

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22221009

研究課題名(和文) ヒト染色体動態の全体像解明に向けた染色体情報システムの構築

研究課題名(英文) A novel approach for the understanding of basic structure and behavior of human 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 172,700,000円

研究成果の概要(和文)： ヒト染色体について、その動態を解析するための技術と情報基盤を開発した。また、SMCタンパク、ヒストン修飾、RNAポリメラーゼを中心にChIP-seq法を用いその細胞周期、老化、分化異常における動態を明らかにした。主たる業績としては1)非ヒストンタンパクのアセチル化による制御機構を解明した、2)染色体高次構造と転写の伸長反応を連携させる因子としてコヒーシンを同定した、3)コンデンシンがR-loopの解消を介して、染色体分配にとって有害な染色体構造を除去するメカニズムの発見、4)染色体動態解析パイプラインの構築が挙げられる。

研究成果の概要(英文)： We have built up the informatics system to explore human chromosome dynamics by Next Generation Sequencer Based Technology. Then by using this technology we have analyzed chromosome behavior during cell cycle, aging, and in cell line established from developmental disease patient. Our main achievements can be summarized as follows. 1) Discovery of cohesin deacetylase and its function during cell cycle, 2) Identification of cohesin as an essential component that link chromosome high order structure and transcriptional elongation, 3) identification of condensin's role as a masker of R-loop during mitosis, and 4) Establishment of new chromosomal informatics system (DROMPA) to understand chromosome dynamics.

研究分野：ゲノム構造学

キーワード：染色体 ゲノム構造 染色体構造 染色体機能 転写 次世代シーケンサー タンパクプロファイル
解析 SMCタンパク

1. 研究開始当初の背景

染色体は種々の染色体機能(複製、分配、転写、高次構造制御、組換え、修復)の連携と統合の場であり、種々の疾病や老化は染色体諸機能の統合不全と捉えることが出来る。現在の染色体研究の命題は染色体諸機能の連携と統合が染色体と言う一つの機能分子上で如何に達成されているか、つまり、個別因子の動態と相互作用を通じた機能的連携が染色体全体の動態に如何に組み込まれているか、を解明することにある。そのためには特定のタンパク質を出発点にした遺伝学、生化学的解析に加え、染色体を丸ごと一つの機能的統合体(DNA-タンパクの巨大複合体)として詳細に解析し、諸機能の連携と階層性を洗い直す、ゲノム学的視点からの研究の展開が必須である。特にヒト染色体に固有の基本構造と連携機構、その疾病分子病態への関与を理解するためには、ヒト染色体の構築、動態の分子基盤の全体像の解明を目指した研究を展開する必要がある。

2. 研究の目的

染色体は生命の本質である。染色体は種々の染色体機能の連携と統合の場であり、種々の疾病や老化は染色体諸機能の統合不全と捉えることが出来る。本課題ではヒト染色体を研究対象とし、1)リピート配列も含め、全染色体レベルで染色体構築、動態、核内構造を掌握可能な染色体情報解析システムの構築、2)1)のシステムを用いた、ヒト染色体の構造基盤、諸機能の連携機構の予測、3)さらに、2)の予測を実験的に検証し、ヒト染色体の基本動態について理解する。本申請により機能連携統合体として全く新たなヒト染色体像を得るだけでなく、構築する染色体情報解析システムは種々の疾病の分子病態に新たな側面から迫るための基盤となる。

3. 研究の方法

本課題の実施にあたっては、ヒト染色体の構造を余すところ無く(リピート配列も含め)迅速に解析可能な汎用性の高いChIP-seq 情報解析パイプライン(シークエンスデータを統計処理し、様々な解像度で情報の可視化までの一連の処理を迅速に行う技術開発)を構築する。解析対象として、ヒト特異的な染色体構造の理解、タンパクの機能分化、という観点から、パラログが複数種類存在する染色体構成タンパクファミリーを重点的に抽出し全染色体レベルでのChIP-seqによるプロファイル解析を行う。個々のタンパク質結合プロファイル、転写産物、さらに、既存データベースと文

献より抽出したゲノム構造情報との相関解析を行い、その結果に基づき、染色体上の各領域を特徴付けるタンパク質群、その変遷と動態を可視化し、ヒト染色体動態を体系的に理解するための情報処理システムを構築する。

