

文部科学省新学術領域

ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能

領域番号：3305

平成23年度～平成27年度

科学研究費助成事業

科学研究費補助金「新学術領域研究（研究領域提案型）」

研究成果報告書

平成29年3月

領域代表 小林 武彦

東京大学分子細胞生物学研究所

目次

はしがき	3
I. 研究領域の概要	6
1. 研究領域の目的	7
2. 研究組織	10
3. 交付決定額	14
4. 研究成果の概要	15
5. 領域内の共同研究	16
6. 若手研究者の成長状況、若手の受賞	19
7. 班員の受賞	21
II. 各研究課題の成果および発表	22
1. 計画班（代表、分担）	23
2. 公募班（代表）	100
III. 研究成果の発信状況	210
1. シンポジウム	211
2. アウトリーチ活動	212
3. 関連資料	213
IV. 評価	217
1. 評価者による評価	218
2. 中間および事後評価	221

はしがき

「非コード DNA」領域を支援いただきありがとうございました。

文科省より「成果取りまとめのための研究費」をいただき、ニューレター 10号として領域の業績をまとめた報告書を作成いたしました。我々の5年間の活動、成果の概要をお伝えすることができれば幸いです。

非コード DNA 領域は「Junk (ゴミ)」ではなく「宝の山」だった！

本領域の申請にあたって「ヒトのゲノムの98%を占めるゲノムの秘境、非コード DNAの真相に迫る」と謳って研究班を立ち上げさせていただきました。5年間という短い研究期間ではありましたが、面白い成果を多数得ることができました。詳しい内容については各班員の報告のページをご覧くださいと思います。数量的には361報の査読論文を発表し、46件の領域内共同研究を行い14報の共同研究論文を出版し、現在も10報は作成中となっています。新しい研究成果については、最低2年間は追跡調査し、領域ホームページに掲載していきます。掘れば掘るほど新しい発見が出てくるまさに「宝の山」でした。

中でも「ヘー」という発見で、今後の研究の方向を示唆する成果を2つ紹介いたします。まずは印南班と高田班の共同研究の成果です。ヒトの遺伝子を大きい順に並べると優位に脳・神経に関わる遺伝子が上位にきます。ただし作られるタンパク質が大きいわけではなく、非コード領域つまりイントロンがでかい。これだけでも何か重大なことが起こっている予感でワクワクしますが、さらに面白いことに、その大きなイントロンには脆弱部位という壊れやすい領域が存在していました。おそらくその脆弱部位が組換えを助長し、新しい遺伝子の創出に寄与したと思われます。ヒトの進化の過程で、急速に大脳皮質が発達した1つの説明になりうる重要な発見です。

また巨大イントロンに脆弱部位が生じるメカニズムについても、他のインターメアとの位置関係で大体説明ができます。遺伝子内にはDNAの複製開始点が存在せず、大きな遺伝子では1つの複製フォークが非常に長い距離を複製することになります。その間、転写と衝突したりDNAの異常構造により複製フォークの進行が阻害され、組換えを起こしやすくなっていると考えられています。つまり非コードDNA領域が新しい遺伝子の創出に関わり、進化の方向性を決めてきたのです。

もう1つの「ヘー」は私(小林班)の研究成果で恐縮ですが、リボソームRNA反復遺伝子の遺伝子間領域にある非コードプロモーター(E-pro)の機能についての新発見です。元々E-proはリボソームRNA遺伝子のコピー数の回復に必要な増幅組換えを誘

導する配列として見つかりました。それだけではなく、転写がオンになるとリボソーム RNA 遺伝子のコピー数の変動が激しく起こり酵母の寿命（分裂回数限界）が短くなります。今度は逆に転写をオフにするとリボソーム RNA 遺伝子は安定化して、なんと寿命が延びました。加えて、この非コードプロモーターの転写は *SIR2* というヒトまで保存されている老化抑制遺伝子（サーチュイン、長寿遺伝子）によって抑制されていることも判明しました。つまり老化抑制遺伝子 *SIR2* はリボソーム RNA 遺伝子の安定化を介して寿命を維持していたわけです。現在リボソーム RNA 遺伝子から発せられる「老化シグナル」の実体の解明を急いでいます。

非コード DNA が演出する新しいゲノム観

～ 結局積荷はいったいなにもの？ ～

上に述べたのは新しく見つかったインターメアのほんの一部の機能で、他にも興味深いものが多数あります。またこれまでも複製の開始点や転写のエンハンサー等々、多数のインターメアが同定されているのはご承知の通りです。まだもちろん見つかっていないインターメアもあるでしょう。それら全てをひっくるめて「非コード DNA」とは一体なんなのでしょうか？ 以前の理解で言えば非コード DNA は、遺伝子（コード領域）「ソフト」を維持・制御する「ハード」です。遺伝子を染色体の積荷に例えたら、非コード DNA は船本体ということになります。これに本領域の成果を加えて非コード DNA を定義しなおすと、非コード DNA はこれまで通りハードはハードですがハード（固い）ではなく、性質としては実にソフト（柔軟）だということが判りました。脆弱部位もリボソーム RNA 遺伝子もそうですが、我々が思っていた以上に変化しやすく、その柔軟性により積荷である遺伝子を守り、また進化の原動力ともなってきたと考えられます。非コード DNA 領域が物理的に大きく、確率的にそちらに変異や傷が入りやすいということだけではなく、むしろ積極的にそちらに変異を誘導することでコード領域の安定性を維持しているようです。先ほどの船の例えにもどりますと、積荷（コード領域）を載せる船（非コード領域）は、積荷を守るために柔軟に形を変え、また積荷の置き場所を変えたり予備を用意したりして、荒波（環境の変化）耐え、適応して航海（進化）していくと考えられます。つまりこれが私たちの本プロジェクトで得た「新しいゲノム観」です。

非コード DNA はこれからどこへ

さて、柔軟に変化する非コード DNA という船はこれからどこへ行くのでしょうか。この新しいゲノム観から次に見えてくるもの、つまり今後の研究はどのように進展していくのでしょうか？

一つは、もちろんさらなるインターメアの探索です。非コードの大体のコンセプトがわかってきたので、さらにその柔軟性を司る転移因子の増幅および安定化機構、また転移因子も含めて非コード転写産物の生理作用、さらに非コードの生理作用に関わる遺伝子の探索も必要です。ここまでは、非コード領域が作る「船」の実体を解明する試みです。もう一つの研究課題は、その船そのものが向かう方向つまり、進化の予測です。非コードの変化の方向性についての研究です。非コード DNA 領域は、コード領域を保護しつつもその柔軟性ゆえにコード領域に与える影響も変化していきます。例えば遺伝子増幅やエンハンサーも含めたゲノムの再編成は進化をもたらす原動力となります。

なんせ染色体の大部分を占める非コード DNA 領域ですから、すべてのことがいっぺんにわかるというのは難しいです。しかし、本領域の成果により得られた新しいゲノム観は、非コード DNA 研究の進むべき方向性をしっかりと示していると思います。

このようなフロンティア研究に関わることができ、班員一同この上ない幸せに存じます。

2017年2月



東京大学分子細胞生物学研究所
教授
小林 武彦

I. 研究領域の概要

I-1. 研究領域の目的

【背景】

染色体は遺伝子を運ぶ乗り物であり、その機能は特徴的な DNA 配列により支えられている。例えば顕著な構造体を形成する配列としては、染色体分配に働くセントロメアや末端の保護構造であるテロメアがある。さらに染色体の“本体部”には、遺伝子の発現、DNA の複製開始、遺伝子増幅や改変を引き起こす組換えのホットスポット、DNA の脆弱部位、染色体凝縮などの染色体上で起こるイベント（染色体諸機能）を制御する配列がある。これら機能性配列はヒトゲノムの 98%を占める遺伝子間やイントロンと言った非コード DNA 領域に主として存在する。

高等真核細胞の非コードDNA領域の特徴は、レトロトランスポゾン、リボソームRNA反復遺伝子（rDNA）、マイクロサテライト等を含んだ反復配列がその大半を占めることである。これらは上に述べたような染色体諸機能を制御する役割を担っていると考えられるが、従来のDNA配列決定法では解析が困難なこともあり、研究が進んでいない。そこで本研究領域では、研究者間の強力な連携体制を築き、次世代シーケンサー等の新技術を駆使して、時代に先駆けて“秘境”非コードDNA領域による染色体制御機構の全貌解明に挑む。

【目的】

真核生物染色体はクロマチンという高次構造をとる。クロマチンは、DNA がヒストンタンパク質に巻き付いたヌクレオソーム構造からなる。ヒストンは、状況に応じてアセチル化やメチル化などの化学修飾を受け局所的なクロマチン構造の変化を生じる。非コード DNA はこのクロマチン構造を介して染色体機能を制御していると考えられる。例えば、セントロメアやテロメアの近傍では「閉じた」クロマチン構造（ヘテロクロマチン）が形成され、それぞれの機能に重要な働きをしている。また、複製、凝縮、接着などの相互に連係し染色体全体の構造変換を含む作用については、染色体の本体部の非コード DNA 領域が、特徴的なクロマチン構造を介して協調的に働き全体的な統率を保っていると考えられる。染色体という巨大構造体を統括・制御するためにはこの“非コード DNA ネットワーク”が必須と考えられるが、その実体は不明である。

本領域研究では、セントロメア、テロメア以外の染色体“本体部”の非コード機能性配列を総称して“インターメア”と名付け、その特徴及び構造を明らかにする。さらにはテロメア、セントロメアを含んだ3メア間でのクロマチン構造を介したネットワークによる染色体統御の全体像を解明する（図1）。



図1 非コードDNAと染色体機能
非コードDNA領域に存在する機能性配列（3メア：セントロメア、インターメア、テロメア）がネットワークを形成し染色体の機能を支えている。

【全体構想】

染色体本体部の非コード機能性配列であるインターメアの実体、およびテロメア、セントロメアとの3メアネットワークに関わる要素を、次に上げる4つの階層に分類し（図2）、最終的にすべてを統合して染色体を制御するシステムの全体像を解明する。

1) 非コード機能性配列の解析（配列チーム）：

非コードDNA領域において染色体機能維持に働く種々のDNA配列と、それに関連するタンパク質・RNAなどの役割を明らかにする。

2) 非コード機能性配列のクロマチン構造の解析（構造チーム）：

インターメア、セントロメア、テロメア（3メア）の上位階層で染色体機能を時空間的に制御している局所的なヌクレオソームの配置、ヒストン修飾などのエピゲノム修飾、クロマチン構造の変化などに関わる因子の同定及び構造解析、そしてそれらの染色体維持における役割を解明する。

3) 染色体維持に働く3メアネットワークの解析（ネットワークチーム）：

3メアは多くの因子を共有し特徴的なクロマチン構造を介して有機的なネットワーク（クロマチンネットワーク）を形成して染色体を統御していると予想される。その実体を解明する。

4) 染色体維持機構の破綻が細胞機能に及ぼす影響（病態解析チーム）：

上述の3メア及びそのネットワークの破綻は、染色体維持機構に決定的なダメージを与え、染色体の逆位や転座、遺伝子増幅などの染色体異常の原因になりうる。ひいては、極度な染色体脆弱部位の出現、がん抑制遺伝子の不活化、がん遺伝子の活性化などを通してがん化が起こるほか、細胞死や老化などによる進行性疾患との関わりも生じてくると考えられる。そこで、最上位階層の観点として、3メア及びそのネットワークと老化やがん化などの疾患との関わりを明らかにする。このような疾患メカニズムの基盤研究は、新しい診断方法や治療技術の開発に欠かすことができない。

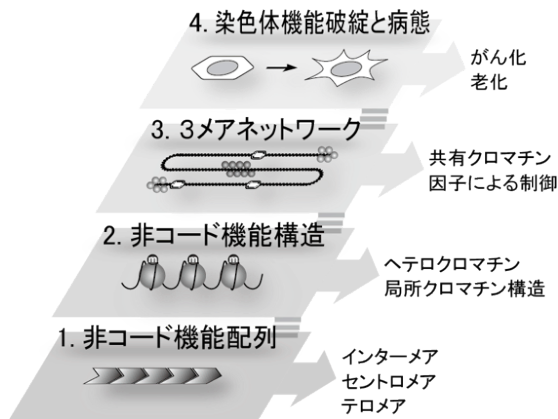


図2 本領域内のチームで取り組む4つの研究階層

【意義】

我が国の染色体研究分野では、優れた研究者がこれまで次々と現れ、常に世界最先端の水準が維持されてきた。現在、次世代シーケンサーによる個別ゲノム解析や、がんの分子標的医薬や FISH などの遺伝子診断技術の発展により、染色体研究に世界的なブレイクスルーが起こりつつある。そのため、現時点での我が国の有利な立ち位置を維持し、さらに強化することが肝要である。加えてこの大変革期は、学術的・技術的な我が国の優位性をさらにリードできる好機でもある。従って、このような時期に新概念の確立を目指す本領域を設立することはきわめて重要であり急務である。本領域研究の実施を通じて、染色体研究が専門分野を越境した次世代の学術領域に昇華・発展し、我が国の生命科学や医科学の学術水準がより一層向上・強化されることが大いに期待される。

本領域では、強固な信頼関係に立脚した日本的共同研究体制によりセントロメア、テロメアに次ぐ第三の機能性配列の発見や、これらを統合的に制御する新たなメカニズムの解明を目指しており、今後当該分野において世界のイニシャティブをとれると確信している。

I-2. 研究組織

【計画研究】

研究項目	課題番号 研究課題名	研究期間	代表者氏名	所属機関・部局・職	構成員数
A01 計画	23114001 rDNA の不安定性が染色体及び細胞機能に与える影響	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	小林 武彦	東京大学・分子細胞生物学研究所・教授	5
A01 計画	23114003 非コード DNA 領域によるゲノム DNA 再編成制御機構	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	太田 邦史	東京大学大学院・総合文化研究科・教授	2
A01 計画	23114004 集団遺伝学理論と比較ゲノムによる非コード DNA 領域の進化メカニズム	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	印南 秀樹	総合研究大学院大学・先導科学研究科・准教授	1
A01 計画	23114005 染色体維持におけるヘテロクロマチンの機能	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	中山 潤一	名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・教授	5
A01 計画	23114006 レトロトランスポゾンがもたらす非コード DNA 領域のクロマチン構造変化	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	梶川 正樹	東京工業大学・大学院生命理工学研究科研究科・講師	1
A01 計画	23114007 非コード DNA 領域が果たす DNA 損傷ストレス耐性機能	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	菱田 卓	学習院大学・理学部・教授	1
A01 計画	23114008 セントロメア構成因子によるクロマチンネットワークの解析	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	舛本 寛	公益財団法人かずさ DNA 研究所・先端研究部・室長	2
A01 計画	23114009 テロメア構成因子による染色体の統合的制御機構	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	加納 純子	大阪大学・蛋白質研究所・准教授	2
A01 計画	23114010 複製フォークの安定化機構とその破綻による病態の解析	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	高田 穰	京都大学・放射線生物研究センター・教授	1

【公募研究 第 1 期】

A01 公募	24114501 インターメア機能配 列の情報量規準と機 械学習による同定お よび進化的解析	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	遠藤 俊徳	北海道大学・情報科学研究科・ 教授	1
A01 公募	24114502 セントロメアと微小 管の位置関係による 染色体分配制御機構 の解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	田中 耕三	東北大学・加齢医学研究所・教 授	5
A01 公募	24114503 減数分裂特異的コヒ ーシン複合体におけ る相同染色体の構造 変換と対合に関する 解析	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	石黒 啓一郎	東京大学・分子細胞生物学研究 所・助教	1
A01 公募	24114505 胚操作によって誘導 されるエピゲノム変 化	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	幸田 尚	東京医科歯科大学・難治疾患研 究所・准教授	1
A01 公募	24114506 機能性非コード DNA 領域が制御する分裂 酵母接合型変換の動 態解析	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	筒井 康博	東京工業大学・生命理工学研究 科・助教	1
A01 公募	24114508 Alu 配列と遺伝性疾患 の病態に関する研究	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	深尾 敏幸	岐阜大学・医学系研究科・教授	2
A01 公募	24114509 複製ポリメラーゼ δ に よる複製フォークの 安定化機構の解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	廣田 耕志	首都大学東京・理工学研究科・ 教授	1
A01 公募	24114510 卵母細胞核小体によ るヘテロクロマチン 確立機構の解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	大串 素雅子	京都大学・白眉センター・助教	1
A01 公募	24114511 非コード DNA 領域に よるゲノム複製タイ ミング制御機構の解 明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	升方 久夫	大阪大学・理学系研究科・教授	1
A01 公募	24114516 染色体を折り畳むた めの DNA 領域の機能	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	仁木 宏典	国立遺伝学研究所・系統生物研 究センター・教授	1
A01 公募	24114517 SMC 複合体による姉 妹染色分体の構造変 換制御	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	広田 亨	がん研究会・実験病理部・部長	1

A01 公募	24114518 転写因子ATF7を介した、ストレスによるテロメアの長さの変化と老化の促進	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	前川 利男	理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・研究員	1
A01 公募	24114519 CpG アイランドを制御する CXXC タンパク質の機能解析	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	伊藤 伸介	理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター・研究員	1
A01 公募	24114520 染色体の核内高次構築を支配する非コード領域とそれを制御するタンパク質の解析	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	正井 久雄	東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・副所長	1
A01 公募	24114521 相同染色体認識における非コード DNA の役割	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	丁 大橋	独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT 研究所バイオ ICT 研究室・主任研究員	1

【公募研究 第 2 期】

A01 公募	26114702 紡錘体微小管と非コード DNA 領域の相互作用による染色体の空間的制御	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	田中 耕三	東北大学・加齢医学研究所・教授	6
A01 公募	26114703 疾患と相関する進化的に保存された機能性非コード領域の情報工学的網羅探索法の開発	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	高橋 広夫	千葉大学・園芸学研究科・准教授	4
A01 公募	26114708 ヒトゲノムにおける Alu 配列の遺伝性疾患、遺伝的多様性に与える影響に関する研究	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	深尾 敏幸	岐阜大学・医学系研究科・教授	2
A01 公募	26114710 非コード DNA による染色体複製制御機構の解明	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	升方 久夫	大阪大学・理学系研究科・教授	1
A01 公募	26114711 セントロメア再編の分子メカニズム	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	中川 拓郎	大阪大学・理学系研究科・准教授	1
A01 公募	26114713 ゲノムワイド解析による複製開始複合体形成制御とクロマチン制御連携の解明	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	藤田 雅俊	九州大学・大学院薬学研究院・教授	4

A01 公募	26114714 DNA 合成に干渉する 非コード配列での複 製フォーク適応機構 の研究	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	釣本 敏樹	九州大学・理学系研究院・教授	1
A01 公募	26114715 セントロメアサイズ を規定する分子機構 の解析	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	深川 竜郎	大阪大学・大学院生命機能研究 科・教授	1
A01 公募	26114716 DNA 再複製防止機構 からのエスケープと ゲノム再編	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	田中 誠司	国立遺伝学研究所・微生物遺伝 研究部門・助教	1
A01 公募	26114717 バクテリアの核様体 形成を促進する rDNA 領域の分子機 能	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	仁木 宏典	国立遺伝学研究所・系統生物研 究センター・教授	1
A01 公募	26114718 細胞周期を通じた染 色体構造変換におけ る非コード DNA 領域 の役割	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	広田 亨	がん研究会・実験病理部・部長	1
A01 公募	26114720 イントロン構造を介 した遺伝子発現特異 性の制御	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	谷内 一郎	理化学研究所・統合生命医科学 研究センター・グループディレ クター	1
A01 公募	26114721 全ゲノムシークエン スによる肝臓関連の 新規機能性非コード 領域の探索と機能解 析	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	藤本 明洋	理化学研究所・統合生命医科学 研究センター・上級研究員	1
A01 公募	26114723 染色体の核内高次構 築を支配する非コー ド領域とそれを制御 するタンパク質の解 析	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	正井 久雄	東京都医学総合研究所・ゲノム 医科学研究分野・副所長	1
A01 公募	26114725 非コード DNA の相同 染色体の認識と対合 における役割	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	丁 大橋	独立行政法人情報通信研究機 構・未来 ICT 研究所バイオ ICT 研究室・主任研究員	1

I-3. 交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	253,400,000	76,020,000	329,420,000
平成24年度	233,400,000	70,020,000	303,420,000
平成25年度	246,600,000	73,980,000	320,580,000
平成26年度	232,500,000	69,750,000	302,250,000
平成27年度	232,500,000	69,750,000	302,250,000
総計	1,198,400,000	359,520,000	1,557,920,000

I-4. 研究成果の概要

多面的な解析の結果、多くの新規インターメアを見つけることができた。さらにすでに機能が解析されているテロメア、セントロメアと、今回新たに見つかったインターメアとのネットワーク（3メアネットワーク）が明らかになり、非コード領域を中心とした「染色体制御システム」の全体像を浮き彫りにすることができた。この新しい「ゲノム観」は、生命科学研究の礎となり、さらにはヒトを含んだ生物が今後どのように変化していくのかを考える新しい学問分野に発展すると期待される。以下、成果の概要を下に示す。

1. 「遺伝子」研究からコピー数の変化やゲノムの改変の制御機構を中心にした染色体制御研究へ

ゲノムを従来の遺伝子中心の捉え方から、全体的な制御を行う1つの構造体として捉えるパラダイムシフトを実行した。例えばゲノムの大きな領域を占める反復配列の安定性に与える遺伝子を包括的に解析し、ゲノム維持の実態を突き止めた。またゲノムを大規模改変しその影響を調べ、遺伝子以外で形態や性質を規定する要素を同定した。さらに同一種のゲノムを多数決定しその配列比較によりインターメア候補を包括的に抽出した。加えてゲノムの機能配列解析ツールも開発し公開した。

2. テロメア、セントロメアに次ぐ第3の機能領域の発見

テロメア、セントロメアに次ぐ重要な非コード機能配列（インターメア）を見つけた。たとえば rDNA、サブテロメア、テロメア様配列、G4 構造 DNA は染色体に広く分布し、染色体の機能維持に関わる。特に興味深いインターメアは、187 bp からなる OwlRep 反復配列である。この配列は、霊長類で唯一の夜行性であるヨザルの視細胞核内にレンズ様構造を形成し、暗闇での視覚感度を上げている。

3. 3メアによる染色体統御の実体解明

ヒストン修飾に関わる因子（HDAC、HAT、ヒルトンシャペロンなど）が3メア間でのネットワーク形成に中心的な役割を果たし、染色体の全体的制御を担っていることが判明した。

I-5. 領域内の共同研究

本領域では、個人研究の枠を超えた連携研究を効率良く行うため、全体を4つの階層（プロジェクトチーム）に分け（図2）、計画班員はその中で親密に計画を練り、テクノロジー・ハブを中心とした研究手段と情報をシェアしながら研究を進めてきた。計画班員だけではカバーできない分野の研究者や、新たな研究系・解析手段を持つ研究者を公募研究によって補完し、領域全体の目標完遂を目指した。総括班は、内部の計画研究者からなる研究代表者1名（小林）、研究分担者2名（太田、中山）、連携研究者6名、および外部から招聘する当該分野のエキスパート5名からなる研究協力者から構成される。総括班は研究面においては全体の舵取り役（ブレイン）として機能し、個々の研究から離れたところで本領域の方向性をチェックし、公募班も含めた共同研究を推進してきた。特に外部のエキスパート5名には毎回会議に来ていただき、客観的な評価、助言をいただいた。

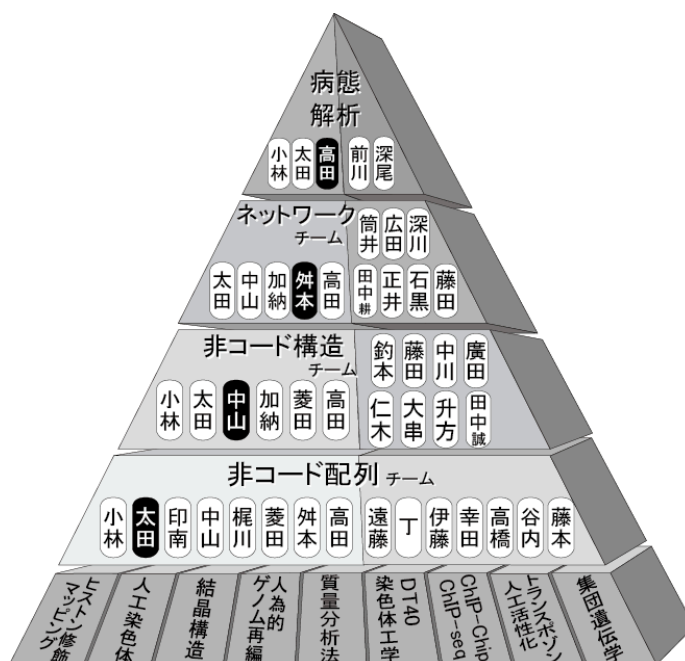


図2 研究体制（左が計画班、右が公募班）

総括班（担当）：小林（代表）、中山（広報）、太田（事務・評価）、菱田（共通利用）高田（病態解析 G の統括）、舩本（ネットワーク解析 G の統括）、加納（事務）、印南（配列解析 G の統括）梶川（広報）

総括班外部協力者（所属）：荒木弘之（遺伝研）、篠原彰（阪大）、柴田武彦（理研）、平野達也（理研）、柳田充弘（OIST）

【主な共同研究の成果】

公募班も含めて 46 件の領域内共同研究が行われた。既に共著論文として発表済みのものは 14 件、論文作成準備中のものは 10 件ある (図 3)。データベースも 4 つ作成し公開している。以下共同研究の代表例をいくつか挙げる。

1. 加納班、太田班が分裂酵母 Sgo2 欠損株の RNA 発現をマイクロアレイで解析し、Sgo2 がサブテロメア遺伝子群の発現維持に重要であることを発見 (2016 *Nature comm* 誌に発表)。
2. 小林班を中心に酵母 rDNA 不安定変異株データベースを作成し公開。中山班、高田班共同で解析。(http://lafula-com.info/kobayashiken/geldata/index.php) (2016)
3. 中山班 (古賀)、舩本班がセントロメア配列の進化について新発見 (2016 *Biol Lett* 誌に発表)。
4. 加納班、升方班が sgo2 遺伝子破壊株における後期複製開始点の発火状態について解析 (2016 *Nature comm* 誌に発表)。
5. 小林班が正井班の協力で動物細胞の複製阻害配列の同定に成功 (2015 *Mol Cell Biol* 誌に発表)。
6. 印南班が中心となり非コード領域部の解析ツールを開発し公開。
http://charles.biology.tohoku.ac.jp:3838/pombermd/distribution.Rmd (2015)
7. 太田班、印南班が減数分裂期の染色体接着部周辺で組換えホットスポットの頻度が低下する現象を見出した (2014 *Genes Cells* 誌に発表)。
8. 印南班、中山班、太田班、小林班が分裂酵母野生株 32 種のゲノム・シーケンスを実施 (2014 年 *PLoS One* に発表、プレスリリース)
9. 仁木班、菱田班が生細胞イメージングによる DNA 二重鎖切断に伴う核様体断片化の可視化に成功 (2013 *J Biol Chem* 誌に発表)。
10. 田中班、広田班がセントロメアと微小管の位置関係について新発見 (2013 *Cancer Sci.* 誌に発表)。
11. 太田班、正井班、廣田班との共同研究で、分裂酵母の複製チェックポイントと染色体高次構造変化、および減数分裂期組換え開始を結びつける新因子「リエゾニン」の同定に成功 (2012 *Mol. Cell* 誌に発表)。
12. 小林班、筒井班で RNA 干渉による細胞周期の調整について解析を実施 (2012 *BBRC* 誌に発表)。
13. 高田班、印南班が FANCIJ へリケースの欠損細胞においてインフォマティクス解析を行い、ゲノムに deletion が頻発することを発見 (2011 *Genes Cells* 誌に発表)。
14. 高田班と舩本班がセントロメア関連因子と、ファンconi貧血 (FA) コア複合体成分の会合を見出し、セントロメアクロマチンと DNA 損傷、複製ストレスが連係するメカニズムを解明 (論文準備中)。

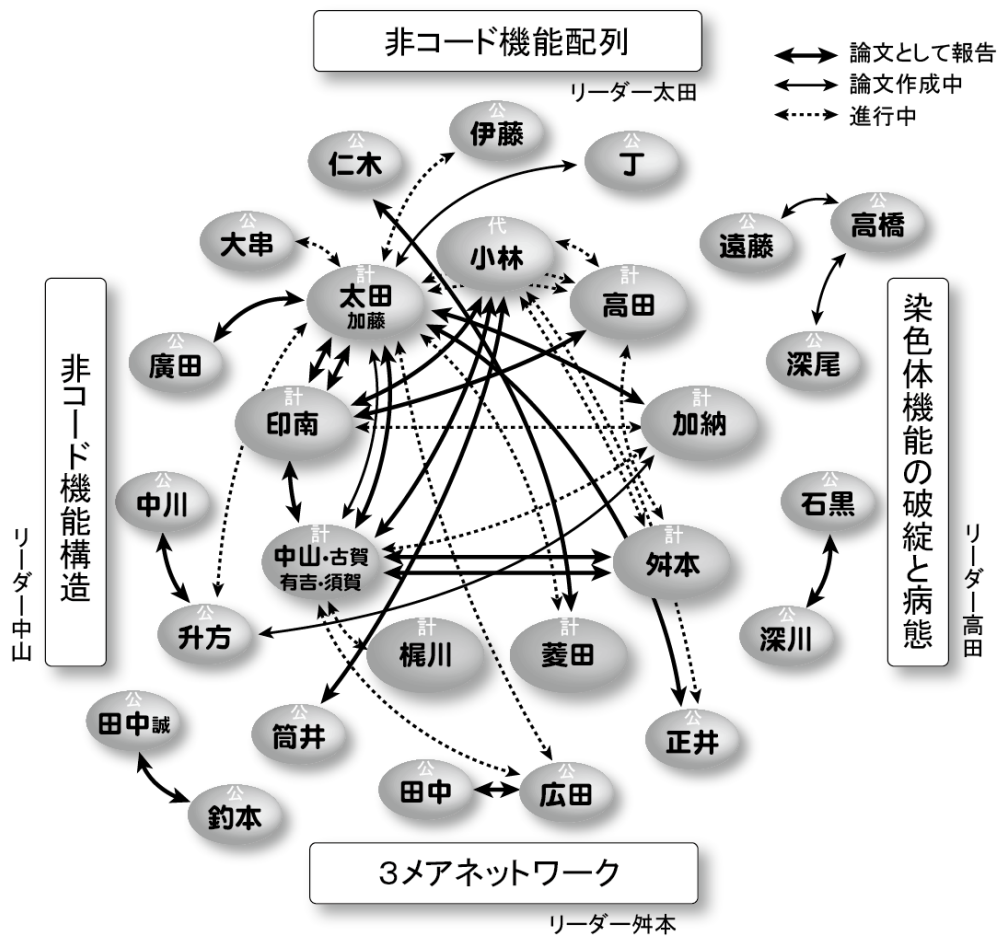


図3 連携研究による成果の発表状況

46件の共同研究が行われ、既に共著論文として発表済みのものは14件、論文作成準備中のものは10件ある。

I-6. 若手研究者の成長状況、若手の受賞

本領域では若手の育成には特に力を入れてきた。シニアの班員がラボの運営や一般的なアドバイスをするのはもちろんのこと、論文投稿時のカバーレターの書き方なども伝授してきた。さらに学生やポスドクに対しては公募情報やプレゼン方法なども必要に応じて相談にのった。以下具体的な昇進等の例（50件）を挙げる。

1. 中山潤一（理研チームリーダー）→ 名市大准教授 → 教授 → 基礎生物学研究所教授
2. 菱田卓（大阪大准教授）→ 学習院大教授（特別研究員等審査会専門委員表彰）
3. 加納純子（大阪大テニュアトラック准教授）→ 大阪大独立准教授（大阪大学総長奨励賞）
4. 梶川一樹 → 東工大研究室独立
5. 大川恭行（准教授）→ 九州大学生体防御医学研究所・教授（文部科学大臣表彰若手科学者賞）
6. 石黒啓一郎（助教）→ 慶應義塾大学医学部特任講師 → 熊本大学発生医学研究所独立准教授
7. 堀哲也（助教）大阪大学准教授、
8. 西野達哉（助教）→ 東京理科大学准教授（日本蛋白質科学会若手奨励賞）
9. 筒井康博（助教）→ ロシュ・ダイアグノスティックス社
10. 三好知一郎：（特任研究員）→ ミシガン大ポスドク→京都大学准教授
11. 藤本明洋（理研研究員）→ 京大特定准教授（日本遺伝学会大会ベスト・ペーパー賞）
12. 佐々木真理子（学振研究員）→ 東大助教
13. 久郷和人（特任研究員）→ 東京大学・特任助教 → かずさ DNA 研究所研究員
14. 家村顕自（産学官連携研究員）→ 東北大学加齢医学研究所助教（日本細胞生物学会若手優秀発表賞）
15. 中野めぐみ（かずさ DNA 研研究員）→ バイオベンチャーに就職
16. 岡村佳明（ポスドク）→ 医療関係翻訳会社に就職）
17. 宅野将平（ポスドク）→ 総合大学院大学先端科学研究科・助教（任期付）
18. 杉野隆一（ポスドク）→ 埼玉県立がんセンター・研究員（常勤）
19. 秋田鉄也（ポスドク）→ 水産総合研究センター 国際水産資源研究所・研究員（テニュアトラック）
20. 竹内やよい（ポスドク）→ 国立環境研究所・研究員（テニュアトラック）
21. 梶川班ポスドク2名 → 海外でポスドク

22. 白井温子（ポスドク）→ 理化学研究所 定年制研究員
23. 林亜紀（ポスドク）→ 関西学院大学 助教
24. 大屋恵梨子（ポスドク）→ スウェーデン・カロリンスカ研究所へ留学
25. 亀高愛（ポスドク）→ 藤田保健衛生大、URA として異動
26. 阿部優介（ポスドク）→ 日本学術振興会・特別研究員（PD）に採用
27. 進藤軌久（ポスドク）→ 研究員に昇進
28. 加納豊（ポスドク）→ 主席研究員へ昇進
29. 伊藤班の基礎科学特別研究員 → 定年制研究員
30. Nighat Yasmin（ポスドク）→ University of Management and Technology (UMT) Assistant Professor
31. マリネラ ペルペレスク（ポスドク）→ 東工大博士研究員
32. 大竹興一郎(大学院生) → かずさ DNA 研特任技術員
33. 山崎聡志（大学院生、ポスドク）→ 製薬会社に就職
34. Josephine Galipon（大学院生）→ 東京大学・特任助教 → 慶應義塾大学・特任助教
35. 八島亮子（大学院生）→ 武蔵野大学・助教（任期付）
36. 山田信太郎（大学院生）→ Memorial Sloan Kettering Cancer Center ポスドク
37. 黒沢耕平（大学院生）→ シカゴ大ポスドク（一高賞）
38. 伊藤将（大学院生）→ カルフォルニア大デイビス校ポスドク（日本遺伝学会大会ベスト・ペーパー賞）
39. 小田有沙（大学院生）→ 東京大学特任助教
40. 河野宏光（大学院生）→ 東京大学助教
41. Liu Binbin（大学院生）→ ポスドク
42. 青山友佳（大学院生）→ 中部大学の助教
43. 長坂浩太（大学院生）→ Research Institute of Molecular Pathology, IMP (Vienna)留学
44. Gallego-Paez, L.M.（大学院生）→ Gulbenkian Institute (Lisbon)留学
45. 西淵剛平（大学院生）→ フランス・IGH へポスドクとして留学
46. 石田真由美（大学院生）→ 徳島大学ポスドク
47. 中山班院生 → 化学系企業に就職
48. 菱田班院生 4 名 → 企業に就職
49. 佐川みなみ（大学院生）→ 私立高校の教員
50. 豊福直子（大学院生）→ 製薬企業に就職

I-7. 班員の受賞

研究期間中に以下の班員が荣誉ある受賞に輝いた。

1. 小林武彦 日本遺伝学会木原賞 2016年
2. 加納純子 日本遺伝学会奨励賞 2016年
3. 加納純子 大阪大学総長特別賞 2014年
4. 菱田卓 日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員表彰 2013年
5. 印南秀樹 日本学術振興会賞・日本学士院奨励賞 2013年
6. 小林武彦 第29回井上学术賞 2012年
7. 小林武彦 文部科学大臣表彰賞（科学技術分野） 2012年
8. 太田邦史 産学官連携功労者表彰・文部科学大臣賞 2012年
9. 太田邦史 関東地方発明表彰・発明協会会長奨励賞 2012年

II. 各研究課題の成果および発表

rDNA の不安定性が染色体及び細胞機能に与える影響



小林 武彦

計画研究 代表者 (平成 23~27 年度)
東京大学分子細胞生物学研究所

【研究目的】

リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)は、同一配列が 100 回以上繰り返して存在し、染色体の大きな領域を占める巨大反復遺伝子群であり、最大級の脆弱部位でもある。そのため rDNA の安定性やコピー数の変化は細胞機能に影響を及ぼす。本研究では rDNA の安定性及びコピー数に関わる因子を網羅的に同定し、その維持機構及び細胞機能、特に細胞老化に与える影響について解析する。

【研究成果】

リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)は、100 回以上繰り返して存在し、染色体の大きな領域を占める巨大反復遺伝子群である。例えば出芽酵母では 9.2 kb の反復単位が 12 番染色体上に約 150 回繰り返して存在し 1.4Mb の領域を占める (図 1)。そのため染色体の維持に関わる配列は、rDNA の遺伝子間領域の約 2.5kb に集中して存在し、まさにインターメアの宝庫である。また、rDNA はコピー間で組換えを繰り返すゲノムで最も不安定な領域であり、その制御に関わるインターメアもこの遺伝子間領域に存在する。本申請研究では以上のような rDNA の特性を生かし、次の 3つの成果を得ることができた。

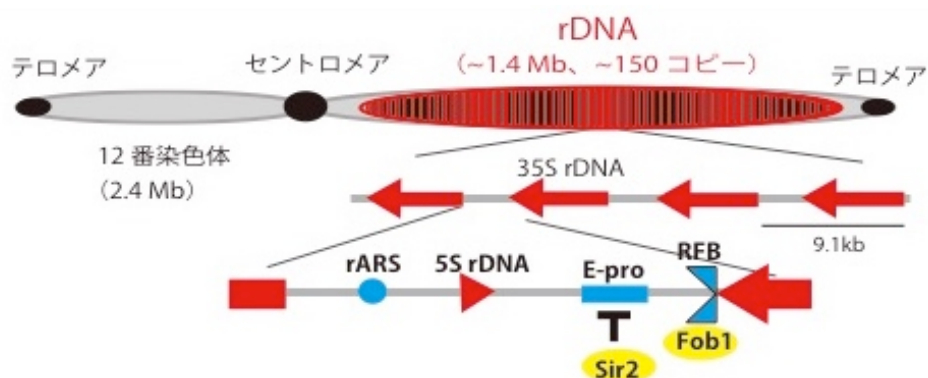


図 1 : 出芽酵母の rDNA の構造

出芽酵母の rDNA は 12 番染色体上に約 150 コピーがタンデムに並んで存在する。1つの反復単位 (9.1kb) には、2つの遺伝子 (35S、5S rDNA) と、その遺伝子間領域に複製開始点 (rARS)、非コードプロモーター (E-pro)、複製阻害点 (RFB) が存在する。

1. 細胞老化に関わるインターメアの発見

出芽酵母の rDNA 遺伝子間に存在するインターメアの 1 つである非コードプロモーター (E-pro) は、rDNA の安定性を制御する働きがある (Kobayashi & Ganley, Science 2005)。その配列を誘導可能なプロモーターに置き換えて、rDNA の安定性を自在に変更できる株を作成したところ、酵母の寿命も自在に変更することができた (Saka et al., 2013 Curr. Biol, 2013、Faculty1000 must read paper)。このことから rDNA は安定性が酵母の寿命を制御していることが判明した。また長寿遺伝子として知られる Sir2 (サーチュイン) は E-pro の制御を通して、老化抑制をしていることも判明した (図 2)。

2. rDNA の安定性に関わる変異株の網羅的解析

巨大非コード DNA 領域である rDNA の安定性にかかわる変異株を出芽酵母遺伝子欠損ライブラリーより検索し、708 の変異株を同定した (Saka et al., 2016, NAR; Kobayashi & Sasaki, 2017, FEMS yeast res)。この数は全遺伝子数の約 10% に相当し、これまで考えられていた以上に多くの遺伝子がゲノムの安定性に関わっていることが判明した。例えばその 1 つであるヒストンアセチル化酵素 Rtt109 はリボソーム RNA 遺伝子の非コード領域に作用し DNA の修復に働いていた (Ide et al., 2012, PloS Genet)。

3. 動物細胞の rDNA 安定性を制御する分子機構

動物細胞における rDNA の安定性に関わるインターメア及びそこに特異的に結合し DNA 複製の進行を阻害するタンパク質を同定した (Akamatsu & Kobayashi, 2015, Mol Cell Biol)。さらに動物細胞では rDNA の転写及び DNA 複製阻害はエピジェネティックな制御を受けていることを解明した。

