

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19207001

研究課題名（和文）ゲノム高次構造の構築メカニズムと細胞内オーガナイゼーション

研究課題名（英文）Higher-order genomic structure and subcellular organization

研究代表者

竹安 邦夫（TAKEYASU KUNIO）

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：40135695

研究代表者の専門分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム構築・機能・再編・発現・維持

1. 研究計画の概要

(I) 高次ゲノム構築の一般原理の解明

再構成系を用いて真核生物のクロマチン高次折りたたみ機構を解明すると共に、染色体・核様体構造を代表的な生物クラス間で比較し、さらにバイオインフォマティクスを用いた比較ゲノム解析を行うことで、真核生物間および原核生物間で特異的あるいは普遍的なゲノム高次構造の構築機構を明らかにする。

(II) 核内タンパク質と高次クロマチンとの相互作用様式の解明

核内でクロマチンの高次折りたたみに関与していると考えられるタンパク質に注目し、それを含んだクロマチン高次複合体の再構成を目指す。たとえば、核マトリクスタンパク質であるII型トポイソラーゼ（トポII）に注目し、トポIIを加えた再構成クロマチンファイバーの構造を、原子間力顕微鏡を用いた1分子イメージング法等により解析する。また、ヒストンシャペロンなどのクロマチン結合タンパク質の作用様式を解明する。

(III) 核膜と高次クロマチンとの相互作用様式の解明

クロマチンと核膜との相互作用は、染色体の核内配置、遺伝子の機能発現、染色体分配等に重要な役割を果たしている。

高次クロマチンファイバーと核膜との結合がいかにして制御されているかを、1分子力計測等の技術を用いて解明する。

2. 研究の進捗状況

(1) 高次ゲノム構築の一般原理の解明

①TK0471遺伝子の破壊株を作成し、始原菌の核様体のヘテロな高次構造におよぼ

す影響を原子間力顕微鏡で、各種遺伝子の発現におよぼす影響をDNAアレイで解析する。

②大腸菌においても、核様体を単離し、MNaseで部分分解し、ショ糖密度勾配法により核様体フラグメントを分画した後、各画分に含まれる遺伝子断片とタンパク質を分析し、核様体フラグメントの構造を原子間力顕微鏡で解析した。その結果、大腸菌核様体は、MrEB遺伝子産物を介して細胞膜と強固に結合していることが分かった。今年度は、核様体フラグメント・MrEB遺伝子産物・細胞膜が織り成す高次構造を原子間力顕微鏡で解析し、その高次構造におよぼすMrEB阻害剤（A22）の影響を調べる。

③分裂酵母のゲノムにはリンカーヒストン（H1やH5）が存在しないが、核内では「Beads-on-a-string」構造をとることが分かっている。ただ、高等動植物のものより、ヌクレオソーム間の距離が数十塩基対短い。一方、試験管内で再構成したヌクレオソームはヒトのものと同様な「Beads-on-a-string」構造をとり、また、ヒストンH1とも結合し「太いファイバー」を形成することが分かった。ただ、ヒストンH1はヒトでは30nmファイバーをつくるが、酵母では20nmファイバーを形成する。これは、コアヒストンのN-末端の電荷の差によるものであると解釈できる。本年度は分裂酵母にヒストンH1遺伝子を導入し、核内でのゲノム構造におよぼす影響を解析する。

(2) 核内タンパク質と高次クロマチンとの相互作用様式の解明

①これまでに、核小体に局在する機能未知の核マトリクスタンパク質（MAK16、WD4

6、MAGEF、FAM27E1等)をコードするcDNAをクローニングし、GFP(クラゲの緑色蛍光タンパク質)との融合タンパク質としてHeLa細胞で発現させた。FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)解析の結果、これらの核内での移動速度の非常に遅いものであった。今年度はこれらのタンパク質をそれぞれsiRNAでノックダウンした際の他のタンパク質の動態への影響を調べ、各タンパク質間の相互作用を明らかにする。

②WD46はN-末端とC-末端にDisordered領域を有するが、これまでに、N-末端のDisordered領域が特異的にヒストン8量体と結合すること、また、分子中央部のWD領域はヒストンH3と特異的に結合することが分かった。今年度はWD46のこれらの領域がもつ特異的機能の更なる解析を進める。