このシステムにより、異なる機能領域が共有する因子、領域を通じた連携、新規の機能領域、タンパク質複合体、タンパク質機能について予測し、実験的に検証する。染色体の基本的機能を司る領域の特異性とその連携について焦点を当て、全体像の解明無くしては困難な課題の解明を、遺伝学、生化学的解析、およびゲノム学的解析を駆使し、目指す。

4. 研究成果

ヒト染色体について、その動態を解析するための技術と情報基盤を開発し、DROMPA と命名した。染色体の基本構造の構築に必須の役割を果たしている SMC タンパクファミリー(コンデンシン、コヒーシン、SMC5/6 複合体)ヒストン修飾、RNA ポリメラーゼを中心にChIP-seq 法を用いその細胞周期、老化、分化異常においての動態を明らかにした。主たる業績としては以下の5つがあげられる。

1) コヒーシンの脱アセチル化酵素、アセチル化酵素の同定と両者によるコヒーシン動態の制御機構

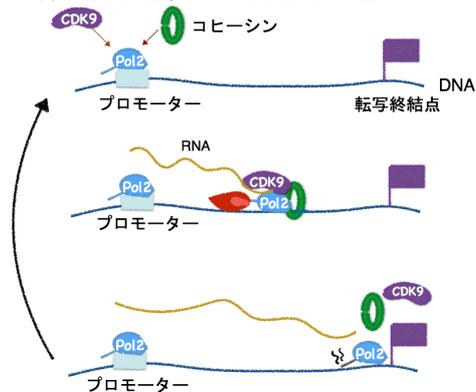
コヒーシンはアセチル化されることにより DNA への結合が安定化される。このアセチル化はコヒーシンの真核生物を通じて保存された機能である姉妹染色分体間接着に重要な役割を果たしていると考えられている。我々はコヒーシンのアセチル化が二種類の酵素 Escp1 と Escp2 により担われており、Escp2 が細胞周期の S 期のみでコヒーシンをアセチル化するのに対し、Escp1 は細胞周期を通じてその活性を維持し、Escp2 に対して補完的に機能することを明らかにした。さらに、Escp1 が常にコヒーシンと相互作用し、その役割を果たすことを明らかにした。

一方、スクリーニングによりコヒーシン脱アセチル化酵素として、Hdac8 を同定した。Hdac8 は前の細胞周期で使用されたコヒーシンをリサイクルする際に機能しており、その欠損により分化異常症の一つである CdLS(コルネリア デラング症候群)が発症することを見出した(業績9,16)。このことはコヒーシンのアセチル化も転写制御に機能していることを示している。

2) 染色体高次構造と転写の伸長反応を連携させる因子(コヒーシン)

コヒーシンが転写の伸長反応を促進する際に、RNA ポリメラーゼの C 末の 2 番目のセリンをリン酸化する酵素である SEC(SUPER ELONGATION COMPLEX: CDK9 を含

む巨大複合体)と相互作用し、転写の伸長反応(プロモーターで停止しているRNAポリメラーゼを伸長反応モードへ活性化する段階)を制御していることを発見した(図)。興味深いことにSECの機能獲得型変異はCHOPS症候群という分化異常症を引き起こし、この疾患はコヒーシンの



図：コヒーシンとCDK9による転写制御

機能欠損により発症するとされるCdLSと転写のプロファイルが非常に類似していた(業績15)。これらのことはCdLSもRNAポリメラーゼの伸長反応異常により引き起こされることを示しており、コヒーシンが従来想像されているようなゆるい染色体のループ構造を通してのみならず、実際の転写過程そのものに役割を担っていることを示している。

3) R-loopの解消を介して、染色体分配にとって有害な染色体構造を除去するコンデンシンの役割

コンデンシンがヒト、分裂酵母において、M期にR-Loop構造を染色体上から取り除くことにより染色体分配に有害な一本鎖DNA構造を除去していることを見出した。分裂酵母ではコンデンシン変異による染色体分配異常が転写阻害剤により抑制され、ヒトでは、コンデンシンを阻害することによりRNAPoIIIがM期にプロモーター領域に再結合することを見出した(Nature Commun,2015 in press)。

4) SMC5/6タンパクの間期における役割の発見

SMC5/6複合体が複製の進行を促進していることを発見した。また、その間期での機能が引き続き誘導される染色体の凝縮(コンデンシン及びTOPIIの局在)に必要であることを見出した(業績13)。