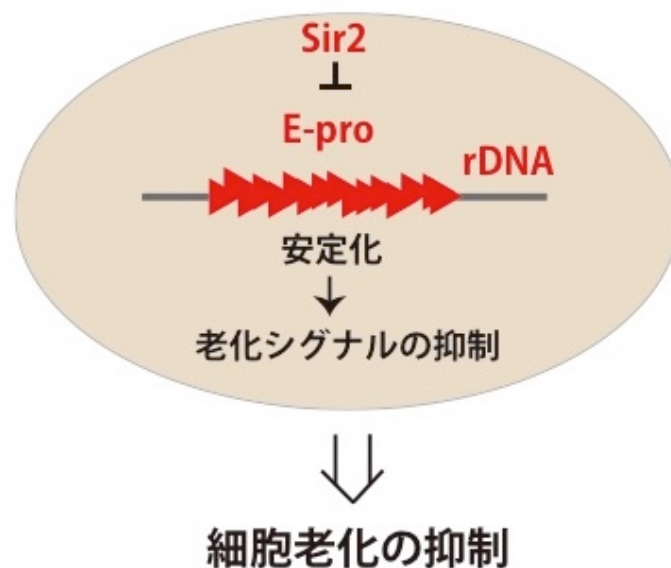


図 2 : rDNA の安定性の維持が細胞老化を抑制する

Sir2 が E-pro の転写を低下させることで rDNA を安定化し、そこから発せられる老化シグナルを抑え細胞の老化を抑制する。

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Kobayashi T, Sasaki M. (2017) rDNA stability is supported by many “Buffer genes”-Introduction to the Yeast rDNA Stability Database-. *FEMS yeast res.* 20:fox001 (査読有り)
2. Saka K, Takahashi A, Sasaki M, Kobayashi T. (2016) More than 10% of yeast genes are related to genome stability and influence cellular senescence via rDNA maintenance. *Nucleic Acids Res.* 44:4211-4221. (査読有り)
3. Kobayashi T. (2016) Genome Instability of Repetitive Sequence: Lesson from the Ribosomal RNA Gene Repeat. “DNA Replication, Recombination, and Repair” Hanaoka, F and Sugawara K. ed. Part IV, Chapter 10: 235-247. (査読有り)
4. Akamatsu Y, Kobayashi T (2015). The Human PolI Transcription Terminator Complex Acts as a Replication Fork Barrier that Coordinates the Progress of Replication with rRNA Transcription Activity. *Mol. Cell. Biol.* 35,1871-1881 (査読有り)
5. Kobayashi T (2014) Ribosomal RNA gene repeats, their stability and cellular senescence. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 90, 119-129. (査読有り)
6. *Fawcett JA, *Iida T, et al. (11名中8番目) (2014) Population Genomics of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 9: e104241 *equal contribution (査読有り)
7. Ganley AR, Kobayashi T (2013) Ribosomal DNA and cellular senescence: new evidence supporting the connection between rDNA and aging. *FEMS Yeast Res* 14, 49-59. (査読有り)
8. Saka K, Ide S, Ganley AR, Kobayashi T. (2013) Cellular senescence in yeast is regulated by rDNA noncoding transcription. *Curr Biol* 23,1794-1798. **F1000 recommended paper.** (査読有り)
9. Ide S, Saka K, Kobayashi T (2013) Rtt109 prevents hyper-amplification of ribosomal RNA genes through histone modification in budding yeast. *PLoS Genet* 9: e1003410. (査読有り)
10. Iida T, Iida N, Tsutsui Y, Yamao F, Kobayashi T (2012) RNA interference regulates the cell cycle checkpoint through the RNA export factor, Ptr1, in fission yeast. *BBRC* 427, 143-147. (査読有り)
11. Poole AM, Kobayashi T, Ganley AR (2012) A positive role for yeast extrachromosomal rDNA circles? *Bioessays* 34, 725-729. (査読有り)
12. Ganley AR, Breitenbach M, Kennedy BK, Kobayashi T. (2012) Yeast hypertrophy: cause or consequence of aging? Reply to Bilinski et al *FEMS Yeast Res.* 12, 267-268. (査読有り)
13. Kobayashi T (2011) How does genome instability affect lifespan?: roles of rDNA and telomeres. *Genes Cells* 16, 617-624. (査読有り)
14. Ganley AR, Kobayashi T (2011) Monitoring the rate and dynamics of concerted evolution in the ribosomal DNA repeats of *Saccharomyces cerevisiae* using experimental evolution. *Mol Biol Evol* 28: 2883-2891. (査読有り)
15. Miyazaki T, Kobayashi T (2011) Visualization of the dynamic behavior of ribosomal RNA gene repeats in living yeast cells. *Genes Cells* 16, 491-502. (査読有り)
16. Kobayashi T (2011) Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell Mol Life Sci* 68: 1395-1403. **F1000 recommended paper.** (査読有り)

《学会発表》

1. Kobayashi T (招待講演) rDNA stability determines the fate of cell 国際シンポジウム

Molecular Biology of Ageing、オランダ、フローリンゲン 2015 年 10 月 25-28 日

2. 小林武彦 第 23 回 DNA 複製、組み換え、修復ワークショップ 全遺伝子の約 10% がゲノムの安定性に関わっている！静岡 焼津市焼津グランドホテル 2015 年 10 月 19-21 日
3. Kobayashi T (招待講演) More than 10 % of yeast genes are related to genome stability and influence cellular senescence via rDNA maintenance. 国際シンポジウム Non-coding DNA and Chromosomal Integrity、淡路市夢舞台国際会議場 2015 年 8 月 7-8 日
4. Kobayashi T (招待講演) ”Reprogramming in yeast”大阪大学蛋白研究所セミナー、吹田市阪大、2015 年 5 月 18-19 日
5. Kobayashi T (招待講演) 「細胞老化とエピジェネティクス」第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会、東京都一橋講堂、2015 年 5 月 25-26 日
6. Kobayashi T (招待講演) 「細胞の若返りの分子機構」第 15 回日本抗加齢医学会総会、福岡市福岡国際会議場、2015 年 5 月 29 日
7. 小林武彦 (招待講演) 「若返りの分子機構」分生研シンポジウム 東京都文京区東京大、2014 年 12 月 15 日
8. Kobayashi T (招待講演) ”rDNA stability and cellular senescence” Vienna Biocenter conference オーストリア、ウィーン 2014 年 12 月 4-6 日
9. Kobayashi T (招待講演) ”Instability of repetitive sequence and cellular senescence” 日本分子生物学会シンポジウム、横浜市パシフィコ横浜 2014 年 11 月 25-27 日
10. 小林武彦 (招待講演) ”rDNA stability and cellular senescence”熊本大学リエゾンラボ研究会、熊本市熊本大、2014 年 10 月 14-15 日
11. 小林武彦 (招待講演) 「ゲノムの安定性と細胞老化」日本生化学会大会シンポジウム、京都市国際会議場、2014 年 10 月 7-10 日
12. 小林武彦「核膜近傍のタンパク質が rDNA の安定性に寄与する」酵母遺伝学フォーラム 2014 年 9 月 1-3 日
13. Kobayashi T (招待講演) ”rDNA stability and cellular senescence”ゴードン会議、香港、2014 年 7 月 6-11 日
14. 小林武彦、坂季美子、井手聖、オーステンガンレイ 「非コードの転写と細胞老化」第 46 回酵母遺伝学フォーラム、仙台市東北学院大、2013 年 9 月 8-10 日
15. Kobayashi T (招待講演) ”Noncoding transcription regulates senescence in yeast”国際シンポジウム Evolution of non-coding DNA region 葉山市湘南国際村、2013 年 8 月 18 日
16. 小林武彦 (招待講演) 公開シンポジウム“遺伝情報場“「非コード DNA 領域が制御する細胞老化機構」東京ステーションコンファレンス、2013 年 1 月 11 日
17. 坂季美子、オーステンガンレイ、井手 聖、小林武彦 「rDNA と細胞老化」第 45 回酵母遺伝学フォーラム・第 20 回酵母合同シンポジウム、京都府宇治市京都大、2012 年 4-6 日
18. 小林武彦 「rDNA の安定性と細胞老化」第 1 回リボソームミーティング、東広島市広島大、2012 年 3 月 15 日
19. 小林武彦 (招待講演) 「リボソーム RNA 遺伝子と細胞老化」日本農芸化学会シンポジウム、京都市京都女子大 2012 年 3 月 2 日
20. Kobayashi T (招待講演) “rDNA recombination and cellular senescence” EMBO Workshop 2012年5月21～25日、セビリヤSpain

21. Kobayashi T (招待講演) “rDNA instability and cellular senescence” FASEB meeting 2012 年7月15~20日コロラド米国
22. Kobayashi T (招待講演) “rDNA instability and cellular senescence” The 8th 3R Symposium 2012 年 11 月 25~28 日淡路市夢舞台国際会議場
23. 小林武彦 「RTT109はrDNAの異常増幅を防ぐ」 第29回染色体ワークショップ、仙台市ニュー水戸屋、2012年1月26日
24. Kobayashi T (招待講演) ”Recovery of rDNA stability contributes to rejuvenation in yeast” 日本分子生物学会シンポジウム、横浜市パシフィコ横浜、2011年12月15日
25. 小林武彦 「ヒストン修飾とリボソームRNA遺伝子のコピー数制御」 酵母遺伝学フォーラム第44回研究報告会、福岡市九州大、2011年9月6日
26. Kobayashi T (招待講演) “Maintenance of the ribosomal RNA gene repeat and its role in cellular senescence” The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. 沖縄県恩納村、2011年10月24日
27. Kobayashi T (招待講演) “Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast “OIST Workshop(QECG2011): Linkage and Recombination in Genome sequences. 沖縄県恩納村 2011年5月25日

《図書》

1. 小林武彦 (著書) “寿命は何が決めるのか～長生き遺伝子のヒミツ” 岩波ジュニア新書 2016 年 2 月
2. Kobayashi, T. (著書、共著) Genome Instability of Repetitive Sequence: Lesson from the Ribosomal RNA Gene Repeat. In “DNA Replication, Recombination, and Repair” Hanaoka, F and Sugawara K. ed. Springer Part IV, Chapter 10; pp235-247. 2016 年 1 月 DOI10.1007/978-4-431-55873-6
3. 小林武彦 (著書、編集) ゲノムを司るインターメア～非コード DNA の新たな展開～化学同人 2015 年 11 月
4. 小林武彦 (著書、共著) “遺伝子が語る生命 38 億年の謎” 悠書館、国立遺伝研編、2014 年 6 月
5. 小林武彦 (著書、共著) 岩波書店 岩波生物学辞典 第 5 版 2013 年 3 月
6. 小林武彦 (著書、共著) ”遺伝子図鑑”悠書館、国立遺伝研編、2013 年 10 月

《和文総説》

1. 小林武彦、赤松由布子 (査読無) (2013)リボソーム RNA 遺伝子の不安定性と生理作用 生化学 84 巻 pp839-844
2. 小林武彦 (査読無)(2013)「染色体安定性の鍵を握る反復配列の維持機構」実験医学 31、2573-2577
3. 小林武彦 (総説、査読無) (2012) 「概論—今開かれる非コード DNA 領域の世界」 実験医学 30、2202-2208
4. 小林武彦 (総説、査読無) (2012) 「rDNA 巨大反復遺伝子群による細胞老化制御」 実験医学 30、2228-2233
5. 小林武彦、坂季美子 (実験書、査読無) (2011) 実験医学 別冊「核酸実験の原理とプロトコール」 羊土社 p85-91

6. 小林武彦 (総説、査読無) (2011) 「核小体の新機能」 生体の科学 「細胞核—構造と機能」 医学書院、vol.62: 412-415
7. 小林武彦 (総説、査読無) (2011) 「リボソームRNA 遺伝子の安定性と細胞老化」 生体の科学 「細胞核—構造と機能」 医学書院、vol.62: 416-417

《特許などその他成果》

1. 小林武彦 「細胞はいかに若返るか」 建築保全センター 「Re」 特集 「アンチエイジング」 p52-55、2016年1月
2. ウェブジャーナル 「日経グッデイ」 2016年2月6日 人間は何歳まで生きられるのか？
3. ウェブジャーナル 「R25」 2015年3月21日 老化を防ぐ 「若返り薬」 実現間近？ 2015年3月22日 「薄毛は隔世遺伝」 は嘘だった!? 2015年4月29日 縄文顔／弥生顔って本当にあるの？ 2015年5月6日 人の“恐怖心”は遺伝するのか？ 2015年5月11日 プチ断食が健康にいいって本当？
4. 小林武彦 「本当は楽しいドケチ研究」 教えてエコ実験 returns 実験医学 vol.33 p2290-2293 2015年9月
5. 2015年3月14日 テレビ朝日 「ミライの鏡」 出演
6. 2015年2月24日 NHK BS プレミアム 「関口宏のそもそも」 出演
7. 小林武彦 長寿遺伝子の正体 Medical Science Digest vol.40 p666-667、2014年

《受賞 (本人) 》

1. 2016年度日本遺伝学会木原賞(2016年9月)
2. 平成24年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 (研究部門) (2012年4月)
3. 第29回井上學術賞(2013年2月)

《受賞 (若手) 》

1. 佐々木真理子 日本遺伝学会第88回大会ベスト・ペーパー賞(2016年12月)
2. 飯田哲史 日本遺伝学会第85回大会ベスト・ペーパー賞(2013年12月)

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 三島市図書館講演会 「ゾウはなぜネズミより長生きか？」 2015年2月28日
2. 高校生職場体験 「生命科学への誘い」 (2011-2015) 毎夏、計5回実施
3. 高校生対象市民公開講座 「ゲノムの調べ」 神奈川、横浜 2015年2月8日
4. 地域 FM ラジオ局ボイスキュー 「サイエンスナウ」 ボランティアパーソナリティー、2011-2015年、年12回出演
5. 三島市市民公開講演会 「生き物の寿命」、三島市、2013年11月

《学会の主催》

1. 国際シンポジウム 3R(DNA replication, recombination and repair)、2014年11月 静岡県御殿場市御殿場高原ホテル

非コード DNA 領域によるゲノム DNA 再編成制御機構



太田 邦史

計画研究 代表者 (平成 23~27 年度)

東京大学大学院総合文化研究科

【研究目的】

がんや遺伝疾患とも密接な関連を持つ DNA 再編成は、非コード DNA 領域を介して複層的に制御されていることが示唆されている。本研究では各班との連携を通じ、ゲノム DNA 再編成の制御における非コード DNA 領域の役割について、「非コード機能配列」、「クロマチン構造」、「反復配列」、「非コード RNA 転写」、「染色体高次構造」、「転位因子」といった観点から分子レベルの解析を行い、新たな非コード機能配列や調節因子の発見を目指す。

【研究成果】

非コード DNA 領域のゲノム再編に関する機能に関して、下記に示す成果を得た。まず、染色体高次構造変化をもたらす Mde2、染色体接着因子コヒーシン Rec8、ヒストン H3K4 のメチル化に関わる Prdm9 が、減数分裂期組換えホットスポット活性を調節することを発見した(三好ら 2012 *Mol. Cell*; 伊藤ら *Genes Cells* 2014; 山田ら 2013 *Nucleic Acids Res.*; 河野ら *DNA Res.* 2014) (図 1)。また、耐熱性制限酵素を酵母や植物の細胞に導入して一過的に活性化することで、表現型変化を伴う種々の染色体再編成を引き起こすことに成功し、この際に転移因子や rDNA などの反復性配列がゲノム進化を促進する証拠を得た (論文審査中)。非コード DNA 領域の遺伝子発現調節に関わる新たな機能として、分裂酵母のストレス遺伝子上流に存在する非コード領域の転写産物が、転写抑制因子と *cis* に相互作用することでその機能を阻害し、局所的な転写活性化の正のフィードバック制御をもたらすことを示した (竹俣ら *Nucleic Acids Res.* 2015) (図 2)。

技術開発面では、分担者の加藤が非コード DNA 領域に関わるタンパク質の機能解明に必要な ChIP-seq 法の改良を行い、少ないサンプル量で偽陽性を減らす手法を開発した。これらの手法により、複製チェックポイントとフォークの進行の密接な関係を明らかにした(De Poccio ら, *Mol. Cell*, 2012)ほか、ヒトのコルネリデランゲ症候群における HDAC8 の変異が、姉妹染色分体接着因子のアセチル化サイクルの異常をもたらすことを示した(Deardorf ら, *Nature*, 2012)。また、太田らは抗体遺伝子の再編成促進により従来の技術で入手できなかった生理活性脂質に対する中和抗体を獲得し、この脂質の

神経ガイダンス機能解明の手がかりを作った(Guy ら, *Science*, 2015)。

領域内の共同研究の事例としては、印南・中山・小林班と共同で分裂酵母の野生株 32 種のゲノムを解読し、非翻訳性 DNA の詳細な基盤情報を入手した(Fawcett ら *PLoS One* 2014)。加納・升方班との共同研究により、セントロメアタンパク質 Sgo2 が間期にサブテロメアに局在し、特殊なクロマチン高次構造を形成することでサブテロメア遺伝子群の発現制御やサブテロメア領域の DNA 複製タイミングを決定していることを見出した (田代ら *Nature Commun.* 2016)。

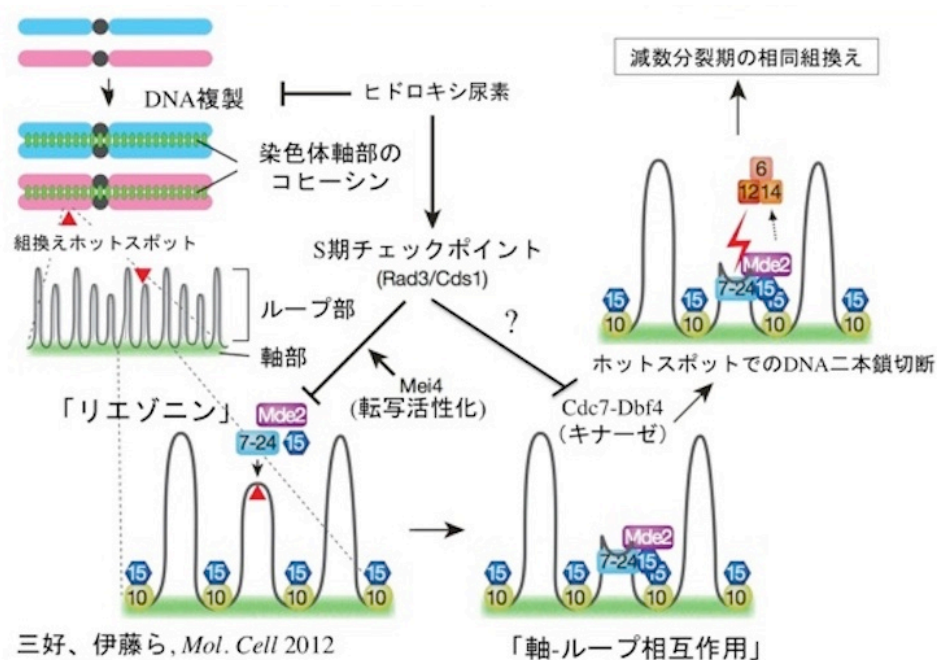


図 1. DNA 複製完了後の染色体構造変化に必要な組換え活性化因子「リエゾニン」を同定

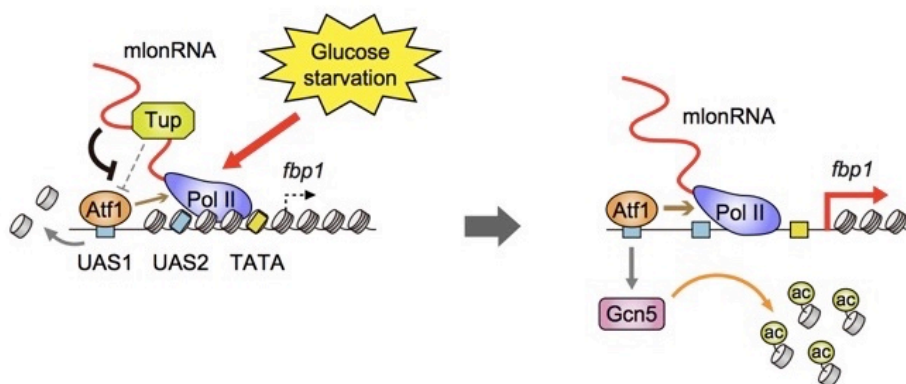


図 2. 上流 lncRNA は転写コリプレッサーの転写抑制機能を合成されたその場で阻害することで転写活性化の正のフィードバックを生み出す

【研究発表】

《主な発表論文等（計41件）》（主要な36件のみ記載）

1. Takemata N, Oda A, Yamada T, Galipon J, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, Hoffman CS, Hirota K, Ohta K. (2016) Local potentiation of stress-responsive genes by upstream noncoding transcription. *Nucleic Acids Res.* 44: 5174-5189 (査読有り)
2. Hirata Y., Oda A., Ohta K., Aihara K. (2016) Three-dimensional reconstruction of single-cell chromosome structure using recurrence plots. *Sci Rep.* 6: 34982. (査読有り)
3. Koya J., Kataoka K., Sato T., Bando M., Kato Y., Tsuruta-Kishino T., Kobayashi H., Narukawa K., Miyoshi H., Shirahige K., Kurokawa M. (2016) DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. *Nature Commun.* 7: 10924. (査読有り)
4. Tashiro S., Handa T., Matsuda A., Ban T., Takigawa T., Miyasato K., Ishii K., Kugou K., Ohta K., Hiraoka Y., Masukata H., Kanoh J. (2016) Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nature Commun.* 10393. (査読有り)
5. Guy AT, Nagatsuka Y, Ooashi N, Inoue M, Nakata A, Greimel P, Inoue A, Nabetani T, Murayama A, Ohta K, Ito Y, Aoki J, Hirabayashi Y, Kamiguchi H. (2015) Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord. *Science* 349:974-977. (査読有り)
6. Kubota T., Katou Y., Nakato R., Shirahige K., Donaldson AD. (2015) Replication-Coupled PCNA Unloading by the Elg1 Complex Occurs Genome-wide and Requires Okazaki Fragment Ligation. *Cell Rep.* (2015) 12: 774-787. (査読有り)
7. Oda A., Takemata N., Hirata Y., Miyoshi T., Suzuki Y., Sugano S., Ohta K. (2015) Dynamic transition of transcription and chromatin landscape during fission yeast adaptation to glucose starvation. *Genes Cells.* 20: 392-407. (査読有り)
8. Asada R., Takemata N., Hoffman C., Ohta K., Hirota K. (2015) Antagonistic controls of chromatin and mRNA start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor. *Mol. Cell. Biol.* 35: 847-855. (査読有り)
9. Tsujioka H., Kunieda T., Katou Y., Shirahige K., Kubo T. (2015) Unique Gene Expression Profile of the Proliferating Xenopus Tadpole Tail Blastema Cells Deciphered by RNA-Sequencing Analysis. *PLoS One* 10:e0111655. (査読有り)
10. 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. (2015) Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin. *Nature Genet.* 47:338-344. (査読有り)
11. Jeppsson K, Carlborg KK, Nakato R, Berta DG, Lilienthal I, Kanno T, Lindqvist A, Brink MC, Dantuma NP, Katou Y., Shirahige K, Sjögren C. (2014) The chromosomal association of the Smc5/6 complex depends on cohesion and predicts the level of sister chromatid entanglement. *PLoS Genet.* 10, e1004680. (査読有り)
12. Takai H, Masuda K, Sato T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Katou Y., Ogawa H, Morishita Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Toyoshima C, Shirahige K, Akiyama T. (2014) 5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex. *Cell Rep.* 9: 48-60. (査読有り)
13. Suda N, Itoh T, Nakato R, Shirakawa D, Bando M, Katou Y., Kataoka K, Shirahige K, Tickle C, Tanaka M. (2014) Dimeric combinations of MafB, cFos and cJun control the apoptosis-survival balance in limb morphogenesis. *Development.* 141: 2885-2894. (査読有り)
14. Yata K, Bleuyard JY, Nakato R, Ralf C, Katou Y., Schwab RA, Niedzwiedz W, Shirahige K,

- Esashi F. (2014) BRCA2 coordinates the activities of cell-cycle kinases to promote genome stability. *Cell Rep.* 7: 1547-1559. (査読有り)
15. Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Huynh LM, Sivaraman P, Kumarevel T, Inoue K, Nakato R, Katou Y, Sado T, Takahashi S, Ogura A, Shirahige K, Ishii S. (2014) Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14: 217-227. (査読有り)
 16. Fawcett JA, Iida T, Takuno S, Sugino RP, Kado T, Kugou K, Mura S, Kobayashi T, Ohta K, Nakayama J, and Innan H. (2014) Population genomics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 9:e104241. (査読有り)
 17. Ito M., Kugou K., Fawcett J.A., Mura S., Ikeda S., Innan H., Ohta K. (2014) Meiotic recombination cold spots in chromosomal cohesion sites. *Genes Cells*, 19: 359-373. (査読有り)
 18. Kono H., Tamura M., Osada N., Suzuki H., Abe K., Moriwaki K., Ohta K, Shiroishi T. (2014) Prdm9 polymorphism unveils mouse evolutionary tracks. *DNA Res.*, 21: 315-326. (査読有り)
 19. Koyama-Nasu R, Haruta R, Nasu-Nishimura Y, Taniue K, Katou Y, Shirahige K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Matsui M, Takahashi R, Hoshino-Okubo A, Sugano H, Manabe E, Funato K, Akiyama T. (2014) The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 33: 2236-2244. (査読有り)
 20. Natsume T, Müller CA, Katou Y, Retkute R, Gierliński M, Araki H, Blow JJ, Shirahige K, Nieduszynski CA, Tanaka TU (2013) Kinetochores coordinate pericentromeric cohesion and early DNA replication by Cdc7-Dbf4 kinase recruitment. *Mol. Cell* (2013) 50: 661-674. (査読有り)
 21. Yamada T., Ohta K. (2013) Initiation of meiotic recombination in chromatin structure. *J. Biochem.* 154:107-114. (査読有り)
 22. Miyoshi T., Ito M., Ohta K. (2013) Spatiotemporal regulation of meiotic recombination by Liaisonin. *Bioarchitecture* 3: 20-24. (査読有り)
 23. Miyoshi T., Ito M., Kugou K., Yamada S., Furuichi M., Oda A., Yamada T., Hirota K., Masai M., Ohta K. (2012) A central coupler for recombination initiation linking chromosome architecture to S-phase checkpoint. *Mol. Cell* 47:1-12. (査読有り)
 24. Galipon J., Miki A., Oda A., Inada T., and Ohta K. (2013) Stress-induced lncRNAs evade nuclear degradation and enter the translational machinery. *Genes to Cells* 18: 353-368. (査読有り)
 25. Yamada S., Ohta K, Yamada T. (2013) Acetylated Histone H3K9 is associated with meiotic recombination hotspots, and plays a role in recombination redundantly with other factors including the H3K4 methylase Set1 in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 41: 3504-3517. (査読有り)
 26. Foltman M, Evrin C, De Piccoli G, Jones RC, Edmondson RD, Katou Y, Nakato R, Shirahige K, Labib K. (2013) Eukaryotic replisome components cooperate to process histones during chromosome replication. *Cell Rep.* 3: 892-904. (査読有り)
 27. Enverald E., Lindgren E., Katou Y, Shirahige K., Ström L. (2013) Importance of Polη for damage-induced cohesion reveals differential regulation of cohesion establishment at the break site and genome-wide. *PLoS Genet.* 9:e1003158. (査読有り)
 28. Dearnorff 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, Gillessen-Kaesbach G, Christianson DW, Kaiser FJ, Jackson LG, Hirota T, Krantz ID, Shirahige K. (2012) HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature* 489: 313-317. (査読有り)

29. Davidson MB, Katou Y, Keszthelyi A, Sing TL, Xia T, Ou J, Vaisica JA, Thevakumaran N, Marjavaara L, Myers CL, Chabes A, Shirahige K. (2012) Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J.* 31: 895-907. (査読有り)
30. De Piccoli G., Katou Y., Itoh T., Nakato R., Shirahige K., Labib K. (2012) Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases. *Mol. Cell* 45:696-704. (査読有り)
31. Tanaka S., Nakato R., Katou Y., Shirahige K., Araki H. (2011) Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Curr. Biol.* 21: 2055-2063. (査読有り)
32. 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. (2011) The replication checkpoint protects fork stability by releasing transcribed genes from nuclear pores. *Cell* 146:233-246. (査読有り)
33. Kegel A, Betts-Lindroos H, Kanno T, Jeppsson K, Ström L, Katou Y, Itoh T, Shirahige K, Sjögren C. (2011) Chromosome length influences replication-induced topological stress. *Nature* 471: 392-396. (査読有り)
34. Hu B., Itoh T., Mishra A, Katoh Y., Chan KL., Upcher W., Godlee C., Roig MB., Shirahige K., Nasmyth K. (2011) ATP hydrolysis is required for relocating cohesin from sites occupied by its Scc2/4 loading complex. *Curr. Biol.* 21: 12-24. (査読有り)
35. Morita T., Yamada T., Yamada S., Matsumoto K., Ohta K. (2011) Fission yeast ATF/CREB family protein Atf21 plays important roles in production of normal spores. *Genes Cells* 16: 217-230. (査読有り)
36. Kurosawa K., Ohta K. (2011) Genetic diversification by somatic gene conversion. *Genes* 2: 48-58. (査読有り)

《学会発表（計 81 件）》（招待講演等主要なもののみ記載）

1. 小田有沙ら 「グルコース飢餓ストレス時のセンス・アンチセンス長鎖非コードRNAを介した遺伝子発現制御」 BMB2015 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市) 2015年12月1日-4日 (国内、招待講演)
2. Oda A., et al. 「Transcriptial dynamics of sense and antisense long noncoding RNAs in stress response.」 Pombe2015 生田神社会館(兵庫県神戸市) 2015年6月21日-26日 (国際、招待講演)
3. 太田邦史 「Chromosome structure and meiotic recombination hot and cold spots」. The 9th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair) 御殿場高原リゾート時之栖(静岡県御殿場市) 2014年11月17日-21日 (国際、招待講演)
4. 太田邦史 「Meiotic DSB Cold Spots in Yeast Chromosomal Axes」 Colby-Sawyer College(ニューロンドン, アメリカ) 2014 Meiosis Gordon Research Conference 2014年6月1日-6日 (国際、招待講演)
5. 太田邦史 「Epigenetics and dynamics of non-coding genome.」 高等研カンファレンス 2014Chromatin Decoding公益財団法人国際高等研究所(京都府木津川市) 2014年5月 12日-16日 (国際、招待講演)
6. 太田邦史 「栄養代謝・環境要素のエピゲノムへの影響」 第87回日本内分泌学会学術総会 福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2014年 4月 24日-26日 (国内、招待講演)
7. 太田邦史 「Massive genome restructuring induced by conditional multiple DNA breaks.」 第29回放生研・放医研国際シンポジウム コープイン京都 (京都府京都市) 2013年11月 28日-29日 (国内、招待講演)

8. 太田邦史 「Determinants of meiotic recombination hotspots in *S. pombe*.」 EMBO Conference on Meiosis, Radebeul-Dresden (ドレスデン、ドイツ) 2013年9月14日-19日 (国際、招待講演)
9. 太田邦史 「Chromatin regulation by stress-induced lncRNAs. 酵母からのエピジェネティクス研究へのメッセージ」 グランディア芳泉(福井県あわら市) 2013年9月2日-9月4日 (国内、招待講演)
10. 太田邦史 「Spatio-temporal control of meiotic recombination initiation」 EMBO Conference on Fission Yeast: *pombe* University of London (ロンドン、イギリス) 2013年6月24日-6月29日 (国際、招待講演)
11. 太田邦史 「TAQingシステムを用いた酵母の大規模ゲノム改変」第183回酵母細胞研究会例会 東京海洋大学(東京都港区) 2012年11月30日 (国内、招待講演)
12. 太田邦史 「Mde2 is a central coupler for meiotic recombination initiation that links chromosome architecture to S-phase checkpoint」 1st IGAKUKEN International symposium on regulation of chromosome cycle 東京都医学総合研究所(東京都世田谷区) 2012年11月29日 (国際、招待講演)
13. Ohta K. 「A novel mediator for meiotic recombination initiation that links chromosome architecture to S-phase checkpoint.」 The 8th 3R Symposium 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市) 2012年11月25日-28日 (国際、招待講演)
14. 太田邦史ら 「A novel mediator for meiotic recombination initiation links chromosome architecture to S-phase checkpoint.」 The 2012 CSHL meeting on dynamic organization of nuclear function Cold Spring Harbor Laboratory (ニューヨーク、アメリカ) 2012年9月27日-10月1日 (国際、招待講演)
15. 太田邦史 「ADLibシステムを用いたシーズ抗体の開発」第12回日本蛋白質科学会 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市) 2012年6月20日-22日 (国内、招待講演)
16. 太田邦史 「“Conditional induction of whole genome remodeling in plants and fungi”」 EMBO Genetic Stability and Change Workshop Roscoff (フランス) 2012年5月2日-5日 (国際、招待講演)
17. 太田邦史ら 「Gene regulation by lncRNAs in response to low glucose stress.」 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2011年12月16日 (国内)
18. 太田邦史 「環境応答とエピゲノム」第25回環境ホルモン学会講演会 東京大学山上会館(東京都文京区) 2011年6月16日 (国内、招待講演)
19. 太田邦史 「大規模ゲノム再編成システム」第7回よこはまバイオマス研究会 横浜市立大学(神奈川県横浜市) 2011年5月31日 (国内、招待講演)

《図書》

1. 小川(西秋) 葉子、太田邦史 「生命デザイン学入門」岩波ジュニア新書224(2016)
2. 太田邦史 「エピゲノムと生命」講談社ブルーバックス 230.(2013)
3. 太田邦史 「理系のための生命科学(第3版)(有性生殖と遺伝) 87-97羊土社(2013)
4. 太田邦史 キャンベル生物学(第9版)(「免疫」) 1085-1112丸善出版
5. 太田邦史 「自己変革するDNA」みすず書房(2011)

《和文総説》

1. 太田邦史 「非コードDNA・インターメアを介したDNA再編成」 in 「非コードDNAの機能—ゲノムを支えるインターメアの機能」東京化学同人 143-160(2015)

2. 石井智子、太田邦史 「アンチセンス型長鎖ノンコーディングRNAの多様な機能」 細胞工学 34: 28-32 (2015)
3. 太田邦史 「エピゲノムと老化」 細胞46:615-618 (2014)
4. 太田邦史 「エピゲノム・ダイナミクス」 生体の科学 65: 414-415 (2014)
5. 黒澤恒平、橋本講司、瀬尾秀宗、太田邦史「ADLibシステムによる抗体の進化分子工学」 147-159. 「進化工学の最前線」 エヌ・ティー・エス出版 (2013)
6. 竹俣直道、三木敦子、太田邦史 「長鎖ノンコーディングRNAによる遺伝子発現・クロマチン修飾制御」 実験医学31:1183-1188, (2013)
7. 太田邦史、久郷和人、山田真太郎、小田有沙 「次世代シーケンサーによる非コードDNA配列解析」 実験医学 30: 2209-2214 (2012)
8. 太田邦史、小田有沙、Josephine Galipon、竹俣直道、三好知一郎、廣田耕志「長鎖ncRNAによるクロマチン・転写活性化の制御」 実験医学 29: 1722-1727 (2011)
9. 太田邦史 「環境応答とエピゲノム」 Endocrine Disrupter News Letter 14:6 (2011)

《特許などその他成果》

1. 「空間的な近さの概念を用いた生体分子データの3次元構造の再構成方法」 平田祥人、小田有沙、太田邦史、合原一幸、東京大学 特許 特願2016-023214, 2016年2月10日 国内
2. 「植物バイオマスの増産方法」 村本伸彦、杉本広樹、光川典宏、太田邦史、久郷和人、豊田中央研究所・東京大学、特許 特願2013-049689、2013年3月12日 国内
3. 「非誘導体型LPAに対して作成された抗LPA抗体」 太田邦史、村山晃歩、出願年月日 2013年12月28日、特許2012-284612
4. 「タンパク質の迅速改良法」 黒澤恒平、太田邦史、瀬尾秀宗、出願年月日 2013年6月20日、特許2012-138293

《受賞（本人）》

1. 平成24年第10回産学官連携功労者表彰・文部科学大臣賞
2. 平成24年度関東地方発明表彰・発明協会会長奨励賞

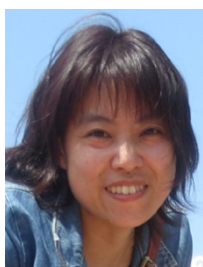
《受賞（若手）》

1. 伊藤将（若手）日本遺伝学会第84回大会ベスト・ペーパー賞(2012年12月)

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 酵母細胞合同・シンポジウム (2014年9月)
2. 日本内分泌学会・シンポジウム (2014年4月)
3. 理研横浜研究所・講演会(2013年3月)
4. 朝日カルチャーセンター・講演会(2013年3月)
5. 東邦大学医学部・講演会(2013年12月)
6. 学習院大学生命科学・シンポジウム(2013年11月)

非コード DNA 領域によるゲノム DNA 再編成制御機構



加藤 由起

計画研究 分担者 (平成 23-27 年度)
東京大学分子細胞生物学研究所

【研究目的】

ChIP-seq 法の解析は、免沈分画と全ゲノム分画での差分ファイルを作成し、p-value が低く、有意に濃縮されているか(濃縮度)を確認する手法が主である。しかし免沈効率の悪い抗体を使用した場合などは偽陽性のシグナルが多く、全ての箇所に個々にプライマーを設計し、定量 PCR で確認を行うのは現実的ではない。そこで私たちは免疫沈降法、ライブラリー調整時、データ解析時の各ステップにおいて、プロトコールを見直す事で、「偽陽性」であるシグナルを偽であると判定する、もしくは偽陽性のシグナルを減少させる事を試みた。

【研究成果】

出芽酵母において Scc2 はコヒーシンローディングタンパクと呼ばれている通り、姉妹染色分体間を強固に接着するコヒーシンを染色体にリクルートするのに必要であると考えられてきた。しかし我々のコヒーシンが染色体にローディングされる時期 (G1-S 期) の Scc2 タンパクの ChIP-seq 法の結果は、有意なピークがたくさん存在するが (図 1)、それら結合箇所はコヒーシンタンパクの結合箇所とは全く相関がなかった。そこでこの Scc2 の結果が偽陽性であるのか、それともその部位で Scc2 が何かしら作用しているのかを確認するために、各ステップにおいて、プロトコールを見直した。

ChIP-seq 法で見られる Scc2 の染色体結合部位は、tRNA など転写が活発な部分が多く、また RNA ポリメラーゼ II の一番大きなサブユニット (RPO21) の ChIP-seq 法のデータと相関係数が高いことから、何かしら転写機構が関与しているのではと考え、免疫沈降前に RNaseA 処理を行ったところ、Scc2 の染色体への結合が劇的に減少した (図 2)。この RNaseA 処理による減少は全てのタンパクで見られるわけではなく、同様に RNaseA 処理を行ったコヒーシンタンパク、RNA ポリメラーゼ II のサブユニットの ChIP-seq 法の結果では見られないこと、また G2 期に見られる Scc2 のセントロメア周辺への結合は影響を受けない事から、G1-S 期において Scc2 はこの箇所で特異的に転写機構に関与する何かしらの役割を行っているのではと考えられる。そこでチオルチンや DRB などの転写阻害剤を添加し、転写を阻害したところ、時の Scc2 の染色体結合数が減少していた (図 3)。以上の事から、Scc2 は、従来から言われていたコヒーシンを染

色体にリクルートするだけでなく、今まで言われていなかった転写機構との連携を行う他の役割があると考えられる。

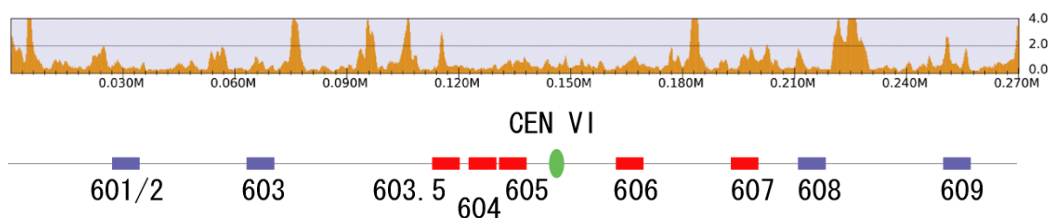


図 1. Scc2 の ChIP-seq の結果

	1.5<	2<
Scc2HU_RNaseA	3	0
Scc2HU_RNaseA(purify)	3	0
Scc2HU_normal	343	343

図 2. RNaseA処理有、無における染色体結合数の変化

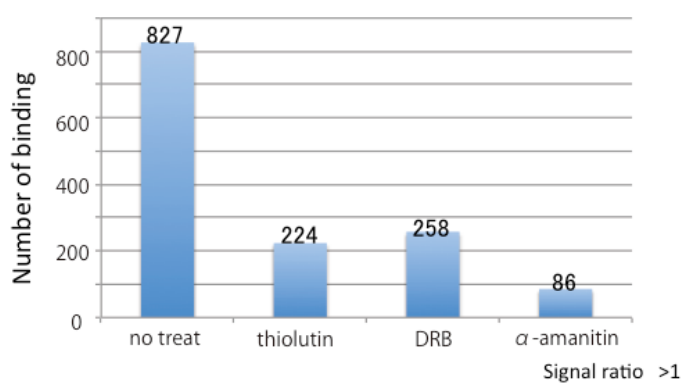


図 3. 転写阻害剤添加時におけるScc2結合数の変化

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Hu, B., Itoh, T., Mishra, A., Katou, Y., Chan, K.L., Upcher, W., Godlee, C., Roig, M.B., *Shirahige, K., *Nasmyth, K. (2011). ATP hydrolysis is required for relocating cohesin from sites occupied by its Scc2/4 loading complex. *Curr Biol.* 21:12-24. (査読有り)
2. Kegel, A., Betts-Lindroos, H., Kanno, T., Jeppsson, K., Ström, L., Katou, Y., Itoh, T., Shirahige, K., *Sjögren, C. (2011) Chromosome length influences replication-induced topological stress. *Nature.* 471:392-6. (査読有り)
3. 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. (2011) The replication checkpoint protects fork stability by releasing transcribed genes from nuclear pores. *Cell.* 146:233-46. (査読有り)
4. Tanaka, S., Nakato, R., Katou, Y., Shirahige, K., *Araki, H. (2011) Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Curr Biol.* 21:2055-63. (査読有り)
5. De Piccoli, G., Katou, Y., Itoh, T., Nakato, R., Shirahige, K., *Labib, K. (2012). Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases. *Mol Cell.* 45:696-704. (査読有り)
6. Natsume, T., Müller, C.A., Katou, Y., Retkute, R., Gierliński, M., Araki, H., Blow, J.J., Shirahige, K., Nieduszynski, C.A., *Tanaka, T.U. (2013) Kinetochores coordinate pericentromeric cohesion and early DNA replication by Cdc7-Dbf4 kinase recruitment. *Mol Cell* 50:661-74. (査読有り)
7. Jeppsson, K., Carlborg, K.K., Nakato, R., Berta, D.G., Lilienthal, I., Kanno, T., Lindqvist, A., Brink, M.C., Dantuma, N.P., Katou, Y., Shirahige, K., *Sjögren, C. (2014) The chromosomal association of the Smc5/6 complex depends on cohesion and predicts the level of sister chromatid entanglement. *PLoS Genet.* 10:e1004680. (査読有り)
8. Izumi, K., Nakato, R., Zhang, Z., Edmondson, A.C., Noon, S., Dulik, M.C., Rajagopalan, R., Venditti, C.P., Gripp, K., Samanich, J., Zackai, E.H., Deardorff, M.A., Clark, D., Allen, J.L., Dorsett, D., Misulovin, Z., Komata, M., Bando, M., Kaur, M., Katou, Y., Shirahige, K., *Krantz, I.D. (2015) Germline gain-of-function mutations in *AFF4* cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin. *Nat Genet.* 47:338-44. (査読有り)
9. Kubota, T., Katou, Y., Nakato, R., Shirahige, K., *Donaldson, A.D. (2015) Replication-Coupled PCNA Unloading by the Elg1 Complex Occurs Genome-wide and Requires Okazaki Fragment Ligation. *Cell Rep.* 12:774-87. (査読有り)

《学会発表》

1. Yuki KATOU “RNA dependent protein binding revealed by ChIP-seq” EMBO conference、ハイデルベルク、2015年5月6日-10日(ポスター、国際)
2. Yuki KATOU “RNA dependent protein binding revealed by ChIP-seq” THE 4D NUCLEOSOME、広島、2014年12月19日(口頭、国際)
3. 加藤由起 “Dynamics of Scc2 during S-phase” 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月26日(口頭、ポスター、国内)
4. Yuki KATOU “Genome-wide Dynamic change of Cohesin and replication in yeast” The 13th International Conference on Systems Biology、トロント、2012年8月19-23日(ポスター、国際)

《和文総説》

1. 加藤由起、インターメアの解析法、ゲノムを司るインターメア、2015年、9-16

集団遺伝学理論と比較ゲノムによる非コードDNA領域の進化メカニズム



印南 秀樹

計画研究 代表者 (平成 23-27 年度)
総合研究大学院大学先導科学研究科

【研究目的】

「非コード配列チーム」に属し、特に塩基配列の解析を中心に行い、全ての班と連携して研究を推進する。一方、独自の理論研究を進めることによって、概念的な理解の促進も図りながら、染色体上の非コード領域の進化メカニズムを解明する。理論研究は一般的に非常に柔軟で、あらゆる生物種の幅広いタイプの非コード領域を研究対象に研究をデザインし遂行することを目的とする。

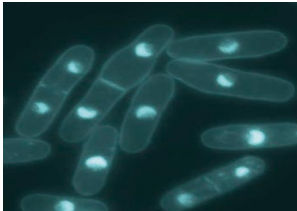
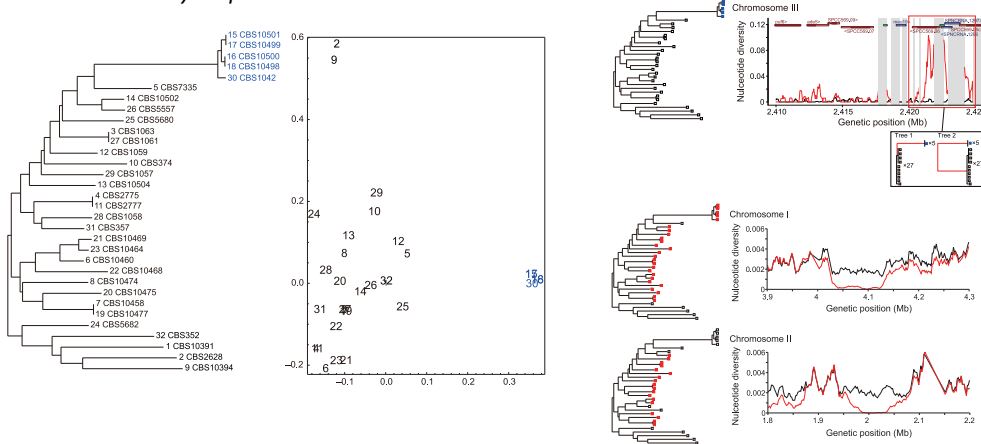
【研究成果】

本研究課題の成果は、多班との共同研究と独自の理論研究とに分けることが出来る。前者の中で特筆すべき成果は、分裂酵母の全ゲノム SNP 解析である。全ゲノム SNP は、ゲノム中に蓄積している塩基多型のカatalogであり、進化的な背景による領域の機能的な重要性を調べる上で非常に重要なデータであり、モデル生物には必須である。にもかかわらず、分裂酵母にはそれが欠けていたため、理論家である本研究者が中心となり、分裂酵母を研究材料としている複数の領域班 (中山班、太田班、小林班) との共同研究として遂行した。実際には、分裂酵母の 38 の野生株の全ゲノム塩基配列を次世代シーケンサーで決定した。種内変異の分布を解析することによって、機能的な重要性などをゲノムワイドで指数化することが出来た。また、機能的制約のつよい特定の非コード配列 (数塩基からなるモチーフ) も探索した。結果は PLoS One 誌 (Fawcett et al. 2014 PLoS One 9: e104241) に掲載された。この論文では、「インターメア」という言葉の定義を、初めて学界に定義した。

一方、多岐にわたる独自の理論研究も同時に行った。例えば、(i) 突然変異率とコピー数変異に働く自然選択の力の相互作用を理論的に記述した (Teshima and Innan 2012 Genetics 190: 1077-1086、Ezawa and Innan 2013 Heredity 111: 364-374)。(ii) また、コピー数変異の種間解析により、そのホットスポットの存在と、そこにおける遺伝変換の役割を明らかにした (Fawcett and Innan 2013 Trends Genet. 29: 561-568)。(iii) 非コード領域の代表とも言えるトランスポゾンの進化ダイナミクスの研究とシミュレーターの開発も行った。新規のデータ解析法の開発としては、(iv) 次世代シーケンサーの配列データから、変異サイト (SNP) の同定と同時にハプロタイプの再構築を

行うアルゴリズムを開発した (Sasaki, Sugino and Innan 2013 Mol. Biol. Evol. 30: 2187-2196)。(v) また、突然変異系統において、効果的に表現型に影響を与える高インパクトの変異サイトを同定する方法の開発を行った。イネの突然変異系統に用いることによって、その有効性を実証した。また、いくつかの機能突然変異を迅速に同定することに成功した (Abe et al. 2012 Nat Biotech. 30: 174-178、Takuno et al. 2012 PLoS One 7: e46545、Takagi et al. 2013 Plant J. 74: 174-183)。

分裂酵母の32の野生株の全ゲノム配列決定 *Schizosaccharomyces pombe*



Population Genomics of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*

Jeffrey A. Fawcett^{1,*,3}, Tetsushi Iida^{2,3}, Shohei Takuno¹, Ryuichi P. Sugino^{1,3}, Tomoyuki Kado¹, Kazuto Kugou⁴, Sachiko Mura⁴, Takehiko Kobayashi², Kunihiro Ohta⁴, Jun-ichi Nakayama^{5,6}, Hideki Innan^{1,*}

With an aim to characterize all functional non-coding elements that lie between centromere and telomere, which we termed “**intermere**”, ...

