

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440010

研究課題名(和文) ヒトゲノムDNAの折り畳み原理の解明

研究課題名(英文) Elucidating the folding principles of the human genome

研究代表者

大山 隆 (Ohyama, Takashi)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：60268513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒトゲノムDNAの折り畳み原理を明らかにすることを目的として実施された。21番染色体内の特定の領域が形成するクロマチンループの構造シミュレーション、ならびに得られたモデルと実在構造との整合性解析を通して、上記原理を解明する糸口が得られた。少なくともクロマチンループの基本構造は、ヌクレオソームの配置、リンカーDNAの拡がり、ループ基部間の空間距離、および同一配列DNAをもつ相同ヌクレオソームの集合現象により規定されている可能性が高いと結論された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the folding principles of the human genome. Based on the simulation of a chromatin loop structure in the chromosome 21 and subsequent comparison between the resulting model and the actual structure, we obtained a clue to the elucidation of the principles. It was strongly suggested that the fundamental structure of a chromatin loop is presumably determined by nucleosome positioning, conformations of linker DNAs, distance between the loop anchors and self-assembly of the nucleosomes with identical DNA sequences.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒトゲノムDNA ゲノムフォールディング 染色体構築 間期染色体 分裂期染色体

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムDNAの塩基配列が解読されて10年もの年月が経過していたが、細胞核内や分裂期の染色体内でヒトゲノムDNAがどのような原理に基づいて折り畳まれているかは、未解明であった。そのような状況下、Fraserのグループがマウスを用いてHi-C法（ゲノムDNAの高次構造解析法のひとつ）による解析を行い、その結果からマウスX染色体の間期構造のモデルを提唱し、話題になっていた(Nagano *et al.*, *Nature* 502, 59-64, 2013)。しかし、ヒトをはじめとした高等真核生物のゲノムDNAの折り畳み原理については依然として未解明であったため、我々はこの問題にアプローチする準備として、まず、(1) 出芽酵母におけるゲノムの折り畳み原理の解明、(2) ヒト間期染色体構造シミュレーション、(3) ヒト染色体内2点間距離の測定、などを並行して進めていた。そして、それぞれに関して以下に述べる成果を得ていた。

(1) 出芽酵母におけるゲノムの折り畳み原理の解明

我々は、出芽酵母の間期染色体構造は、ゲノムDNAの物性と細胞核の大きさだけでほぼ決定されていることを解明していた(Kimura *et al.*, *J. Biochem.* 154, 137-147, 2013)。この成果は以下に述べる研究から得られた。ゲノム上のヌクレオソームの配置はDNA物性（特に柔軟性の特性）で決まり(Segal *et al.*, *Nature.* 442, 772-778, 2006)、リンカーDNAの空間的拡がりもDNA物性だけで予測できる。そこで我々は、全ヌクレオソームと全リンカーDNAの位置を予測し、加えて各リンカーDNAの空間的拡がりを予測した。そして、これらのデータと細胞核の大きさを基に、全染色体16本の核内構造を予測した。分解能は、10 nmクロマチン繊維内の全てのヌクレオソームの配置とそれらの上でのDNAの回転位相および全リンカーDNAの3D構造が明確に判別できるレベルである。得られた結果を染色体内の空間距離に関する既報の全実験データ(FISHおよび4Cデータ)と照合したところ、両者がほぼ合致することが分かり、予測された各構造が極めて精密であることが判明した。

(2) ヒト間期染色体構造シミュレーション

ヒトにおいてもゲノムDNAの物性（特に柔軟性の特性）マップが作成できれば、その上

でのヌクレオソームとリンカーDNAの配置、ならびに後者の空間的拡がりを予測できると考えられる。そこでまず、ヒトゲノムDNAの柔軟特性マップを作成した(Kimura *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 77, 612-617, 2013)。これにより、出芽酵母に対して行ったと同様の方法を用いて、間期染色体構造のシミュレーションを行うことが可能になった。

(3) ヒト染色体内2点間距離の測定

標記のデータは、シミュレーションにより得られた構造モデルを検証する際に必須である。そこで、当該科研費プロジェクトの開始以前の段階でヒト正常線維芽細胞WI-38を用い、間期と分裂期のそれぞれにおける、21番染色体内の領域間距離・配置に関する一定量のFISHデータを取得していた。

さて、以上のような状況下にあつて、本研究は次のような目的をもって実施した。

2. 研究の目的

(1) ヒト染色体の間期構造を明らかにする。

ヒトゲノムDNAの物性やヌクレオソームの配置などを基にして、ヒト染色体の間期構造をシミュレーションする。

(2) ヒトの分裂期染色体におけるDNAの軌道(path)解析を行う。

(3) (1)と(2)を通して、ヒトゲノムDNAの折り畳み原理を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 染色体の構造情報の取得

