahige, H. Aburatani, and S. Inoue Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene.* 26, 4453-4463 (2007) 査読有
 15. S. Mori and K. Shirahige Perturbation of the activity of replication origin by meiosis specific transcription, *J. Biol. Chem.*, 282, 4447-4452 (2007) 査読有
 16. S. Ide, K. Watanabe, H. Watanabe, K. Shirahige, T. Kobayashi, and H. Maki Abnormality in initiation program of DNA replication is monitored by the highly repetitive rDNA array on chromosome XII in budding yeast, *Mol. Cell. Biol.*, 27, 568-578 (2007) 査読有
 17. K. Kaneshiro, S. Tsutsumi, S. Tsuji, K. Shirahige, and H. Aburatani An integrated map of p53-binding sites and histone modification in the human ENCODE regions *Genomics*, 89, 178-188 (2007) 査読有
 18. M. T. Ocampo-Hafalla, Y. Katou, K. Shirahige, F. Uhlmann Displacement and re-accumulation of centromeric cohesin during transient pre-anaphase centromere splitting. *Chromosoma.* 116, 531-544 (2007) 査読有
 19. Y. Katou, K. Kaneshiro, H. Aburatani, and K. Shirahige. Genomic Approach for the Understanding of Dynamic Aspect of Chromosome Behavior. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, vol. 409, chapter 23, 389-410 in "DNA Repair" (edited by J. Campbell) (2006) 査読有
 20. C. G. Riedel, V. L. Katis, Y. Katou, S. Mori, T. Itoh, W. Helmhart, M. Gálová, M. Petronczki, J. Gregan, B. Cetin, I. Mudrak, E. Ogris, K. Mechtler, L. Pelletier, F. Buchholz, K. Shirahige and K. Nasmyth. Protein Phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion. *Nature* (Article) 441, 53-61 (2006) 査読有

21. Y. Kanoh, K. Tamai, and K. Shirahige. Different requirements for the association of ATR-ATRIP and 9-1-1 to the stalled replication forks. *Gene.*, 377, 88-95 (2006) 査読有
22. K. Matsui, T. Hirayama, K. Kuroda, K. Shirahige, T. Ashikari, and M. Ueda. Screening for candidate genes involved in tolerance to organic solvents in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 71, 75-79 (2006) 査読有
23. H. Betts Lindroos, L. Strom, T. Itoh, Y. Katou, K. Shirahige*, and C. Sjogren* (*equally contributed author). Chromosomal Association of the Smc5/6 Complex Reveals that It Functions in Differently Regulated Pathways. *Mol Cell.*, 22, 755-767 (2006) 査読有
24. Y. Katou, K. Kaneshiro, H. Aburatani, and K. Shirahige. Genomic Approach for the Understanding of Dynamic Aspect of Chromosome Behavior. *Methods in Enzymology*, Elsevier Life Sciences (CA), vol. 409, chapter 23, 389-410 in "DNA Repair" (edited by J. Campbell) (2006) 査読有
25. S. Gruber, P. Arumugam, Y. Katou, D. Kuglitsch, W. Helmhart, K. Shirahige, and K. Nasmyth Evidence that Loading of Cohesin Onto Chromosomes Involves Opening of Its SMC Hinge, *Cell*, 127, 523-537 (2006) 査読有
26. M. Petronczki, J. Matos, S. Mori, J. Gregan, A. Bogdanova, M. Schwickart, K. Mechtler, K. Shirahige, W. Zachariae, and K. Nasmyth Monopolar attachment of sister kinetochores at meiosis I requires casein kinase 1. *Cell*, 126, 1049-1064 (2006) 査読有
27. A. Lengronne, J. McIntyre, Y. Katou, Y. Kanoh, K. P. Hopfner, K. Shirahige, and F. Uhlmann Establishment of Sister Chromatid Cohesion at the S. cerevisiae Replication Fork. *Mol Cell.*, 23, 787-799 (2006) 査読有
28. D. Q. Ding, N. Sakurai, Y. Katou, T. Itoh, K. Shirahige, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. Meiotic cohesins modulate chromosome compaction during meiotic prophase in fission yeast. *J Cell Biol.*, 174, 499-508 (2006) 査読有
29. H. Tamaki, C.W. Yun, T. Mizutani, T. Tsuzuki, Y. Takagi, M. Shinozaki, Y. Kodama, K. Shirahige, and H. Kumagai. Glucose-dependent cell size is regulated by a G protein-coupled receptor system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells.*, 10, 193-206 (2005) 査読有
30. Y. Tonami, H. Murakami, K. Shirahige, and M. Nakanishi. A checkpoint control linking meiotic S phase and recombination initiation in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 5797-801 (2005) 査読有
31. K. Unno, P. R. Juvvadi, H. Nakajima, K. Shirahige, and K. Kitamoto. Identification and characterization of rns4/vps32 mutation in the RNase T1 expression-sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for altered ambient response resulting in transportation of the secretory protein to vacuoles. *FEMS Yeast Res.*, 5, 801-812 (2005) 査読有

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chromosomeinformatics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白髭 克彦 (SHIRAHIGE KATSUHIKO)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
 研究者番号：90273854

(2) 研究分担者

広田 亨 (HIROTA TORU)
 財団法人癌研究会・癌研究所・実験病理部・部長
 研究者番号：50421368
 須谷 尚史 (SUTANI TAKASHI)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
 研究者番号：30401524
 伊藤 武彦 (ITOH TAKEHIKO)
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
 研究者番号：90501106