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Fawcett, J. A.* , Innan, H. (2016). High similarity between distantly related species of a plant SINE family is consistent with a scenario of vertical transmission without horizontal transfers. *Mol Biol Evol.* 33: 2593-2604. (査読有り)
2. Yashima, A. S., Innan, H.* (2016). VARVER: a database of microsatellite variation in vertebrates. *Mol Ecol Resour.* (in press) (査読有り)
3. Takeuchi, Y., Innan, H. (2015). Evaluating the performance of neutrality tests of a local community using a niche-structured simulation model. *Oikos* 124: 1203-1214. (査読有り)
4. Fawcett, J. A., Innan, H. (2015). Spreading good news. *eLife* 4: e07108. (査読有り)
5. Fawcett, J. A., Iida, T., Takuno, S., Sugino, R. P., Kado, T., Kugou, K., Mura, S., Kobayashi, T., Ohta, K., Nakayama, J.*, Innan, H.* (2014). Population genomics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 9: e104241. (査読有り)
6. Kutsukake, N.* , Innan, H. (2014). Detecting phenotypic selection by approximate Bayesian computation in phylogenetic comparative methods. In "Modern Phylogenetic Comparative Methods and Their Application in Evolutionary Biology", edited by R. L. Z. Garamszegi. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (査読有り)
7. Tezuka, A., Kasagi, S., van Oosterhout, C., McMullan, M., Iwasaki, W. M., Kasai, D., Yamamichi, M., Innan, H., Kawamura, S., Kawata, M.* (2014). Divergent selection for opsin gene variation in guppy (*Poecilia reticulata*) populations of Trinidad and Tobago. *Heredity* 113: 381-389. (査読有り)
8. Ito, M., Kugou, K., Fawcett, J. A., Mura, S., Ikeda, S., Innan, H., Ohta, K.* (2014). Meiotic recombination cold spots in chromosomal cohesion sites. *Genes Cells.* 19: 359-373. (査読有り)
9. Kutsukake, N.* , Innan, H. (2013). Simulation-based likelihood approach for evolutionary models of phenotypic traits on phylogeny. *Evolution* 67: 355-367. (査読有り)
10. Takagi, H., Abe, A., Yoshida, K., Kosugi, S., Natsume, S., Mitsuoka, C., Uemura, A., Utsushi, H., Tamiru, M., Takuno, S., Innan, H., Cano, L. M., Kamoun, S., Terauchi, R.* (2013). QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J.* 74: 174-183. (査読有り)
11. Sasaki, E., Sugino, R. P., Innan, H.* (2013). The linkage method, a novel approach for SNP detection and haplotype reconstruction from a single diploid individual with next generation sequence data. *Mol Biol Evol.* 30: 2187-2196. (査読有り)
12. Ezawa, K., Innan, H.* (2013). Competition between the sperm of a single male can increase the evolutionary rate of haploid expressed genes. *Genetics* 194: 709-719. (査読有り)
13. Ezawa, K., Innan, H.* (2013). Theoretical framework of population genetics with somatic mutations taken into account: application to copy number variations in humans. *Heredity* 111: 364-374. (査読有り)
14. Kijima, TE, Innan, H.* (2013). Population genetics and molecular evolution of DNA sequences in Transposable elements. I. A simulation framework. *Genetics* 195: 957-967. (査読有り)
15. Fawcett, J. A., Innan, H.* (2013). The role of gene conversion in preservation of rearrangement hotspots in the human genome. *Trends Genet.* 29: 561-568. (査読有り)
16. Fawcett, Jeffrey A., Kado, T., Sasaki, E., Takuno, S., Yoshida, K., Sugino, R. P., Kosugi, S., Natsume, S., Mitsuoka, C., Uemura, A., Takagi, H., Abe, A., Ishii, T., Terauchi, R.* , Innan, H.* (2013). QTL map meets population genomics: an application to rice. *PLoS One* 8: e83720. (査読有り)

17. Sugino, R. P., Innan, H.* (2012). Natural selection on gene order in the genome re-organization process after whole genome duplication of yeast. *Mol Biol Evol.* 29: 71-79. (査読有り)
18. Yamamichi, M., Gojobori, J., Innan, H.* (2012). An autosomal analysis gives no genetic evidence for complex speciation of humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 29: 145-156. (査読有り)
19. Yamamichi, M., Innan, H.* (2012). Estimating the migration rate from genetic variation data. *Heredity* 108: 362-363 (査読有り)
20. Takuno, S., Kado, T., Sugino, R. P., Nakhleh, L., and Innan, H.* (2012). Population genomics in Bacteria: A case study of *Staphylococcus aureus*. *Mol Biol Evol.* 29: 797-809 (査読有り)
21. Abe, A., Kosugi, S., Yoshida, K., Natsume, S., Takagi, H., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Mitsuoka, C., Tamiru, M., Innan, H., Cano, L., Kamoun, S., Terauchi, R.* (2012). Genome sequencing reveals agronomically-important loci in rice from mutant populations. *Nat Biotech.* 30: 174-178. (査読有り)
22. Teshima, K. M., Innan, H.* (2012). The coalescent with selection on copy number variants. *Genetics* 190: 1077-1086 (査読有り)
23. Akita, T., Takuno, S., Innan, H.* (2012). Modeling evolutionary growth of a microRNA-mediated regulation system. *J Theor Biol.* 311: 54-65. (査読有り)
24. Takuno, S., R. Terauchi, R., Innan, H.* (2012). The power of QTL mapping with RILs. *PLoS One* 7: e46545. (査読有り)
25. Fawcett, J. A., Innan, H.* (2011). Neutral and non-neutral evolution of duplicated genes with gene conversion. *Genes* 2: 191-209 (in “*Gene Conversion in Duplicated Genes*” edited by H. Innan) (査読有り)
26. Mansai, S. P., Kado, T., Innan, H.* (2011). The rate and tract length of gene conversion between duplicated genes. *Genes* 2: 313-331. (in “*Gene Conversion in Duplicated Genes*” edited by H. Innan) (査読有り)
27. Innan, H.* (2011). Special Issue: *Gene Conversion in Duplicated Genes*. *Genes* 2: 394-396. (in “*Gene Conversion in Duplicated Genes*” edited by H. Innan) (査読無し)
28. Takuno, S., Innan, H.* (2011). Selection fine tunes the expression of microRNA target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol.* 28: 2429-2434. (査読有り)
29. Kitao, H., Nanda, I., Sugino, R.P., Kinomura, A., Yamazoe, M., Arakawa, H., Schmid, M., Innan, H., Hiom, K., and Takata, M.* (2011). FancJ/Brip1 helicase protects against genomic losses and gains in vertebrate cells. *Genes Cells* 16: 714-727. (査読有り)
30. Asano, K., Yamasaki, M., Takuno, S., Miura, K., Katagiri, S., Ito, T., Doi, K., Wu, J., Ebana, K., Matsumoto, T., Innan, H., Kitano, H., Ashikari, M., Mitsuoka, M.* (2011). Artificial selection for a green revolution gene during *japonica* rice domestication. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 11034-11039. (査読有り)

《学会発表》

1. 印南秀樹 「重複遺伝子の集団遺伝学」 第 8 4 回日本遺伝学会、福岡、2012年9月24-26日 (招待、国内)
2. Innan H ”Footprint of selection in duplicated genes” Population and Evolutionary Genetics、ミュンヘン、2015年3月6-11日 (招待、国際)
3. Innan H ”Population genetics of SNPs in duplicated region” Bay Area Population Genomic Meeting、バークレイ、2013年10月5日 (招待、国際)
4. Innan H ”The evolutionary roles of gene conversion between duplicates” SMBE Meeting、シ

カゴ、2013年7月7-11日（招待、国際）

《和文総説》

1. 岩嵯航、印南秀樹(2015)「ゲノム進化メカニズムと情報学的解析」ゲノムを司るインターメア、17-28
2. 杉野隆一、印南秀樹(2012)「ドライなアプローチによる遺伝子の並び順を決める要因の探索」実験医学、2215-2220

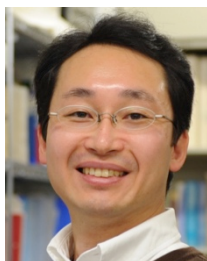
《受賞（本人）》

1. 日本学術振興会賞
2. 日本学士院奨励賞

《学会の主催》

1. 国際シンポジウム「Evolution of non-coding DNA」国際、2013年8月18—19日、神奈川県葉山

染色体維持におけるヘテロクロマチンの機能



中山 潤一

計画研究 代表者 (平成 23-27 年度)

名古屋市立大学大学院
システム自然科学研究科

(現：基礎生物学研究所)

【研究目的】

セントロメアやテロメアなどの染色体の機能ドメインは、反復配列や転移因子などいわゆる非コード DNA によって構成され、ヘテロクロマチンと呼ばれる構造を介してその機能が制御されている。しかし、非コード DNA とヘテロクロマチン化の関係には不明な点が多く残されている。本研究では、ヘテロクロマチンの中心的因子である HP1 に着目し、その生化学的解析から非コード DNA によるヘテロクロマチン化の分子機構の解明を目指した。

【研究成果】

HP1 は、リン酸化を中心とする様々な翻訳後修飾を受け、その修飾が HP1 自身の機能や動態、また他のクロマチン制御因子との結合を制御していると考えられる。HP1 のクロマチン結合とリン酸化制御の関連を探るため、まず HP1 α の N 末端側のセリンクラスターをリン酸化する酵素の探索を行った。HP1 α の N 末端断片をリコンビナントタンパク質として調製し、HeLa の核抽出液に存在するリン酸化酵素を生化学的に分離したところ、カゼインキナーゼ II (CK2) が HP1 α のリン酸化酵素であることを突き止めた。

以前の研究によって、HP1 α の N 末端側のセリンクラスターのリン酸化が、メチル化ヒストン H3 への結合を促進するということを明らかにしていた。しかし、HP1 の細胞内の標的はヌクレオソームであり、メチル化 H3 を含むヌクレオソームへの結合に対するリン酸化の役割は不明である、そこで HP1 のクロマチン結合とリン酸化制御の関連を探るため、再構成ヌクレオソームに対するリン酸化 HP1 α の結合を解析した。その結果、N 末端のセリンクラスターのリン酸化は、メチル化 H3 への結合を促進するだけでなく、メチル化 H3 を含むヌクレオソームへの特異性を高めていることが分かった。この効果と HP1 α 自身の DNA 結合能との関係を調べ、N 末端のセリンクラスターのリン酸化が、HP1 α のヒンジ領域の DNA 結合能を抑制し、その結果ヌクレオソーム結合の特異性を高めていることが明らかになった (図 1)。

HP1 α は N 末端の恒常的なリン酸化に加えて、細胞周期の M 期特異的にリン酸化されることが報告されている。M 期特異的なリン酸化の役割を明らかにするため、候補となるセリン残基に変異を導入した HP1 α を発現させ、そのリン酸化状態を調べた。その結果、HP1 α のヒンジ領域の 92 番目のセリンが主要な M 期特異的なリン酸化部位であること、また、阻害剤や M 期特異的な相互作用因子の解析から、HP1 α の M 期特異的なリン酸化が Aurora キナーゼと PP2A/C フォスファターゼによって拮抗的に制御されていることが明らかになった。

HP1 α の細胞内機能と M 期特異的なリン酸化の関連をさらに解析するため、細胞周期を同調させたヒト培養細胞を用いてリン酸化 HP1 α の挙動を解析した。その結果、HP1 α の S92 のリン酸化が、M 期の指標であるヒストン H3S10 のリン酸化に先行して起きること、またリン酸化 HP1 α がクロマチンから遊離していることを見出した。以上の結果から、HP1 α の M 期特異的なリン酸化は、HP1 α とヌクレオソーム DNA との相互作用を調節し、HP1 α の細胞周期特異的なクロマチン結合を制御していることが強く示唆された。

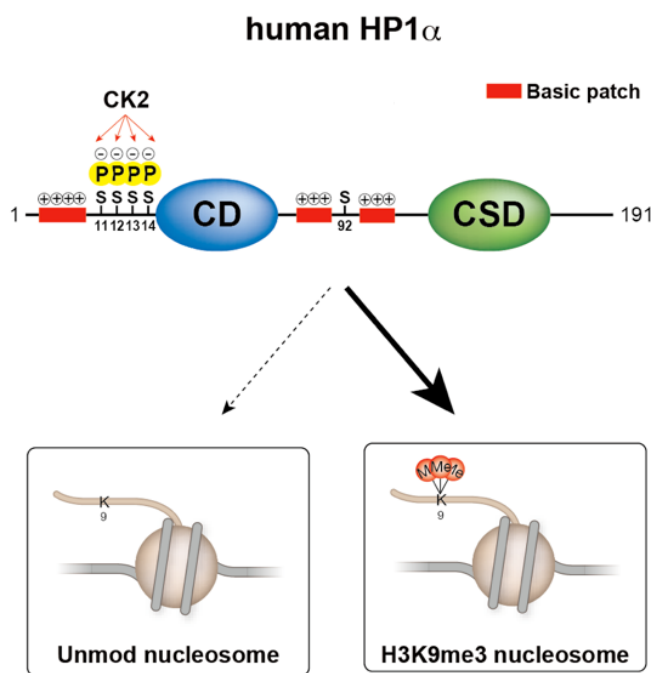


図 1 HP1 α の翻訳後修飾とその役割

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Mutazono, M., Morita, M., Tsukahara, C., Chinen, M., Nishioka, S., Yumikake, T., Dohke, K., Sakamoto, M., Ideue, T., Nakayama, J., Ishii, K., and *Tani, T. (2017). The intron in centromeric noncoding RNA facilitates RNAi-mediated formation of heterochromatin. *PLoS Genet.* in press. (査読有り)
2. Kamata, K., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Hatashita, M., Uchida, H., and *Oki, M. (2016). Four domains of Ada1 form a heterochromatin boundary through different mechanisms. *Genes Cells.* 21,1125-1136. (査読有り)
3. Mitsumori, R., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Uchida, H., *Oki, M. (2016). Gic1 is a novel heterochromatin boundary protein in vivo. *Genes Genet Syst.* 91, 151-159. (査読有り)
4. Shimojo, H., Kawaguchi, A., Oda, T., Hashiguchi, N., Omori, S., Moritsugu, K., Kidera, A., Hiragami-Hamada, K., Nakayama, J., Sato, M., *Nishimura, Y. (2016). Extended string-like binding of the phosphorylated HP1a N-terminal tail to the lysine 9-methylated histone H3 tail. *Sci Rep.* 6: e22527. (査読有り)
5. Nishibuchi, G. Machida, S., Osakabe, A., Murakoshi, H., Hiragami-Hamada, K., Nakagawa, R., Fischle, W., Nishimura, Y., Kurumizaka, H., Tagami, H., *Nakayama, J. (2014). N-terminal phosphorylation of HP1a increases its nucleosome-binding specificity. *Nucleic Acids Res.* 42: 12498-12511. (査読有り)
6. Nishibuchi, G., Shibata, Y., Hayakawa, T., Hayakawa, N., Ohtani, Y., Shinmyozu, K., Tagami, H., *Nakayama, J. (2014). Physical and functional interactions between the histone H3K4 demethylase KDM5A and the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *J Biol Chem.* 289: 28956-28970. (査読有り)
7. Fawcett, J.A., Iida, T., Takuno, S., Sugino, R.P., Kado, T., Kugou, K., Mura, S., Kobayashi, T., Ohta, K., *Nakayama, J., *Innan, H. (2014). Population genomics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 9: 104241. (査読有り)
8. Nishibuchi, G., *Nakayama, J. (2014). Biochemical and structural properties of heterochromatin protein 1: understanding its role in chromatin assembly. *J Biochem.* 156: 11-20. (査読有り)
9. *Kato, H., Okazaki, K., Iida, T., Nakayama, J., Murakami, Y., Urano, T. (2013). Spt6 prevents transcription-coupled loss of posttranslationally modified histone H3. *Sci Rep.* 3: 2186. (査読有り)
10. Mano, Y., Kobayashi, T.J., Nakayama, J., Uchida, H., *Oki, M. (2013). Single cell visualization of yeast gene expression shows correlation of epigenetic switching between multiple heterochromatic regions through multiple generations. *PLoS Biol.* 11: e1001601. (査読有り)
11. Kamata, K., Hatanaka, A., Goswami, G., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Urano, T., Hatashita, M., Uchida, H., *Oki, M. (2013). C-terminus of the Sgf73 subunit of SAGA and SLIK is important for retention in the larger complex and for heterochromatin boundary function. *Genes Cells* 18: 823-837. (査読有り)
12. Kawakami, K., Hayashi, A., Nakayama, J., *Murakami, Y. (2012). A novel RNAi protein, Dsh1, assembles RNAi machinery on chromatin to amplify heterochromatic siRNA. *Genes Dev.* 26: 1811-1824. (査読有り)
13. Ishida, M., Shimojo, H., Hayashi, A., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., Uegaki, K., *Nishimura, Y., *Nakayama, J. (2012). Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing. *Mol Cell* 47: 228-241. (査読有り)
14. Shiomi, Y., Hayashi, A., Ishii, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Sugasawa, K., *Nishitani, H. (2012). Two different replication factor C proteins, Ctf18 and RFC1, separately control

PCNA-CRL4Cdt2-mediated Cdt1 proteolysis during S phase and following UV irradiation. *Mol Cell Biol.* 32: 2279-2288. (査読有り)

15. Hayashi, A., Ishida, M., Kawaguchi, R., Urano, T., Murakami, Y., *Nakayama, J. (2012). Heterochromatin protein 1 homologue Swi6 acts in concert with Ers1 to regulate RNAi-directed heterochromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 6159-6164.
16. *Goto, D.B., *Nakayama, J. (2011). RNA and epigenetic silencing: Insight from fission yeast. *Dev Growth Differ.* 54: 129-141. (査読有り)
17. Hatanaka, A., Chen, B., Sun, J.Q., Mano, Y., Funakoshi, M., Kobayashi, H., Ju, Y., Mizutani, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Miyamoto, K., Uchida, H., *Oki M. (2011). Fub1p, a novel protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. *Genes Genet Syst.* 86: 305-314. (査読有り)
18. Kitano, E., Hayashi, A., Kanai, D., Shinmyozu, K., *Nakayama, J. (2011). Roles of fission yeast Grc3 in ribosomal RNA processing and heterochromatic gene silencing. *J Biol Chem.* 286: 15391-402. (査読有り)

《学会発表》

1. 中山潤一「高次クロマチン構造の形成と維持の分子機構」金沢大学と北陸先端科学技術大学 RNA 研究公開合同セミナー、金沢大学医学図書館（金沢市）、2015年12月11日（招待、国内）
2. 中山潤一「HP1によるクロマチン構造形成の分子機構」、平成27年度遺伝研研究会「クロマチン・核構造の形成とダイナミクスによるゲノム機能制御」、国立遺伝学研究所（三島市）、2015年10月29日（招待、国内）
3. 西淵剛平、中山潤一「HP1における分裂期特異的リン酸化の動的制御とその機能」、第32回染色体ワークショップ・第13回核ダイナミクス研究会合同研究会、安芸グランドホテル（広島市）、2014年12月16日（一般口頭発表、国内）
4. 西淵剛平、町田晋一、越阪部晃永、村越大夢、濱田京子、中川れい子、Wolfgang Fischle、胡桃坂仁志、田上英明、中山潤一、「HP1のリン酸化はH3K9me3ヌクレオソームに対する結合特異性を制御している」、第87回日本生化学会大会、国立京都国際会館（京都市）、2014年10月16日（ポスター、国内）
5. Jun-ichi Nakayama “Roles of heterochromatin protein 1 in higher-order chromatin assembly”, IAS Research Conference 2014 Chromatin Decoding、国際高等研究所（木津川市）、2014年5月14日（招待、国際）
6. 中山潤一、他、「Posttranslational modifications of HP1 regulates its function in heterochromatin formation」、Keystone Symposia “Chromatin mechanisms and cell physiology、Oberstdorf Haus（オーベストドルフ、ドイツ）2014年3月25日（ポスター、国際）
7. 中山潤一、「ヘテロクロマチンタンパク質HP1による高次クロマチン構造形成の分子機構」、平成25年度遺伝研研究会、国立遺伝学研究所（静岡県三島市）、2013年10月17日（招待、国内）
8. 中山潤一、「ヘテロクロマチンタンパク質HP1による高次クロマチン構造形成のメカニズム」、第86回日本生化学会大会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）、2013年9月12日（招待、国内）
9. 中山潤一、「Roles of chromodomain proteins in higher-order chromatin assembly」、エピジェネティクス国際シンポジウム、グランディア芳泉（福井県あわら市）、2013年9月2日（招待、国際）
10. 中山潤一、「分裂酵母の遺伝子サイレンシングにおけるクロモドメインタンパク質の役割」、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場（福岡市）2012年12月11-14日（招待、国内）

11. 西淵剛平、他、「ヒストン脱メチル化酵素 RBP2 と相互作用する因子の探索と転写調節における役割の解明」、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場(福岡市)、2012 年 12 月 11~14 日 (ポスター、国内)
12. 西淵剛平、他、「ヒストン脱メチル化酵素 RBP2 と相互作用する因子の探索と転写調節における役割の解明」、第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会、学術総合センター (東京都千代田区)、2012 年 5 月 14~15 日 (ポスター、国内)
13. 中山潤一、“Roles of chromodomain proteins in higher-order chromatin assembly”、第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜市)、2011 年 12 月 15 日 (招待、国内)
14. 中山潤一、「高次クロマチン構造の形成と維持の分子機構」、第 62 回染色体学会年会、神奈川大学 (横浜市)、2011 年 11 月 12 日 (招待、国内)
15. 中山潤一、“Roles of chromodomain proteins in RNAi-directed heterochromatin assembly”、第 6 回国際分裂酵母学会、ボストン (アメリカ)、2011 年 6 月 30 日 (招待、国際)
16. 中山潤一、「分裂酵母ヘテロクロマチン形成における Chp1 の役割」、第 29 回染色体ワークショップ、仙台市、2012 年 1 月 26 日 (一般口頭、国内)

《図書》

1. ネッサ・キャリー (著) 中山潤一 (訳)、『ジャンク DNA~ヒトゲノムの 98%はガラクタなのか?~』、丸善出版、2016 年、412 ページ
2. ネッサ・キャリー (著) 中山潤一 (訳)、『エピジェネティクス革命~世代を超える遺伝子の記憶~』、2015 年、428 ページ

《和文総説》

1. 中山潤一、「第 4 章 非コード DNA と高次クロマチン構造」、化学同人 (『ゲノムを司るインターメア』: 小林武彦編)、2015 年、29-39 ページ
2. 中山潤一、「第 6 章 ヘテロクロマチン」、化学同人 (『染色体と細胞核のダイナミクス』: 平岡泰・原口徳子編)、2013 年、79-93 ページ
3. 中山潤一 他、「第 4 章 ヒストンのアセチル化制御」、化学同人 (『エピジェネティクス』: 田嶋正二編)、2013 年、49-65 ページ
4. 中山潤一 他、「第 5 章 ヒストンのアセチル化」、羊土社 (『エピジェネティクスキーワード事典』)、2013 年、9 ページ
5. 中山潤一、「ヘテロクロマチン構造の形成とサイレンシング」、生化学 (日本生化学会)、vol. 85(7)、2013 年、565-570 ページ
6. 中山潤一、「ヘテロクロマチン構造からみる非コード DNA と染色体」、実験医学 2012 年 9 月号、vol. 30(14)、2012 年、2221-2227 ページ
7. 中山潤一、「ヘテロクロマチンタンパク質 HP1」、生体の科学 2011 年 9-10 月号、vol. 62(5)、2011 年、466-467 ページ
8. 中山潤一、「高次クロマチン構造とノンコーディング RNA」、細胞工学 2011 年 7 月号、vol. 30(7)、2011 年、699-705 ページ

《受賞 (若手) 》

1. 西淵剛平 (大学院生)、第 87 回日本生化学会大会、若手優秀発表賞

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 中日文化センター『楽しいサイエンス実験』、名古屋市立大学、名古屋、2016 年 6 月 18

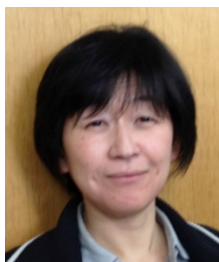
日、(内容)一般の参加者(8名)に対して、光学顕微鏡の使い方を習得してもらうとともに、生きた細胞を見る実験を指導した。

2. サイエンスカフェ『ゲノムの話～98%はガラクタなのか?～』、7th Cafe、ナディアパーク、名古屋、2016年1月15日(内容)一般の参加者(約70名)に対して、ゲノムに関わる話題を提供して、遺伝子や染色体、タンパク質や疾患との関連について紹介した。
3. 中日文化センター『学びなおしの理科と最近の科学の話』、中日ビル、名古屋、2015年3月2日、30日(内容)一般の参加者(約15名)に対して、中学高校の理科の学びなおしをしてもらうとともに、最先端科学の話題も提供した。
4. サイエンスカフェ『遺伝子を運ぶ染色体の不思議』、7th Cafe、ナディアパーク、名古屋、2013年9月20日(内容)一般の参加者(約50名)に対して染色体の構造やその数、また性の決定や病気との関わりについて話題提供した。

《学会の主催》

1. Kick-Off Symposium in Nagoya City University “Regulatory Mechanisms of Epigenetic Information and Their Clinical Applications” Nagoya, Japan, February 29 – March 1 (2016)
2. International Symposium on “Non-coding DNA and Chromosomal Integrity” Awaji, Japan, August 7 – 8 (2015)

非コード DNA と高次クロマチン構造基盤の解析



有吉 真理子

計画研究 分担者 (平成 23-27 年度)

京都大学工学研究科

【研究目的】

核内には、非コード DNA 領域が機能発現するための場を形成する様々なタンパク質因子、タンパク質複合体が存在する。本研究では、ヘテロクロマチン構造形成の中心因子である HP1、およびセントロメアの形成・維持に関わる Mis18 タンパク質複合体が関与する非コード DNA の高次クロマチン化の分子機構を構造学的なアプローチによって検証する。

【研究成果】

項目1 ヘテロクロマチン形成因子HP1の構造解析

HP1aタンパク質は、ヒストンH3のアミノ末端領域に結合し、遺伝子発現を負に制御するクロマチンの凝集を促進する。HP1aのアミノ末端側には、ヒストンH3の9番目のリジン残基のメチル化状態を認識するクロモドメイン(CD)が存在する。また、HP1aのN末端の11-14番目のセリンの側鎖のリン酸化によって、H3K9me3との結合が促進されることが報告されている。本研究では、溶液NMR法および生化学的手法を用いて、主要なヘテロクロマチン形成因子であるHP1aのヒストン結合制御におけるN末端領域の役割およびリン酸化の影響を構造生物学的な観点から解析した。

大腸菌内リン酸化の系を用いて、構造機能解析のためのリン酸化HP1aを調製し、ヒストンH3との相互作用、タンパク質の立体構造や動的挙動の変化を検証した。その結果、N末端領域がクロモドメインのヒストン結合部位周辺と静電的に相互作用することによって、メチル化H3K9me3との結合を阻害していること、また、リン酸化によってその阻害機構が解除されるというモデルが示唆された(図1)。

項目2 セントロメア形成・維持に関わるMis18複合体の構造機能解析

キネトコア形成領域であるセントロメアは、正常な染色体分配と細胞周期におけるクロマチン動態において極めて重要な役割を担っている。本研究では、セントロメアの形成と維持に関わる Mis18 複合体の構造機能解析を行った。Mis18 複合体は、Mis18a, Mis18bおよび M18BP1(Mis18 binding protein 1/KNL2)の3つのタンパク質から構成される。第一に、Mis18abコアの電子顕微鏡による単粒子解析を行い、高次のヘテロ複

合体（4量体）を形成することを示した。さらに、Mis18abと結合する Mis18BP1 の最小領域を同定し、3者複合体の結晶を得ることに成功している。また、進化的に保存された新規構造モチーフである SANTA ドメインの結晶構造を決定した。結晶構造に基づいたデータベース解析の結果、このドメインがアセチル化リジンに結合する可能性が示唆された。これらの構造知見は、Mis18 複合体の会合機構の解明につながるものである。

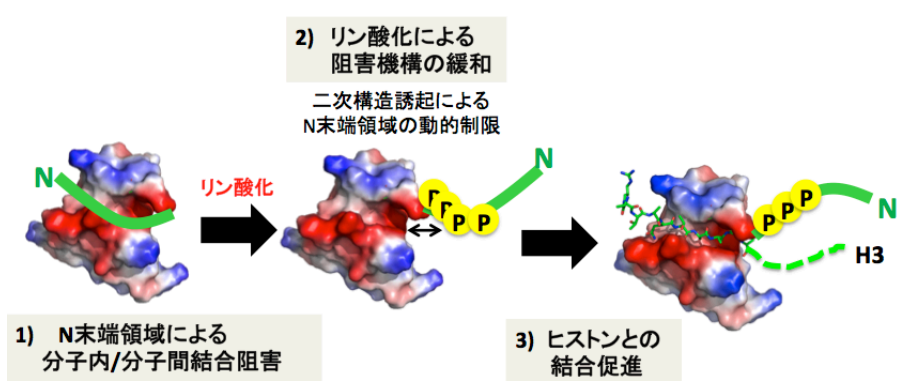


図1 Hp1αにおけるN末端領域のリン酸化によるH3結合制御モデル

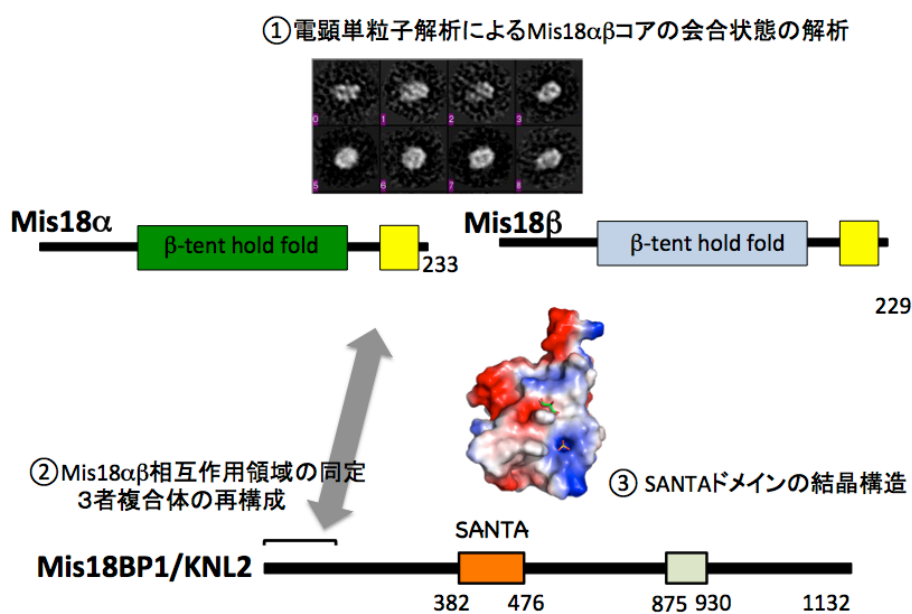


図2 Mis18複合体の構造機能解析

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Han, Y-W., Yokota, H., Ariyoshi, M., Tsunaka, Y., Iwasa, T., Yokokawa, R., Hiramatsu, R., Chiba, D., Ono, T. and *Harada, Y. (2013) Characterization of SRA-methylated DNA complex dynamics related to chromatin structure regulation. *Biophysical J.* 104: 255-258 (査読有り)
2. Takaoka, Y., Kioi, Y., Morito, A., Otani J., Arita, K., Ashihara, E., Ariyoshi, M., Tochio, H., Shirakawa, M. and *Hamachi, I. (2013) Quantitative comparison of protein dynamics in live cells and *in vitro* by in-cell ¹⁹F-NMR. *Chem. Commun.* 49, 2801-2803 (査読有り)

《学会発表》

1. Matsuda, M., Shirakawa, M., Ariyoshi, M. “Structural basis of a novel conserved domain in a CENP-A loading factor, Mis18BP1” 第#回分子生物学会年会、神戸、2015年12月1-4日 (ポスター発表、国内)
2. Ariyoshi, M. “Structure basis for combinatorial recognition of histone modifications by UHRF1” IIAS Research Conference on ‘Chromatin Decoding’、奈良、2014年5月12-14日 (口頭、国際)
3. 有吉真理子 “メチル化 DNA 結合タンパク質 MBD4 の可塑的な塩基認識機構” 日本薬学会 134 年会シンポジウム「薬学が拓くエピジェネティクス研究の最前線」、熊本、2014年3月28-30日(招待、国内)
4. 有吉真理子, 大谷淳二, 白川昌宏 “メチル化 Cp 結合蛋白質 MBD4 による緩い基質 DNA 認識” 第 51 回日本生物物理学会年会 シンポジウム：過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解、京都、2013年10月28-30日(招待、国内)
5. Ariyoshi, M. “Combinatorial recognition of histone modifications by UHRF1” Sixth International Epigenomics, Sequencing & SNIps-2013 Meeting on ‘Chromatin Methylation to Disease Biology & Theranostics’、ボストン、July 10- 11, 2013年7月10-11日 (口頭、国際)
6. 有吉真理子 “エピジェネティクス制御の構造基盤” 千里ライフサイエンスセミナー、吹田、2013年7月4日(招待、国内)
7. 小宮源之介、大谷淳二、森本大智、星野可奈子、朽尾豪人、白川昌宏、有吉真理子 「ヒストン H3 結合における HP1 α のフレキシブル N 末端領域の機能的役割」 2012 年度日本生物物理学会中部支部講演会、名古屋、2013年2月19日(口頭、国内)
8. Komiya, G., Otani, J., Morimoto, D., Hoshino, K., Tochio, H., Shirakawa, M., Ariyoshi, M. “Modulation of HP1 α binding to histone H3 by its flexible N-terminal region” 第 # 回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11-14日 (ポスター発表、国内)

《図書》

1. 有吉真理子 “DNA メチル化・脱メチル化によるエピジェネティック制御” 「エピジェネティクスの産業応用」第 II 編・第 1 章 監修 畑田出穂・窪田健夫、シーエムシー出版、2014年4月

《和文総説》

1. *有吉真理子, 大谷淳二, 白川昌宏 (2015) メチル化 DNA 結合蛋白質 MBD4 の可塑的な塩基認識機構. YAKUGAKU ZASSHI 135, 3-9
2. 大谷淳二, 有吉真理子, 白川昌宏 (2013) メチル化 DNA 結合蛋白質 MBD4 による緩い

基質 DNA 認識。BioMed サーカス.com http://biomedcircus.com/paper_03_15.html

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 兵庫県立兵庫高校 1-2 年生(15 人)を対象として、京都大学工学研究科オープンキャンパス・研究室訪問において、高校生向けの講義（細胞・生体分子を観る）を担当、クロマチン構造、タンパク質の構造と役割について解説。京都大学桂キャンパス、2015 年 8 月 28 日

染色体維持におけるヘテロクロマチンの機能



須賀 則之

計画研究 分担者 (平成 23~27 年度)
明星大学大学院理工学研究科

【研究目的】

染色体の維持に必要なヘテロクロマチンは反復配列や転移因子などいわゆる非コードDNAによって構成され染色体機能が制御されていると考えられる。ヘテロクロマチン形成において中心的な役割を果たすHP1が、どのように非コードDNAのヌクレオソームを変化させているのか、まだ不明な点が多い。本研究では、HP1が形成するヌクレオソーム構造の特徴を解明する。特にHP1のメチル化に依存しない機能を解析する。

【研究成果】

HP1はヌクレオソーム中のヒストンH3の9番目のリジン残基のメチル化を認識結合し、ヘテロクロマチンの形成と維持に重要な機能を果たしている。しかし、ヘテロクロマチンの新たな確立時には、そのメチル化は存在せず、さらにヘテロクロマチンの維持においてもメチル化が外れることも考えられる。そこで、メチル化に依存しないヌクレオソームへの結合が重要と考えられる。

まず、HP1の*in vitro*再構成ヌクレオソームの重合を利用したクロマチンタンパク質の結合アッセイ系を開発し、HP1のK9メチル化修飾に依存しないヌクレオソームへの結合を検出した。次に、K9メチル化が存在しない出芽酵母にマウスHP1αを異種的に発現する系を開発し、*in vivo*におけるHP1のメチル化に依存しないヌクレオソームへ結合を解析した。ChIP-Seq法により、HP1がK9メチル化非依存的に結合する出芽酵母クロマチン領域135ヶ所を見出した (図1)。これらの結合領域は、すべての染色体に分布しており、テロメアのヘテロクロマチンなどの特定の領域には結合していなかった。近傍の遺伝子の特徴を調べた結果、それらの結合領域はインタージェニック領域であり、ヌクレオソームの占有率が低いことが判明した。また、結合領域の近傍遺伝子150個をYGA (Yeast Genes Analyzer <http://www.yeasttract.com/formsearchbydnamotif.php>) により解析したところ、約半数の70個の遺伝子が、転写因子Fhl1、Sok2、Rap1により制御されていることが分かった。また、HP1α結合モチーフ配列をMUSAにより検索したところ、TTTCTT、TGTAT、AAAGAAの配列が明らかとなった。興味深いことにTGTATは、Rap1の結合モチーフである。これらの結果は、HP1αが転写因子Rap1を介し、H3K9me非依存的にプロモーターへ結合する可能性を示している。同定した10個

のHP1 α の結合領域について、CD、HR、CSDをそれぞれ欠損した変異株により、HP1 α のK9me非依存的な結合に複数の結合機構があること示唆された(図2)。HP1 α はHRにより、DNA配列依存的な結合をし、CSDにより転写因子依存的な結合をするのかもしれない(図3)。さらに、メチル化されたK9が存在しない出芽酵母では、異種的に発現したHP1の発現に伴い生じる生育阻害(コロニー形成阻害とHP1発現プラスミドの欠落)が、HP1 α 89-91と104-107番目のアミノ酸配列KRKとKKKRによるbipartite NLSに依存していることを見出した(図4)。HP1発現プラスミドの維持機構に異常をきたしていると考えられた。

また、クロマチン関連タンパク質の構造解析のためピキア酵母を利用した内在性超分子複合体の調製法を開発した(Higo et al. 2014, J Struct Funct Genomics)。さらにヌクレオソーム構造基盤としてH4ヒストンのテール領域に存在する4つのリジン残基をアセチル化したヌクレオソームの結晶構造と生化学解析を行い、そのテール領域とヌクレオソームの相互作用領域を明らかにした。また、H4テール領域を機能的に区分けできることを提唱した(Wakamori et al. 2015 Sci Rep)。梶川班との共同研究でヒトゲノムのレトロトランスポゾンであるSINEの主要な構成配列であるAlu配列のヌクレオソーム形成について、*in vitro*のヌクレオソーム再構成法により評価した。Alu配列の繰り返し単位は、ヌクレオソーム形成能を有し、前後の繰り返し単位で、ヌクレオソームの配置に違いが見られることを発見した。