WI-38を用いて、染色体内の任意の2点間の距離をFISH法を用いて多数解析し、構造モデルの検証に用いた。

(2) 間期染色体の構造シミュレーション

研究の基本的なストラテジーとして、①細胞核内の染色体の構造をいくつかのパラメーターを用いてシミュレーションし、②得られたモデルが実際の染色体の構造を反映しているか否かを検証する、という計画を立てた。

①に関しては、まずは、我々が出芽酵母を対象として同様の解析を行った際に用いた方法を用いることにした。即ち、10 nmクロマチン繊維の空間的拡がりをヌクレオソームの配置とリンカーDNAの空間的拡がりに基づいてシミュレーションし、所定の空間に収まるものだけをスクリーニングするという方法である(Kimura *et al.*, *J. Biochem.* 154,

137- 147, 2013)。

(3) クロマチンループの構造シミュレーション

ヒト 21 番染色体内 46,210,000 - 46,360,000 の領域が形成するクロマチンループを対象とした構造シミュレーションを、(2) と同様に行った。

4. 研究成果

(1) 染色体の実構造情報

21 番染色体の長腕全域を対象として、約 30 箇所を標的とした FISH プローブを用意し、これらを組み合わせて約 150 に及ぶ 2 点間距離の測定を、分裂期と間期におけるそれぞれの構造に対して行った。さらにこれらの箇所の空間的配置を解析した。その際、ひとつひとつの距離に対して、それぞれ少なくとも 30 回の解析を行い、信頼度の高いデータを取得した。同様に、2 番染色体と 8 番染色体についても、多数の距離情報を取得した。

次に、21 番染色体に関しては、上記のデータと既存の Hi-C データ (Rao *et al.*, *Cell* 159, 1665-1680, 2014) との関係性を求めた。この関係式を用いて、以下に述べる (2) と (3) の結果の検証を行った。

(2) 21 番染色体全体の間期構造シミュレーション

[研究の方法] で述べた方法によるシミュレーションを重ねたが、ヒトの間期染色体全体を実在の構造のように折り畳むためには、出芽酵母の解析で用いたパラメーターだけでは不足していることが明らかになった。

(3) クロマチンループの構造シミュレーション

21 番染色体内 46,210,000 - 46,360,000 の領域が形成するクロマチンループの構造シミュレーションを以下に述べる 3 つの方法で行った。その後、上記 (1) の解析で得られた距離データを用いて構造モデルの検証を行った。以下にそれぞれの方法と検証結果について述べる。

【シミュレーション1】

ヌクレオソームの配置とリンカーDNAの空間的拡がりに関するデータだけによるシミュレーションを1万回以上行った。得られた構造モデルの一例を図1Aに示す。[検証結果] x軸に1次元距離(塩基配列上の距離)、y軸に構造内距離(構造内での直線距離)の2乗をとって、2点間の実際の距離と構造モデル内での対応する距離をプロット(それぞれのプロット数

は434)すると、モデルが実際の構造に比べかなり弛緩した構造をとっていることがわかった。

【シミュレーション2】

シミュレーション1で用いたふたつのパラメーターに加え、クロマチンループの基部間距離を50 nm以下に設定したシミュレーションを83回行った。得られた構造モデルの一例を図1Bに示す。[検証結果] 上記の座標平面において、それぞれ対応するデータポイントはかなり近づくようになったが、まだ、モデルが実際の構造に比べ弛緩した構造であることがわかった。

【シミュレーション3】

シミュレーション2で用いた3つのパラメーターに加え、5 kb以内に存在する各Alu配列上のヌクレオソームが自己集合的相互作用をすると仮定したシミュレーションを78回行った。得られた構造モデルの一例を図1Cに示す。検証結果について述べる前に、このシミュレーションをした背景について述べておく。シミュレーション2でも構造モデルは、実際の構造に比べて弛緩したものであった。そこで、細胞内では反復配列領域がヘテロクロマチン構造をとっていることを考慮して、新たなシミュレーションを行うことにした。それに先立って反復配列の種類、位置、ならびにヌクレオソームの有無について解析をした結果、上記の領域に存在する反復配列は大部分がAlu配列(散在型の反復配列)であることと、それらの上には多くの場合ヌクレオソームが形成されていることが判明した。同じDNA配列を有するヌクレオソームが生理的濃度のマグネシウムイオン存在下で選択的に集合する現象が存在する(Nishikawa and Ohyama, *Nucl. Acids Res.* 41, 1544-1554, 2013) ことを考慮すれば、散在型の反復配列の上に形成されたヌクレオソームであっても細胞内では互いに近傍に集合しているかもしれない。そこで、ヌクレオソームの配置、リンカーDNAの空間的拡がり、クロマチンループ基部間距離に加え、Alu配列上に形成されるヌクレオソームの集合を想定したシミュレーションを行った。得られた構造モデルの一例を図1Cに示す。[検証結果] 新たなパラメーターを追加したことで、2点間距離に関する実験データをかなり高精度に説明できるクロマチンループのモデルを作製できることが明らかになった。