③昨年度、細胞骨格タンパク質であるアクチニン4は細胞周期依存的に細胞核-細胞質間をシャトルすることを発見した。核内に入ったアクチニン4はINO80複合体と結合し、特定の遺伝子の発現を制御することも分かった。また、アクチニン4の分子量は大きい(105kDa)にも関わらず、その核内移行にはインポーチンを必要としないことも分かった。今年度はこのアクチニン4の核移行メカニズムの詳細を、アクチニン4の有するスペクトリンリピートに注目して解析する。

(3)核膜と高次クロマチンとの相互作用様式の解明

今年度は大腸菌で発現させたGST-LBR融合タンパク質を原子間力顕微鏡探針に取り付け、LBRと高次クロマチンとの相互作用を力学的に解析し、また認識イメージングによりLBRと高次クロマチンとの結合様式を明らかにする。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

4. 今後の研究の推進方策

予定通り進める。

5. 代表的な研究成果(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22件)すべて査読有数が多いので、以下過去1年分のみを掲載

1. Y. Suzuki, Y. Higuchi, K. Hizume, M. Yokokawa, S.H. Yoshimura, K. Yoshikawa & K. Takeyasu (2010) Molecular Dynamics of DNA and Nucleosomes in Solution Studied by Fast-scanning Atomic Force Microscopy. *Ultramicroscopy* (In Press)

2. H. Takahashi, K. Hizume, M. Kumeta, S.H. Yoshimura & K. Takeyasu (2010) Single-molecule Anatomy by Atomic Force Microscopy and Recognition Imaging. *Arch. Histology and Cytology* (In Press)
3. Y. Hirano, Y. Iwase, K. Ishii, M. Kumeta, T. Horigome & K. Takeyasu (2009) Cell Cycle-Dependent Phosphorylation of MAN-1. *Biochemistry*, 48:1636-1643.
4. K. Hizume, T. Nakai, S. Araki, E. Prieto, K. Yoshikawa & K. Takeyasu (2009) Removal of histone tails from nucleosome dissects the physical mechanisms of salt-induced aggregation, linker histone H1-induced compaction and 30-nm fiber formation of the nucleosome array. *Ultramicroscopy*, 109: 868-873.
5. J.L. Gilmore, Y. Suzuki, G. Tamulaitis, V. Siksnys, K. Takeyasu & Y.L. Lyubchenko (2009) Single-Molecule Dynamics of the DNA-EcoRII Protein Complexes Revealed with High-Speed Atomic Force Microscopy. *Biochemistry*. 48(44): 10492-8.
6. F. Pratto, Y. Suzuki, K. Takeyasu & J.C. Alonso (2009) Single-molecule analysis of protein-DNA complexes formed during partition of newly replicated plasmid molecules in *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem*. 284(44): 30298-306.

[学会発表](計20件)

省略

[図書](計4件)

1. Takeyasu K, Maruyama H., Suzuki Y., Hizume K. & Yoshimura S.H. (2009) Modern Atomic Force Microscopy and Its Application to the Study of Genome Architecture. In "Applied Scanning Probe Methods, Vol. 14" ed. B. Bhushan. Springer-Verlag, Heidelberg
2. Ohniwa R.L., K. Morikawa, Ohta T., Wada C. & Takeyasu K. (2009) Nucleoid Architecture and Dynamics in Bacteria. In "Bacterial DNA Research Progress" eds. Frank Columbus and Lauren Perl. NOVA Publishers
3. Hizume K, Yoshimura S.H., Kumeta M, Takeyasu K. (2007) Structural organization of dynamic chromatin. In "Chromatin and Disease" eds. T.K Kundu. D. Dipak (Subcellular Biochemistry series Vol. 41) Page 3-28. SpringerVerlag.
4. Kobori T, Hizume K, Ohniwa R.L., Yoshimura S.H., Takeyasu K. (2007) Biochemical and biophysical basis of genome folding mechanisms. In "Biopolymer Research Trends" ed. Pablo C. Sanchez. Page 107-135. Nova Science Publishers

[産業財産権]

なし