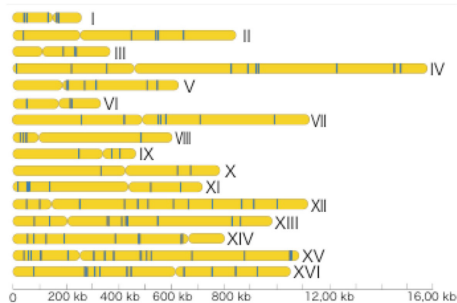


図1. 出芽酵母染色体上のHP1 α 結合領域。出芽酵母の染色体16本とHP1 α の結合領域を図示した。セントロメアを境に右腕と左腕に分け、HP1 α の結合を縦線で示した。

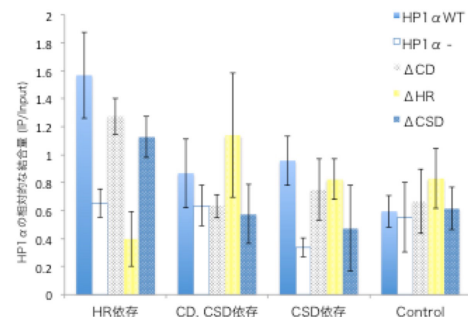


図2. HP1 α の各ドメインに依存したクロマチン結合。出芽酵母からChIP法によりHP1 α が結合したDNAを精製し、定量PCRで結合量を解析した。



図3. HP1 α のH3K9meに依存しないクロマチン結合モデル。HP1はヌクレオソームが少ないプロモーター領域に、CSD依存的、Hinge依存的、CDとCSD依存的に結合する。また、認識配列に結合したRap1などの転写因子を介し結合する。

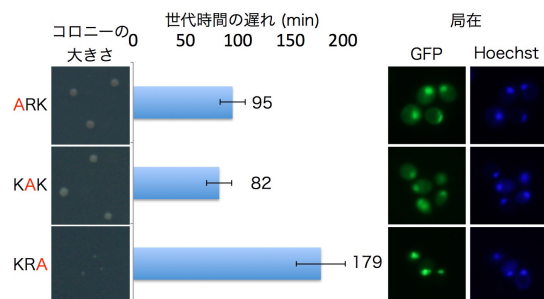


図4. HP1 α の89番目のリジン残基または90番目のアルギニン残基のアラニン置換(K89AまたはR90A)により出芽酵母の世代時間の遅れが回復した。

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Higo T, Suka N, Ehara H, Wakamori M, Sato S, Maeda H, Sekine SI, Umehara T, Yokoyama S. (2014). Development of a hexahistidine-3× FLAG-tandem affinity purification method for endogenous protein complexes in *Pichia pastoris*. *J Struct Funct Genomics*. 4:191-199. (査読有り)
2. Wakamori M, Fujii Y, Suka N, Shirouzu M, Sakamoto K, Umehara T, Yokoyama S. (2015). Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation. *Sci Rep*. 5:17204 (査読有り)

《学会発表》

1. Mitsugi Y, Haijima T, Endou S, Okawa K, Kageyama Y, Kobayashi M, Nakayama J, Suka N “H3K9me-independent function of HP1 in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*” エピジェネティクス国際シンポジウム、福井県あわら市、2013年9月2日（招待、国内）
2. 西淵剛平、町田晋一、越坂部晃永、中川れい子、須賀則之、胡桃坂仁志、中山潤一「ヘテロクロマチンタンパク質HP1による高次クロマチン構造形成のメカニズム」第86回日本生化学会大会 シンポジウム ミクロなクロマチン研究で解くマクロなエピジェネティクス研究、横浜、2013年9月12日（招待、国内）
3. 梅原崇史、若森昌聡、須賀則之、安達仁朗、向井崇人、寺田貴帆、白水美香子、坂本健作、横山茂之「部位特異的なアセチル化を含む『エピヌクレオソーム』の試験管内再構成」第34回 日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月15日（一般口頭、国内）
4. 嘉手苺幸平、須賀則之「リンカーDNAによるNCP重合阻害」第3回 高次クロマチン研究会、神戸、2012年8月7日（一般口頭、国内）
5. 三ツ木祐介、須賀則之「HP1 α タンパク質の出芽酵母クロマチンを用いた解析」第3回高次クロマチン研究会、神戸、2012年8月7日（一般口頭、国内）
6. 靄島俊哉、須賀則之「ヘテロクロマチンタンパク質HP1の出芽酵母クロマチンへの結合」第5回 高次クロマチン研究会、札幌、2014年9月16日（一般口頭、国内）
7. 木下千明、須賀則之「pH低下におけるヌクレオソーム相互作用促進へのヒストンH3 & H4のN末端テールの関与」第5回 高次クロマチン研究会、札幌、2014年9月16日（一般口頭、国内）
8. 小林昌代、須賀則之「HP1 α のHinge領域による出芽酵母細胞内の局在解析」第5回 高次クロマチン研究会、札幌、2014年9月16日（一般口頭、国内）
9. 木下千明、須賀則之「ヒストンH3とH4のN末端テールによるヌクレオソーム相互作用の制御」第6回 高次クロマチン研究会、八王子、2015年9月12日（一般口頭、国内）
10. 小林昌代、須賀則之「マウスHP1 α タンパク質の発現プラスミド欠落による出芽酵母の生育の抑制」第6回 高次クロマチン研究会、八王子、2015年9月12日（一般口頭、国内）
11. 梅原崇史、若森昌聡、藤井佳史、須賀則之、白水美香子、坂本健作、横山茂之「ヒストンH4テールのリジンアセチル化によるヌクレオソーム構造への影響」第38回 日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月1日（一般口頭、国内）
12. 梅原崇史、若森昌聡、須賀則之、安達仁朗、向井崇人、寺田貴帆、白水美香子、坂本健作、横山茂之「エピジェネティック情報を持つヌクレオソームコア粒子の試験管内再構成」第5回日本エピジェネティクス研究会年会、熊本、2011年5月20日（ポスター、国内）

13. 肥後聡明、須賀則之、江原晴彦、前田秀明、関根俊一、梅原崇史、横山茂之「ピキア酵母を用いたエピジェネティクス制御因子複合体の構造解析に向けた生産技術開発」第5回日本エピジェネティクス研究会年会、熊本、2011年5月20日（ポスター、国内）
14. 梅原崇史、若森昌聡、須賀則之、安達仁朗、向井崇人、寺田貴帆、白水美香子、坂本健作、横山茂之「部位特異的なアセチル化を含む『エピヌクレオソーム』の試験管内再構成」第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月16日（ポスター、国内）
15. 梅原崇史、若森昌聡、須賀則之、向井崇人、寺田貴帆、白水美香子、坂本健作、横山茂之「複数の残基特異的なアセチル化を含む「エピヌクレオソーム」の再構成と機能解析」第6回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、2012年5月14日（ポスター、国内）
16. 肥後聡明、須賀則之、前田秀明、梅原崇史、横山茂之「ピキア酵母を利用した真核タンパク質超分子複合体の調製技術開発」第12回日本タンパク質科学学会年会、名古屋、2012年6月21日（ポスター、国内）
17. 梅原崇史、三桝信哉¹、佐藤 心、須賀則之、丹羽英明、半田徳子、横山茂之「ヒストン脱メチル化酵素LSD1/KDM1の結晶構造解析と阻害剤開発」第12回日本タンパク質科学学会年会、名古屋、2012年6月21日（ポスター、国内）
18. 梅原崇史、若森昌聡、須賀則之、向井崇人、寺田貴帆、白水美香子、坂本健作、横山茂之「クロマチンを創る：エピジェネティック情報を持つヌクレオソームの試験管内再構成」「細胞を創る」研究会5.0、東京、2012年11月21日（ポスター、国内）
19. 戸所泰人、森脇義仁、長土居有隆、立和名博昭、須賀則之、胡桃坂仁志、西村善文「固体NMRを用いたクロマチン構造におけるヒストンの構造解析」第35回 日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月12日（ポスター、国内）
20. 瀬間祐樹、嘉手苺幸平、佐野直士、梅原崇史、横山茂之、須賀則之「ヌクレオソームコアパーティクルの重合におけるpHの影響」第35回 日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月14日（ポスター、国内）
21. 梅原崇史、若森昌聡、須賀則之、高橋美穂子、佐藤心、柳沢達男、向井崇人、白水美香子、坂本健作、横山茂之「残基特異的な翻訳後修飾を導入した「エピヌクレオソーム」の調製技術開発と機能解析」第7回日本エピジェネティクス研究会年会、奈良市、2013年5月30日（ポスター、国内）
22. 三ツ木祐介、靛島俊哉、松戸慶太、小林昌代、影山雄輝、須賀則之「出芽酵母におけるHP1 α の発現は、H3K9me非依存的なプラスミドの欠落を引き起こす」第36回 日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月4日（ポスター、国内）
23. Umehara T, Wakamori M, Fujii Y, Suka N, Shirouzu M, Sakamoto K, and Yokoyama S “Functional and structural analyses of H4-acetylated nucleosome core particles” 11th EMBL Conference、ドイツ、2014年8月23-26日（ポスター、国際）
24. 若森昌聡、藤井佳史、須賀則之、白水美香子、坂本健作、梅原崇史、横山茂之「H4テトラアセチル化ヌクレオソームコア粒子の再構成と構造・機能解析」第37回 日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月25日（ポスター、国内）
25. 木下千明、安達-西井智子、梅原崇史、横山茂之、須賀則之「pH低下によるヌクレオソーム相互作用の促進は、ヒストンH3とH4のN末端テールに依存する」第37回 日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月25日（ポスター、国内）
26. 小林昌代、三ツ木祐介、河島由実、須賀則之「出芽酵母におけるHP1 α 発現プラスミドの欠落は、HR3に依存する」第37回 日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月26日（ポスター、国内）

27. 齋島俊哉、久郷和人、村幸子、村尾真梨、三ツ木祐介、高倉麻菜美、藤原悠太郎、堀田真由、太田邦史、須賀則之「HP1 α の出芽酵母クロマチンへの結合」第37回 日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月26日（ポスター、国内）
28. Kobayashi M, Kidokoro Y, Kawashima Y, Mitsugi Y, and Suka N “H3K9me-independent function of HP1 in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*” 新学術領域研究「非コードDNA」第2回シンポジウム、淡路、2015年8月7日（ポスター、国際）
29. 梅原崇史、若森昌聡、藤井佳史、須賀則之、白水美香子、坂本健作、横山茂之「ヒストンH4テイルのリジンアセチル化によるヌクレオソーム構造への影響」第38回 日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月1日（ポスター、国内）
30. 藤井佳史、若森昌聡、須賀則之、白水美香子、坂本健作、梅原崇史、横山茂之「ヒトヌクレオソームH4のアセチル化リジン導入技術開発とそのヌクレオソームの結晶構造解析」第38回 日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月1日（ポスター、国内）
31. 小林昌代、城所佑梨江、河島由実、三ツ木祐介、須賀則之「出芽酵母におけるHP1 α 発現プラスミドの欠落による生育阻害には、HR 104-109の核局在が必要である」第38回日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月2日（ポスター、国内）
32. 木下千明、田中佑樹、川窪恭平、安達智子、梅原崇史、横山茂之、須賀則之「pH低下によるヌクレオソーム相互作用の促進におけるヒストン H3 N末端テール領域の解析」第38回 日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月2日（ポスター、国内）

《図書》

1. 須賀則之、第6章 インターメアのヌクレオソーム配置とその変換機構（『ゲノムを司るインターメア』：小林武彦編）、化学同人、2015、14

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 高校生向け公開講座 ゲノムの調べ〜ゲノムにかくされた謎の旋律、生命のエニグマをときあかす〜、高校生と一般、横浜情報文化センター 情文ホール、2015年2月8日

《学会の主催》

1. 第6回 高次クロマチン研究会、国内、2015年9月10-12日、八王子セミナーハウス

霊長類での大規模反復配列の機能



古賀 章彦

計画研究 分担者 (平成 26~27 年度)
京都大学霊長類研究所

【研究目的】

真核生物のゲノムには一般に、多くの種類の縦列反復配列が存在する。ゲノムの数パーセントを占めるほどの大きな規模に増幅するものもある。そのような大規模反復配列の機能は、大まかにしかわかっていないか、あるいはまったく知られていない。前者については機能をより具体的に明らかにすること、後者については機能の推測をすることを、本研究の目的とした。

【研究成果】

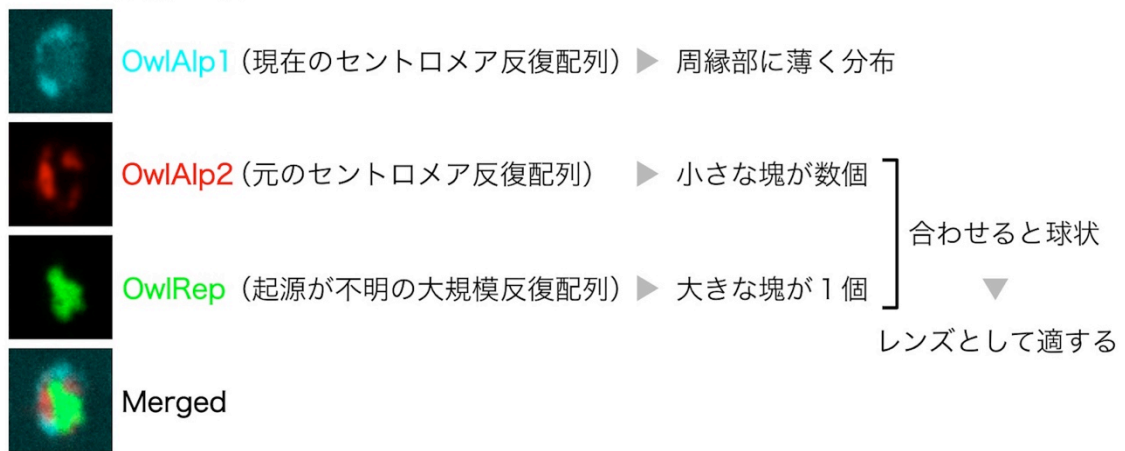
霊長類を対象とし、2つのテーマを設定した。(a)セントロメア反復配列がもつシグナルの進化的意義、(b)棲息環境への適応への関与、である。

(a)で扱ったシグナルは、具体的には CENP-B box である。本領域の構成員である舛本が20年以上前に発見したものであり、セントロメアの形成に関与することがわかっている。しかしこのシグナルをもたないと思われる生物種も多いことから、その重要性についてはいまだに議論が続いている。古賀と舛本が共同で解析をして、つぎの結果を得た。(1)霊長類ではヒト科のみで存在が知られていたが、マーモセット・タマリン・オマキザル等も含め広く存在する。(2)それぞれの種で、タンパク結合のシグナルとして機能している。(3)シグナルの位置は種ごとに異なる。(1)と(2)から「CENP-B box はホストにとって、当該世代の存続や次世代への継続に必須ではないものの、たとえば100世代単位などの長い時間スケールでは生存に有利な効果をもたらす」、また(1)と(3)から「CENP-B box は多くの系統で独立にそして頻繁に生じる」との推測が成立した。

(b)で対象とした反復配列は、古賀が5年前にヨザル（漢字では夜猿）で同定した3種類で、OwlAlp1、OwlAlp2、OwlRep という名称である。OwlAlp1 は現在のセントロメア反復配列で、本来のセントロメア反復配列である OwlAlp2 から機能が移った。OwlRep はヨザルで新規に生じて増幅した反復配列である。近縁のマーモセットやリスザル等にはみられない。ヨザルは昼行性から夜行性に移行したという特徴をもつ。古賀の研究とは別に、ドイツのグループが、視細胞の核の中心にヘテロクロマチンが凝集し光を集めるレンズの役を果たすことを、8年前に明らかにしていた。古賀は、OwlAlp2

または OwlRep が核内レンズを構成しているとの仮説を立てた。そして視細胞の核での空間分布を調べて、つぎの結果を得た。(1)OwlRep が核の中心部に不定形の塊を1個形成する。(2)OwlAlp2 は1～5個の小さな塊を形成し、OwlRep の塊の凹部に位置する。(3)両者を合わせた領域は球に近い形状となる。以上から、仮説は正しいことに加え、レンズの形成に OwlRep が主要な役割、OwlAlp2 が補助的な役割を果たしていることが、判明した。

ヨザルの視細胞の核



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Kugou, K., Hirai, H., *Masumoto, H., *Koga, A. (2016) Formation of functional CENP-B boxes at diverse locations in repeat units of centromeric DNA in New World monkeys. *Sci. Rep.* 13: 27833. (査読有り) doi: 10.1038/srep27833
2. Suntronpong, A., Kugou, K., Masumoto, H., Srikulnath, K., Ohshima, K., Hirai, H., *Koga, A. (2016) CENP-B box, a nucleotide motif involved in centromere formation, occurs in a New World monkey. *Biol. Lett.* 12: 20150817. (査読有り) doi: 10.1098/rsbl.2015.0817
3. Sujiwattarat, P., Thapana, W., Srikulnath, K., Hirai, Y., Hirai, H., *Koga, A. (2015) Higher-order repeat structure in alpha satellite DNA occurs in New World monkeys and is not confined to hominoids *Sci. Rep.* 5:10315. (査読有り) doi: 10.1038/srep10315
4. Thapana, W., Sujiwattarat, P., Srikulnath, K., Hirai, H., *Koga, A. (2014) Reduction in the structural instability of cloned eukaryotic tandem-repeat DNA by low-temperature culturing of host bacteria. *Genet. Res.* 96: e13. (査読有り) doi: org/10.1017/S0016672314000172
5. Baicharoen, S., Miyabe-Nishiwaki, T., Arsaithamkul, V., Hirai, Y., Duangsaard, K., Siriaronrat, B., Domae, H., Srikulnath, K., Koga, A., *Hirai, H. (2014) Locational diversity of alpha satellite DNA and intergeneric hybridization aspects in the *Nomascus* and *Hylobates* genera of small apes. *PLOS ONE* 9: 10,e109151. (査読有り) doi: 10.1371/journal.pone.0109151
6. *Koga, A., Hirai, Y., Terada, S., Jahan, I., Baicharoen, S., Arsaithamkul, V., Hirai, H. (2014) Evolutionary origin of higher-order repeat structure in alpha-satellite DNA of primate centromeres. *DNA Res.* 21: 407-415. (査読有り) doi: 10.1093/dnares/dsu005
7. Choi, Y., Jung, Y. D., Ayarpadikannan, S., Koga, A., Imai, H., Hirai, H., Roos, C., *Kim, H. S. (2014) Novel variable number of tandem repeats of gibbon *MAOA* gene and its evolutionary significance. *Genome* 57: 427-432. (査読有り) doi: 10.1139/gen-2014-0065

《学会発表》

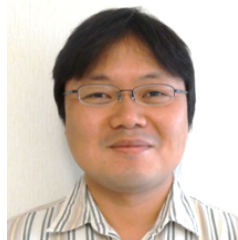
1. Koga A, "Rapid replacement of centromeres by a variant-type repetitive DNA in a primate taxon" Society for Molecular Biology and Evolution 2016 Conference, ゴールドコースト、2016年07月3-7日 (一般口頭、国際)
2. Koga A, "Higher-order repeat structure in centromere-region satellite DNA occurs in a wide range of primates", The 5th Asian Chromosome Colloquium, バンコク、2015年04月29日-5月1日 (招待、国際)
3. Koga A, "DNA-based transposable elements as natural mutators in vertebrate genomes", The 26th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, ソウル、2014年10月21-23日 (招待、国際)
4. Koga A, Hirai Y, Jahan I, Bbicharoen S, Arsaithamkul V, Hirai H, "Diversity in the organization of repetitive DNA among the four gibbon genera", The 4th International Congress on Asian Primates, ボコール、2014年08月21-23日 (招待、国際)
5. Suntronpong A, 久郷和人, 舛本寛, 平井啓久, 古賀章彦, "CENP-B box is likely to confer a selective advantage on its host organism", 日本遺伝学会第87回大会, 仙台、2015年09月24-26日 (一般口頭、国内)
6. 古賀章彦, 平井啓久, 「夜行性への移行に関与したと考えられるヨザルの大規模反復配列」, 第31回日本霊長類学会大会, 京都、2015年07月18-20日 (一般口頭、国内)

7. Sujiwattanarat P、Thapana W、Srikulnath K、平井啓久、古賀章彦、「Higher-order repeat structure in centromeric repetitive DNA is not confined to central regions」, 日本進化学会第16回大会, 大阪、2014年08月21-24日 (一般口頭、国内)
8. 古賀章彦、Prakhongcheep、Chaipraserti N、平井百合子、平井啓久、「ヨザルの染色体変異に関与したと考えられる大規模反復配列」, 第30回日本霊長類学会大会, 大阪、2014年07月4-6日 (一般口頭、国内)

《図書》

1. Koga A, Hirai H. "Unique Evolution of Heterochromatin and Alpha Satellite DNA in Small Apes", pages 139-150, Chapter 6 of "*The Evolution of Gibbons and Siamang*" (edited by Ulrich R.H. et al.; ISBN 978-1-4939-5614-2; doi 10.1007/978-1-4939-5614-2), Springer-Verlag New York, 2016年08月
2. 古賀章彦「第15章. ヒトと類人猿に見られる非コードDNAの大きな違い」, 小林武彦編「ゲノムを司るインターメア:非コードDNAの新たな展開」, (ISBN 9784759817249、5,600円) の第15章, 2015年12月

レトロトランスポゾンがもたらす非コード DNA 領域のクロマチン構造変化



梶川 正樹

計画研究 代表者（平成 23-27 年度）
東京工業大学大学院生命理工学研究科

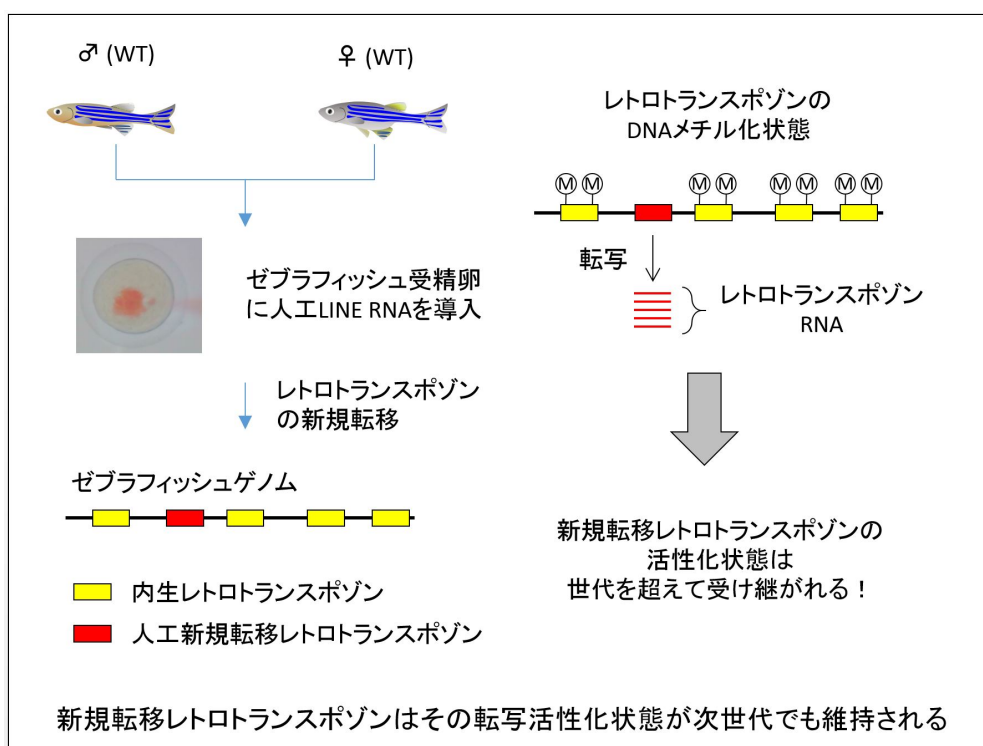
【研究目的】

高等真核生物ゲノムの大部分は、非コード領域で構成されている。非コード領域には未だ明らかにされていない未知の機能が存在し、遺伝子発現調節などのゲノム機能に深く関与していると考えられるが、その理解はあまり進んでいない。本研究は、非コード領域の大きな構成要素である転移因子の一種レトロトランスポゾンが、非コード領域の成り立ちやその機能にどのような影響を及ぼすのか解明することである。

【研究成果】

レトロトランスポゾンは、自身配列から転写された RNA を逆転写することでそのコピーを合成し、宿主ゲノムの新たな場所に挿入することで自身配列を増幅する。レトロトランスポゾン研究は、レトロトランスポゾンタンパク質の生化学的解析や培養細胞を用いた転移・増幅機構の解析が主として行われている。しかし、生体内でのレトロトランスポゾンの挙動に関する研究はほとんど為されておらず、生体内でレトロトランスポゾンが、発生段階のいつ、どの組織で、どの程度、転移・増幅しているのか、あるいは、レトロトランスポゾンの新規転移が宿主ゲノムの非コード領域にどのような影響を及ぼすのかなど、ほとんど解明されていない。本研究では、レトロトランスポゾンが生体内で宿主ゲノムにどのような影響を及ぼすのか解明することを目的とし、まず、生体内でのレトロトランスポゾンの新規転移誘導系を構築した。この新規転移誘導系では *in vitro* 合成レトロトランスポゾン RNA をゼブラフィッシュの受精卵に導入し、レトロトランスポゾンの新規転移を人工的に引き起こす。この実験系を用いて、ゼブラフィッシュ生体内で細胞あたり 1~10,000 転移にも及ぶ大量の新規転移レトロトランスポゾンを作り出すことに成功した。次に、この新規転移レトロトランスポゾン配列と既にゼブラフィッシュゲノム内に存在するレトロトランスポゾン配列の DNA (CpG サイト) のメチル化状態を解析したところ、内生レトロトランスポゾンは高度にメチル化されているのに対して、新規転移レトロトランスポゾンのプロモーター領域にはほとんどメチル化が導入されないことを見出した。この結果と一致するように、新規転移レトロト

ンスポゾンのプロモーター領域のヒストン修飾は、新規転移レトロトランスポゾンが転写されていることを示す修飾パターンであり、また実際に転写されたレトロトランスポゾン RNA の検出に成功している。この結果は、新規転移レトロトランスポゾンが転移先の非コード領域のエピジェネティック情報およびその領域の転写状態に影響を及ぼすことを示している。更に、我々は、この新規転移レトロトランスポゾンのエピゲノム情報（転写活性化状態）が、ゼブラフィッシュの発生過程および世代を経ても維持されることを見出した。



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Yamaguchi, K., *Kajikawa, M., *Okada, N. (2015). LINE retrotransposition and host DNA repair machinery. *Mob Genet Elements*. 5:92-97. (査読有り)
2. Yamaguchi, K., *Kajikawa, M., *Okada, N. (2014). Integrated mechanism for the generation of the 5' junctions of LINE inserts. *Nucleic Acids Res.* 42:13269-13279. (査読有り)
3. Hayashi, Y., Kajikawa, M., Matsumoto, T., *Okada, N. (2014). Mechanism by which a LINE protein recognizes its 3' tail RNA. *Nucleic Acids Res.* 42:10605-10617. (査読有り)
4. Terasaki, N., Goodier, J.L., Cheung, L.E., Wang, Y.J., Kajikawa, M., Kazazian, H.H., *Okada, N. (2013). In vitro screening for compounds that enhance human L1 mobilization. *PLoS One* 8:e74629. (査読有り)
5. *Kajikawa, M., Yamaguchi, K., Okada, N. (2012). A new mechanism to ensure integration during LINE retrotransposition: a suggestion from analyses of the 5' extra nucleotides. *Gene* 505:345-351. (査読有り)
6. *Kajikawa, M., Sugano, T., Sakurai, R., Okada, N. (2012). Low dependency of retrotransposition on the ORF1 protein of the zebrafish LINE, ZfL2-1. *Gene* 499:41-47. (査読有り)
7. Nakamura, M., *Okada, N., *Kajikawa, M. (2012). Self-Interaction, nucleic acid binding, and nucleic acid chaperone activities are unexpectedly retained in the unique ORF1p of zebrafish LINE. *Mol Cell Biol.* 32:458-469. (査読有り)

《学会発表》

1. 山口勝己「ゼブラフィッシュ生体内でのLINE新規転移部位のDNAメチル化状態の解析」日本遺伝学会第87回大会、仙台、2015年9月26日（一般口頭発表、国内）
2. 柳川麦「転移因子の新規転移が引き起こすクロマチン構造変化」第38回日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月1日（ポスター、国内）
3. 松本琢磨「転移因子LINEタンパク質のRNA認識機構」第38回日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月1日（ポスター、国内）
4. 田村政人「新規転移したLINEの転写制御に関する研究」第38回日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月4日（一般口頭発表、国内）

非コード DNA 領域が果たす DNA 損傷ストレス耐性機構



菱田 卓

計画研究 代表者 (平成 23~27 年度)
学習院大学理学部生命科学科

【研究目的】

非コード DNA 領域に特徴的な反復配列やヘテロクロマチン構造などは、DNA 損傷修復の際に障害となりうるため、非コード DNA 領域上で生じる DNA 損傷がゲノムの安定性維持に及ぼす影響は極めて大きいと考えられる。本研究では、反復配列やクロマチン構造が DNA 損傷トレランスや DNA 相同組換え経路を介した DNA 損傷ストレス耐性機能に及ぼす影響を詳細に解析し、非コード DNA 領域が損傷ストレス耐性機能に果たす役割を明らかにする。

【研究成果】

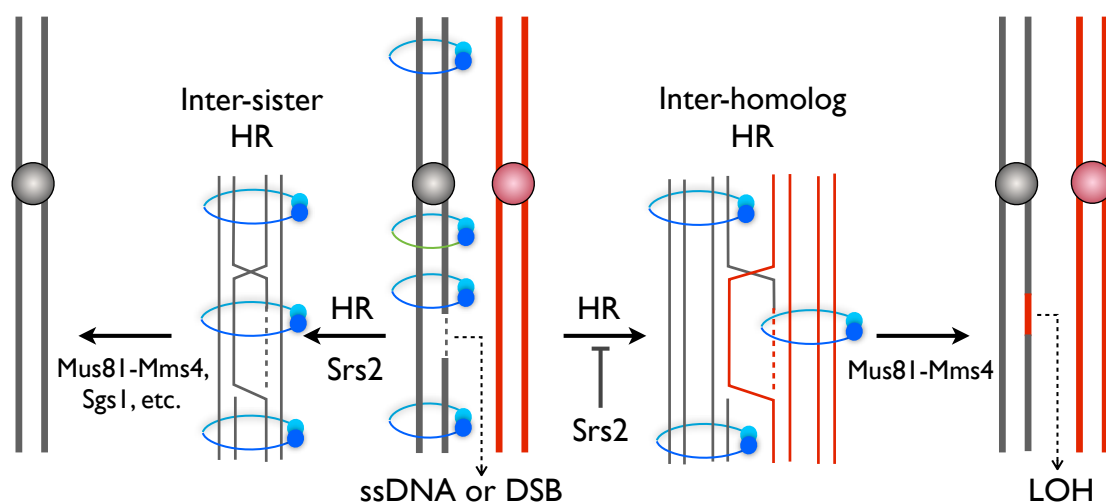
本研究では、DNA 損傷ストレスに対する耐性機能とゲノム安定性の維持において非コード DNA 領域が果たす役割を明らかにするために、以下の 2 つの項目を中心に研究を行った。

1) DNA 損傷ストレス耐性機能に関与するクロマチン制御機構

DNA 損傷ストレスによる DNA 複製阻害の回避は、損傷ストレス耐性において中心的な役割を果たしているが、クロマチンの動態制御機構との関連性は不明な点が多く残されている。本研究では、DNA 損傷トレランスの欠損株 (*rad18Δ*株) と 421 種類のヒストン H3、H4 変異コレクションとの二重変異株を作製し、様々な DNA 損傷ストレスに対する耐性機能を解析した。その結果、DNA 損傷感受性の相乗的な増加を引き起こす 64 の H3、H4 変異を同定し、さらに、*rad18Δ*株の DNA 損傷感受性を抑圧する 9 つのヒストン変異をそれぞれ同定した。さらに、これらの抑圧効果は DNA 相同組換え経路の活性化に依存して起こることや、増殖を回復する一方で反復配列間の組換え頻度の上昇などのゲノム不安定性を増大させていることを明らかにした。また、抑圧型ヒストン変異箇所は、いずれもヌクレオソームの非常に近接した場所に位置しており、これらの残基を介して H3-H4-DNA の分子間相互作用が可能であることが明らかになった。これらの結果から、今回明らかにしたヌクレオソーム領域が DNA 相同組換えの制御と関連して損傷ストレス耐性機能に重要な役割を果たしていることが示唆された (論文投稿準備中)。

2) 非コードの安定性や染色体構造維持における DNA 相同組換えの役割

ヒトを含めた二倍体細胞では、DNA 損傷に伴う相同組換え反応の際に低い頻度ながらも相同染色体が鋳型として用いられる場合があり、これはヒトのがん細胞などで顕著に見られるヘテロ接合性の喪失 (LOH) の原因となっている。出芽酵母 *SRS2* は、バクテリアからヒトまで保存された DNA ヘリケースをコードし、DNA 相同組換えの制御に関与している。本研究において、*Srs2* の DNA ヘリケース活性を失った *srs2K41A* 変異体は、二倍体細胞において相同染色体間の組換え中間体の蓄積と染色体再編を顕著に引き起こし、細胞増殖の障害を引き起こすことを見出した。さらに、この二倍体特異的な致死効果が組換え中間体の解消に関与する Mus81-Mms4 エンドヌクレアーゼの阻害によって引き起こされており、この結果と一致して、*srs2Δ mus81Δ* や *srs2Δ mms4Δ* 二重変異株は、二倍体においてのみ組換え中間体の蓄積を伴って致死となることがわかった。この結果は、相同及び姉妹染色体間で生じる組換え中間体の制御機構に違いが存在することを意味しており、相同染色体間の組換え中間体制御には *Srs2* 及び *Mus81-Mms4* が必須の機能を持つことを示している (図) (*PLOS Genet.* 2016)。さらに、本研究成果は、二倍体酵母を使った研究がヒトを含めた二倍体生物の組換え制御の解明に重要かつ有効であることを示しており、これはがん化と関連の深い相同染色体間の組換え制御モデルの構築において有効な解析手段として今後益々の発展が期待できる。



図の説明 : *Srs2* と *Mus81-Mms4* は異なるステップで相同染色体間組換え制御に必須の役割を果たしている。コヒーシン (青) が姉妹及び相同染色体間組換え中間体の制御において違いを生じる原因となっているモデル。

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Keyamura, K., Arai, K., *Hishida, T. (2016). Srs2 and Mus81-Mms4 Prevent Accumulation of Toxic Inter-homolog Recombination Intermediates. *PLoS Genet.* Jul 07. (査読有り)
2. Keyamura, K., Sakaguchi, C., Kubota, Y., Niki, H., *Hishida, T. (2013). RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 288: 29229-29237.
3. Haruta, N., Kubota, Y., *Hishida, T. (2012) Chronic low-dose ultraviolet induced mutagenesis in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 40:8406-8415.
4. *Masuda, Y., Suzuki, M., Kawai, H., Hishiki, A., Hashimoto, H., Masutani, T., Hishida, T., Suzuki, F., Kamiya, K. (2012) En bloc transfer of polyubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2-E3 pairs. *Nucleic Acids Res.* 40:10394-10407.

《学会発表》

1. Ishige, D., Keyamura, K., Hasegawa, Y., Iwasaki, H., and Hishida, T. “A genetic screen for genes that suppress the temperature sensitivity of *mgs1-18 rad18Δ* cells in *Saccharomyces cerevisiae*” 第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、(口頭、国内)
2. 毛谷村賢司、菱田卓「相同染色体間の組換え制御メカニズムの解析」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 1 日 (ポスター、国内)
3. 長谷川ゆき、毛谷村賢司、重森悠、菱田卓「複製ストレス応答における出芽酵母 Mgs1 の役割」第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2015 年 10 月 19 日 (ポスター、国内)
4. 石毛大輔、毛谷村賢司、長谷川ゆき、岩崎博史、菱田卓「出芽酵母における複製ストレス応答に関わる新たな因子の探索」第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2015 年 10 月 19 日 (ポスター、国内)
5. 毛谷村賢司、菱田卓「出芽酵母 Srs2 ヘリカーゼと Mus81-Mms4 ヌクレアーゼによる相同染色体間の組換え制御機構」第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2015 年 10 月 19 日 (口頭、国内)
6. 塩入拓馬、毛谷村賢司、田中修平、菱田卓「慢性的な低線量率紫外線照射下における出芽酵母 NER 欠損株の動態解析」第 87 回日本遺伝学会、2015 年 9 月 24 日 (口頭、国内)
7. 石毛大輔、毛谷村賢司、長谷川ゆき、岩崎博史、菱田卓「出芽酵母における複製ストレス応答に関わる新たな因子の探索」第 87 回日本遺伝学会、2015 年 9 月 24 日 (口頭、国内)
8. Keyamura, K., and Hishida, T. “Regulation of inter-homologue recombination by the Srs2 helicase in *Saccharomyces cerevisiae*” 非コード DNA 国際シンポジウム、2015 年 8 月 7 日、(ポスター、国内)
9. 毛谷村賢司、戸羽あす美、仁木宏典、菱田卓「二本鎖 DNA の切断修復に関与する RecN の機能解析」第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、2015 年 6 月 4 日 (口頭、国内)
10. 毛谷村賢司、菱田卓「相同染色体間の組換え制御機構における出芽酵母 Srs2 の役割」第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会、2014 年 12 月 15 日 (口頭、国内)
11. 吉田麻美、毛谷村賢司、菱田卓「DNA 損傷ストレス応答に影響を及ぼすヒストン変異体の解析」第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日 (ポスター、国内)

12. 重森 悠、毛谷村賢司、菱田卓「出芽酵母 Mgs1 タンパク質の機能ドメインの解析」第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日（ポスター、国内）
13. 毛谷村賢司、新井康太、菱田卓 “Roles of the *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase in inter-homologue recombination repair” 第 9 回 3R シンポジウム、2014 年 11 月 17 日（口頭、国内）
14. 菱田卓「慢性的な紫外線損傷ストレスに対する耐性獲得に關与するヌクレオソーム構造」第 57 回日本放射線影響学会、2014 年 10 月 1 日（招待、国内）
15. 吉田麻美、毛谷村賢司、菱田卓「DNA 損傷ストレス応答に關与するヒストン変異体の網羅的解析」第 86 回日本遺伝学会、2014 年 9 月 17 日（口頭、国内）
16. 毛谷村賢司、金子佳樹、仁木宏典、菱田卓「DNA 二本鎖切断修復に關与する RecN の DNA 相互作用メカニズムの解析」第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、2014 年 6 月 5 日（口頭、国内）
17. 毛谷村賢司、久保田佳乃、小林万希子、金子佳樹、仁木宏典、菱田卓「SMC ファミリータンパク質 RecN の DNA 二重鎖切断修復における役割」第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日（ポスター、国内）
18. 櫻本健郎、毛谷村賢司、菱田卓「出芽酵母を用いたジーンターゲットングに關与する新規因子の同定」第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日（ポスター、国内）
19. 櫻本健郎、毛谷村賢司、菱田卓「出芽酵母を用いたジーンターゲットングに關与する新規遺伝子の探索」第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2013 年 11 月 20 日（ポスター、国内）
20. 毛谷村賢司、新井康太、菱田卓「相同染色体間の組換えにおける出芽酵母 Srs2 ヘリカーゼの役割」第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2013 年 11 月 20 日（口頭、国内）
21. 毛谷村賢司、新井康太、菱田卓「相同 染色体間の DNA 相同組換え制御メカニズムの解析」第 85 回日本遺伝学会、2013 年 9 月 19 日（口頭、国内）
22. 毛谷村賢司、久保田佳乃、仁木宏典、菱田卓「DNA 二重鎖切断修復に關与する SMC ファミリータンパク質 RecN の機能解析」第 10 回 21 世紀大腸菌研究会、2013 年 6 月 20 日（口頭、国内）
23. 菱田卓「Srs2 による相同染色体間の組換え制御機構」第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 11 日（口頭、国内）
24. 菱田卓「相同染色体間の組換え制御機構の解析」第 84 回日本遺伝学会、2012 年 9 月 23 日（口頭、国内）
25. 菱田卓「慢性的な紫外線照射による突然変異の誘起メカニズム」放射線影響学会第 55 回大会（招待講演）、2012 年 9 月 6 日（招待、国内）
26. 菱田卓「DNA 二重鎖切断修復に關与する RecN の機能解析」第 9 回 21 世紀大腸菌研究会 2012 年 6 月 21 日（口頭、国内）

《図書》

1. 菱田卓 “ゲノムを司るインターメア：非コード DNA 領域の DNA 損傷応答” 化学同人 2015 年 12 月, pp161-174.

《和文総説》

1. 菱田卓 (2015) 「ノーベル化学賞：DNA 修復の分子メカニズムの解明」パリティ 2015、Vol.30 No.12、43-45.