5) 染色体動態可視化ソフトDROMPAの開発

ChIP-seq、ChIP-chip等のタンパク結合プロファイルデータを手早く解析、可視化可能なソフトDROMPAを開発した(業績12)。本ソフトを用い国内外で40以上の共同研究を行いその成果を発表した。現在、DROMPAはDROMPAIIにバージョンア

ップし、web上で可視化ツールとして公開している

(<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chromosomeinformatics/rnakato/drompa/>)

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38件)代表的なものを示す。

1. Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. Nishiyama T, Ladurner R, Schmitz J, Kreidl E, Schleiffer A, Bhaskara V, Bando M, Shirahige K, Hyman AA, Mechtler K, Peters JM. *Cell*. 2010 Nov 24;143(5):737-49. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.031.
2. A positively charged channel within the Smc1/Smc3 hinge required for sister chromatid cohesion. Kurze A, Michie KA, Dixon SE, Mishra A, Itoh T, Khalid S, Strmecki L, Shirahige K, Haering CH, Löwe J, Nasmyth K. *EMBO J*. 2011 Jan 19;30(2):364-78. doi: 10.1038/emboj.
3. ATP hydrolysis is required for relocating cohesin from sites occupied by its Scc2/4 loading complex. Hu B, Itoh T, Mishra A, Katoh Y, Chan KL, Upcher W, Godlee C, Roig MB, Shirahige K, Nasmyth K*. *Curr Biol*. 2011 Jan 11;21(1):12-24. doi: 10.1016/j.cub.2010.12.004. (*Shared Corresponding Authors)
4. Chromosome length influences replication-induced topological stress. Kegel A, Betts-Lindroos H, Kanno T, Jeppsson K, Ström L, Katou Y, Itoh T, Shirahige K, Sjögren C. *Nature*. 2011 Mar 17;471(7338):392-6. doi: 10.1038/nature09791.
5. Spo11-accessory proteins link double-strand break sites to the chromosome axis in early meiotic recombination. Panizza S, Mendoza MA, Berlinger M, Huang L, Nicolas A, Shirahige K, Klein F. *Cell*. 2011 Aug 5;146(3):372-83. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.003.
6. The replication checkpoint protects fork stability by releasing transcribed genes from nuclear pores. Bermejo R, Capra T, Jossen R, Colosio A, Frattini C, Carotenuto W, Cocito A,

- Doksani Y, Klein H, Gómez-González B, Aguilera A, Katou Y, Shirahige K, Foiani M. **Cell**. 2011 Jul 22;146(2):233-46. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.033.
7. The prereplication complex recruits XEco2 to chromatin to promote cohesin acetylation in *Xenopus* egg extracts. Higashi TL, Ikeda M, Tanaka H, Nakagawa T, Bando M, Shirahige K, Kubota Y, Takisawa H, Masukata H, Takahashi TS. **Curr Biol**. 2012 Jun 5;22(11):977-88. doi: 10.1016/j.cub.2012.04.013.
 8. Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases. De Piccoli G, Katou Y, Itoh T, Nakato R, Shirahige K, Labib K. **Mol Cell**. 2012 Mar 9;45(5):696-704. doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.007.
 9. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. Deardorff MA, Bando M, Nakato R, Watrin E, Itoh T, Minamino M, Saitoh K, Komata M, Katou Y, Clark D, Cole KE, De Baere E, Decroos C, Di Donato N, Ernst S, Francey LJ, Gyftodimou Y, Hirashima K, Hullings M, Ishikawa Y, Jaulin C, Kaur M, Kiyono T, Lombardi PM, Magnaghi-Jaulin L, Mortier GR, Nozaki N, Petersen MB, Seimiya H, Siu VM, Suzuki Y, Takagaki K, Wilde JJ, Willems PJ, Prigent C, Gillissen-Kaesbach G, Christianson DW, Kaiser FJ, Jackson LG, Hirota T, Krantz ID, Shirahige K. **Nature**. 2012 Sep 13;489(7415):313-7. doi: 10.1038/nature11316.
 10. PPAR α -induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. Fujiki K, Shinoda A, Kano F, Sato R, Shirahige K, Murata M. **Nat Commun**. 2013;4:2262. doi: 10.1038/ncomms3262.
 11. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. **Nat Genet**. 2013 Oct;45(10):1232-7. doi: 10.1038/ng.2731.
 12. DROMPA: easy-to-handle peak calling and visualization software for the computational analysis and validation of ChIP-seq data. Nakato R1, Itoh T, Shirahige K. **Genes Cells**. 2013 Jul;18(7):589-601. doi: 10.1111/gtc.12058.
 13. Smc5/6-mediated regulation of replication progression contributes to chromosome assembly during mitosis in human cells. Gallego-Paez LM, Tanaka H, Bando M, Takahashi M, Nozaki N, Nakato R, Shirahige K*, Hirota T*. **Mol Biol Cell**. 2014 Jan;25(2):302-17. doi: 10.1091/mbc.E13-01-0020. (*Shared Corresponding Authors)
 14. The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. Jeppsson K, Kanno T, Shirahige K, Sjögren C. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2014 Sep;15(9):601-14. doi: 10.1038/nrm3857. Review.
 15. Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin. Izumi K, Nakato R, Zhang Z, Edmondson AC, Noon S, Dulik MC, Rajagopalan R, Venditti CP, Gripp K, Samanich J, Zackai EH, Deardorff MA, Clark D, Allen JL, Dorsett D, Misulovin Z, Komata M, Bando M, Kaur M, Katou Y, Shirahige K*, Krantz ID*. **Nat Genet**. 2015 Apr;47(4):338-44. doi: 10.1038/ng.3229. (*Shared Corresponding Authors)
 16. Esco1 Acetylates Cohesin via a Mechanism Different from That of Esco2. Minamino M, Ishibashi M, Nakato R, Akiyama K, Tanaka H, Kato Y, Negishi L, Hirota T, Sutani T, Bando M, Shirahige K. **Curr. Biol.** (2015) in press
- [学会発表](計13件)
 1. 2014年5月7日~2014年5月12日
 発表者: 白髭 克彦
 IAS Research Conference 2014