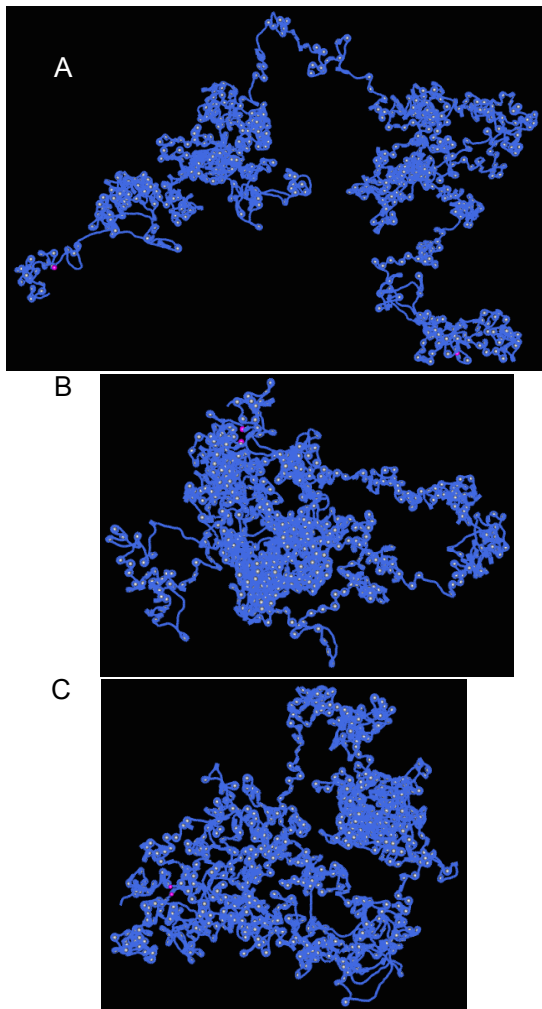


図 1. ヒト 21 番染色体内 46,210,000 - 46,360,000 の領域のクロマチン構造モデル

(4) 分裂期染色体における DNA の軌道解析

少なくとも今回用いた染色体における解析対象部位に関しては、DNA 配列上の位置番号が染色体の長軸方向に沿ってその大小関係を逆転することなく配置されていることが明らかになった。

(5) 総括

当初立てた計画のうち、ヒト間期染色体構造に関しては、少なくともクロマチンループの収納原理解明の糸口は得られたと考えている。つまり、ヌクレオソームの配置、リンカー DNA の空間的拡がり、ループ基部間距離、および同一配列 DNA を有する相同ヌクレオソームの自己集合がクロマチンループの構造を規定する重要なパラメーターであることが強く示唆された。なお、クロマチンループは間期染色体におけるひとつの重要な構造単位であるので、今回の成果は、今後の研究にとって大きな意義をもつと考えている。

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 1 件)

- ①Jun-ichi Tanase, Takehiro Yokoo, Yuuki Matsumura, Makoto Kinoshita, Yo Kikuchi, Hirofumi Suemori, Takashi Ohyama; Magnesium chloride and polyamine can differentiate mouse embryonic stem cells into trophectoderm or endoderm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 482, 764-770 (2016), 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2016.11.108

〔学会発表〕(計 9 件)

- ①大山 隆, 遺伝情報収納の基本原則, 第 6 回都医学研シンポジウム「DNA とゲノム: 二重らせん構造を超えて」(招待講演), 2016 年 12 月 16 日, 新宿明治安田生命ホール(東京)

- ②米山 大貴, 大橋 拳登, 大山 隆, ヒト間期染色体におけるクロマチンループの構造モデリング, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 2 日, パシフィコ横浜(横浜)

- ③Osamu Miura, Hiroki Yoneyama, Takashi Ohyama; Biological significance of cruciform structures as deduced by genome-wide analyses, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 2 日, パシフィコ横浜(横浜)

- ④米山 大貴, 吉田 快, 三浦 理, 山田 修司, 大山 隆, ヒト間期染色体におけるクロマチンループの微細構造モデル, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

- ⑤黒田 浩太郎, 池田 桃子, 大山 隆, メチル化が二本鎖 DNA 分子の相同性認識と選択的集合に与える影響, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

- ⑥池田 桃子, 黒田 浩太郎, 荒井 直樹, 大山 隆, 塩基組成が二本鎖 DNA 分子の相同性認識と選択的集合に与える影響, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

- ⑦下岡 保俊, 清水 貴行, 池田 桃子, 大山 隆, ヌクレオソームの自己集合において DNA のメチル化は識別される, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜(横浜)

- ⑧清水 貴行, 下岡 保俊, 池田 桃子, 大山 隆, メチル化が DNA の自己識別能に与える影響, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜(横浜)

⑨ 大山 隆, DNAの物理的特性に隠された情報と機能, 日本分析化学会第63年会 (招待講演), 2014年9月18日, 広島大学 東広島キャンパス (広島)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 隆 (OHYAMA, Takashi)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号 : 60268513

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

米山 大貴 (YONEYAMA, Hiroki)

吉田 快 (YOSHIDA, Kai)