《受賞（本人）》

1. 菱田卓 日本学術振興会、平成 25 年度・特別研究員等審査会専門委員表彰

《受賞（若手）》

1. 櫻本健郎 (M2)、若手優秀発表賞（ポスター発表部門）、第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2013 年 11 月 20-22 日

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. ”放射線が生物に与える影響” 文京区立茗台中学校（2012 年 2 月 15 日）、文京区立第十中学校（2012 年 3 月 2 日）、文京区立第六中学校（2013 年 3 月 4 日）
2. ”ゲノム不安定性と発がん” 学習院女子高等科（2012 年 7 月 9 日）、学習院男子高等科（2015 年 7 月 15 日）

《学会の主催》

1. 非コード DNA 領域、公開シンポジウム「インターメアによる染色体制御機構」（2014 年 1 月 8 日、東京）
2. 第 22 回 DNA 複製、修復、組換えワークショップ（2013 年、11 月 20-22 日、仙台）
3. 第 10 回 21 世紀大腸菌研究会（2013 年 6 月 20-21 日、熱海）

セントロメア構成因子によるクロマチンネットワークの解析



舩本 寛

計画研究 代表者 (平成 23-27 年度)
公益財団法人かずさ DNA 研究所

【研究目的】

本研究では、人工染色体システムを用い、非コード DNA である合成反復 DNA と融合タンパクの結合からセントロメア機能構造をつくり出し(図 1)、多様な構成因子の集合機構を明らかにする。更に、セントロメアとヘテロクロマチン、複製、転写、損傷修復などの各非コード DNA 上の染色体諸機能との関係を制御するクロマチンネットワーク機構のメカニズムに迫ることを目的とする。

【研究成果】

- (1) 人工染色体と異所的挿入部を用いた「作って調べる」手法により、セントロメアのエピジェネティックなマークである CENP-A クロマチンを集合させる能力を指標に、多様な構成因子を 4 つの機能的階層グループ (図 1、Class I-IV) に分類した (論文 8)。さらにこの解析により、CENP-C と CENP-I は、キネトコア機能形成と CENP-A クロマチンの補充との両反応ネットワークで要として働くことを明らかにした (論文 8)。
- (2) セントロメアの反復 DNA 結合タンパクである CENP-B (Class II 因子: 図 1) は、CENP-A クロマチンの安定維持に関することを明らかにした (論文 9)。
- (3) ヒストンアセチル化酵素 HATs は、セントロメア反復 DNA へのヘテロクロマチンの侵入をブロックして CENP-A クロマチンの集合を促進する働きがあることを明らかにした (論文 24: 論文 12: 図 1 & 2)
- (4) CENP-C の下流で Mis18 複合体にヒストンアセチル化酵素(HAT)の KAT7 と CENP-A シャペロンの HJURP が結合すること、KAT7 は H3K14 残基をアセチル化し、リモデリング因子 RSF1 を集合させ、ヒストン交換反応を促進すること等を明らかにした (論文 4: 図 2)。これにより、Mis18 複合体の下流で KAT7 は、セントロメアへのヘテロクロマチンの侵入を抑制すると共に、HJURP による CENP-A クロマチンの集合を促進し、セントロメア機能維持に関わることを証明した (図 2)。KAT7/HBO1/MYST2 は、DNA 複製開始や転写活性化にも関

わる HAT である。この HAT によるヒストン交換反応は、ヘテロクロマチン化による機能抑制からの解除として各染色体機能の制御で共有されていることを示唆した。これにより、クロマチンネットワークを介した細胞高次調節の一端が明らかになった。

- (5) 霊長類ではヒトや類人猿のセントロメアに限定されると考えられていた CENP-B box (反復 DNA に保存されている CENP-B 結合配列) が、新世界ザルの多様な種で、セントロメア反復 DNA 中に多様なレベルで且つ独立に獲得されて、CENP-B の結合配列として機能している結果を得た (論文 5: 論文 3)。セントロメア機能の非コード DNA へのリンクが種ごとに多様であることを示す今回の結果は、種の維持や独立など、進化を考える上で極めて興味深い知見である。
- (6) cDNA のゲノムへの挿入は多くの場合不活性化を免れなが、人工染色体へ挿入したヒト巨大ゲノム遺伝子はマウス個体で 8 世代を経ても組織特異的な発現様式を維持し続けることを示し、ゲノム非コード領域インターメアの種を越えた重要性を示唆した。(論文 11)。

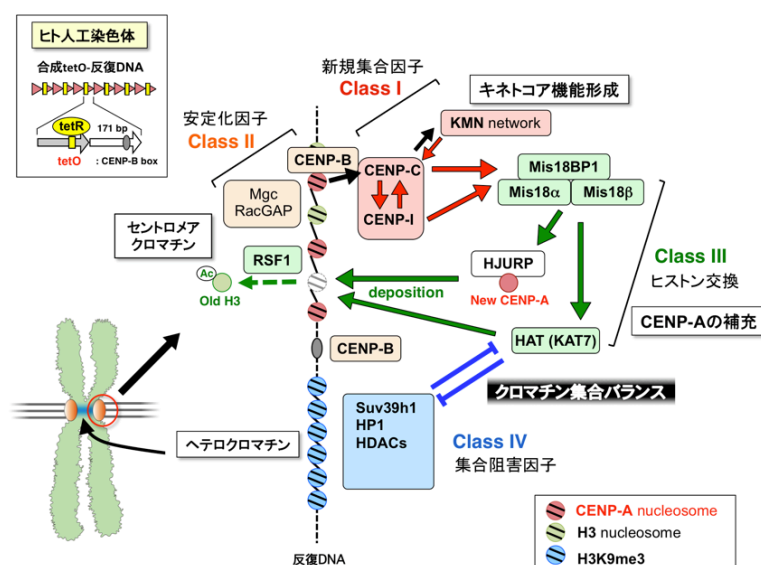


図 1. セントロメアクロマチンの集合ネットワーク

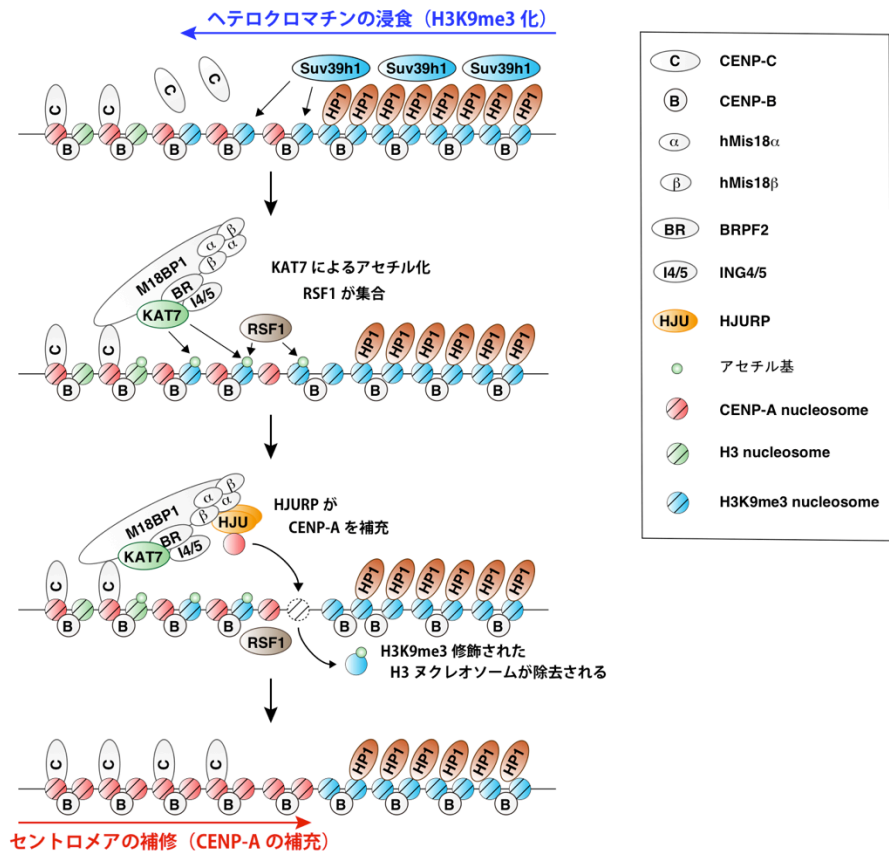


図 2. ヒストンアセチル化を介した CENP-A の補充機構

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Molina, O., Vargiu, G., Abad, M.A., Zhiteneva, A., Jeyaprakash, A.A., Masumoto, H., Kouprina, N., Larionov, V., *Earnshaw, W.C. (2016). Epigenetic engineering reveals a balance between histone modifications and transcription in kinetochore maintenance. *Nat Commun.* 7: 13334. (査読有り)
2. Booth, D.G., Beckett, A.J., Molina, O., Samejima, I., Masumoto, H., Kouprina, N., Larionov, V., Prior, I.A., *Earnshaw, W.C. (2016). 3D-CLEM reveals that a major portion of mitotic chromosomes is not chromatin. *Mol Cell* 64(4): 790-802. (査読有り)
3. Kugou, K., Hirai, H., *Masumoto, H. and *Koga, A. (2016). Formation of functional CENP-B boxes at diverse locations in repeat units of centromeric DNA in New World monkeys. *Sci Rep.* 6:27833. (査読有り)
4. Ohzeki, J., Shono, N., Otake, K., Martins, N.M.C., Kugou, K., Kimura, H., Nagase, T., Larionov, V., Earnshaw, W.C., *Masumoto, H. (2016). KAT7/HBO1/MYST2 regulates CENP-A chromatin assembly by antagonizing Suv39h1-mediated centromere inactivation. *Dev Cell* 37: 413-427. (査読有り)
5. #Suntronpong, A., #Kugou, K., Masumoto, H., Srikulnath, K., Ohshima, K., Hirai, K. and *Koga, A. (2016). CENP-B box, a nucleotide motif involved in centromere formation, occurs in a New World monkey. *Biol Lett.* 12, pii: 20150817, # equally contributed, (査読有り)
6. Kim, J-H., Lee, H-S., Lee, N.C., Goncharov, N.V., Kumeiko, V., Masumoto, H., Earnshaw, W.C., Kouprina, N., *Larionov, V. (2016). Development of a novel HAC-based "gain of signal" quantitative assay for measuring chromosome instability (CIN) in cancer cells. *Oncotarget* 7:14841-14856. (査読有り)
7. Martins, N.M.C., Bergmann, J.H., Shono, N., Kimura, H., Larionov, V., Masumoto, H. and Earnshaw, W.C. (2016). Epigenetic engineering shows that a human centromere resists silencing mediated by H3K27me3/K9me3. *Mol Biol Cell.* 27:177-96. (査読有り)
8. Shono, N., Ohzeki, J., Otake, K., Martins, N.M.C., Nagase, T., Kimura, H., Larionov, V., Earnshaw, W.C. and *Masumoto, H. (2015). CENP-C and CENP-I are key connecting factors for kinetochore and CENP-A assembly. *J Cell Sci.*, 128:4572-87. (査読有り)
9. # Fujita, R., # Otake, K., Arimura, Y., Horikoshi, N., Miya, Y., Shiga, T., Osakabe, A., Tachiwana, H., Ohzeki, J., Larionov, V., *Masumoto, H. and *Kurumizaka, H.: (2015). Stable complex formation of CENP-B with the CENP-A nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 43:4909-22. # equally contributed, (査読有り)
10. Kononenko, A., Lee, N.C., Liskovych, M., Masumoto, H., Earnshaw, W.C., Larionov, V., *Kouprina, N. (2015). Generation of a conditionally self-eliminating HAC gene delivery vector through incorporation of a tTAVP64 expression cassette. *Nucleic Acids Res.* 43:e57. (査読有り)
11. Hasegawa, Y., Ishikura, T., Hasegawa, T., Watanabe, T., Suzuki, J., Nakayama, M., Okamura, Y., Okazaki, T., Koseki, H., Ohara, O., Ikeno, M. and *Masumoto, H. (2015). Generating a transgenic mouse line stably expressing human MHC surface antigen from a HAC carrying multiple genomic BACs. *Chromosoma* 124:107-18. (査読有り)
12. Ohzeki, J., Larionov, V., Earnshaw, W.C. and *Masumoto, H. (2015). Genetic and epigenetic regulation of centromeres: A look at HAC formation. *Chromosome Res.* 23, 87-103. 総説, (査読有り)
13. Erliandri, I., Fu, H., Nakano, M., Kim, J-H., Miga, K.H., Liskovych, M., Earnshaw, W.C., Masumoto, H., Kouprina, N., Aladjem, M.I., *Larionov, V. (2015). Replication of alpha-satellite DNA arrays in endogenous human centromeric regions and in human artificial chromosome. *Nucleic Acids Res.* 42:11502-16. (査読有り)

14. Kononenko, A.V., Bansal, R., Lee, N.C., Grimes, B.R., Masumoto, H., Earnshaw, W.C., Larionov, V., *Kouprina, N. (2014). A portable BRCA1-HAC (human artificial chromosome) module for analysis of BRCA1 tumor suppressor function. *Nucleic Acids Res.* 42:0. (査読有り)
15. Obata, Y., Furusawa, Y., Endo, T.A., Sharif, J., Takahashi, D., Atarashi, K., Nakayama, M., Onawa, S., Fujimura, Y., Takahashi, M., Ikawa, T., Otsubo, T., Kawamura, Y.I., Dohi, T., Tajima, S., Masumoto, H., Ohara, O., Honda, K., Hori, S., Ohno, H., Koseki, H., *Hase, K. (2014). The epigenetic regulator Uhrfl facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol.* 15:571-9. (査読有り)
16. Kouprina, N., Tomilin, A.N., Masumoto, H., Earnshaw, W.C. and *Larionov, V. (2014). Human artificial chromosome based gene delivery vectors for biomedicine and biotechnology. *Expert Opin Drug Deliv.* 11:517-35. (査読有り)
17. Kouprina, N., Earnshaw, W.C., Masumoto, H. and *Larionov, V. (2013). A new generation of human artificial chromosomes for functional genomics and gene therapy. *Cell Mol Life Sci.* 70:1135-48. (査読有り)
18. Dai, X., Otake, K., You, C., Cai, Q., Wang, Z., Masumoto, H. and *Wang, Y. (2013). Identification of novel α -N-methylation modification of CENP-B that regulates its binding to the centromeric DNA. *J Proteome Res.* 12:4167-75. (査読有り)
19. Lee, H-S., Lee, N.C., Grimes, B.R., Samoshkin, A., Kononenko, A.V., Bansal, R., Masumoto, H., Earnshaw, W.C., Kouprina, N., *Larionov, V. (2013). A new assay for measuring chromosome instability (CIN) and identification of drugs that elevate CIN in cancer cells. *BioMed Central Cancer* 13:252. (査読有り)
20. Lee, N.C., Kononenko, A.V., Lee, H-S., Tolkunova, E.N., Liskovych, M.A., Masumoto, H., Earnshaw, W.C., Tomilin, A.N., Larionov, V., *Kouprina, N. (2013). Protecting a transgene expression from the HAC-based vector by different chromatin insulators. *Cell Mol Life Sci.* 70:3723-37. (査読有り)
21. Tachiwana, H., Miya, Y., Shono, N., Ohzeki, J., Osakabe, A., Otake, K., Larionov, V., Earnshaw, W.C., *Masumoto, H. and *Kurumizaka, H. (2013). Nap1 regulates proper CENP-B binding to nucleosomes, *Nucleic. Acid. Res.* 41:2869-2880. (査読有り)
22. Gross, S., Catez, F., Masumoto, H. and *Lomonte, P. (2012). Centromere architecture breakdown induced by the viral E3 ubiquitin ligase ICP0 protein of herpes simplex virus type 1. *PLoS ONE* 7:e44227. (査読有り)
23. Kouprina, N., Samoshkin, A., Erliandri, I., Nakano, M., Lee, H-S, Fu, H., Iida, Y., Aladjem, M., Oshimura, M., Masumoto, H., Earnshaw, W.C. and *Larionov, V. (2012). Organization of Synthetic Alphoid DNA Array in Human Artificial Chromosome (HAC) with a Conditional Centromere. *ACS Synth. Biol.* 1:590-601. (査読有り)
24. Ohzeki, J., Bergmann, J.H., Kouprina, N., Noskov, V., Nakano, M., Kimura, H., Earnshaw, W.C., Larionov, V. and *Masumoto, H. (2012). Breaking the HAC Barrier: Histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly. *EMBO J.* 31:2391-2402. (査読有り)
25. Bergmann, J.H., Jakubsche, J., Martins, N.M., Nakano, M., Kimura, H., Kelly, D.A., Turner, B.M., Masumoto, H., Larionov, V. and *Earnshaw, W.C. (2012). Epigenetic Engineering: Histone H3K9 acetylation is compatible with kinetochore structure and function. *J Cell Sci.* 125:411-421. (査読有り)
26. Bergmann, J.H., Martins, N.M., Larionov, V., Masumoto, H. and *Earnshaw, W.C. (2012). HACKing the Centromere Chromatin Code: insights from Human Artificial Chromosomes. *Chromosome Res.* 20:505-519. 総説, (査読有り)
27. Takada, Y., Naruse, C., Costa, Y., Shirakawa, T., Tachibana, M., Sharif, J., Kezuka-Shiotani, F., Kakiuchi, D., Masumoto, H., Shinkai, Y., Ohbo, K., Peters, A.H., Turner, J.M., Asano, M., *Koseki, H. (2011). HP1 γ links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice. *Development* 138:4207-17. (査読有り)

28. Kim, J-H., Kononenko, A., Erliandri, I., Kim, T., Nakano, M., Iida, Y., Barrett, C.J., Oshimura, M., Masumoto, H., Earnshaw, W.C., Larionov, V. and *Kouprina, N. (2011). Human Artificial Chromosome (HAC) vector with a conditional centromere for correction of genetic deficiencies in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:20048-53. (査読有り)
29. Bergmann, J.H., Rodriguez, M.G., Martins, N.M.C., Kimura, H., Kelly, D.A., Masumoto, H., Larionov, V., Jansen, L.E.T. and *Earnshaw, W.C. (2011). Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore, *EMBO J*. 30:328-340. (査読有り)
30. Earnshaw WC, Allshire RC, Black BE, Bloom K, Brinkley BR, Brown W, Cheeseman IM, Choo KHA, Copenhagen GP, DeLuca JG, Desai A, Diekmann S, Erhardt S, Fitzgerald-Hayes M, Foltz D, Fukagawa T, Gassmann R, Gerlich DW, Glover DM, Gorbsky GJ, Harrison SC, Heun P, Hirota T, Jansen LET, Karpen G, Kops GJPL, Lampson MA, Lens SM, Losada A, Luger K, Maiato H, Maddox PS, Margolis RM, Masumoto H, McAinsh AD, Mellone BG, Meraldi P, Musacchio A, Oegema K, O'Neill RJ, Salmon ED, Scott KC, Straight AF, Stukenberg PT, Sullivan BA, Sullivan KF, Sunkel CE, Swedlow JR, Walczak CE, Warburton PE, Westermann S, Willard HF, Wordeman L, Yanagida M, Yen TJ, Yoda K, Cleveland DW.(2013). Esperanto for histones: CENP-A, not CenH3, is the centromeric histone H3 variant. *Chromosome Res*. 21:101-106,

《学会発表》

1. Masumoto H: "A Human Artificial Chromosome: a powerful tool for investigating the centromere/kinetochore assembly and a gene delivery vector ", The Future of Biomedicine 2015 conference at the Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, 2015, 9/2-9/7 (招待、国際)
2. Masumoto H: "The centromeric acetyl/methyl histone modification balance regulates CENP-A assembly on alphoid DNA", The Gordon Research Conference on Centromere Biology, at Bentley University in Waltham, MA, United States. 2014, 07/27- 08/01 (招待、国際)
3. Masumoto H, Ohzeki J, Nakano M, Kouprina N, Larionov V and Earnshaw WC: "A chromatin assembly balance on satellite DNA determines the fate of de novo kinetochore and HAC formation. ", Japanese-German JSPS and DFG-funded workshop "Centromeres and Artificial Chromosomes", Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany, 2011, 31 October - 3 November (招待、国際)
4. Masumoto H, Ohzeki J, Nakano M, Noskov V, Kouprina N, Earnshaw WC and Larionov V: "Heterochromatin assembly balance determines the fate of de novo kinetochore formation on satellite DNA", 第63回日本細胞生物学会大会、札幌、2011年6月27-29日(ミニシンポジウム主催)
5. 舛本寛: 「ヒト人工染色体を創って調べる。」、第84回日本生化学会大会、京都、2011年9月21-23日 (招待)
6. Masumoto H, Ohzeki J, Nakano M, Kouprina N, Larionov V and Earnshaw WC: "Chromatin assembly balance determines the fate of de novo kinetochore formation on satellite DNA", 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月13-16日 (招待)
7. 太閤淳一郎、庄野暢晃、中野めぐみ、William C. Earnshaw, Vladimir Larionov、長瀬隆弘、舛本寛: 「セントロメアをアセチル化する機構の探索」、第29回染色体ワークショップ、仙台、2011年1月25-27日 (口頭発表)
8. 舛本寛、太閤淳一郎、中野めぐみ、Larionov V and Earnshaw WC:細胞へ導入された DNA の運命: 「人工染色体形成、宿主染色体への組込み、核からの脱落、どのように起こるか?」、第84回日本遺伝学会大会、博多、2012年9月24-26日 (招待)
9. Ohzeki J, Shono N, Otake K, Nakano M, Earnshaw WC, Larionov V, Nagase T, Masumoto H: "Exploring of centromere acetylating mechanism using tetO-alphaoid system.", 第30回染色体ワークショップ、第11回核ダイナミクス研究会、淡路夢舞台国際会議場、2012年12月19日~21日 (口頭発表)

10. Shono N, Ohzeki J, Otake K, Nakano M, Nagase T, Earnshaw WC, Larionov V, Masumoto H: “Analysis of centromere chromatin assembly using tetO/tetR synthetic DNA system.”、第 35 回日本分子生物学会、福岡国際会議場、2012/12/11-14 (口頭発表)
11. 舩本寛:「ヒト人工染色体を用いたセントロメアとヘテロクロマチンの集合機構の解析」、高等研プロジェクト第 1 回「クロマチン・デコーディング」研究会、国際高等研、2014 年 3 月 28-30 日 (招待)
12. 舩本寛:「サテライト DNA へのセントロメアとヘテロクロマチンの集合を制御するクロマチン修飾バランス」、大阪大学蛋白質研究所セミナー「染色体伝承の分子背景：複製から染色体分離まで」、2014 年 9 月 25-26 日 (主催/招待)
13. 舩本寛:セントロメア・サテライト DNA への CENP-A とヘテロクロマチンの集合機構、高等研プロジェクト第 2 回「クロマチン・デコーディング」研究会、国際高等研、木津川、2015 年 3 月 19 日-21 日 (招待)
14. 舩本寛:セントロメアへの CENP-A クロマチンとヘテロクロマチンの集合機構」、高等研プロジェクト第 3 回「クロマチン・デコーディング」研究会、国際高等研、木津川、2015 年 12 月 19 日 (招待)
15. 舩本寛、太閔淳一郎、庄野暢晃、大竹興一郎、久郷和人、岡崎孝映:「セントロメアへの CENP-A とヘテロクロマチンの集合機構」、第 33 回染色体ワークショップ、松島一の坊、宮城、2016 年 1 月 13 日 (口頭) (ポスター発表)
16. Ohzeki J, Bergmann JH, Kouprina N, Vladimir N, Nakano M, Kimura H, Earnshaw WC, Larionov V, Nagase T, Masumoto H: “Breaking the HAC barrier by operating a histone H3K9 acetyl/methyl switch”、第 34 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜、2011/12/13-16 (ポスター発表)
17. Nakano M, Ohzeki J, Okamura Y, Shimajima T, Ikeno M, Larionov V, Earnshaw WC and Masumoto H: “Analyses of DNA elements and chromatin structures required for the efficient formation of human artificial chromosomes”、第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011/12/13-16 (ポスター発表)
18. 岡村佳明、霜島司、中野めぐみ、太閔淳一郎、舩本寛:「脱落制御可能な人工染色体(HAC)を用いた iPS 細胞の作製」、CREST 公開シンポジウム、2011/1/14 (ポスター発表)
19. Okamura Y, Shimajima T, Nakano M, Ohzeki J, Hasegawa Y, Ikeno M, Earnshaw WC, Larionov V, Masumoto H: “Generation of induced Pluripotent stem cells (iPSCs) using conditional human artificial chromosome (HAC)”、第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011/12/13-16 (ポスター発表)
20. 大竹興一郎、太閔淳一郎、中野めぐみ、舩本寛:「tetO Alphoid System を用いた新規 CENP-A 集合メカニズムの解析」、第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011/12/13-16 (ポスター発表)
21. 庄野暢晃、太閔淳一郎、中野めぐみ、長瀬隆弘、Earnshaw WC、Larionov V、舩本寛:「tetO/TetR テザリングシステムを用いた CENP-A 集合制御機構の解析」、第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011/12/13-16 (ポスター発表)
22. 庄野暢晃、太閔淳一郎、中野めぐみ、長瀬隆弘、Earnshaw WC、Larionov V、舩本寛:「tetO/TetR テザリングシステムを用いた CENP-A 集合制御機構の解明」、第 29 回染色体ワークショップ、仙台、2012 年 1 月 25-27 日 (ポスター発表)
23. Ohzeki J, Shono N, Otake K, Nakano M, Earnshaw WC, Larionov V, Nagase T, Masumoto H: “Exploring of centromere acetylating mechanism using tetO-alphoid system.”、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012 年 12 月 11-14 日 (ポスター発表)
24. Nakano M, Ohzeki J, Otake K, Shono N, Larionov V, Earnshaw WC and Masumoto H: “The Analysis of regulation and maintenance mechanisms of centromere functional structure with chromatin-alterable human artificial chromosome system.”、第 35 回日本分子生物学会年会、

福岡国際会議場、2012年12月11-14日（ポスター発表）

25. Okamura Y, Shimojima T, Nakano M, Ohzeki J, Hasegawa Y, Ikeno M, Earnshaw WC, Larionov V and Masumoto H: “Generation of induced Pluripotent stem cells (iPSCs) using conditional human artificial chromosome (HAC).”、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月11-14日（ポスター発表）
26. Otake K, Ohzeki J, Nakano M, Masumoto H: “The effect of CENP-B binding to Alphoid DNA on the formation and maintenance of CENP-A chromatin.” 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月11-14日（ポスター発表）
27. Shono N, Ohzeki J, Nakano M, Nagase T, Earnshaw WC, Larionov V, Masumoto H: “Analysis of centromere chromatin assembly using tetO/tetR synthetic DNA system.”、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月11-14日（ポスター発表）
28. 庄野暢晃、大関淳一郎、中野めぐみ、長瀬隆弘、Earnshaw WC、Larionov V、舛本寛: 「tetO/TetR 合成 DNA システムを用いたセントロメアクロマチン集合機構の解明」、第30回染色体WS・第11回核ダイナミクス研究会、淡路夢舞台国際会議場、2012年12月19-21日（ポスター発表）
29. 大関淳一郎、庄野暢晃、大竹興一郎、中野めぐみ、William C. Earnshaw、Vladimir Larionov、長瀬隆弘、舛本寛: 「セントロメア形成を制御するアセチル化酵素の探索」、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2013/12/3-6（ポスター発表）
30. 岡村佳明、霜島司、中野めぐみ、大関淳一郎、長谷川嘉則、池野正史、William C. Earnshaw3, Vladimir Larionov, 舛本寛: 「脱落制御可能なヒト人工染色体(HAC)を用いたiPS細胞の作製と細胞選抜への利用」、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2013/12/3-6（ポスター発表）
31. 岡村佳明、霜島司、中野めぐみ、大関淳一郎、舛本寛: 「脱落制御可能なヒト人工染色体(HAC)を用いたiPS細胞の作製と細胞選抜への利用」、「iPS細胞」研究支援3制度合同シンポジウム2014、日本科学未来館、2014/1/14-15（ポスター発表）
32. 岡崎孝映、中野めぐみ、大関淳一郎、大竹興一郎、庄野暢晃、山田和子、Larionov V、Earnshaw WC、舛本寛: 「クロマチン制御による de novo ヒト人工染色体形成最適化の試み」、第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014/11/25-27（ポスター発表）
33. Ohzeki J, Shono N, Otake K, Nakano M, Kimura H, Earnshaw WC, Larionov V, Nagase T, Masumoto H: “Role of hMis18 complex-associating HAT protein for new CENP-A assembly.” 高等研カンファレンス Chromatin Decoding、木津川、2014/5/12-15、（ポスター発表）
34. Ohzeki J, Shono N, Otake K, Nakano M, Kimura H, Earnshaw WC, Larionov V, Nagase T, Masumoto H: “Role of hMis18 complex-associating HAT protein for new CENP-A assembly.”、第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014/11/25-27（ポスター発表）
35. Ohzeki J, Shono N, Otake K, Kugou K, Kimura H, Nagase T, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H: “A M18BP1 binding protein HDP1 (HAT Domain Protein 1) positively regulates CENP-A assembly and antagonizes Suv39h1-mediated centromere inactivation.”、第38回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2015年12月2日（ポスター発表）
36. 岡崎孝映、山田和子、大竹興一郎、庄野暢晃、久郷和人、大関淳一郎、Larionov V、Earnshaw WC、舛本寛: 「合成アルフォイド DNA によるヒト人工染色体作製：CENP-A クロマチンとヘテロクロマチンの個別制御」、第38回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2015年12月2日（ポスター発表）
37. 久郷和人、大関淳一郎、中戸隆一郎、白髭克彦、舛本寛: 「ChIP-seq 法を用いたセントロメアタンパク質 CENP-B と CENP-A のヒト染色体上の分布の比較解析」、第38回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2015年12月2日（ポスター発表）
38. 大竹興一郎、大関淳一郎、長瀬隆弘、山川央、Larionov V、Earnshaw WC、舛本寛: 「合

成 Alphoid DNA と tetO/tetR tethering system を利用した CENP-B 相互作用因子の探索と機能解析」、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2015 年 12 月 2 日（ポスター発表）

39. 庄野暢晃、大関淳一郎、大竹興一郎、Martins NMC、長瀬隆弘、木村宏、Larionov V、Earnshaw WC、舩本寛：「合成セントロメア DNA と tetO/tetR テザリングシステムを用いたセントロメアクロマチン集合機構の解明」、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2015 年 12 月 2 日（ポスター発表）
40. 久郷和人、大関淳一郎、中戸隆一郎、白髭克彦、舩本寛：「セントロメアタンパク質 CENP-A と CENP-B のヒト染色体上の分布のゲノムワイドな解析」、第 33 回染色体ワークショップ、松島一の坊：宮城、2016 年 1 月 13 日（ポスター発表）
41. Ohzeki J、Shono N、Otake K、Kugou K、Kimura H、Nagase T、Larionov V、Earnshaw WC、Masumoto H：”A M18BP1 binding protein HDP1 (HAT Domain Protein 1) positively regulates CENP-A assembly and antagonizes Suv39h1-mediated centromere inactivation.”第 2 回「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」国際シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場、2015 年 8 月 7 日（ポスター発表）

《和文総説》

1. 大関淳一郎、舩本寛：「ゲノムを支えるインターメアの機能（1）- セントロメア機能とサテライト DNA -」。DOJIN BIOSCIENCE シリーズ 23「ゲノムを司るインターメア」、p69-85、（小林武彦編集、化学同人、2015 年 12 月 15 日）
2. 舩本寛：セントロメア形成を決定するクロマチン集合バランス。生体の科学：62(5):458-459 (2011)

《特許などその他成果》

出願状況（計 1 件）

名称：A method for positively or negatively regulating the assembly of newly synthesized CENP-A to exogenous alphoid DNA containing CENP-B boxes in mammalian cell lines.

発明者：Masumoto H、Ohzeki J、Larionov V、Earnshaw WC:

権利者：かずさ DNA 研究所

種類：PCT/JP2012/007384

番号：No.61/562,825

出願年月日：Nov. 22 (2012)

国内外の別：国際

取得状況（計 1 件）

名称：Rapid generation of long synthetic centromeric tandem repeats for mammalian chromosome formation

発明者：Larionov V., Earnshaw WC., Gassman R., Kandels-Lewis S., Masumoto H., Nakano M., Noskov V., Kouprina N., Barrett CJ. and Cardinale S.

権利者：NIH

種類：US Patent

番号：9,139,849

取得年月日：September 22, 2015

国内外の別：国際

《受賞》

名称：”Daiwa-Adrian prizes 2016” by The Daiwa Anglo-Japanese Foundation (at The Royal Society on 15 November)

Japanese Team: Masumoto, H. (Team Leader), Ohzeki, J., Nakano, M., Shono, N., Otake, K.,
Okazaki, K.

British Team: Earnshaw, W.C. (Team Leader), Bergman, J., Martins, N.M.C., Molina, O.,
Ruppert, J.

For their joint collaboration in; “Using Synthetic Human Chromosomes to understand Epigenetic Regulation of Chromosome Segregation”

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 舩本寛：『47本目のヒト人工染色体をつくる』、スーパーサイエンス高校特別講義、千葉県立長生高校、2014年11月21日

テロメア構成因子による染色体の統合的制御機構



加納 純子

計画研究 代表者 (平成 23~27 年度)
大阪大学蛋白質研究所

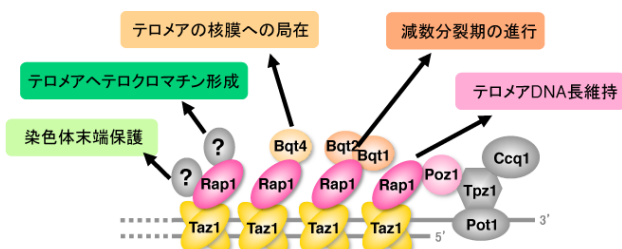
【研究目的】

線状染色体の末端に存在するテロメアは、染色体の代表的な機能を持った非コード DNA 領域であり、世代を超えた染色体の維持、細胞老化のタイミング等に深く関与している。本研究では、テロメアと、テロメアに隣接するサブテロメアが“ゲノムワイドな”染色体機能ネットワークにおいて果たす役割の解明を目指した。

【研究成果】

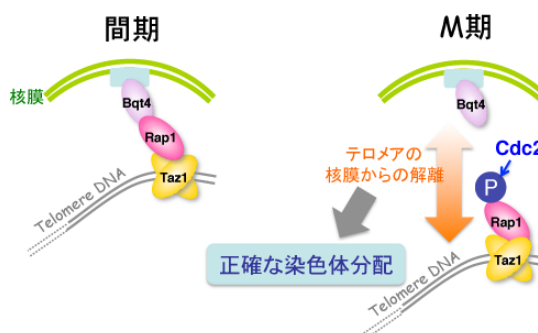
A) テロメアタンパク質複合体の形成メカニズムと生理学的意義の解明

分裂酵母 Rap1 はテロメアタンパク質複合体において、中心的な役割を果たしている。Rap1 とその複数の相互作用因子との相互作用ドメインを同定し、Rap1 を中心としたテロメア複合体形成の詳しいメカニズムを明らかにした。さらに、各相互作用ドメインの *vivo* での機能を明らかにした (Fujita *et al.*, *PLoS ONE*, 2012; Deng *et al.*, *Cell Res.*, 2015)。



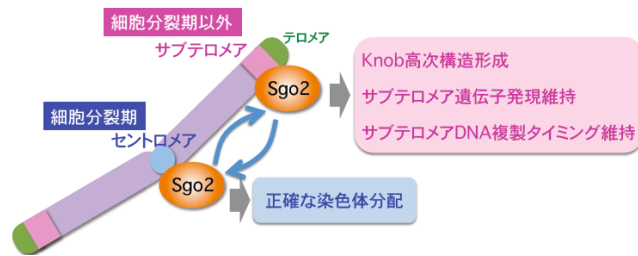
B) 細胞分裂期進行におけるテロメア制御の重要性の発見

テロメアの新規機能を探るため、分裂酵母のテロメア結合タンパク質複合体で中心的な役割を果たしている Rap1 の翻訳後修飾に着目し、その生理学的機能を解析した。その結果、Rap1 は細胞分裂期 (M 期) において Cdc2 によってリン酸化され、そのリン酸化が Rap1 と核膜タンパク質 Bqt4 との相互作用を阻害し、テロメアの核膜からの解離を誘導することがわかった。このテロメアの核膜からの一時的な解離は、染色体のスムーズな動きを可能にし、正常な染色体分配に寄与することを発見した (Fujita *et al.*, *Curr. Biol.*, 2012)。



C) サブテロメア特異的クロマチン構造の形成メカニズムと機能の発見

サブテロメアのヘテロクロマチン以外の領域（約 50 kb）ではユニークな DNA 配列があるが、ヒストン修飾レベルが低く、knob と呼ばれる極度に凝縮したクロマチン構造が間期（M 期以外の時期）に形成される。この領域について解析を行った結果、M 期にセントロメアで正確な染色体分配に寄与するシュゴシンタンパク質 Sgo2 が間期にサブテロメアに局在し、knob 構造形成を誘導するとともに、サブテロメア領域の遺伝子発現や DNA 複製タイミングの維持に重要な役割を果たしていることを発見した (Tashiro et al., *Nature Commun.*, 2016)。



D) 染色体末端危機に対処する染色体機能の発見

サブテロメアには長大な相同 DNA 配列（SH 配列）が存在する。染色体数が少ないことを活かして分裂酵母の SH 配列を完全に削除した株（SD5 株）の作製に成功した。SD5 株では SH 領域に形成していたヘテロクロマチンが内側に侵入し、その領域の遺伝子発現の著しい低下が見られるなどの異常が観察された。一方、末端のテロメア DNA を欠失させると、多くの細胞は染色体末端保護機能が失われて致死となったが、一部の細胞では、サブテロメア近傍に存在するレトロトランスポゾン LTR 配列などにおいて染色体末端融合が起こり、染色体が安定化していた。異染色体間で融合したものでは、余剰なセントロメアが不活性化されており、ヘテロクロマチンの異常な局在が見られた。以上のことから、サブテロメアは遺伝子発現や染色体恒常性維持において重要な役割を果たしていることが明らかになった（論文投稿中）。

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Takigawa, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., Masukata, H., Kanoh, J. (2016). Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulate transcription and replication timing. *Nature Commun.* 7: 10393. (査読有り)
2. Deng, W., Wu, J., Wang, F., Kanoh, J., Dehe, PM., Inoue, H., Chen, J., Lei, M. (2015). Fission yeast telomere-binding protein Taz1 is a functional but not a structural counterpart of human TRF1 and TRF2. *Cell Res.* 25: 881-884. (査読有り)
3. Tarumoto, Y., Kanoh, J., Ishikawa, F. (2013). Receptor for activated C-kinase (RACK1) homolog Cpc2 facilitates the general amino acid control response through Gcn2 kinase in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 288: 19260-19268. (査読有り)
4. Kanoh, J. (2013). Release of chromosomes from the nuclear envelope: a universal mechanism for eukaryotic mitosis? *Nucleus* 4: 100-104. (査読有り)
5. Tashiro, S., Asano, T., Kanoh, J., Ishikawa, F. (2013). Transcription-induced chromatin association of RNA surveillance factors mediates facultative heterochromatin formation in fission yeast. *Genes Cells* 18: 327-339. (査読有り)
6. Fujita, I., Tanaka, M., Kanoh, J. (2012). Identification of the functional domains of the telomere protein Rap1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS ONE* 7: e49151. (査読有り)
7. Fujita, I., Nishihara, Y., Tanaka, M., Tsujii, H., Chikashige, Y., Watanabe, Y., Saito, M., Ishikawa, F., Hiraoka, Y., Kanoh, J. (2012). Telomere-nuclear envelope dissociation promoted by Rap1 phosphorylation ensures faithful chromosome segregation. *Curr. Biol.* 22: 1932-1937. (査読有り)

《学会発表》

1. 加納純子「サブテロメア相同配列全破壊によって見えてくる染色体機能」第33回染色体ワークショップ、松島、2016年1月13日（一般口頭、国内）
2. 加納純子「サブテロメアの機能を探る」国際高等研究所 研究プロジェクト「クロマチン・デコーディング」2015年度第1回研究会、奈良、2015年12月19日（招待、国内）
3. 加納純子「サブテロメアの新規機能の解明」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)ワークショップ、神戸、2015年12月1日（招待、国内）
4. 加納純子「サブテロメア相同DNA領域完全欠失株の作製と解析」第48回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、広島、2015年9月1日（一般口頭、国内）
5. Kanoh J. “Dissection of subtelomere functions” Forefront of Chromosome Biology、京都、2015年8月10日（招待、国際）
6. Kanoh J. “Dissection of subtelomere functions” The 8th international fission yeast meeting、神戸、2015年6月24日（招待、国際）
7. Kanoh J. “Spindle assembly checkpoint protein Sgo2 regulates silenced chromatin formation and DNA replication timing at subtelomere” Telomeres & Telomerase meeting、Cold Spring Harbor, USA、2015年4月30日（一般口頭、国際）
8. Kanoh J. “Roles of protein complexes at chromosome end” The 1st Trilateral Workshop for Frontier Protein Studies、北京、2015年4月23日（招待、国際）
9. Kanoh J. “Novel Functions of Shugoshin 2 (Sgo2) at telomere-adjacent region in interphase” The 9th 3R Symposium、御殿場、2014年11月20日（招待、国際）

10. 加納純子「サブテロメア領域の新規機能の解明」第86回日本遺伝学会大会ワークショップ、長浜、2014年9月17日（招待、国内）
11. 加納純子「染色体末端の神秘」第21回酵母合同シンポジウム、東京、2014年9月3日（招待、国内）
12. Kanoh J. “Fission yeast without subtelomeres” EMBO conference “Telomeres, telomerase and disease”、ブリュッセル、2014年5月2日（ポスター、国際）
13. 加納純子「テロメア隣接領域の機能」第36回日本分子生物学会年会ワークショップ、神戸、2013年12月3日（招待、国内）
14. 加納純子「テロメア隣接領域の機能解析」国立遺伝学研究所研究会「染色体DNAの安定維持の分子メカニズム」、三島、2013年9月28日（招待、国内）
15. 加納純子「分裂酵母のサブテロメア領域の機能解析」第46回酵母遺伝学フォーラム、仙台、2013年9月9日（一般口頭、国内）
16. Kanoh J. “Structure and functions of subtelomere” Message from yeast to epigenetics ~Yeast clarifies the frontiers of life science~、福井、2013年9月3日（招待、国際）
17. Kanoh J. “Roles of *S. pombe* subtelomeres” The 7th international fission yeast meeting、London、2013年6月28日（招待、国際）
18. Kanoh J. “Rif3, a novel Rap1-interacting factor in *S. pombe*” Telomeres & Telomerase meeting、Cold Spring Harbor, USA、2013年5月1日（ポスター、国際）
19. 加納純子「テロメア結合タンパク質Rap1とDDKサブユニットDfp1との相互作用」第30回染色体ワークショップ、2012年12月19日（一般口頭、国内）
20. 加納純子「核膜非崩壊分裂を保障するテロメア-核膜ネットワーク」東北大学生命科学研究科セミナー、仙台、2012年1月27日（招待、国内）
21. 加納純子「Genome-wide networks by telomere-associated proteins」第34回日本分子生物学会年会ワークショップ、横浜、2011年12月15日（招待、国内）
22. 加納純子「分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*を用いたゲノム機能研究」大阪大学寄附講座・酵母リソース工学開設記念講演会、大阪、2011年11月25日（招待、国内）
23. 加納純子「Closed mitosisにおけるテロメアの役割」大阪大学生命機能研究科研究交流会、大阪、2011年11月15日（招待、国内）
24. 加納純子「Closed mitosisの進行を保障するテロメア-核膜ネットワーク」第84回日本生化学会大会シンポジウム、京都、2011年9月24日（招待、国内）
25. 加納純子「核膜非崩壊分裂における染色体末端テロメアの機能」第73回酵母研究会講演会、神戸、2011年9月13日（招待、国内）

《図書》

1. 加納純子 他（多数の著者の一人として）「生物学辞典第5版」岩波書店（2013）。

《和文総説》

1. 加納純子「サブテロメアはテロメアのサブじゃない」BioResource Now! 12 (6), (2016).
2. 加納純子「第8章ゲノムを支えるインターメアの機能（2）— テロメア機能とサブテロメア—」Dojin Bioscience 23・ゲノムを司るインターメア・化学同人（2015）。
3. 加納純子「第5章テロメア」Dojin Bioscience 11・染色体と細胞核のダイナミクス・化学同人（2013）。

《受賞（本人）》

1. 平成 28 年度日本遺伝学会奨励賞
2. 平成 26 年度大阪大学総長奨励賞

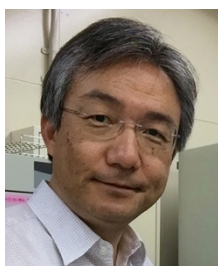
《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 大阪大学蛋白質研究所・第 9 回高校生のための特別公開講座セミナー「蛋白質—生命を担うこの身近で不思議な物質」、講師、大阪、2016 年 8 月 3 日
2. Thermo Fisher 社情報誌・NEXT「留学のすすめ」、インタビュー記事の掲載、2016 年 7 月
3. 大阪大学広報誌・阪大 News Letter「未来に輝く研究者」、インタビュー記事の掲載、2016 年 7 月
4. 新学術領域研究“非コード DNA”・高校生向け市民講座「ゲノムの調べ」、講師、横浜、2015 年 2 月 8 日
5. 第 35 回日本分子生物学会年会・高校生ポスター発表、ディスカッサー、博多、2012 年 12 月 14 日
6. 九州大学・エクセレント スチューデント イン サイエンス 高校生育成プロジェクト、一般公開講演会講師、博多、2011 年 10 月 15 日