Mechanism of Transcriptional Dysregulation in Cornelia de Lange syndrome: Novel insight from Novel Gene Identification
招待講演

2. 2014年6月24日-2014年6月29日
発表者：白髭 克彦
CdLS symposia and conference
Transcription regulation by cohesin
招待講演

3. 2014年9月19日
発表者：白髭 克彦
日本遺伝学会
コヒーシンによる転写制御 研究発表

4. 2014年10月10日
発表者：白髭 克彦
British Columbia 大学, the Child & Family
Reserch Institute's signature seminar
講演

5. 2014年10月16日
発表者：白髭 克彦
Karolinska Inst. A day of chromosome and
cell cycle dynamics.
Transcriptional regulation by Cohesin loader
講演

6. 2013年01月23日
発表者：白髭 克彦
第14回がん・エピゲノム研究会
宮城県・仙台市
転写調節因子としてのコヒーシン、コンデン
シン

7. 2012年10月22日
発表者：白髭 克彦
London Research Institute (cancer research
UK)
Transcriptional Regulation by SMC protein
イギリス・ロンドン

8. 2012年10月20日
発表者：白髭 克彦
Symposium on Chromosome Biology
Transcriptional regulation by condensin in
yeast and human cells
イギリス・オックスフォード

9. 2012年08月24日～2012年08月25日
発表者：白髭 克彦

The Research Institute of Molecular
Pathology in Vienna
HDAC8 mutations in Cornelia de Lange
Syndrome provide insight into the cohesin
acetylation cycle

オーストリア・ウィーン

10. 2012年08月19日～2012年08月21日
発表者：白髭 克彦
The 13th International Conference on
Systems Biology in Toronto
HDAC8 mutations in Cornelia de Lange
Syndrome provide insight into the cohesin
acetylation cycle
カナダ・トロント

11. 2012年07月19日～2012年07月21日
発表者：白髭 克彦
第30回日本骨代謝学会学術集会
ゲノムワイドアプローチ
東京都・新宿区

12. 2012年06月30日
発表者：白髭 克彦
東京大学生命科学シンポジウム
タンパク動態地図から知る生命機能
東京都・文京区

13. 2012年06月19日～2012年06月23日
発表者：白髭 克彦
CdSL Foundation Scientific and Educational
Symposia 2012
Genome wide Localization Study of
Acetylated Cohesin in Human
アメリカ・シカゴ

6. 研究組織
(1)研究代表者
白髭 克彦(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
伊藤 武彦(東京工業大学 生命理工学研究
科 教授)

研究者番号：90501106

広田 亨（公益財団法人がん研究会 部長）

研究者番号：50421368

須谷 尚史（東京大学 分子細胞生物学研究所 助教）

研究者番号：30401524