《学会の主催》

1. Forefront of Chromosome Biology、2016 年 8 月 10 日、京都（国際）
2. BMB2015 ワークショップ「染色体の機能・構築原理」、2015 年 12 月 1 日（国内）
3. 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム「多様なモデル生物から明らかになる普遍的な細胞分裂原理」、2011 年 9 月 24 日、京都（国内）

複製フォークの安定化機構とその破綻による病態の解析



高田 穰

計画研究 代表者 (平成 23-27 年度)
京都大学放射線生物研究センター

【研究目的】

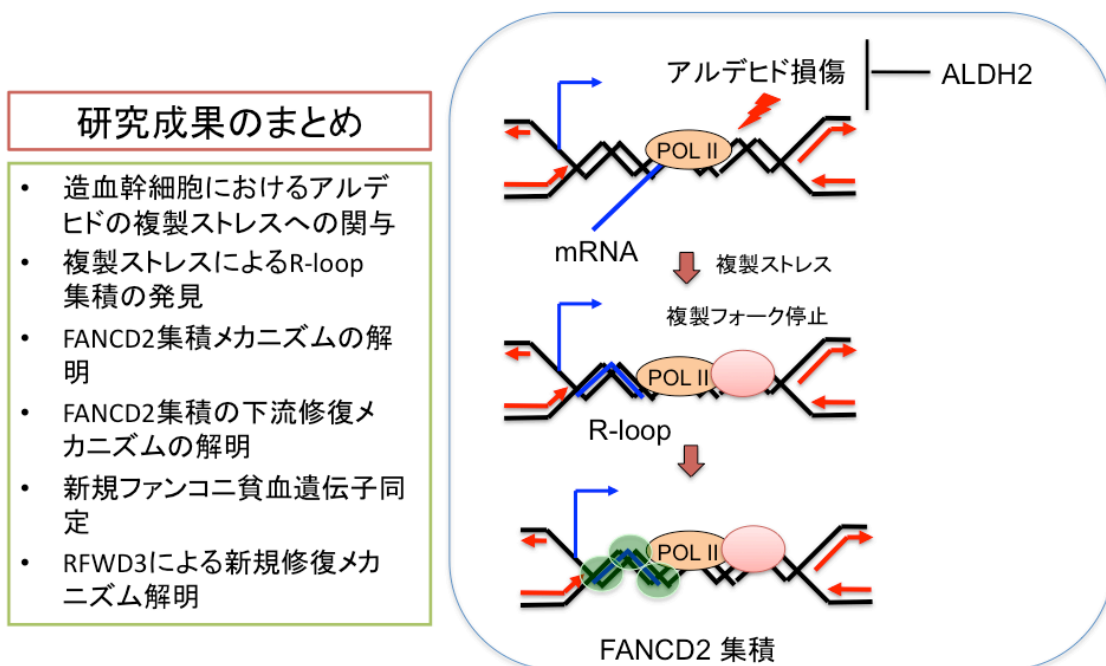
高等真核細胞染色体の非コード DNA 領域／インターメアには、“染色体ストレス”高感受性領域のいわゆる「脆弱部位」が存在する。本研究では、非コード DNA 上で展開される染色体ストレスの応答因子と各脆弱部位の位置関係を同定し、ゲノム配列の面からその実体を探る。さらに、非コード領域安定化のための分子機構の初期活性化とエフェクター機構を含めた全貌解明を行う。また、他班と連携した「病態解析チーム」を主導して領域の基礎的な知見を老化やがんなどのヒト疾患理解へと展開する。

【研究成果】

- 1) 領域内共同研究により、遺伝病ファンコニ貧血の原因遺伝子FANCD2が複製ストレス下で染色体脆弱部位である巨大遺伝子の中央部分のイントロン領域に結合することが明らかとなった。またこの結合には、転写とそれに伴うR-loop形成を必要としていた (論文準備中)。
- 2) 国際共同研究で、新規ファンコニ貧血遺伝子としてリングフィンガー型ユビキチンリガーゼであるRFWD3を同定した。RFWD3 は染色体ストレス応答に必須の因子であり、そのユビキチン化ターゲットはRPAとRAD51であることを同定した。これら因子のユビキチン化が相同組換え後期における分解を引き起こし、シナプス形成後のDNA修復合成が進むことを明らかにした (論文準備中)。
- 3) 日本人患者の解析によってファンコニ貧血の新規原因遺伝子としてFANCTを同定した (Hira et al. *Am J Hum Genet* 2015)。
- 4) 日本人患者においてアルデヒド分解酵素ALDH2の遺伝子型を調べ、活性を失ったバリエーション型遺伝子をホモに持つ患者が極度に重症で生後すぐにMDS発症すること、ヘテロ型でも骨髄不全の進行が促進されていることを明らかにした (Hira et al. *Blood* 2013)。生体内、骨髄幹細胞における複製フォーク不安定化における内因性アルデヒドの役割が想定される。

- 5) ファンconi貧血のキー分子FANCD2の会合分子を探索し、DNA二重鎖切断末端をプロセスするヌクレアーゼであるCtIPを同定した。CtIPはFANCD2によってその局在を調節され、複製フォーク安定化に機能するものと考えられた (Unno et al. *Cell Rep.* 2014)。
- 6) 染色体ストレス下のFA経路活性化におけるATRの役割をしらべ、ATRがFANCD2ユビキチン化のトリガーであるFANCIリン酸化を行うこと、しかし通常のATR活性化経路であるRAD17-RAD9-TopBP1経路に非依存的であること、さらにATRの重要な会合分子であるATRIP/ATRのクロマチン結合の安定化にFAコア複合体分子が重要な役割をもつことなどを解明した (Shigechi et al. *Can Res.* 2012; Tomida et al. *NAR* 2013)。

複製フォーク破綻と修復のメカニズム



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Yabe, M., Yabe, H., Morimoto, T., Fukumura, A., Ohtsubo, K., Koike, T., Yoshida, K., Ogawa, S., Etsuro Ito, E., Okuno, Y., Muramatsu, H., Kojima, S., Matsuo, M., Hira, A., Takata, M. (2016) The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi anemia infants is influenced by the patient's, but not the mother's, *ALDH2* genotype. **Br. J. Hematol.** 175:457-461. (査読あり)
2. Takahashi, D., Sato, K., Hirayama, E., Takata, M., *Kurumizaka, H. (2015). Human FAN1 promotes strand incision in 5'-flapped DNA complexed with RPA. **J Biochem.** 158:263-70. (査読あり)
3. Suzuki, N.M., Niwa, A., Yabe, M., Hira, A., Okada, C., Amano, N., Watanabe, A., Watanabe, K., Heike, T., Takata, M., Nakahata, T., *Saito, M.K. (2015). Pluripotent cell models of fanconi anemia identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. **Stem Cells Transl Med.** 4:333-8. (査読あり)
4. Hira, A., Yoshida, K., Sato, K., Okuno, Y., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Shimamoto, A., Tahara, H., Ito, E., Kojima, S., Kurumizaka, H., Ogawa, S., *Takata, M., Yabe, H., Yabe, M. (2015). Mutations in the Gene Encoding the E2 Conjugating Enzyme UBE2T Cause Fanconi Anemia. **Am J Hum Genet.** 96:1001-7. (査読あり)
5. Schmid, M., Takata, M. et al. (2015). Third Report on Chicken Genes and Chromosomes 2015. **Cytogenetic and Genome Research.** 145: 78-179. (査読あり)
6. Takata, K.I., Tomida, J., Reh, S., Swanhart, L.M., Takata, M., Hukriede, N.A., Wood, R.D. (2015). Conserved overlapping gene arrangement, restricted expression and biochemical activities of DNA polymerase ν ; (POLN). **J Biol Chem.** 290:24278-93. (査読あり)
7. Sato, K., Ishiai, M., Takata, M., *Kurumizaka, H. (2014). Defective FANCI Binding by a Fanconi Anemia-Related FANCD2 Mutant. **PLoS One.** 9:e114752. (査読あり)
8. Ishii, K., Ishiai, M., Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Niwa, O., Takata, M., *Shinohara, T. (2014). The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b Pathway Regulates the Radiation Response of Mouse Spermatogonial Stem Cells. **Stem Cell Reports.** 3:676-89. (査読あり)
9. Takahashi, D., Sato, K., Shimomuki, M., Takata, M., *Kurumizaka, H. (2014). Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using Escherichia coli cells. **Protein Expr Purif.** 103C:8-15. (査読あり)
10. Huang, Y., Leung, J.W., Lowery, M., Matsushita, N., Wang, Y., Shen, X., Huong, D., Takata, M., Chen, J., *Li, L. (2014). Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. **Cell Rep.** 7:1849-57. (査読あり)
11. Unno, J., Itaya, A., Taoka, M., Sato, K., Tomida, J., Sakai, W., Sugasawa, K., Ishiai, M., Ikura, T., Isobe, T., Kurumizaka, H., *Takata, M. (2014). FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. **Cell Rep.** 7:1039-47. (査読あり)
12. Hosono, Y., Abe, T., Ishiai, M., Islam, M.N., Arakawa, H., Wang, W., Takeda, S., Ishii, Y., Takata, M., Seki, M., *Enomoto, T. (2014). Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. **Biochim Biophys Acta.** 1843:1002-12. (査読あり)
13. Tomida, J., Itaya, A., Shigechi, T., Unno, J., Uchida, E., Ikura, M., Masuda, Y., Matsuda, S., Adachi, J., Kobayashi, M., Meetei, A.R., Maehara, Y., Yamamoto, K.I., Kamiya, K., Matsuura, A., Matsuda, T., Ikura, T., Ishiai, M., *Takata, M. (2013). A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. **Nucleic Acids Res.** 41:6930-6941. (査読あり)
14. Hira, A., Yabe, H., Yoshida, K., Okuno, Y., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Nakamura, J., Kojima, S., Ogawa, S., Matsuo, K., Takata, M., Yabe M. (2013). Variant *ALDH2* is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. **Blood.** 122:3206-9. (査読あり)

15. Sato, K., Toda, K., Ishiai, M., Takata, M., *Kurumizaka, H. (2012). DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. *Nucleic Acids Res.* 40:4553-61. (査読あり)
16. Yabe, M., Shimizu, T., Morimoto, T., Koike, T., Takakura, H., Tsukamoto, H., Muroi, K., Oshima, K., Asami, K., Takata, M., Yamashita, T., Kato, S., *Yabe, H. (2012). Matched sibling donor stem cell transplantation for Fanconi anemia patients with T-cell somatic mosaicism. *Pediatr Transplant.* 16:340-5. (査読あり)
17. Sato, K., Ishiai, M., Toda, K., Furukoshi, S., Osakabe, A., Tachiwana, H., Takizawa, Y., Kagawa, W., Kitao, H., Dohmae, N., Obuse, C., Kimura, H., Takata, M., *Kurumizaka, H. (2012). Histone chaperone activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair. *EMBO J.* 31:3524-36. (査読あり)
18. Nishimura, K., Ishiai, M., Horikawa, K., Fukagawa, T., Takata, M., Takisawa, H., *Kanemaki, M.T. (2012). Mcm8 and Mcm9 Form a Complex that functions in Homologous Recombination Repair Induced by DNA Interstrand Crosslinks. *Mol Cell.* 47:511-22. (査読あり)
19. Yan, Z., Guo, R., Paramasivam, M., Shen, W., Ling, C., Fox, D., 3rd, Wang, Y., Oostra, A.B., Kuehl, J., Lee, D.Y., Takata, M., Hoatlin, M.E., Schindler, D., Joenje, H., de Winter, J.P., Li, L., Seidman, M.M., *Wang, W.A. (2012). ubiquitin-binding protein, FAAP20, links RNF8-mediated ubiquitination to the Fanconi anemia DNA repair network. *Mol Cell.* 47:61-75. (査読あり)
20. Minami, D., Takigawa, N., Takeda, H., Takata, M., Ochi, N., Ichihara, E., Hisamoto, A., Hotta, K., Tanimoto, M., *Kiura, K. (2013). Synergistic Effect of Olaparib with Combination of Cisplatin on PTEN-Deficient Lung Cancer Cells. *Mol Cancer Res.* 11:140-8. (査読あり)
21. Kobayashi, M., Hayashi, N., Takata, M., *Yamamoto, K. (2013). NBS1 directly activates ATR independently of MRE11 and TOPBP1. *Genes Cells.* 18:238-46. (査読あり)
22. Kitao, H., Nanda, I., Sugino, R.P., Kinomura, A., Yamazoe, M., Arakawa, H., Schmid, M., Innan, H., Hiom, K., *Takata, M. (2011). FancJ/Brip1 helicase protects against genomic losses and gains in vertebrate cells. *Genes to Cells.* 16:714-27. (査読あり)
23. Yamamoto, K.Y., Kobayashi, S., Kurumizaka, H., Takata, M., Kono, K., Jiricny, J., Takeda, S., *Hirota, K. (2011). The involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:6492-6. (査読あり)
24. Guervilly, J.H., Renaud, E., Takata, M., *Rosselli, F. (2011). USP1 deubiquitinase maintains phosphorylated CHK1 by limiting its DDB1-dependent degradation. *Hum Mol Genet.* 20:2171-81. (査読あり)
25. Hosono, Y., Abe, T., Ishiai, M., Takata, M., Enomoto, T., *Seki, M. (2011). The role of SNM1 family nucleases in etoposide-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 410:568-73. (査読あり)
26. Bell, D.W., Sikdar, N., Lee, K.Y., Price, J.C., Chatterjee, R., Park, H.D., Fox, J., Ishiai, M., Rudd, M.L., Pollock, L.M., Fogoros, S.K., Mohamed, H., Hanigan, C.L.; NISC Comparative Sequencing Program, Zhang, S., Cruz, P., Renaud, G., Hansen, N.F., Cherukuri, P.F., Borate, B., McManus, K.J., Stoepel, J., Sipahimalani, P., Godwin, A.K., Sgroi, D.C., Merino, M.J., Elliot, G., Elkahlon, A., Vinson, C., Takata, M., Mullikin, J.C., Wolfsberg, T.G., Hieter, P., Lim, D.S., *Myung, K. (2011). Predisposition to cancer caused by genetic and functional defects of Mammalian atad5. *PLoS Genet.* 7:e1002245. (査読あり)
27. Matsushita, N., Endo, Y., Sato, K., Kurumizaka, H., Yamashita, T., Takata, M., *Yanagi, S. (2011). Direct Inhibition of TNF- α Promoter Activity by Fanconi Anemia Protein FANCD2. *PLoS One.* 6:e23324. (査読あり)
28. Rosado, I.V., Langevin, F., Crossan, G.P., Takata, M., *Patel, K.J. (2011). Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 18:1432-4. (査読あり)
29. Fujinaka, Y., Matsuoka, K., Iimori, M., Tuul, M., Sakasai, R., Yoshinaga, K., Saeki, H., Morita, M., Kakeji, Y., Gillespie, D.A., Yamamoto, K.I., Takata, M., *Kitao, H., Maehara, Y.

- (2012). ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity. *DNA Repair (Amst)*. 11:247-58. (査読あり)
30. Shigechi, T., Tomida, J., Sato, K., Kobayashi, M., Eykelenboom, J.K., Pessina, F., Zhang, Y., Uchida, E., Ishiai, M., Lowndes, N.F., Yamamoto, K., Kurumizaka, H., Maehara, Y., *Takata, M. (2012). ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res.* 72:1149-1156. (査読あり)
31. Kitao, H., *Takata, M. (2011). Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol.* 93:417-24. (査読あり)
32. *Takata, M. (2011). Guest editorial: fanconi anemia and the DNA damage response. *Int J Hematol.* 93:415-6. (査読あり)

《学会発表》

1. Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akita Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Minoru Takata, Hiromasa Yabe, Miharuru Yabe. Identification of UBE2T as a novel Fanconi anemia gene. ICRR2015, Kyoto Japan May 25-29, 2015 (一般、国際)
2. 高田 穰 「ファンconi貧血と遺伝性乳がん卵巣がん：相同組換え欠損を基盤とした高発がん症候群」第74回日本癌学会 学術総会 シンポ14. 癌の診断・治療標的としてのDNA修復機構の可能性 2015年10月8-10日 (招待、国内)
3. Minoru Takata “DNA damage and repair in Fanconi anemia” 第2回 IFOM-京都大学合同シンポジウム 「がん生物学の展望：ゲノム変異とがん-宿主相互作用」 Perspective in Cancer Biology: Genetic Variations and Host-tumor Interactions. 2015年10月6日 (招待、国際)
4. Hira, K. Yoshida, K.Sato, Y. Shiraishi, K. Chiba, H. Tanaka, S. Miyano, A. Shimamoto, H.Tahara, E.Ito, S.Kojima, H. Kurumizaka, S.Ogawa, M.Takata, H.Yabe, M. Yabe. “Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia.” 27th Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium. Toronto, Canada. September 17-20, 2015 (一般、国際)
5. Minoru Takata, Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akira Shimamoto, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Hiromasa Yabe, and Miharuru Yabe. “UBE2T/FANCT is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients.” 16th Ataxia-Teleangiectasia Workshop. Beijing, China, October 11-14th, 2015 (一般、国際)
6. 稲野将二郎、佐藤浩一、石合正道、勝木陽子、中田慎一郎、胡桃坂仁志、高田 穰 「相同組換えにおけるRPA2のエピキチン化を介した分解」分子生物学会ワークショップ 多様なDNA損傷応答の統合制御機構 2015 ~ゲノム不安定性の病態解明研究~ 2015年12月1-4日 神戸 (招待、国内)
7. 石合正道、岩崎航、高橋数冴、久郷和人、小田有沙、大木千夏、福井哲也、河合秀彦、山本卓、太田邦史、印南秀樹、高田 穰 「複製ストレスによるFANCD2集積部位のゲノムワイド解析」分子生物学会ワークショップ 複製フォーク：多様なNAトランスアクションのプラットフォーム 2015年12月1-4日 神戸 (招待、国内)
8. Miharuru Yabe, Hiromasa Yabe, Kenichi Yoshida, Seishi Ogawa, Etsuro Ito, Yusuke Okuno, Hideki Muramatsu, Seiji Kojima, Asuka Hira, Minoru Takata. Genetic subtyping of Fanconi anemia in Japanese patients. 27th Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium. Toronto, Canada. September 17-20, 2015 (ポスター、国際)
9. Yoko Katsuki, Minoru Takata. FANCD2-dependent ATM phosphorylation after incision during DNA interstrand crosslink repair. ICRR2015, Kyoto Japan May 25-29, 2015
10. Masamichi Ishiai, Koishi Sato, Minoru Takata, Hitoshi Kurumizaka. “The Role of FANCD2 as central player of the Fanconi anemia pathway in DNA repair.” ICRR2015, Kyoto Japan May 25-29, 2015 (ポスター、国際)

11. 高田 穰「ファンconi貧血症と DNA 修復メカニズム」第36回日本光医学・光生物学会シンポジウム 大阪大学銀杏会館 2014年7月25日(招待、国内)
12. 高田 穰「遺伝性 DNA 修復異常疾患：家族性乳がんとファンconi貧血」日本家族性腫瘍学会 第17回家族性腫瘍セミナー 近畿大学・東大阪キャンパス 2014年8月24日(招待、国内)
13. Minoru Takata, Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Hiromasa Yabe, and Miharuru Yabe 「UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients」The 9th 3R Symposium, November 17-21, 2014 Gotemba Kogen Hotel (一般、国際)
14. Minoru Takata Comprehensive analysis of Japanese Fanconi anemia (FA) patients has led to the identification of an E2 enzyme UBE2T as a novel FA gene. 日米修復会議 エクシブ鳴門 2014年10月29日(招待、国際)
15. M. Yabe, A. Hira, H. Yabe, T. Morimoto, A. Fukumura, M. Miyashita, K. Ohtsubo, K. Matsuo, M. Takata. Infant Japanese Fanconi anemia patients with the ALDH2-AA genotype. 26th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. September 18-21, 2014. Bethesda MA, USA (一般、国際)
16. 平 明日香, 吉田 健一, 佐藤 浩一, 嶋本 顕, 田原 栄俊, 胡桃坂 仁志, 小川 誠司, 高田 穰, 矢部 普正, 矢部 みはる「日本人ファンconi貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定」第37回日本分子生物学会年会 ワークショップ 2014年11月25-27日 横浜市 (招待、国内)
17. 高田 穰, 勝木 陽子, 佐藤 浩一, 石合 正道, 胡桃坂 仁志「ファンconi貧血経路とそのキータンパク質 FANCD2 の機能解析」第37回日本分子生物学会年会 ワークショップ 2014年11月25-27日 横浜市 (招待、国内)
18. 坂本 裕貴, 大川 沙織, 穀田 哲也, 勅使河原 愛, 飯島 健太, 高田 穰, 小松 賢志, 田内 広「相同組換え修復の細胞周期依存性解析」日本放射線影響学会第57回大会 2014年10月1-3日 鹿児島市 (一般、国内)
19. ワークショップ「低線量(率)放射線による生物影響研究の新展開」座長 立花 章, 石合正道 日本放射線影響学会第57回大会 2014年10月1-3日 鹿児島市 (一般、国内)
20. Minoru Takata, Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Hiromasa Yabe, and Miharuru Yabe “UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients”The 9th 3R Symposium, 17-21, November, 2014 Gotemba Kogen Hotel (一般、国際)
21. 高田 穰「遺伝性 DNA 修復異常疾患：家族性乳がんとファンconi貧血」日本家族性腫瘍学会 第17回後期家族性腫瘍セミナー 浜離宮朝日ホール 2015年3月8日(招待、国内)
22. 高橋 大介, 佐藤 浩一, 平山 恵美子, 高田 穰, 胡桃坂 仁志「DNA 鎖間架橋除去における FAN1 ヌクレアーゼの役割」第87回日本生化学会大会 2014年10月15-18日 京都市 (ポスター、国内)
23. 久野 真央, 平 明日香, 高田 穰「ゲノム編集酵素によるファンconi貧血原因遺伝子 FANCA のノックアウト細胞作製の試み」第37回日本分子生物学会年会 2013年11月25-27日 横浜市 (ポスター、国内)
24. 平 明日香, 吉田 健一, 佐藤 浩一, 嶋本 顕, 田原 栄俊, 胡桃坂 仁志, 小川 誠司, 高田 穰, 矢部 普正, 矢部 みはる 「日本人ファンconi貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定」 第37回日本分子生物学会年会 2013年11月25-27日 横浜市 (ポスター、国内)
25. 高田 穰, 勝木 陽子, 佐藤 浩一, 石合 正道, 胡桃坂 仁志「ファンconi貧血経路とそ

- のキータンパク質 FANCD2 の機能解析」第 37 回日本分子生物学会年会 2013 年 11 月 25-27 日 横浜市 (一般、国内)
26. 佐藤 浩一, 石合 正道, 高田 穰, 胡桃坂 仁志「Fanconi 貧血患者にみられる FANCD2 変異体の機能解析」第 37 回日本分子生物学会年会 2013 年 11 月 25-27 日 横浜市 (ポスター、国内)
 27. 平山恵美子, 高橋 大介, 佐藤 浩一, 高田 穰, 胡桃坂 仁志「DNA 鎖間架橋修復で働く FAN1 ヌクレアーゼの生化学的機能解析」第 37 回日本分子生物学会年会 2013 年 11 月 25-27 日 横浜市 (ポスター、国内)
 28. 高田 穰 「Fanconi 貧血とゲノム不安定性」第 13 回血液フォーラム 21 「造血不全」東京国際フォーラム 2013 年 5 月 18 日 (招待、国内)
 29. 高田 穰 “Fanconi anemia and genome instability” 京都大学大学院医学研究科 腫瘍コース コロキウム 2013 年 9 月 29 日 京都大学紫蘭会館 (招待、国内)
 30. 高田 穰 「ファンコニ貧血と DNA クロスリンク修復の分子機構 –最近の進歩–」プロGRESS 教育講演 日本血液学会 札幌 2013 年 10 月 11~13 日 (招待、国内)
 31. 高田 穰 「ファンコニ貧血とゲノム損傷応答」京都大学 大学病院 血液内科セミナー 2013 年 11 月 5 日 京大附属病院 病棟セミナー室 (招待、国内)
 32. 高田 穰 「ファンコニ貧血-家族性乳がん (FA-BRCA) 経路によるゲノム安定性制御」聖マリアンナ医大 講演会 2013 年 11 月 7 日 (招待、国内)
 33. 高田 穰 第 6 回 岡山肺癌治療セミナー 2013 年 12 月 3 日 岡山大学病院 病棟セミナー室 「ゲノム不安定性と発がん」高田 穰 (招待、国内)
 34. 石合正道, 佐藤浩一, 胡桃坂仁志, 高田 穰 「ファンコニ貧血原因遺伝子産物 FANCD2 の示すヒストンシャペロン活性の生理的意義」分子生物学会ワークショップ 動的な蛋白質複合体が織りなすゲノム動態の連係制御 Coordinated regulations in genome transactions promoted by dynamic protein complexes 神戸 2013 年 12 月 3-6 日 (招待、国内)
 35. 西村 浩平, 夏目 豊彰, 石合 正道, 深川 竜郎, 高田 穰, 鐘巻 将人 「Mcm8-9 複合体は Rad51 依存的鎖潜り込み反応後の DNA 伸長反応に関わる」分子生物学会ワークショップ 神戸 2013 年 12 月 3-6 日 (招待、国内)
 36. Miharuru Yabe, Asuka Hira, Hiromasa Yane, Kenichi Yoshida, Seishi Ogawa, Seiji Kojima, Minoru Takata. Clinical interaction between Japanese Fanconi anemia patients and aldehyde metabolism. 日本血液学会 札幌 2013 年 10 月 11~13 日 (一般、国内)
 37. J. Unno, A. Itaya, M. Taoka, K. Sato, J. Tomida, W. Sakai, T. Ikura, T. Isobe, H. Kurumizaka, M. Takata “FANCD2 in chromatin anchors CtIP and regulates DNA end resection during crosslink repair.” 25th Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium October 24-27, 2013 Houston, Texas (一般、国際)
 38. 田内広, 大原麻希, 田中 彩, 飯島健太, 高田 穰, 小林純也, 小松賢志 「DNA 損傷修復関連タンパクによるアポトーシス制御の二面性」放射線影響学会シンポジウム 「放射線による細胞死研究の新展開」放射線影響学会 青森 2013 年 10 月 18-20 日 (招待、国内)
 39. 大原麻希, 阿部紘子, 田中 彩, 伊坂早央里, 戸松静香, 高田 穰, 立花 章, 田内広 「DNA 二本鎖切断修復タンパク質欠損細胞の DNA 複製阻害剤感受性」放射線影響学会 青森 2013 年 10 月 18-20 日 (一般、国内)
 40. 坂本裕貴, 深作直子, 阿部紘子, 田中 彩, 戸松静香, 大原麻希, 高田 穰, 小松賢志, 立花 章 「DNA に重鎖切断修復欠損細胞における ATM 阻害の影響」放射線影響学会 青森 2013 年 10 月 18-20 日 (一般、国内)
 41. 坂本裕貴, 深作直子, 阿部紘子, 田中彩, 戸松静香, 大原麻希, 高田 穰, 小松賢志,

- 立花章、田内広 「DNA 二重鎖切断修復欠損細胞における ATM 阻害の影響」 放射線影響学会 青森 2013 年 10 月 18-20 日 (一般、国内)
42. Zhijiang Yan, Dongyi Xu, David Fox 3rd, Jinhu Yin, Rong Guo, Yutong Xue, Ling Chen, Weiping Shen, Yongjiang Li, Amom Ruhikanta Meetei, Minoru Takata, Lei Li, Johan de Winter, Michael Seidman, Weidong Wang. "Fanconi anemia and Bloom syndrome proteins constitute a multifunctional complex to repair DNA damage." 29th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM "Next Generation" Radiation Biology and beyond: New perspectives on genome damage and stability. November, 28-29, 2013, Kyoto, JAPAN (招待、国際)
 43. Masamichi Ishiai, Junya Unno, Koichi Sato, Akiko Itaya, Junya Tomida, Hitoshi Kurumizaka, Minoru Takata. "Roles of the Fanconi anemia protein FANCD2 in DNA crosslink repair." 29th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM "Next Generation" Radiation Biology and beyond: New perspectives on genome damage and stability. November, 28-29, 2013, Kyoto, JAPAN (招待、国際)
 44. Masamichi Ishiai, Junya Unno, Koichi Sato, Akiko Itaya, Junya Tomida, Hitoshi Kurumizaka and Minoru Takata. "Roles of the Fanconi anemia protein FANCD2 in DNA cross link repair." International Conference, Kyoto, 2014, "Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity" February 4-5, 2014, Kyoto, JAPAN (ポスター、国際)
 45. G. Guilbaud, P. Sarkies, M. Takata, K. Patel, J. Sale. "Involvement of the FA pathway in the maintenance of epigenetic stability near G-quadruplex forming DNA sequences." 25th Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium October 24-27, 2013 Houston, Texas (ポスター、国際)
 46. Y. Huang, J.W.C. Leung, M. Lowery, N. Matsushita, Y. Wang, X. Shen, H.G. Do, M. Takata, J. Chen, L. Li. "Modularized functions of the Fanconi anemia core complex." 25th Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium October 24-27, 2013 Houston, Texas (ポスター、国際)
 47. N. Suzuki, A. Niwa, M. Yabe, A. Hira, M. Takata, T. Nakahara, M.K. Saito. "Pluripotent cell models of Fanconi anemia identify the earliest pathological defect in human hemoangiogenic progenitors." 25th Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium October 24-27, 2013 Houston, Texas (ポスター、国際)
 48. Yuuki Sakamoto, Naoko Fukasaku, Hiroko Abe, Aya Tanaka, Shizuka Tomatsu, Maki Ohara, Minoru Takata, Kenshi Komatsu, Akira Tachibana, Hiroshi Tauchi. "Effect of ATM kinase inhibitor on radiosensitivity of various DNA double strand break repair deficient cells." 29th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM "Next Generation" Radiation Biology and beyond: New perspectives on genome damage and stability 京都市 2013 年 11 月 28-29 日 (ポスター、国際)
 49. Koichi Sato, Daisuke Takahashi, Mayo Shimomuki, Emiko Hirayama, Masamichi Ishiai, Minoru Takata and Hitoshi Kurumizaka. "Biochemical analysis of ICL repair proteins, FANCI-FANCD2 complex." 29th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM "Next Generation" Radiation Biology and beyond: New perspectives on genome damage and stability 京都市 2013 年 11 月 28-29 日 (ポスター、国際)
 50. Naoya M. Suzuki, Bumpei Samata, Akira Niwa, Toshiyuki Habu, Minoru Takata, Jun Takahashi, Tatsutoshi Nakahata, Mugumu K. Saito. "Pluripotent stem cell model of Seckel syndrome revealed that ATR regulates neural progenitors for orderly brain development." 29th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM "Next Generation" Radiation Biology and beyond: New perspectives on genome damage and stability 京都市 2013 年 11 月 28-29 日 (ポスター、国際)
 51. 佐藤 浩一, 高橋 大介, 平山 恵美子, 高田 穰, 胡桃坂 仁志 「ICL 修復に重要な FAN1 ヌクレアーゼの生化学的機能解析」 日本分子生物学会 神戸 12 月 3-6 日 (ポスター、国内)

52. Asuka Hira, Hiromasa Yabe, Keitaro Matsuo, Minoru Takata, Miharuru Yabe : “Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients” 24th ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM September 27-30, 2012 Denver, Colorado (一般、国際)
53. F.Makki, J.B. Wilson, H.J. van der Vrugt, Y.Xhiao. A. Aladwani, M. Takata, G.M. Kupfer, N.J. Jones. “FANCG functions independently of FANCA in the D1-D2-X3-Rad51C complex: Evidence for incomplete epistasis of FANCG/A” 24th ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM September 27-30, 2012 Denver, Colorado
54. K. Nishimura, M.Ishiai, K. Horikawa, T.Fukagawa, M. Takata, H.Takisawa, M. Kanemaki. “Mcm8 and Mcm9 form a complex that functions in homologous recombination repair induced by DNA interstrand crosslinks. 24th ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM September 27-30, 2012 Denver, Colorado (ポスター、国際)
55. 高田 穰 : 「DNA 損傷シグナルとファンコニ貧血経路」 生体調節研究所セミナー講演 2012年11月15日 (招待、国内)
56. Minoru Takata, Asuka Hira, Naoya Suzuki, Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata, Hiromasa Yabe, Megumu K. Saito, Keitaro Matsuo, Miharuru Yabe : “Genetic interplay between the Fanconi anemia pathway and aldehyde metabolism in humans” The 8th 3R Symposium Nov 25-28, 2012 淡路市 (一般、国際)
57. Minoru Takata, Asuka Hira, Naoya Suzuki, Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata, Hiromasa Yabe, Megumu K. Saito, Keitaro Matsuo, Miharuru Yabe : “Genetic interplay between the Fanconi anemia pathway and aldehyde metabolism in humans” 28th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM Nov 25-28, 2012, 京都市 (招待、国際)
58. Minoru Takata : “Molecular pathogenesis of Fanconi anemia” 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012年11月30日-12月2日 横浜 (招待、国内)
59. 西村浩平、石合正道、堀川一樹、深川竜郎、高田 穰、滝澤温彦、鐘巻将人 : “Mcm8 と Mcm9 は複合体を形成し、DNA 二本鎖架橋修復時に引き起こされる相同組換え修復において働く” 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月 福岡市 (一般、国内)
60. 高田 穰、平明日香、鈴木直也、丹羽明、中畑龍俊、矢部普正、斉藤潤、松尾恵太郎、矢部 みはる : “ファンコニ貧血経路とアルデヒド代謝の遺伝的相互作用解析” 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日 福岡市 (一般、国内)
61. 石合正道、佐藤浩一、胡桃坂仁志、高田 穰 : “FANCD2 のヒストンシャペロン活性が DNA 修復機能に果たす役割” 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日 福岡市 (一般、国内)
62. 海野純也、板谷(内田)亜希子、冨田純也、井倉毅、田岡万悟、佐藤浩一、胡桃坂仁志、磯辺俊明、高田 穰 : “DNA 鎖間架橋応答におけるファンコニ貧血経路による CtIP の調節” 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日 福岡市 (一般、国内)
63. 高田 穰 : ゲノムへのストレスとの戦い：生命の適応戦略を考える 「内なる敵アルデヒドの攻撃からゲノムを守る－「体内浄化」と「傷の修理」の二つの戦略－ 第33回品川セミナー 2013年2月1日 東京 (一般、国内)
64. Asuka Hira, Hiromasa Yabe, Keitaro Matsuo, Minoru Takata, Miharuru Yabe : “Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients” 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日札幌 (ポスター、国内)
65. Jun Adachi, Taakahisa Kuga, Takashi Shiromizu, Hideaki Kume, Satoshi Murakami, Keiichi Nakayama, Tsuyoshi Ikura, Minoru Takata, Takeshi Tomonaga : “Discovery of early-response kinases in DNA-damage signaling using phosphoproteome analysis” 第71回日本癌学会学

術総会 2012年9月19-21日札幌 (ポスター、国内)

66. Hiroyuki Kitao, Ysohihiko Fujinaka, Kauaki Matsuoka, Makoto Imori, Munkhbold Tuul, Ken-ichi Yamamoto, Minoru Takata, Eiji Oki, Yoshihiro Kakeji, Yoshihiko Maehara : “ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity” 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日 札幌 (ポスター、国内)
67. Asuka Hira, Naoya Suzuki, Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata, Megumu Saito, Hiromasa Yabe, Keitaro Matsuo, Minoru Takata, Miharuru Yabe : “Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients” 1st IFOM-KU joint symposium October 25-27 2012, Milan, Italy (ポスター、国際)
68. Masamichi Ishiai, Koichi Sato, Kazue Toda, Satoshi Furukoshi, Akihisa Osakabe Hiroaki Tachiwana, Yoshimasa Takizawa, Wataru Kagawa, Hiroyuki Kitao, Naoshi Dohmae, Chikashi Obuse, Hiroshi Kimura, Minoru Takata, and Hitoshi Kurumizaka : “Histone chaperon activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair” The 8th 3R Symposium Nov 25-28, 2012 淡路市 (ポスター、国際)
69. Naoya Suzuki, Asuka Hira, Akira Niwa, Keitaro Matsuo, Minoru Takata, Miharuru Yabe, Tatsutoshi Nakahata, Megumu Saito : “Mesodermal progenitors from reprogrammed FA cells were affected by ALDH2 enzymatic activity” ASH highlights in Asia 2013, March 23-24 2013, Shanghai, China (ポスター、国際)
70. 佐藤浩一、石合正道、高田 穰、胡桃坂仁志 : “FANCD2 のモノユビキチン化機構の解析” 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日 福岡市 (ポスター、国内)
71. 細野嘉史、関政幸、阿部拓也、石合正道、武田俊一、石井裕、高田穰、榎本武美 : “RecQL5ヘリカーゼのDNAクロスリンク修復における役割” 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日 福岡市 (ポスター、国内)
72. 穀田哲也、勅使河原愛、長谷川直己、飯島健太、高田穰、小松賢志、田内広 : “DNA二重鎖切断修復における相同組換え修復の細胞周期依存性の解析” 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日 福岡市 (ポスター、国内)
73. Junya Unno, Junya Tomida, Tomoko Shigechi, Akiko Itaya, and Minoru Takata : “Crosstalk signaling between checkpoint and the Fanconi anemia DNA repair pathway” 第71回日本癌学会学術総会 International Session “Maintaining the integrity of genomic information by cell cycle checkpoints” 2012年9月19-21日札幌 (一般、国内)
74. Minoru Takata, Asuka Hira, Hiromasa Yabe, Keitaro Matsuo, Miharuru Yabe : “Genetic interplay between Fanconi anemia and aldehyde metabolism in humans” 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日札幌 (一般、国内)
75. Koichi Sato, Masamichi Ishiai, Minoru Takata, Hitoshi Kurumizaka : “Histone chaperone activity of FANCD2 plays an important role in the Fanconi anemia pathway” 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日札幌 (一般、国内)
76. Junya Unno, Akiko Itaya, Junya Tomida, Tsuyoshi Ikura, Masato Taoka, Toshiaki Isobe, and Minoru Takata. Identification of interactors with the Fanconi anemia proteins FANCD2 using mass spectrometry. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Genomic Instability and DNA Repair (X6). カナダ アルバータ州 バンフ、ザ フェアモント バンフ スプリングス 2013年3月3日-8日 (ポスター、国際)
77. 石合正道、佐藤浩一、高田穰、胡桃坂仁志 : 「ファンコニ貧血DNA修復経路の中心タンパク質FANCD2はヌクレオソームアセンブリー活性を示す」 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3-5日 名古屋市 (一般、国内)
78. 高田 穰、富田純也、板谷(内田)亜希子、茂地智子、海野純也、前原善彦、石合正道 : 「ファンコニ貧血コア複合体によるATR-ATRIPキナーゼのクロマチン動態

- 制御」第 70 回日本癌学会学術総会 シンポジウム“Molecular basis of genome instability in cancer” 2011 年 10 月 3-5 日 名古屋市 (招待、国内)
79. 茂地智子、冨田純也、佐藤浩一、海野純也、小林昌彦、山本健一、石合正道、胡桃坂仁志、前原善彦、高田 穰：「複製ストレスによる F A 経路の活性化には、A T R I P -A T R キナーゼが必須である」第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3-5 日 名古屋市 (一般、国内)
 80. T.Shigechi, J.Tomida, K.Sato, Y.Zhang, E.Uchida, J.Eykelenbo, N.Lowndes, H.Kurumizaka, Y.Machara, M.Takata: “An Absolute Requirement of ATRIP-ATR Kinase in Replication Stress-induced Triggering of the FA Pathway Activation” 23rd ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 20-23, 2011 Barcelona, Spain (一般、国際)
 81. J.B.Wilson, J.K.Lingley, F.A.Makki, A.M.Alandwani, K.Lee, Y.Xiao, M.Takata, G.M.Kupfer, N.J.Jones: “Inhibition of NHEJ Reveals Distinct Roles for FANCG in the Repair of Interstrand Crosslinks and DNA Strand Breaks” 23rd ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 2011 20-23, Barcelona, Spain (一般、国際)
 82. 海野純也、坂谷 (内田) 亜希子、冨田純也、井倉毅、高田 穰：「ファンコニ貧血蛋白質 F A N C D 2 / F A N C I 結合タンパク質のプロテオーム解析」日本放射線影響学会第 54 回大会 2011 年 11 月 17-19 日 神戸市 (一般、国内)
 83. 茂地智子、冨田純也、佐藤浩一、小林昌彦、内田恵美、山本健一、胡桃坂仁志、前原善彦、高田 穰：「複製ストレスによるファンコニ貧血経路の活性化には、A T R -A T R I P キナーゼ複合体が必須である」日本放射線影響学会第 54 回大会 2011 年 11 月 17-19 日 神戸市 (一般、国内)
 84. Takata, M: 「ファンコニ貧血と D N A 損傷シグナリング」シンポジウム「International session for DNA repair and related subjects」日本放射線影響学会第 54 回大会 2011 年 11 月 17-19 日 神戸市 (招待、国内)
 85. Masamichi Ishiai, Junya Tomida, Tomoko Shigechi, Akiko Itaya, Emi Uchida, Junya Unno, Minoru Takata: “Molecular mechanisms of the Fanconi anemia pathway.”日本分子生物学会第 34 回年会 ワークショップ 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (一般、国内)
 86. 足立淳、鳴海良平、佐野聖三、久家貴寿、白水崇、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、井倉毅、高田 穰、朝長毅：「リン酸化プロテオミクスを用いた新規 D N A 損傷初期応答キナーゼの探索」日本分子生物学会第 34 回年会 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (ポスター、国内)
 87. Junya Unno, Akiko Itaya, Junya Tomida, Tsuyoshi Ikura, Minoru Takata: “Mass spectrometric analysis identifies factors associated with the Fanconi anemia proteins FANCD2 and FANCI” 日本分子生物学会第 34 回年会 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (ポスター、国内)
 88. Hiroyuki Kitao, Yoshihiko Fujinaka, Kazuaki Matsuoka, Makoto Iimori, Munkhbold Tuul, Ryo Sakasai, Ken-ichi Yamamoto, Minoru Takata, Yoshihiko Kakeji, Yoshihiko Machara: Homologous recombinational repair and Chk1-mediated S-phase arrest protect cells from 5-FU cytotoxicity. 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (ポスター、国内)
 89. 松下暢子、菊間啓太、太田莉英子、もたい龍介、徳山郷土、高田 穰、胡桃坂仁志、山下孝之、稲留涼子、柳茂：ファンコニ貧血蛋白質 FANCD2 による NF-kappaB 転写制御機構の解析。日本分子生物学会第 34 回年会 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (ポスター、国内)
 90. Koichi Sato, Masamichi Ishiai, Kazue Toda, Satoshi Furukoshi, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwara, Yoshimasa Takizawa, Wataru Kagawa, Hiroyuki Kitao, Naoshi Dohmae, Chikashi Obuse, Hiroshi Kimura, Minoru Takata, Hitoshi Kurumizaka: Histone chaperone activity of the FANCD2-FANCI complex and its importance in repair of interstrand DNA crosslinks by the Fanconi anemia pathway. 日本分子生物学会第 34 回年会 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (ポスター、国内)

91. Kazue Toda, Koichi Sato, Masamichi Ishiai, Minoru Takata, Hitoshi Kurumizaka: Robust stimulation of the FANCD2 monoubiquitination by three-way brached DNAs. 日本分子生物学会第 34 回年会 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (ポスター、国内)
92. Kohei Nishimura, Masamichi Ishiai, Tatsuo Fukagawa, Minoru Takata, Haruhiko Takisawa, Masato Kanemaki: Mcm8 and Mcm9 form a novel complex involved in resistance to DNA crosslinking agents. 日本分子生物学会第 34 回年会 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (ポスター、国内)
93. Tomoko Shigechi, Junya Tomida, Koichi Sato, Masahiko Kobayashi, John Eykelenboom, Pessina Fabio, Zhang Yanbin, Emi Uchida, Masamichi Ishiai, Noel Lowndes, Kenichi Yamamoto, Hitoshi Kurumizaka, Yoshihiko Maehara, Minoru Takata: ATR-ATRIP kinase complex is responsible for triggering of the FA pathway. 日本分子生物学会第 34 回年会 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (ポスター、国内)
94. Minoru Takata : “Fanconi anemia and the DNA damage signaling” 27th RBC-NIRS International Symposium「DNA 損傷応答シグナルにおけるクロマチン動態とエピジェネティクス制御」Dec 9-10, 2011. Kyoto (招待、国際)
95. 高田 穂:「DNA 損傷への応答メカニズムと疾患」第 11 回分子予防環境医学研究会 シンポジウムオーガナイザー&演者 2012 年 1 月 27 日 倉敷市 (招待、国内)
96. Minoru Takata : The Sugahara Memorial International Symposium on" Prospective Topics and Charm of Radiation Biology". “Fanconi anemia and the DNA damage response” Jan 25-26, 2012 Kyoto (招待、国際)
97. 海野純也、板谷 (内田) 亜希子、冨田純也、井倉毅、高田 穂 :「ファンconi貧血蛋白質 FANCD2/FANCI 結合タンパク質のプロテオーム解析」第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3-5 日 名古屋市 (ポスター、国内)
98. J.B.Wilson, Y.Xiao, G.M.Kupfer, M.Takata, N.J.Jones:“Hypersensitivity to PARP-1 inhibitors and Reduced Homologous Recombination Repair in Mutant FANCD2 Cell Lines”23rd ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 20-23, 2011, Barcelona, Spain (ポスター、国際)
99. H. Kitao, R. Nakanishi, M. Iimori, Y. Fujinaka, M. Tuul, N. Yamashita, M. Takata, Y. Kakeji, Y. Maehara: “Involvement of FancJ and Msh2 in the Cellular Response to 5-FU-Induced DNA Damages” 23rd ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 20-23, 2011, Barcelona, Spain (ポスター、国際)
100. K. Sato, M. Ishiai, K. Toda, S. Furukoshi, A. Osakabe, H. Tachiwara, Y. Takizawa, W. Kagawa, H.Kitao, N. Dohmae, C. Obuse, H. Kimura, M. Takata, H. Kurumizka: “Histone Chaperone Activity of FANCD2-FANCI Complex, the Key Proteins for the Fanconi Anemia Pathway” 23rd ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 20-23, 2011, Barcelona, Spain (ポスター、国際)
101. J. Tomida, A. Itaya, T. Shigechi, J. Unno, E. Uchida, R. Meetei, Y. Maehara, M. Ishiai, M. Takata: “The Fanconi Anemia Core Complex Promotes ATR Signaling” 23rd ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 20-23, 2011, Barcelona, Spain (ポスター、国際)
102. Kokuta Tetsuya, Ai Techigawara, Naoki Hasegawa, Minoru Takata, Kenshi Komatsu, Hiroshi Tauchi: DNA double-strand break repair via gene conversion is dependent on cell cycle. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (ポスター、国内)
103. Tomoko Shigechi, Junya Tomida, Koichi Sato, Masahiko Kobayashi, JohnEykelenboom, Passina Fabio, Zhang Yanbin, Emi Uchida, Masamichi Ishiai, Noel Lowndes, Kenichi Yamamoto, Hitoshi Kurumizaka, Yoshihiiko Maehara, Minoru Takata: “ATR-ATRIP kinase complex is responsible for friggering activation of the FA pathway” 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13-16 日 横浜市 (ポスター、国内)
104. Junya Unno, Akiko Itaya, Junya Tomida, Tsuyoshi Ikura, Minoru Takata: “Mass sepectrometric analysis identifies factors associated with the Fanconi anemia proteins

FANCD2 and FANCI” 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日 横浜市 (ポスター、国内)

105. 足立淳、鳴海良平、佐野聖三、久家貴寿、白水崇、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、井倉毅、高田 穰、朝長毅：リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日 横浜市 (ポスター、国内)
106. Hiroyuki Kitao, Yoshihiko Fujinaka, Kazuaki Matsuoka, Makoto Iimori, Munkhbold Tuul, Ryo Sakasai, Ken-ichi Yamamoto, Minoru Takata, Yoshihiko Kakeji, Yoshihiko Maehara: Homologous recombinational repair and Chk1-mediated S-phase arrest protect cells from 5-FU cytotoxicity. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日 横浜市 (ポスター、国内)
107. Koichi Sato, Masamichi Ishiai, Kazue Toda, Satoshi Furukoshi, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Yoshimasa Takizawa, Wataru Kagawa, Hiroyuki Kitao, Naoshi Dohmae, Chikashi Obuse, Hiroshi Kimura, Minoru Takata, Hitoshi Kurumizaka: Histone chaperone activity of the FANCD2-FANCI complex and its importance in repair of interstrand DNA crosslinks by the Fanconi anemia pathway. 2011年12月13-16日 横浜市 (ポスター、国内)
108. Kazue Toda, Koichi Sato, Masamichi Ishiai, Minoru Takata, Hitoshi Kurumizaka: Robust stimulation of the FANCD2 monoubiquitination by three-way branched DNAs. 日本分子生物学会第34回年会 2011年12月13-16日 横浜市 (ポスター、国内)
109. Kohei Nishimura, Masamichi Ishiai, Tatsuo Fukagawa, Minoru Takata, Haruhiko Takisawa, Masato Kanemaki: Mcm8 and Mcm9 form a novel complex involved in resistance to DNA crosslinking agents. 日本分子生物学会第34回年会 2011年12月13-16日 横浜市 (ポスター、国内)

《図書》

1. The Fanconi Anemia Pathway and Interstrand Cross-Link Repair. Masamichi Ishiai, Junya Tomida, Akiko Itaya, James Hejna, *Takata M. ***DNA Replication, Recombination, and Repair.*** pp 175-210. 2015 Edited by Fumio Hanaoka and Kaoru Sugawara. Springer Japan.
2. Motegi A, Takata M. Multiple genetic manipulations of DT40 cell line. *Methods Mol Biol.* 2014;1114:25-35. Springer
3. Ishiai M., Uchida E., and Takata M. Establishment of the DNA repair-defective mutants in DT40 cells. *Methods Mol Biol.* 2012;920:39-49. Springer
4. Kitao H, Hirano S, Takata M. Evaluation of Homologous Recombinational Repair in Chicken B Lymphoma Cell Line, DT40. *Methods Mol Biol.* 2011;745:293-309. Springer

《和文総説》

1. 高田 穰 (2015) 「ゲノム脆弱部位の維持と機能」ゲノムを司るインターメア 非コードDNAの新たな展開 小林武彦編 化学同人 11章 123-160
2. 平明日香、稲野将二郎、高田 穰 (2015) Fanconi貧血 - DNAクロスリンク損傷修復の分子機構から臨床まで- 遺伝子医学MOOK別冊 シリーズ:最新遺伝医学研究と遺伝カウンセリング シリーズ1 「最新遺伝性腫瘍・家族性腫瘍研究と遺伝カウンセリング」 [編集:三木義男]
3. 稲野将二郎、平明日香、高田 穰 (2015) 家族性腫瘍学 —家族性腫瘍の最新研究動向— II.各論 原因遺伝子 Fanconi anemia 経路によるDNA鎖間結合の修復メカニズム 日本臨床 増刊号6、305-310
4. 石合正道、高田 穰 (2015) 「DNA修復」 生体の科学 増大特集 細胞シグナル操作法 66、466-467

5. 平明日香、高田 穰 (2013) ファンconi貧血とDNAクロスリンク損傷修復の分子機構 : 最近の進歩 臨床血液 54、1625-32
6. 高田 穰 (2013) 「染色体脆弱部位の複製とDNA損傷ストレス応答のメカニズム」 実験医学 30、2234-2239
7. 石合正道、高田 穰 (2012) 「ゲノムDNA損傷応答ネットワーク解明の新展開」 メディカル・サイエンス・ダイジェスト 特集「DNA損傷応答ネットワークと疾患」 特集編集 高田穰, 38、4-16
8. 海野純也、高田 穰 (2011) DNA損傷応答シグナリングにおけるユビキチン化. 実験医学増刊「タンパク質分解系による生体制御」 29: 165

《受賞（若手）》

ポスター賞受賞（筆頭著者は早稲田大、胡桃坂研の若手）

K. Sato, M. Ishiai, K. Toda, S. Furukoshi, A. Osakabe, H. Tachiwana, Y. Takizawa, W. Kagawa, H. Kitao, N. Dohmae, C. Obuse, H. Kimura, M. Takata, H. Kurumizka: "Histone Chaperone Activity of FANCD2-FANCI Complex, the Key Proteins for the Fanconi Anemia Pathway" 23rd ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM October 20-23, 2011, Barcelona, Spain (ポスター、国際)

《アウトリーチ活動、社会貢献》

一般対象の研究成果の講演会

高田 穰：ゲノムへのストレスとの戦い：生命の適応戦略を考える「内なる敵アルデヒドの攻撃からゲノムを守るー「体内浄化」と「傷の修理」の二つの戦略ー 第33回品川セミナー 2013年2月1日 東京（一般、国内）

国際シンポジウムの開催

29th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM "Next Generation" Radiation Biology and beyond: New perspectives on genome damage and stability. November, 28-29, 2013, Kyoto, JAPAN

インターメア機能配列の情報量規準と機械学習による同定 および進化的解析



遠藤 俊徳

公募研究 代表者（平成 24~25 年度）
北海道大学大学院情報科学研究科

【研究目的】

「インターメア」に特化した種間配列比較解析の方法を確立し、主要なモデル生物について、機能配列を提示すると同時に、生物間における機能配列の進化的関係性を明らかにする。特に、効率的な確率論的配列パターン抽出と、機械学習などを用いた特徴抽出、およびそのための評価関数の確立を多面的に試行することによって目標達成を目指す。また、実験的に得られた機能配列情報を、情報科学的に抽出されたものとは区別された形でデータベース化し、推定用のツールを供する。

【研究成果】

これまでに多数の生物ゲノムが明らかにされてきた。これらゲノムのうち、タンパク質コード遺伝子領域については既存技術によって大半が予測され、その過半数は機能推定もされてきた。その結果から、動物におけるゲノム中のタンパク質コード遺伝子数は、概ね 1.5 万~4 万程度に収まっていることがわかってきた。一方で、これらの遺伝子領域は、ゲノム中の数パーセント程度に過ぎず、9 割以上の領域は、DNA の構造維持や発現制御に関わっていることが明らかになっている一部を除き、具体的機能は不明の部分が多い。また、進化的観点からみれば、染色体部分重複の産物であったり、組み換えを生じやすい部分であったりと過去の進化の痕跡や今後の生物進化の材料となる配列の可能性がある。そこで機能的配列の進化的変化の解明を目指した各種生物のゲノム配列をもとに保存性および生物種間の量的変化の解析を行い、遺伝子オントロジーレベルでのプロファイリングを得た。およそ 400 種の生物についてゲノム配列が決定・公開されている。機能的配列の進化的変化の解明を目指し、個々のゲノムデータに含まれる配列の機能モチーフ抽出を行い、遺伝子オントロジーレベルでの遺伝子プロファイリングを調べた。上記を進め、生物系統間の遺伝子機能比較データベースを構築し公開を始めた。

<http://phylomix.ibio.jp/web/spectra/level/phylum1>

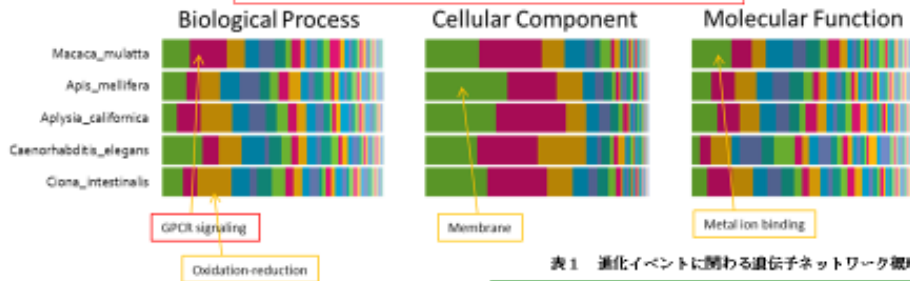
真核生物の各系統段階の遺伝子レベルにおける共通性と系統特異性の解明を目指し、NCBI で公開された真核生物 10 門 24 綱 99 目 189 属 393 種のゲノム情報を用いた遺伝子の網羅的分類と解析を行った。遺伝子同定には各プロジェクトが提供するアノテーション

情報をもとに、遺伝子機能を表す語幹の抽出加工を行うことで、種間比較を可能にした。系統分類表記には揺らぎがある。そこで複数の系統分類情報を用い手作業で曖昧性除外したデータを作成した。これらをもとに門・綱・目・属のレベルで遺伝子分類し、系統を跨いだ共通遺伝子機能の同定を行い、真核生物各系統に共通する基幹遺伝子群について、進化における役割の解析を進めた。

また、多くの遺伝子疾患は、遺伝子の非致死的变化によってもたらされる。霊長類特異的な代表的反復配列の Alu 配列は、ヒトゲノム中に 100 万コピー含まれ、長さにしてゲノムの 10-15%程度を占めるが、うち半数は約 3 万程度と言われるタンパク質コード遺伝子領域近傍に存在する。遺伝子平均 15 個程度の Alu 配列が関係し、遺伝子の非致死的变化をもたらしている可能性がある。深尾らにより、Alu 配列がスプライシングや相同性組換えに影響を与え疾患に結びつく例が複数報告されておりこの可能性を裏付けている。Alu 配列を含む全ての遺伝子領域の抽出とサブクラス同定を行った。Alu 配列そのものが選択的スプライシングや相同組換えに影響を与えるという報告や、Alu 配列が miRNA のターゲットとして働いているという報告もあるが、疾患に結びつくことが報告された例は限られている。これらを踏まえ、今後は既知の疾患原因遺伝子の情報を用いて、周辺配列の統計的特徴の抽出や疾患への影響についての説明を進める。

遺伝子スペクトルから見た生物進化

オントロジースペクトルの比較解析による進化イベントの理解



進化の系譜と主要イベント



表 1 進化イベントに関わる遺伝子ネットワーク概略

生物	進化イベント	遺伝子ネットワーク
酵母	真核生物出現	細胞内シグナル伝達系
カイン	多細胞化	細胞間シグナル伝達系
クワグ	二胚葉	細胞分化
線虫	三胚葉・体軸	細胞分化・神経系
ホヤ	腎索	中枢神経系
サカナ	HOX4 遺伝子, レンズ眼	HOX4 遺伝子, 免疫系, 感覚器系
カエル	四肢・空気呼吸	HOX 遺伝子, 循環器系
トリ	尿酸代謝	代謝系
ウシ	有胎盤化	胎盤形成・代謝系
サル	色覚回復	オプシン・視細胞系
ヒト	大脳肥大化	中枢神経系形成

ヒトの組織・器官の諸機能は進化過程を通じて形成されてきた

【研究発表】

《学会発表》

1. 遠藤俊徳 「生物種間比較プロテオミクスデータベース構築と遺伝子スペクトル比較解析」第87回日本遺伝学会大会、仙台、2015年9月24-26日（一般口頭発表、国内）

紡錘体微小管と非コード DNA 領域の相互作用による 染色体の空間的制御



田中 耕三

公募研究 代表者 (平成 24~27 年度)
東北大学加齢医学研究所

【研究目的】

遺伝情報の伝達は染色体の空間的制御によって成立しており、この制御にはゲノムの大部分を占める非コード DNA 領域が主要な役割を果たしている。本研究では、染色体が紡錘体微小管の側面への結合から末端への結合に移行することにより染色体が均等に分配されるというモデルを検証し、セントロメアを中心とした非コード DNA 領域による染色体の動態制御機構を明らかにすることを目的とする。

【研究成果】

1. 染色体が紡錘体中央に移動する機構

染色体の正確な分配には、まず染色体が紡錘体中央に整列することが必要である。我々はこの過程にキネトコアに局在するモーター分子 CENP-E と染色体腕部に局在するモーター分子 Kid が共同してはたらくことを明らかにした (Iemura and Tanaka, 2015, *Nat Commun*)。これは Kid がヒト細胞で染色体の整列に寄与することを明らかにした初めての報告であり、また紡錘体が形成される過程での微小管の安定性に応じて、Kid と CENP-E が使い分けられているというモデルを提唱した。

2. 微小管結合因子 CLIP-170 による染色体と紡錘体微小管との相互作用の制御

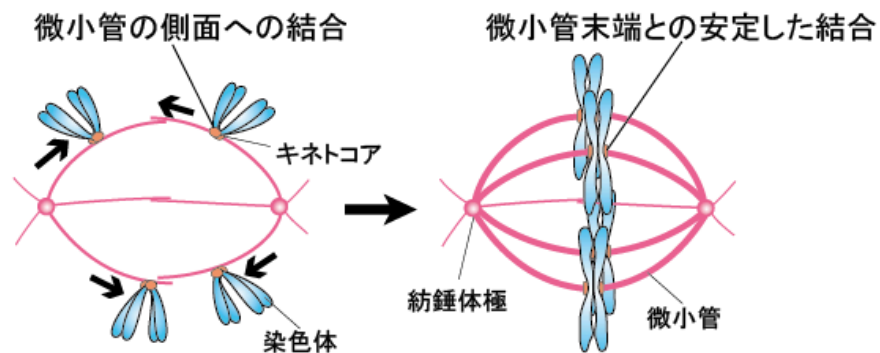
微小管結合因子 CLIP-170 は微小管側面に結合しているキネトコアに局在する。我々は CLIP-170 がモーター分子ダイニンのはたらきを抑制することにより、染色体を紡錘体微小管の先端につなぎとめるのにはたらいていることを明らかにした (Amin et al. 2015, *FEBS Lett*)。このはたらきはキネトコアが微小管の側面から末端への結合に移行する過程に関与していることが予想された。また CLIP-170 が分裂期キナーゼ Plk1 と結合してそのキネトコア局在に寄与することにより、キネトコアと微小管の結合を制御していることを明らかにした (Amin et al. 2014, *J Cell Sci*)。

3. ヘテロクロマチン結合因子 CHAMP1 の神経系の形成への関与

CHAMP1 は我々が同定したヘテロクロマチン結合因子であり、キネトコアと微小管

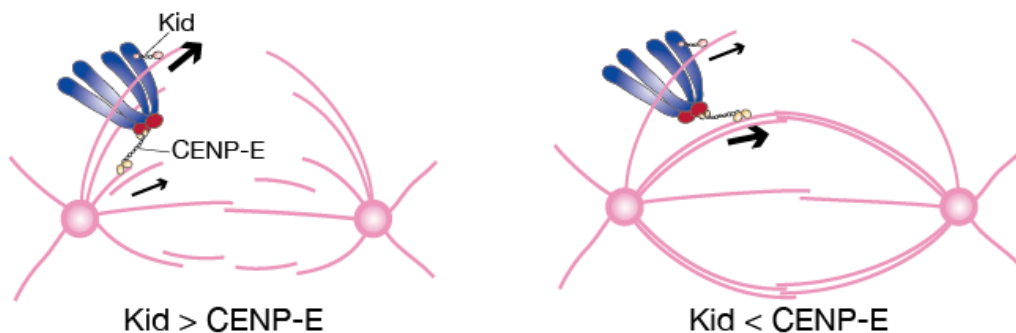
の結合の維持に参与する。我々は CHAMP1 の変異が小児の重度知的障害で認められ、これによって生じる変異 CHAMP1 タンパク質は同じく知的障害で変異を認める POGZ タンパク質との結合ができないことを明らかにした (Isidor et al. 2016, *Hum Mutat*)。このことは CHAMP1 が神経系の形成に参与しており、このはたらきには POGZ との複合体形成が必要であることを示唆している。

以上のような成果により、非コード DNA 領域と紡錘体微小管との相互作用による染色体の空間的制御に関して、染色体が微小管の側面への結合から末端への結合に移行することにより適切な結合が成立するというモデルが裏付けられた。



染色体は微小管の側面に結合して紡錘体中央へと移動し、微小管末端との安定した結合を形成する。

分裂前中期のはじめ: 微小管が不安定 分裂前中期の終わり: 微小管が安定化



微小管の側面に結合した染色体の紡錘体中央への移動には、微小管の安定性に応じて2つのモーター分子KidとCENP-Eが使い分けられている(Nat Commun, 2015)。

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Takahashi, M., Tanaka, K., Wakai, T., Hirota, T. (2016) Phosphoproteomic analysis of human mitotic chromosomes identified a chromokinesin KIF4A. *Biomed Res.* 37:161-165. (査読有り)
2. Hasanpourghadi, M., Karthikeyan, C., Pandurangan, A.K., Looi, C.Y., Trivedi, P., Kobayashi, K., Tanaka, K., Wong, W.F., Mustafa, M.R. (2016) Targeting of tubulin polymerization and induction of mitotic blockage by Methyl 2-(5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-1H-benzo[d]imidazole-5-carboxylate (MBIC) in human cervical cancer HeLa cell. *J Exp Clin Cancer Res.* 35:58. (査読有り)
3. †Isidor, B., †Küry, S. (†equally contributors), Rosenfeld, J.A., Besnard, T., Schmitt, S., Joss, S., Davies, S.J., Lebel, R.R., Henderson, A., Schaaf, C.P., Streff, H.E., Yang, Y., Jain, V., Chida, N., Latypova, X., Caignec, C.L., Cogné, B., Mercier, S., Vincent, M., Colin, E., Bonneau, D., Denommé, A.S., Parent, P., Gilbert-Dussardier, B., Odent, S., Toutain, A., Piton, A., Dina, C., Donnart, A., Lindenbaum, P., Charpentier, E., Redon, R., Iemura, K., Ikeda, M., *Tanaka, K., *Bézieau, S (*equally contributors). (2016) De Novo Truncating Mutations in the kinetochore-microtubules attachment gene *CHMP1* Cause Syndromic Intellectual Disability. *Hum Mutat.* 37:354-358. (査読有り)
4. * Amin, M.A., Kobayashi, K., *Tanaka, K. (2015) CLIP-170 tethers kinetochores to microtubule plus ends against poleward force by dynein for stable kinetochore-microtubule attachment. *FEBS Lett.* 589:2739-2746. (査読有り)
5. Ohira, M., Iwasaki, Y., Tanaka, C., Kuroki, M., Matsuo, N., Kitamura, T., Yukuhiro, M., Morimoto, H., Pang, N., Liu, B., Kiyono, T., Amemiya, M., Tanaka, K., Yoshida, K., Sugimoto, N., Ohshima, T., Fujita, M. (2015) A novel anti-microtubule agent with carbazole and benzohydrazide structures suppresses tumor cell growth in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1850:1676-1684. (査読有り)
6. Iemura, K., *Tanaka, K. (2015) Chromokinesin Kid and kinetochore kinesin CENP-E differentially support chromosome congression without end-on attachment to microtubules. *Nat Commun.* 6:6447. (査読有り)
7. *Tanaka, K. (2015) Mitosis. *eLS*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001356.pub2. (査読有り)
8. Amin, M.A., Itoh, G., Iemura, K., Ikeda, M., *Tanaka, K. (2014) CLIP-170 is required to recruit PLK1 to kinetochores during early mitosis for chromosome alignment. *J Cell Sci.* 127:2818-2824. (査読有り)
9. †Itoh, G., †Sugino, S., †Ikeda, M. (†equally contributors), Mizuguchi, M., Kanno, S.I., Amin, M.A., Iemura, K., Yasui, A., Hirota, T., *Tanaka, K. (2013) The nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis. *Cancer Sci.* 104:871-879. (査読有り)
10. *Tanaka, K. (2013) Regulatory mechanisms of kinetochore-microtubule interaction in mitosis. *Cell Mol Life Sci.* 70, 559-579. (査読有り)
11. *Tanaka, K. (2012) Dynamic regulation of kinetochore-microtubule interaction during mitosis. *J Biochem* 152:415-424. (査読有り)

《学会発表》

1. 國安絹枝, 家村顕自, 田中耕三 「効率的な染色体整列の染色体安定性への関与」 第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会、松島、2016 年 1 月 12 日-14 日 (ポスター、国内)
2. 池田真教, 田中耕三 「M 期キナーゼ Plk1 による紡錘体チェックポイント制御機構の解明」 第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会、松島、2016 年 1 月 12 日-14 日 (ポスター、国内)

3. 家村顕自, 田中耕三「赤道面に整列した染色体でのキネトコア-微小管結合修正における Aurora A の役割」第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会、松島、2016 年 1 月 12 日-14 日 (ポスター、国内)
4. 田中耕三「天然変性ハブ CAMP の機能と疾患・創薬との関連」よこはま NMR 研究会第 54 回ワークショップ、横浜、2016 年 1 月 8 日 (招待、国内)
5. 池田真教, 田中耕三「ゲノム安定性を司る紡錘体チェックポイントの新規分子機構の解明」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、神戸、2015 年 12 月 1 日-4 日 (口頭、国内)
6. 國安絹枝, 家村顕自, 田中耕三「効率的な染色体整列の染色体安定性への関与」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、神戸、2015 年 12 月 1 日-4 日 (ポスター、国内)
7. 田中耕三「効率的な染色体整列の異常による染色体不安定性の出現」第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月 8 日-10 日 (口頭、国内)
8. 小林絹枝, 家村顕自, 田中耕三「効率的な染色体整列の染色体安定性への関与」平成 27 年度がん若手研究者ワークショップ、茅野市、2015 年 9 月 2 日-5 日 (ポスター、国内)
9. Iemura K, Tanaka K “Role of Kid and CENP-E on Efficient Chromosome Alignment” International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function、淡路、2015 年 8 月 23 日-26 日 (ポスター、国際)
10. Iemura K, Tanaka K “Role of Kid and CENP-E on efficient chromosome alignment” 第 10 回研究所ネットワーク国際シンポジウム、札幌、2015 年 7 月 23 日-24 日 (口頭、国際)
11. 家村顕自, 田中耕三「効率的な染色体整列における Kid 及び CENP-E の機能解析」第 67 回日本細胞生物学会大会、東京、2015 年 6 月 30 日-7 月 2 日 (口頭、国内)
12. 田中耕三「染色体不安定性と発がん」第 9 回日本エピジェネティクス研究会、東京、2015 年 5 月 25 日-26 日 (招待、国内)
13. 家村顕自, 田中耕三「効率的な染色体整列における Kid 及び CENP-E の役割」第 81 回日本生化学会東北支部例会、仙台、2015 年 5 月 9 日 (口頭、国内)
14. Tanaka K “Chromosomal instability: a road to cancer and aging” Alfred Benzon Workshop、コペンハーゲン、2015 年 5 月 7 日 (口頭、国際)
15. 池田真教, 田中耕三「体細胞分裂期での M 期チェックポイントを制御する新規分子機構の解明」第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会、宮島、2014 年 12 月 15 日 (口頭、国内)
16. 池田真教, 田中耕三「Mps1 キナーゼの局在・活性制御機構と分裂期チェックポイントにおけるその機能的役割の解明」第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月 26 日 (口頭、国内)
17. 家村顕自, 水野夏紀, 小林絹枝, 田中耕三「効率的な染色体整列における Kid 及び CENP-E の機能解析」第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月 27 日 (口頭、国内)
18. 池田真教, 田中耕三「M 期チェックポイントキナーゼ Mps1 の活性調節機構とその機能的役割の解明」第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月 18 日 (口頭、国内)
19. 家村顕自, 伊藤剛, 田中耕三「染色体整列制御分子 CAMP は分裂期停止時におけるがん細胞の生存に寄与する」第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 27 日 (口頭、国内)
20. 池田真教「染色体恒常性の維持に必須な分裂期チェックポイント制御機構の解明」平成 26 年度がん若手研究者ワークショップ、蓼科、2014 年 9 月 5 日 (口頭、国内)

21. 田中耕三「動原体キネシン CENP-E とクロモキネシン Kid による染色体運動の制御」理研シンポジウム第 4 回分子モーター討論会、大阪、2014 年 6 月 27 日-28 日（口頭、国内）
22. 家村顕自, 伊藤剛, 池田真教, Amin MA, 田中耕三 “Chromokinesin Kid and kinetochore kinesin CENP-E differentially support chromosome congression during prometaphase” アメリカ細胞生物学会(ASCB)年会、ニューオーリンズ、2013 年 12 月 16 日（ポスター、国内）
23. 池田真教, 伊藤剛, 家村顕自, Amin MA, 田中耕三「分裂期初期におけるキネトコア—微小管結合の解析」第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 5 日（口頭、国内）
24. 家村顕自, 伊藤剛, 田中耕三「染色体整列制御分子 CAMP は分裂期停止時における細胞の生存に参与する」第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3 日（ポスター、国内）
25. 池田真教, 伊藤剛, 家村顕自, 水野夏紀, 田中耕三「染色体動態を司る動原体—微小管結合制御機構の解明」第 31 回染色体ワークショップ・第 12 回核ダイナミクス研究会、箱根、2013 年 11 月 26 日（口頭、国内）
26. 家村顕自, 田中耕三「動原体キネシン CENP-E とクロモキネシン Kid による動原体微小管非存在下の分裂期における染色体運動の制御」第 31 回染色体ワークショップ・第 12 回核ダイナミクス研究会、箱根、2013 年 11 月 26 日（口頭、国内）
27. 伊藤剛, 池田真教, 菅野新一郎, Amin MA, 家村顕自, 安井明, 広田亨, 田中耕三「核膜複合体構成因子 Nup188 による染色体分配の制御について」第 22 回複製・組換え・修復ワークショップ、仙台、2013 年 11 月 22 日（口頭、国内）
28. 伊藤剛, 安井明, 広田亨, 田中耕三「染色体分配における核膜複合体構成因子 Nup188 の機能」第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、2013 年 10 月 3 日（口頭、国内）
29. 伊藤剛, 池田真教, 菅野新一郎, Amin MA, 家村顕自, 安井明, 広田亨, 田中耕三 “Mitotic role of Nup188, a component of the nuclear pore complex” 第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013 年 9 月 11 日（口頭、国内）
30. 家村顕自, 伊藤剛, 田中耕三「分裂期での細胞周期停止持続による細胞死機構」第 46 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、仙台、2013 年 9 月 10 日（口頭、国内）
31. 伊藤剛, 池田真教, 家村顕自, Amin MA, 田中耕三「キネトコアと微小管の双方向性結合の成立過程の解析」第 65 回日本細胞生物学会大会、名古屋、2013 年 6 月 21 日（口頭、国内）
32. 伊藤剛, 杉野史朗, 池田真教, 水口万裕美, 菅野新一郎, Amin MA, 家村顕自, 安井明, 広田亨, 田中耕三「染色体分配における核膜孔複合体構成因子 Nup188 の機能」日本生化学会東北支部第 79 回例会・シンポジウム、仙台、2013 年 5 月 11 日（口頭、国内）
33. 伊藤剛, 杉野史朗, 池田真教, 水口万裕美, 菅野新一郎, Amin MA, 家村顕自, 安井明, 広田亨, 田中耕三 “The nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis” NIH-Tohoku University-JSPS Symposium、仙台、2013 年 5 月 10 日（ポスター、国内）

《和文総説》

1. 田中耕三 (2016) 「1 枚の写真館 「側面結合」との出会い」細胞工学 35、95
2. 田中耕三 (2015) 「治療標的としての Aurora キナーゼによる動原体制御」血液内科 71、712-717
3. 田中耕三 (2015) 「特集 染色体安定性制御と疾患 総論 染色体不安定性の病態生理」細胞 47、212-214

4. 田中耕三 (2013) 「分裂期チェックポイントアダプテーション阻害による抗がん剤耐性克服」 次世代がん戦略研究 Update がん基盤生物学 193-199
5. 田中耕三 (2013) 「Mad2/Mad2L2(Rev7)の構造と機能」 生化学 85、629-637
6. 田中耕三 (2013) 「染色体分配を司る動原体と微小管の相互作用」 細胞工学 32、291-296
7. 田中耕三 (2012) 「染色体分配の分子機構と関連分子を標的としたがん治療への展望」 実験医学 30、3118-3124

《受賞（若手）》

1. 第 67 回日本細胞生物学会大会若手優秀発表賞 家村顕自（若手）
2. 第 23 回加齢医学研究所研究奨励賞 家村顕自（若手）

《学会の主催》

1. 第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会合同開催、国内、2016 年 1 月 12 日～1 月 14 日、松島一の坊（松島町・宮城県）

減数分裂特異的コヒーシ複合体における相同染色体の構造変換と対合に関する解析



石黒 啓一郎

公募研究 代表者（平成 24~25 年度）
東京大学分子細胞生物学研究所
（現：熊本大学発生医学研究所）

【研究目的】

高等動物の生殖細胞では減数第一分裂に特異的なコヒーシ複合体が存在するが、その機能については大いに謎とされていた。本研究課題では、減数第一分裂における (1) 二価染色体の形成機構、(2) 染色体の axis 構造形成、(3) 姉妹動原体の接着制御、これらの分子機構に減数分裂型コヒーシ複合体が如何に関与しているのか？について検討を行った。

【研究成果】

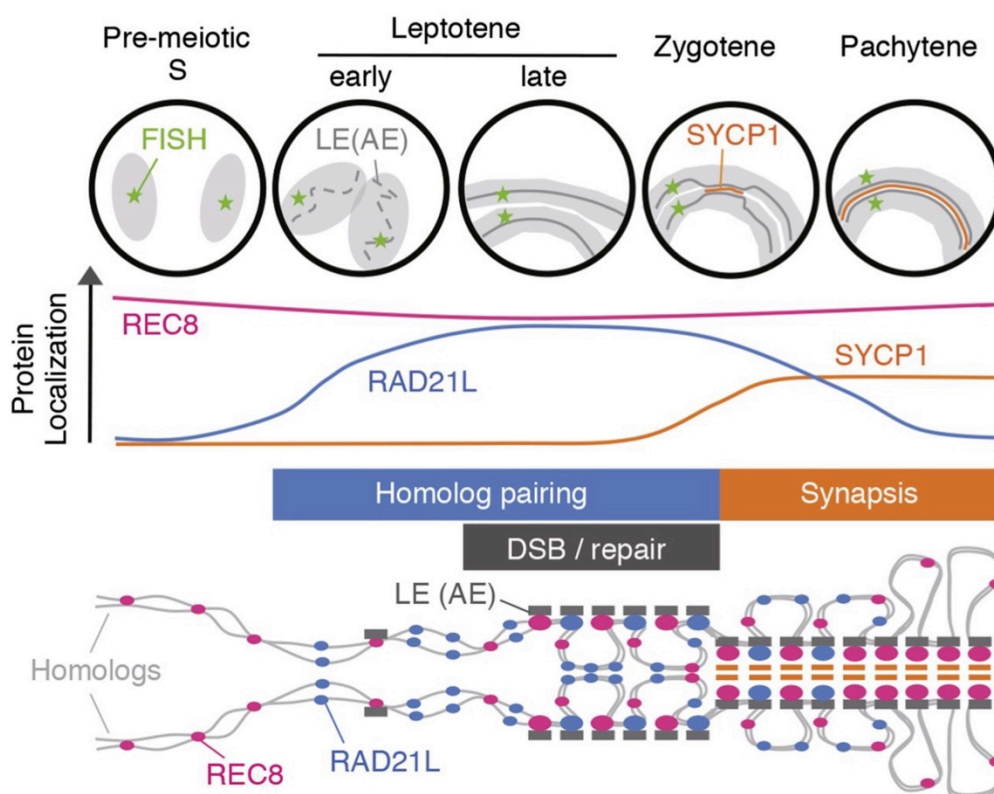
減数第一分裂期の染色体上にはAxial Element(AE) と呼ばれる軸構造が形成されており、体細胞期の染色体構造と極めて様相が異なっている。近年我々が同定したRAD21L型コヒーシ複合体は、REC8型コヒーシ複合体とともに、減数分裂期において染色体の軸構造を形成するのに何らかの役割があると推測されていた。またRAD21L型、REC8型コヒーシ複合体は相同染色体上で相互排他的局在パターンを示すことから、ゲノム一次配列上にそれぞれのコヒーシに固有の集積領域があることが示唆されていた。

公募班第1期の研究期間中には、以下の成果が上げられた。(1) immuno-FISH法の解析から、*Rad21L*欠損マウス精母細胞では組換え反応が開始されているにも拘らず、相同染色体の初期ペアリングが著しく低下することが判明した。この時、bouquet構造とよばれる染色体配置が蓄積されることから、RAD21Lが相同染色体のペアリングに大きな寄与を果たしていることが示唆された。一方、REC8を欠損させても相同染色体のペアリングへの影響は少なく、REC8は相同組換えのhomolog間へのバイアスに寄与していることが示唆された。(2) RAD21LまたはREC8をそれぞれ欠失させるとAEの長さが部分的に短くなること、さらに*Rad21L/ Rec8*二重欠損によりAE構造が完全に失われることが判明した。この事実は、深川班との共同研究で行った免疫電子顕微鏡解析からも裏付けられ、RAD21L型およびREC8型コヒーシは染色体の軸構造の形成に必須の役

割を果たしていることが判明した。(3) AE構造の主要構成因子SCP3を欠損させてもRAD21L型、REC8型コヒーシ複合体によって染色体軸構造の骨格自体は維持されていること、さらに相同染色体のペアリングは正常に達成されることが明らかにされた。

なお公募班第1期終了後も、引き続きセントロメア近傍の姉妹染色分体接着と減数分裂型コヒーシとの関連について継続して研究を進めた。その結果、MEIKINとよばれる減数第一分裂に特異的な新規セントロメア因子-MEIKINが見出された。欠損マウスの解析から、MEIKINがREC8型コヒーシのセントロメア近傍への局在を制御することにより第一分裂で見られる還元型の染色体分配に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

Schematic models of homolog pairing in mouse spermatocytes.



Ishiguro K et al. *Genes Dev.* 2014;28:594-607

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Ishiguro K., Watanabe Y. (2016). REC8-cohesin prevents illegitimate inter-sister SC assembly. *EMBO Rep.* 17:783-784. (News & Views) (査読なし)
2. Kumar R., Ghyselinck N., Ishiguro K., Watanabe Y., Kouznetsova A., Höög C., Strong E., Schimenti J., Daniel K., Toth A., *de Massy B.: (2015). MEI4, a central player in the regulation of meiotic DNA double strand break formation in mouse: *J Cell Sci.* 128: 1800-1811. (査読有り)
3. (†: equally contributed)†Kim J, †Ishiguro K., Nambu A., Akiyoshi B., Yokobayashi S., Kagami A., Ishiguro T., Pendas A.M., Takeda N., Sakakibara Y., Kitajima T.S., Tanno Y., Sakuno T., *Watanabe Y. (2014). Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function: *Nature* 517:466-471. Epub 2014 Dec 24 (査読有り)
4. Ishiguro K., Kim J, Shibuya H, Hernández-Hernández A, Suzuki A, Fukagawa T, Shioi G, Kiyonari H, Li XC, Schimenti J, Höög C, *Watanabe Y. (2014). Meiosis-specific cohesin mediates homolog recognition in mouse spermatocytes. *Genes Dev.* 28: 594-607. (査読有り)
5. Shibuya H, Ishiguro K., *Watanabe Y. (2014). The TRF1-binding protein TERB1 promotes chromosome movement and telomere rigidity in meiosis. *Nat Cell Biol.* 16:145-156. (査読有り)
6. Belzil C., Asada N., Ishiguro K., Nakaya T., Parsons K., Pendolino V., Neumayer G., Mapelli M., Nakatani Y., Sanada K., *Nguyen MD. (2014). p600 regulates spindle orientation in apical neural progenitors and contributes to neurogenesis in the developing neocortex. *Biol OPEN* 8 :475-485. (査読有り)
7. (†: equally contributed) †Nakaya T., †Ishiguro K., Belzil C., Rietsch A.M., Yu Q., Mizuno S., Bronson R.T., Geng Y., Nguyen M.D., Akashi K., Sicinski P., *Nakatani Y. (2013). p600 Plays Essential Roles in Fetal Development., *PLoS One* 8(6): e66269 (査読有り)
8. Kim J., *Ishiguro K., Kudo N., Watanabe Y. (2012). Meiosis specific cohesins in mouse embryonic oocytes. *Methods in Mol Biol.* 957: 47-57. (査読なし)
9. Morimoto A, Shibuya H, Zhu X, Kim J, Ishiguro K., Han M, *Watanabe Y. (2012). A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J Cell Biol.* 198:165-172. (査読有り)

《学会発表》

1. 石黒啓一郎: 減数分裂期に特異的な染色体構造変換とコヒーシン複合体の役割、 遺伝研研究会、三島、 2013年9月28日 (一般口頭、国内)
2. Kei-ichiro Ishiguro, Jihye Kim, Abrahan Hernandez, Aussie Suzuki, Tatsuo Fukagawa, Christer Höög, Yoshinori Watanabe. Cohesin mediates DSB-independent homolog pairing in mouse meiosis 日本分子生物学会ワークショップ、福岡、2012年12月13日 (招待、国内)
3. 石黒啓一郎、金智慧、渡邊嘉典：減数分裂特異的コヒーシンの解析、生殖サイクルシンポジウム、京都、2012年11月19日(一般口頭、国内)
4. Kei-ichiro Ishiguro, Jihye Kim, Abrahan Hernandez, Aussie Suzuki, Tatsuo Fukagawa, Christer Höög, Yoshinori Watanabe. The REC8- and RAD21L-cohesins promote the initial homolog pairing in mouse spermatocytes. Gordon Research Conference, New Hampshire, U.S.A., 2012年6月3日 (招待、国際)
5. 石黒啓一郎、金智慧、鈴木應志、深川竜郎、渡邊嘉典：減数分裂特異的コヒーシン複合体の相同染色体のペアリング過程における役割、2012染色体ワークショップ、仙台、2012年1月27日(一般口頭、国内)
6. 石黒啓一郎、金智慧、渡邊嘉典：減数分裂特異的染色体因子の解析 生殖サイクルシ

ンポジウム、大阪、2011年11月12日(一般口頭、国内)

7. Kei-ichiro Ishiguro, Jihey Kim, Yoshinori Watanabe :A novel meiosis specific MeiRad21L cohesin is implicated in “cohesin code” for chromosome dynamics in mammalian meiosis 染色体ワークショップ、小松、2011年1月11日 (一般口頭、国内)

《和文総説》

1. 石黒啓一郎, 金智慧、渡邊嘉典(2015) 減数第一分裂に特異的な染色体分配を制御する新規動原体因子 MEIKIN: 実験医学 Current Topics , vol33, No9, 1427-1431
2. 秋山智彦, 小田真由美, 石黒啓一郎, 洪繁, 洪実(2015)マウス ES 細胞の染色体安定性を制御するエピゲノム機構: 細胞工学 Vol.34 (11), 1052-1056
3. 石黒啓一郎, 金智慧、渡邊嘉典(2015) 減数第一分裂に特異的な染色体分配の司令塔としてはたらく新規動原体因子 MEIKIN: ライフサイエンス新着論文レビュー,大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構ライフサイエンス統合データベースセンター, URL : <http://first.lifesciencedb.jp/archives/9704>
4. 石黒啓一郎、渡邊嘉典(2013) 減数分裂特異的コヒーシと染色体異数性疾患: 実験医学 vol31, No6, 2578-2585

胚操作によって誘導されるエピゲノム変化



幸田 尚

公募研究 代表者（平成 24~25 年度）
東京医科歯科大学難治疾患研究所

【研究目的】

本研究では顕微授精（ICSI）などの初期胚への介入による遺伝子発現への影響を指標として、反復配列などのインターメアの調節単位としての機能を明らかにすることを目的とした。このため、ICSI によって最初に影響を受ける遺伝子を同定するとともにマウス系統ごとの違いを解析し、反復配列などのインターメアとの関連を明らかにすることを計画した。

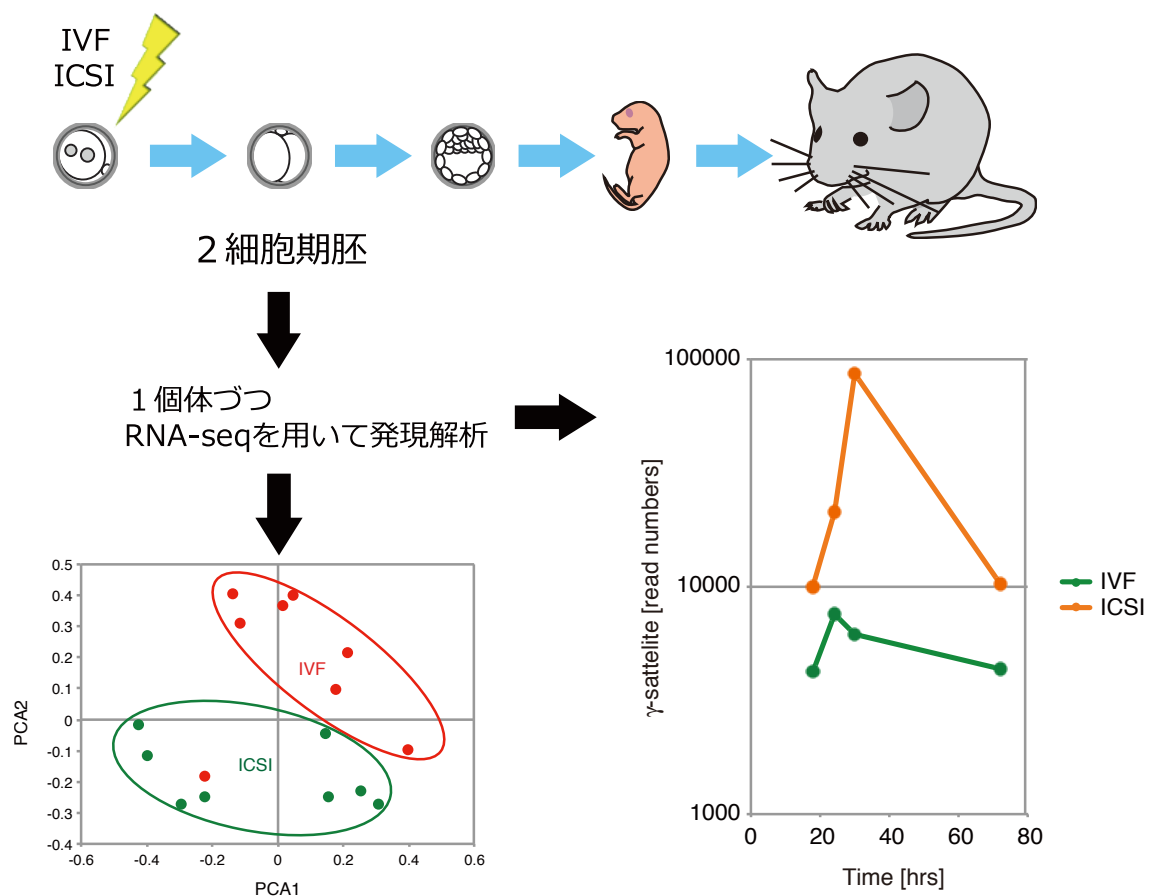
【研究成果】

これまで我々はマウスを用いた研究で、ICSI によって受精し生まれたマウスは、自然交配によって生まれたマウスと比較すると新生仔期における遺伝子発現が異なること、影響を受ける遺伝子がマウスの系統によって異なることを見いだしてきた。そこで、ICSI により遺伝子発現に影響を最初に受ける遺伝子を同定し、マウス系統間での応答の違いも含めて解析することで、系統の違いによる反復配列の挿入や欠失などとの関連を明らかにすることを目指して研究を行った。

まず、単一のマウス初期胚から遺伝子発現プロファイルを取得するため、マウス 2 細胞期胚一つから極微量の RNA を抽出し、T7-RNA polymerase を用いて cRNA を増幅し、RNA-seq を行う実験系を確立した。この手法を用いて、マウスの 2 細胞期胚から桑実胚期の初期胚の遺伝子発現プロファイルを経時的に取得した。この際、C57BL/6 の卵と DBA2 の精子を用いて受精させた胚の解析を行うとともに、DBA2 の卵と C57BL/6 の精子を用いて受精させた胚の解析もあわせて行った。系統間の多型を用いて父親由来、母親由来のアレルを分けて遺伝子発現解析を行うことで、未受精卵由来の maternal RNA を除いた zygotic RNA として父親由来、母親由来のアレル特異的な発現を示す遺伝子を多数同定した。

また通常の体外受精胚と ICSI 胚とを同様に比較し、2 細胞期胚において ICSI の影響を受ける遺伝子を同定するとともに、片アレルのみで ICSI の影響を受ける遺伝子も同定することができた。さらに、レトロトランスポゾンなどを含む反復配列の転写物の解析を行ったところ、2 細胞期胚においてセペリセントリック領域の反復配列である γ

サテライトから転写される RNA 量が ICSI によって受精した胚では顕著に増加することを見いだした。このことは、受精や初期発生段階に ICSI などの介入を行うと反復配列のエピジェネティックな修飾の変化を伴う遺伝子発現の変化が引き起こされる可能性を示唆している。



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Kohda T, Ishino F. (2013) Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1609):20120353 (査読有り)
2. Kohda T. (2013) Effects of embryonic manipulation and epigenetics. *J Hum Genet* 58(7): 416-420 (査読有り)

《学会発表》

1. 幸田尚「顕微授精によって誘導される遺伝子発現の変化」第6回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年5月15-16日、東京（ポスター、国内）
2. 幸田尚「顕微授精によって最初に誘導される遺伝子発現調節の変化」第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡（一般口頭発表、国内）
3. Kohda T “Gene expression changes induced by intracytoplasmic sperm injection.” 11th Transgenic Technology Meeting、2013年2月25-27日、中国・広州（招待、国際）
4. 幸田尚、高木清考、及川真実、越後貫成美、井上貴美子、小倉淳郎、金児-石野知子、石野史敏「マウスを用いた初期胚の父系発現遺伝子の同定」第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2013年5月30-31日、奈良（ポスター、国内）
5. 幸田尚「マウス初期胚のエピジェネティックな非対称性と遺伝子発現」大阪大学蛋白質研究所セミナーDNAメチル化の制御機構ーメチル化模様形成、維持と消去ー、2013年11月1日、大阪（招待、国内）
6. 幸田尚、高木清考、及川真実、越後貫成美、井上貴美子、小倉淳郎、金児-石野知子、石野史敏「マウス初期胚で顕微授精によって誘導される遺伝子発現調節の変化」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸（ポスター、国内）

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 講演 着床前の遺伝子発現制御と体外受精 ART FORUM（受精着床学会サテライトシンポジウム） 2014.7.31.

非コード DNA 領域が制御する分裂酵母接合型変換の動態解析



筒井 康博

公募研究 代表者 (平成 24~25 年度)
東京工業大学大学院生命理工学研究科

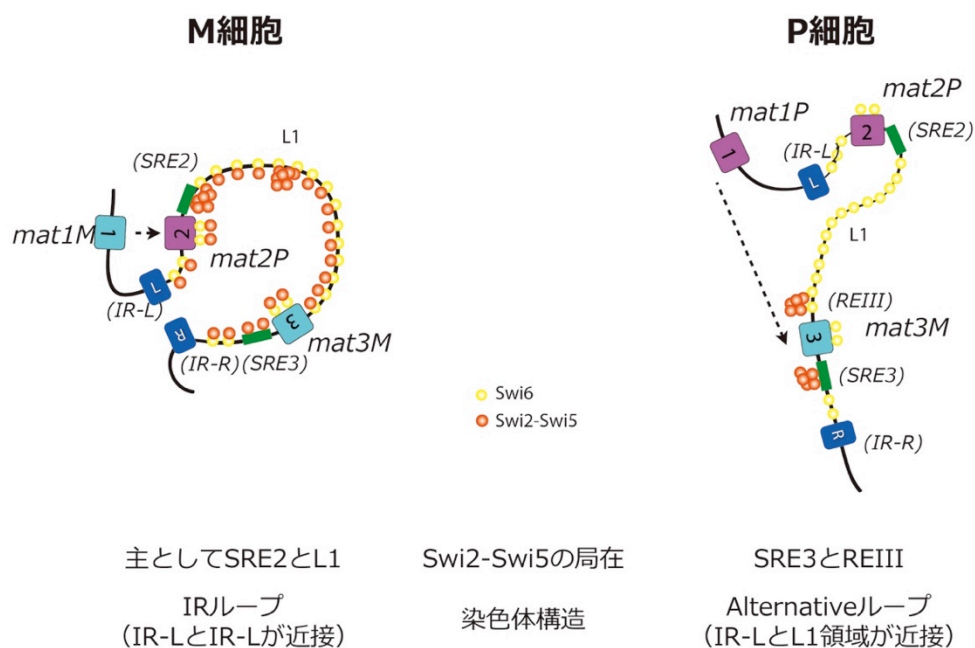
【研究目的】

生物に普遍的な生命現象である DNA 相同組換えは、生物種多様性の創出やゲノムの安定維持機構に深く関わっている。近年、その分子機構の理解は著しく深まってきた一方で、核内で空間的に大きく離れた相同な DNA をどのように検索するのかというマクロ分子としての空間的機能理解は極めて乏しい。そこで、分裂酵母の接合型変換をモデルとして、この空間的機能の解明を試みた。

【研究成果】

分裂酵母の接合型は *mat1* 遺伝子座の遺伝情報によって決定され、「*plus(P)*」の遺伝情報が入っている細胞は P 細胞、「*minus(M)*」遺伝情報が入っている細胞は M 細胞となる。ホモタリクな野生型株 (h^{90}) においては、*mat1* とその下流に位置するサイレントな遺伝子座 (*mat2P* あるいは *mat3M*) との間で遺伝子変換を介した接合型変換が規則的に起こっている。この変換は *mat1* の下流にプログラムされた二重鎖切断が形成されることで生じる、Rad51 リコンビナーゼ依存的な組換え反応である。この際、P 細胞は *mat3M* を、M 細胞は *mat2P* をドナーとして選択するという方向性制御が存在する。過去に単離された接合型変換 (Swi) タンパク質群のうち「クラス Ib」に分類される、Swi2-Swi5 複合体と Swi6 (ヒト HP1 ホモログ) がドナー選択に関与すると考えられており、さらに、接合型変換領域に存在する複数の非コード DNA 領域 (インターメア) の関与が示唆されている。しかしながら、これらの因子がどのようにドナー選択の方向性を制御するかについては不明な点が多い。そこで、空間的近傍に位置する染色体領域の検出に優れた解析手法である Chromosome Conformation Capture(3C)法によって、接合型変換における 2 つの相同な DNA の核内動態を観察した。その結果、接合型変換領域の構造が接合型で異なっており、選択されるべきドナーが *mat1* と空間的に近接する立体構造となっていることが示唆された。一方、酵母 Two-hybrid スクリーニングによって Swi2 相互作用因子の検索を行ない、複数の新規クラス Ib タンパク質候補を同定した。今回 Swi2 相互作用因子として同定した Chp2、Orc 複合体の局在を ChIP-seq 法で調べたところ、Swi2 の局在との類似性がみられ、接合型変換のドナー選択への関与が示唆された。今

後、Class1b タンパク質および Swi2 相互作用因子が接合型変換領域の立体構造にどのような影響を与えるかを 3C 法で解析することで、接合型変換時のドナー選択がどのように制御されているかが明らかになるものと期待される。



Chromosome conformation capture (3C)解析結果から予想される 接合型変換領域の染色体構造の模式図

※カッコ内は非コードDNA配列を示す。

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. *Tsutsui, Y., Y. Kurokawa, K. Ito, M.S. Siddique, Y. Kawano, F. Yamao, and H. Iwasaki* (2014). Multiple regulation of Rad51-mediated homologous recombination by fission yeast Fbh1. *PLoS Genet.* 10: e1004542. (査読有り)
2. Fornander, LH, A. Renodon-Cornière, N. Kuwabara, K. Ito, Y. Tsutsui, T. Shimizu, H. Iwasaki, B. Nordén, and M. Takahashi (2014). Swi5-Sfr1 protein stimulates Rad51-mediated DNA strand exchange reaction through organization of DNA bases in the presynaptic filament. *Nucleic Acids Res.* 42: 2358-2365. (査読有り)
3. Murayama Y, Y. Kurokawa, Y. Tsutsui, and H. Iwasaki (2013). Dual regulation of Dmc1-driven DNA strand exchange by Swi5-Sfr1 activation and Rad22 inhibition. *Genes Dev.* 27: 2299-2304. (査読有り)
4. Yoshikawa, M., T. Iki T, Y. Tsutsui, K. Miyashita, R.S. Poethig, Y. Habu, and M. Ishikawa (2013). 3' fragment of miR173-programmed RISC-cleaved RNA is protected from degradation in a complex with RISC and SGS3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110: 4117-4122. (査読有り)
5. Iida, T., N. Iida, Y. Tsutsui, F. Yamao, and T. Kobayashi (2012). RNA interference regulates the cell cycle checkpoint through the RNA export factor, Ptr1, in fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 427:143-147. (査読有り)
6. Kuwabara, N., Y. Murayama, H. Hashimoto, Y. Kokabu, M. Ikeguchi, M. Sato, K. Mayanagi, Y. Tsutsui, H. Iwasaki, and T. Shimizu (2012). Mechanistic insights into the activation of Rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the Swi5-Sfr1 complex. *Structure* 20: 440-449. (査読有り)

《学会発表》

1. Yasuhiro Tsutsui “Fbh1 versatilely regulates Rad51-mediated homologous recombination in fission yeast” 9th 3R Sumposium, 日本、2014年11月17-24日 (一般口頭、国際)
2. 筒井康博、黒川裕美子、伊藤健太郎、川野由美子、山尾文明、岩崎博史「分裂酵母Fボックスヘリカーゼによる相同組換えの多面的制御機構」第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月16日 (招待、国内)
3. Yasuhiro Tsutsui “Fission yeast Fbh1 regulates Rad51-mediated homologous recombination” 4th RecA meeting、韓国、2014年10月5-8日 (一般口頭、国際)
4. Yasuhiro Tsutsui “Multiple regulation of Rad51-mediated homologous recombination by fission yeast Fbh1” The 3rd RecA meeting、フランス、2013年10月3-4日 (一般口頭、国際)
5. Yasuhiro Tsutsui, Yumiko Kurokawa, Yumiko Kawano, Fumiaki Yamao, Hiroshi Iwasaki “Dual roles of fission yeast F-box DNA helicase, Fbh1 during homologous recombination” 7th International Fission Yeast Meeting、ロンドン、2013年6月24-29日 (ポスター、国際)
6. 筒井康博、黒川裕美子、川野由美子、山尾文明、岩崎博史「相同組換えにおける分裂酵母Fbh1ヘリカーゼの2つの役割」日本遺伝学会第85回大会、横浜、2013年9月19-21日 (一般口頭、国内)
7. Yasuhiro Tsutsui “Biochemical characterization of Fbh1 helicase toward a better understanding of molecular mechanism of Rad51-mediated DNA strand exchange reaction” The 2nd RecA meeting、京都、2012年11月28-30日 (一般口頭、国際)
8. 筒井康博「分裂酵母接合型変換におけるドナー選択機構の解析」第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11-14日 (招待、国内)
9. Yasuhiro Tsutsui, Yumiko Kurokawa, Hiroshi Iwasaki “Dual roles of fission yeast F-box DNA helicase Fbh1 during homologous recombination” The 8th 3R Symposium、兵庫、2012年11月25-28日、 (ポスター、国際)

ヒトゲノムにおける Alu 配列の遺伝性疾患，遺伝的多様性に与える影響に関する研究



深尾 敏幸

公募研究 代表者（平成 24~27 年度）

岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学

【研究目的】

Alu 配列は霊長類に特異的に認められる配列であり，遺伝性疾患を引き起こす一方で遺伝的多様性を与えてきたと考えられる．この両面について明らかにするのが本研究の目的である．1) 遺伝性疾患を引き起こす面は MLPA 法をケトン体代謝異常症を中心に 5 疾患を対象として確立し，Alu 配列の引き起こす挿入欠失例を同定する．2) Alu 配列の引き起こす遺伝的多様性については Alu 配列の近傍エクソン認識（スプライシング）に与える影響について mini-gene splicing experiments を用いて解析をすすめ，どのような条件のときに Alu 配列はスプライシングに影響するのか？ について解析を行う．

【研究成果】

Alu 配列は遺伝性疾患を引き起こす: ミトコンドリアアセトアセチル-CoA チオラーゼ (T2) 欠損症について，MLPA 法を確立しイントロン内の Alu 配列間での非同一相同組換えによる欠失，重複による 3 つの遺伝子再構成を検出できることを示した．さらに新たにエクソン 2-3 を欠失する遺伝子再構成について同定し，それも Alu 配列間での非同一相同組換えによる欠失であることを明らかにした．HMG-CoA lyase 欠損症についても MLPA 法を確立し，通常の遺伝子解析で一方の変異を同定出来なかった 2 例について MLPA 法で解析し，1 例ではヘテロ接合でのエクソン 2-4 の欠失を証明し，その切断点のイントロン 1 側が Alu 配列内であることを明らかにした．またもう 1 例では MLPA 法の結果から，Alu 配列の関与する遺伝子再構成ではなく，Uniparental disomy が病因であることが示唆され，マイクロアレイ解析にて証明することができた．

Alu 配列の引き起こす遺伝的多様性: ACAT1 遺伝子イントロン 9 へ，元々イントロン 6 に存在した Alu 配列のタンデムに並んだ配列を逆方向 (AluYc—AluSz—AluSx の順) で挿入した場合，mini—gene splicing 実験でエクソン 10 をスキップさせることを明らかにした．この Alu 配列の影響はエクソン 10 内の exonic splicing enhancer の変異と相加的に働き，またエクソン 10 の最初の塩基を C から G に置換すると消失するこ

とを明らかにした。これはスプライス部位の弱いときにはじめてイントロン内の Alu 配列がスプライシングに影響することが示唆した。さらにこの AluYc—AluSz—AluSx を1つの AluSx のみとしてもエクソン10スキップが生じた。一方同じイントロン10の上流に存在した正方向の AluJo を取り除くと、エクソン10をスキップする効率は低下した。続いて AluSx の位置をエクソン10に近づけるとスキップする効果が強くなった。このようにイントロン上の逆方向に挿入された Alu 配列はその位置、周りの Alu の存在に影響されつつエクソン10スキップを来すことが明らかになった。現在もこの解析を継続しており、さらに詳細な constructs を作成している。

Alu配列

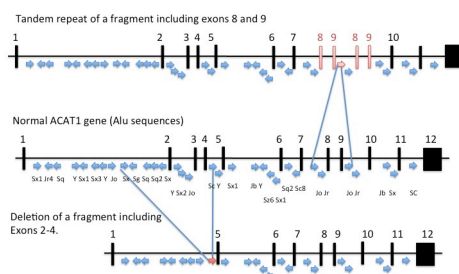
疾患を引き起こす

多様性を引き起こす

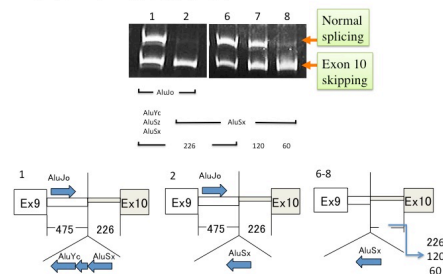
Alu挿入による遺伝子の不活化
Alu配列間での非同義相同組換えによる遺伝子再構成

Alu配列挿入によるスプライシング効率の変化
Alternative splicing
RNA editing

イントロンのAlu配列間で非同義相同組換えによる遺伝子再構成



イントロン内のAlu配列は近傍のスプライシングに影響を与える



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Fukao T, Maruyama S, Ohura T, Hasegawa Y, Toyoshima M, Haapalainen AM, Kuwada N, Imamura M, Yuasa I, Wierenga RK, Yamaguchi S, Kondo N. Three Japanese patients with beta- ketothiolase deficiency whoshare a mutation , c.431A>C(H144P) in ACAT1: subtle abnormality in urinary organic acid analysis and blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry. *JIMD reports* 3:107-115, 2012 (査読有り)
2. Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Fukao T, Yamaguchi S. Clinical and Molecular Aspects of Japanese Children with Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Mol Genet Metab* 107(1-2):237-40, 2012 (査読有り)
3. Hori T, Fukao T, Murase K, Sakaguchi N, Harding CO, Kondo N. Molecular basis of two exon skipping (exons 12 and 13) by c.1248+5g>a in OXCT1 gene. Study on intermediates of OXCT1 transcripts in fibroblasts. *Hum Mutat* 34:473-480, 2013.
4. Shafqat N, Kavanagh KL, Sass JO, Christensen E, Fukao T, Lee WH, Oppermann U, Yue WW. A structural mapping of mutations causing succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 36(6):983-987, 2013. (査読有り)
5. Buhaş D, Bernard G, Fukao T, Lortie A, Décarie J-C, Chouinard S, Mitchell GA. A treatable new cause of cholea:beta-ketothiolase deficiency. *Movement Disorders* 28:1054-1056, 2013 (査読有り)
6. Fukao T, Aoyama Y, Murase K, Hori T, Wierenga R, Boneh A, Kondo N: Development of MLPA for Human ACAT1 Gene and Identification of a Heterozygous Alu-mediated Deletion of Exons 2 and 3 in a Patient with Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase (T2) Deficiency. *Mol Genet Metab*, 110:184-187, 2013 (査読有り)
7. Akella RR, Aoyama Y, Mori C, Lingappa L, Cariappa R, Fukao T: Metabolic encephalopathy in beta-ketothiolase deficiency: The first report from India. *Brain Dev*. 2014 Jun;36(6):537-40 (査読有り)
8. Fukao T, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y. The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. *J Hum Genet* 59:609-14, 2014 (査読有り)
9. Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyo P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain Dev* 37:698-703, 2015 (査読有り)
10. Aoyama Y, Yamamoto T, Sakaguchi N, Ishige M, Tanaka T, Ichihara T, Ohara K, Kouzan H, Kinoshita Y, Fukao T. Application of Multiplex ligation-dependent probe amplification and identification of a heterozygous Alu-associated deletion and a uniparental disomy of chromosome 1 in two Japanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Int J Mol Med* 35: 1554-1560, 2015 (査読有り)
11. Fukao T, Mitchell G, Saas JO, Hori T, Orii K, Aoyama Y: Ketone body metabolism and its defects. *J Inherited Metab Dis* 37:541-551, 2014 (査読有り)
12. Hori T, Yamaguchi S, Shintaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Hakayanagi M, Fukao T: Inborn errors of ketone body utilization. *Pediatr Int* 57:41-48, 2015 (査読有り)
13. Elsayed Abdelkreem, Hiroki Otsuka , Hideo Sasai , Yuka Aoyama, Tomohiro Hori, Mohamed Abd El Aal, Shaimaa Mahmoud, Toshiyuki Fukao: Beta-ketothiolase deficiency: Resolving challenges in diagnosis. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening* 4:1-9, 2016 (査読有り)

《学会発表》

1. 深尾敏幸: 分野別シンポジウム 4-3 「有機酸代謝異常症の治療戦略」第 115 回日本小児科学会学術集会(平成 24 年 4 月, 福岡) (国内シンポジウム)
2. 深尾敏幸: 学会賞受賞講演「ケトン体代謝異常症の病態解明に関する研究」第 54 回日本先天代謝異常学会総会/第 11 回アジア先天代謝異常症シンポジウム(平成 24 年 11 月, 岐阜) (国内 特別講演)
3. 深尾敏幸: シンポジウム「若手の人材育成, 臨床能力の修得戦略」第 54 回日本先天代謝異常学会総会/第 11 回アジア先天代謝異常症シンポジウム(平成 24 年 11 月, 岐阜) (国内、シンポジウム)
4. Fukao T: (Workshop) Keton body metabolism and its defects. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism(2013.09, Barcelona) (国外 招待講演)
5. Fukao T: Educational lecture9; Inborn errors of ketogenesis and ketone body utilization The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases(ACIMD)/The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Interited Metabolic Diseases(JSIMD)(2013.11, Maihama, Chiba) (国内、教育講演)
6. Fukao T, Hori T, Sasai H, Ohtsuka H, Kimura T, Aoyama Y: Alu elements insertions into intron 9 affect exon 10 recognition with a suboptimal splice acceptor site in human ACAT1 gene. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, 2-5 September, Innsbruck, 2014 (国際, ポスター)
7. Fukao T: Clinical Importance of ketone body metabolism and its defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism and 3rd National Conference of ISIEM, Sep 19-21, Hyderabad(India), 2014 (国際 招待講演)
8. 青山友佳、市原朋子、山本俊至、大原克明、深尾敏幸: HMG-CoAリアーゼ欠損症においてMLPA法を用いた 1 症例におけるUniparental disomyの同定. 日本マススクリーニング学会 8 月 22-23 日 広島 2014 (国内, 口演)
9. 赤川翔平、保坂泰介、石井紘介、寺口正之、村上貴孝、岡府寺美、木野稔、深尾敏幸、青山友佳、重松陽介: ケトン性低血糖発作を契機に診断したHSD10病の4歳男児. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014 (国内, 口演)
10. 折居建治、森本将敬、笹井英雄、松井永子、村上圭、大竹明、深尾敏幸: 新生児期発症ミトコンドリア呼吸鎖複合体IV型異常症の姉弟例の検討 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014
11. 小林正久、深尾敏幸、重松陽介、長谷川有紀、村山圭、井田博幸: 本邦初の乳児期発症のHSD10病症例. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014 (国内, 口演)
12. 青山友佳、山本俊至、坂口直美、石毛美夏、田中藤樹、市原朋子、大原克明、深尾敏幸: HMG-CoAリアーゼ (HMGCL) 遺伝子のMLPA法確立とHMGCL欠損症1症例におけるUniparental disomyの同定. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014 (国内, 口演)
13. 笹井英雄 北澤徹三 木村豪 川本典生 川本美奈子 深尾敏幸 下澤伸行, 山本崇裕: 経過中に大脳白質病変を呈したホモシスチン尿症の 1 例. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014 (国内, 口演)
14. 伊藤哲哉 中島葉子 加藤沙耶香 深尾敏幸: ミトコンドリアHMG-CoA合成酵素欠損症の急性期症状. 第 56 回日本先天代謝異常学会 11 月 12-15 日 仙台、2014 (国内, 口演)

15. 深尾敏幸、堀友博、笹井英雄、大塚博樹、青山友佳: ACAT1遺伝子のイントロン9へのAlu挿入はエクソン10の認識に影響を与える。第56回日本先天代謝異常学会 11月12-15日 仙台、2014 (国内, 口演)
16. Fukao T: (Plenary lecture) Ketolysis and Ketogenesis Defects. XIII Metabolic Diseases and Nutrition Congress. April 14-18, Adana (Turkey) 2015 (国際 招待講演)
17. Fukao T: Metabolism of ketone bodies and its defects. X Congreso Latinoamericano De Errores Innatos Del Metabolismo Y Pesquisa Neonatal November 17-20 Santiago (Chile) 2015 (国際 招待講演)
18. Fukao T: (plenary lecture) Organic acidemia and beta-oxidation defects: expanded neonatal screening in Japan. X Congreso Latinoamericano De Errores Innatos Del Metabolismo Y Pesquisa Neonatal November 17-20 Santiago (Chile) 2015 (国際 招待講演)
19. Sasai H, Shimozawa N, Kawamoto N, Yamamoto T, Kimura T, Kawamoto M, Fukao T: Successive MRI and MRS findings during the course of a reversible cerebral white matter lesion due to hypermethioninemia in a patient with homocystinuria. 4th Asian Congress for Inherited Metabolic Disease 2015 March 20-21, Taipei, 2015 (国際, ポスター)
20. Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hori T, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y. Three patients with HSD10 disease in Japan. 4th Asian Congress for Inherited Metabolic Disease 2015 March 20-21, Taipei, 2015 (国際, ワークショップ)
21. Sasai H, Aoyama Y, Ohtsuka H, Ohara O, Fukao T: OXCT1 heterozygous carriers could develop severe ketoacidotic episodes in conjunction with ketogenic stresses. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 1-4, Lyon (FRANCE) 2015 (国際, ポスター)
22. Bo R, Purevsuren J, Fukao T, Yamada K, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Clinical and Genetic investigation of Japanese 16 patients with trifunctional protein deficiency. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 1-4, Lyon (FRANCE) 2015 (国際, ポスター)
23. Fukao T, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y: Two patients with atypical form and one with infantile form of HSD10 disease were identified in Japan. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 1-4, Lyon (FRANCE) 2015 (国際, ポスター)
24. Djouadi F, Habarou F, Bachelier C, Ferdinandusse S, Schlemmer D, Benoist JF, Boutron A, Andresen BS, Visser G, Lonlay P, Olpin S, Fukao T, Yamaguchi S, Strauss AW, Wanders RJA, Bastin J: Mitochondrial trifunctional protein deficiency in human cultured fibroblasts: effects of bezafibrate. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 1-4, Lyon (FRANCE) 2015 (国際, ポスター)
25. Mungan O, Yilmaz BS, Kor D, Bulut D, Okten M, Yildizdas D, Ceylaner S, Fukao T: Report of Five Turkish patients with ketolytic defects and four novel mutations. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 1-4, Lyon (FRANCE) 2015 (国際, ポスター)
26. Nakajima Y, Fukao T, Nakano Y, Sasai H, Aoyama Y, Kato S, Hasegawa Y, Sakai Y, Yoshikawa T, Ito T: First two patients with mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency in Asia. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 1-4, Lyon (FRANCE) 2015 (国際, ポスター)
27. 深尾敏幸、中村公俊、伊藤哲哉、大竹明、窪田満、小林弘典、長谷川有紀、坂本修、清水教一、但馬剛、小林正久、村山圭、福田冬季子、濱崎考史、遠藤文夫: 新しい診療ガイドラインについて。シンポジウム タンデムマス似よる代謝異常スクリーニングの現状の問題点と今後の展望。第42回日本マススクリーニング学会学術集会 平成27年8月21日-22日 東京 (国内 シンポジウム)

28. 大塚博樹、笹井英雄、青山友佳、川本典生、川本美奈子、松井永子、深尾敏幸、沼倉周彦、早坂清：シトリン欠損症の兄妹例で行ったグルコース負荷試験結果およびMCTオイル投与の効果。第57回日本先天代謝異常学会総会、第13回アジア先天代謝異常症シンポジウム 平成27年11月12日～14日 大阪 (国内 口演)
29. 笹井英雄、青山友佳、大塚博樹、堀友博、藤木亮次、小原收、深尾敏幸：OXCT1ヘテロキャリアーでもケアアシドーシス発作を起こしうる。第57回日本先天代謝異常学会総会、第13回アジア先天代謝異常症シンポジウム 平成27年11月12日～14日 大阪 (国内 口演)
30. 李知子、浜平陽史、小林弘典、長谷川有紀、山口清次、笹井英雄、大塚博樹、深尾敏幸、飯島一誠、竹島泰弘：インフルエンザ罹患を機に意識障害を呈し、ミトコンドリアHMG-CoA合成酵素欠損症と診断した一例。第57回日本先天代謝異常学会総会、第13回アジア先天代謝異常症シンポジウム 平成27年11月12日～14日 大阪 (国内 口演)
31. 中島葉子、深尾敏幸、加藤沙耶香、中野優、笹井英雄、青山友佳、長谷川有紀、酒井好美、吉川哲史、伊藤哲哉：ミトコンドリアHMG-CoA合成酵素欠損症の2例における臨床的、生化学的共通点。第57回日本先天代謝異常学会総会、第13回アジア先天代謝異常症シンポジウム 平成27年11月12日～14日 大阪 (国内 口演)
32. 深尾敏幸、小林正久、中村公俊、松本志郎、但馬剛、小林弘典、長谷川有紀、濱崎考史、坂本修、伊藤哲哉：新生児マススクリーニング対象先天代謝異常症の遺伝子パネルによる遺伝子型同定の試み。第57回日本先天代謝異常学会総会、第13回アジア先天代謝異常症シンポジウム 平成27年11月12日～14日 大阪 (国内 口演)
33. 大塚博樹、笹井英雄、青山友佳、深尾敏幸：ACAT1遺伝子のエクソン10のc.949G>Aによるエクソン10スキップ。青山友佳、笹井英雄、大塚博樹、Sandeep Kumar、Anju Sukla、Shrikiran Aroor、Suneel Mundkur、深尾敏幸：ACAT1遺伝子のイントロン2内のc.121-13T>A異変によるエクソン3のスキップ。第57回日本先天代謝異常学会総会、第13回アジア先天代謝異常症シンポジウム 平成27年11月12日～14日 大阪 (国内 口演)
34. 山口清次、長谷川有紀、小林弘典、山田健治、坊亮介、古居みどり、竹谷健、福田誠司、深尾敏幸：日本人グルタル酸血症2型の臨床的分子遺伝子的特徴：32例の検討。第57回日本先天代謝異常学会総会、第13回アジア先天代謝異常症シンポジウム 平成27年11月12日～14日 大阪 (国内 口演)
35. 湯浅光織、畑郁江、河北亜希子、磯崎由宇子、巨田元礼、重松陽介、深尾敏幸、大嶋勇成：重圧なケトアシドーシスの治療中に眼球運動障害を呈したβ-ケトチオラーゼ欠損症の1例。第57回日本先天代謝異常学会総会、第13回アジア先天代謝異常症シンポジウム 平成27年11月12日～14日 大阪 (国内 口演)
36. 小川えりか、石毛美夏、碓井ひろみ、米沢龍太、笹井英雄、深尾敏幸、藤木亮次、小原收、瀧上達夫、高橋昌里：ケトン体利用障害を疑い絶食試験、遺伝子解析により精査したが診断に至っていないケトン性低血糖症の男児例。第57回日本先天代謝異常学会総会、第13回アジア先天代謝異常症シンポジウム 平成27年11月12日～14日 大阪 (国内 口演)
37. 但馬剛、香川礼子、前田康博、深尾敏幸：新生児マススクリーニングで発見されるプロピオン酸血症患者の臨床像と遺伝子型の相関：全国アンケート調査。第57回日本先天代謝異常学会総会、第13回アジア先天代謝異常症シンポジウム 平成27年11月12日～14日 大阪 (国内 口演)

《図書》

1. Fukao T. Cryptic Splice Sites and Cryptic Splicing. In: Maloy S, Hughes K ed. Brenner's Encyclopedia of Genetics, vol. 2. New York: Elsevier; 2013:245-248.

《和文総説》

1. 深尾敏幸：Alu配列の関連した遺伝子異常が遺伝性疾患を引き起こす。実験医学 9:2240-2246, 2012)
2. 深尾敏幸：遺伝病遺伝子診断のピットフォール 小児内科 44：1614-1618, 2012
3. 深尾敏幸：16章 インターメアと疾患—機能性をもつAlu配列：小林武彦編集 ゲノムを司るインターメア 非コードDNAの新たな展開、東京：化学同人；2015年：pp203-216

《受賞（本人）》

1. 平成24年度 日本先天代謝異常学会学会賞受賞

《受賞（若手）》

1. 平成25年度 日本先天代謝異常学会奨励賞 堀友博（若手）
2. 平成27年度 日本先天代謝異常学会 JCR トラベラーズアワード 笹井英雄（若手）
3. 平成28年度 日本先天代謝異常学会奨励賞 青山友佳（若手）

複製ポリメラーゼ δ による複製フォークの安定化機構の解明



廣田 耕志

公募研究 代表者（平成 24~25 年度）
首都大学東京

【研究目的】

損傷 DNA で停止した複製フォークの停止解除には、TLS ポリメラーゼによる損傷乗り越えが中心的に働く。TLS ポリメラーゼには様々な種類が存在するが、損傷によってどの TLS ポリメラーゼが機能するかの選択機構は分かっていない。本研究では、申請者が独自に発見した新経路:複製ポリメラーゼ δ による損傷乗り越え経路と既知 TLS ポリメラーゼ経路の関係や役割分担を研究した。

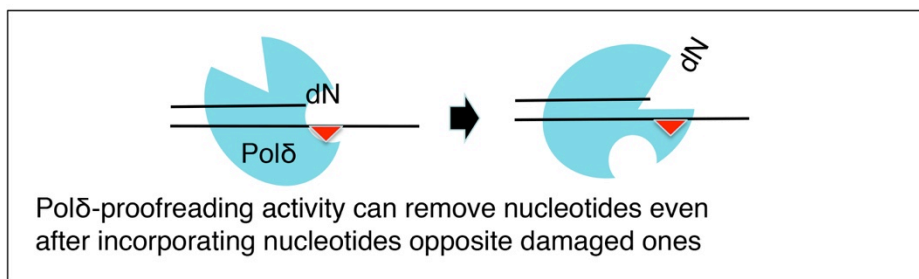
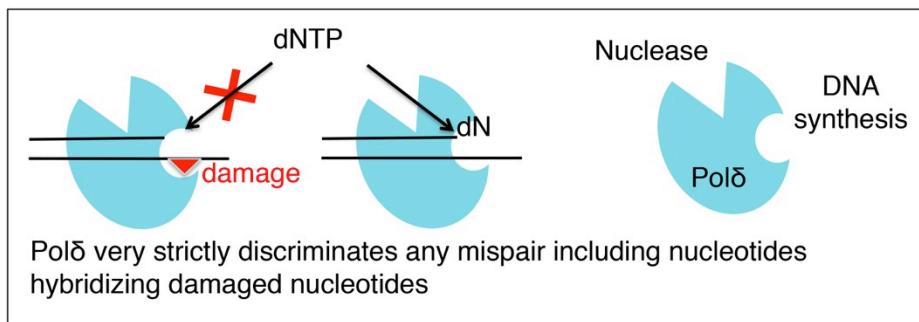
【研究成果】

巨大なゲノム複製を担う複製ポリメラーゼ δ は正確な複製の代償に、損傷DNAを乗り越えて複製できないと考えられてきた。本研究でポリメラーゼ δ が細胞内で乗り越え反応を行い、ポリメラーゼ η や ζ 経路を補完していることを明らかにした。

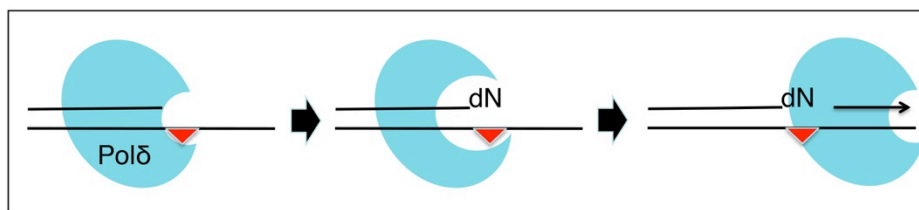
複製ポリメラーゼ δ の第3サブユニットPold3の変異体pold3^{*}をニワトリDT40細胞で作成し、損傷乗り越え複製によって引き起こされる免疫グロブリン遺伝子の超変異が20%まで低下していることを示した。また、紫外線損傷後のDNA複製の継続がpold3^{*}細胞では不良となっていることを示した。これらの結果から、Pold3が損傷乗り越えに必須の機能を担うことが示唆された。Pold3はポリメラーゼ δ と ζ に共通のサブユニットである。Pold3遺伝子をpol η /pol ζ 細胞で破壊すると合成致死となり、Pold3がPol ζ と独立して生存に寄与することを示した。ポリメラーゼ δ の乗り越え機能の活性型変異によって、pold3^{*}/DT40細胞の損傷乗り越え機能不良の表現型も回復した。さらに、pold3^{*}/pol η /pol ζ 細胞の合成致死も、ポリメラーゼ δ の乗り越え機能の活性型変異の導入によって回復した。これらのことから、ポリメラーゼ δ は細胞内で損傷乗り越え反応を行い、この活性は従来知られているPol η と ζ の連携による損傷乗り越え経路と相補的關係にあることが理解できた。

ポリメラーゼ δ は正確なゲノム複製を行うために、DNA合成活性中心が狭い構造を取っていることが知られている。一方、損傷を乗り越える場合には、損傷ヌクレオチドと挿入ヌクレオチドは正しいベースペアを形成しないために、狭い構造のままでは挿入できないことが予想される。申請者は、DNA損傷部に遭遇した時にポリメラーゼ δ の構造

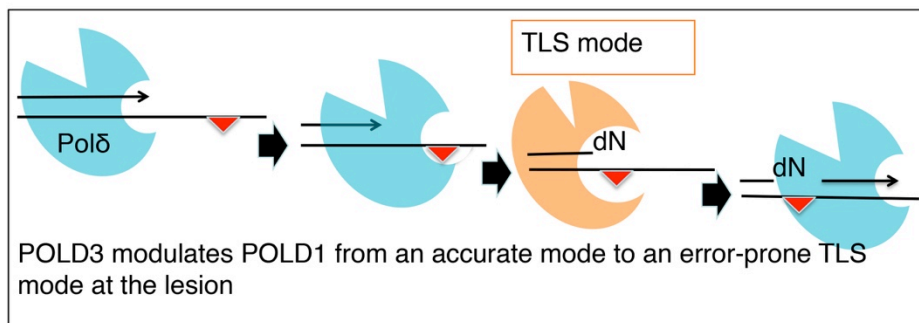
変化が誘導され、変異を許す広い活性中心に変化すると仮説した（フィデリティースイッチ仮説）。現在、フィデリティースイッチに関わる経路因子をプロテオミクスアプローチと遺伝学手法を合わせて解明しようと挑戦している。



Our finding: Efficient TLS by proofreading-deficient Polδ



Proposed model: TLS by Polδ by changing its conformation



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Takemata, N., Oda, A., Yamada, T., Galipon, J., Miyoshi, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Hoffman, C.S., Hirota, K., and *Ohta, K. (2016). Local potentiation of stress-responsive genes by upstream noncoding transcription. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5174-5189. (査読有り)
2. Ooka, M., Takazawa, H., Takeda, S., and *Hirota, K. (2016). Cytotoxic and genotoxic profiles of benzo[a]pyrene and N-nitrosodimethylamine demonstrated using DNA repair deficient DT40 cells with metabolic activation. *Chemosphere* **144**, 1901-1907. (査読有り)
3. Hirota, K., Yoshikiyo, K., Guilbaud, G., Tsurimoto, T., Murai, J., Tsuda, M., Phillips, L.G., Narita, T., Nishihara, K., Kobayashi, K., Sale, J and *Takeda, S. (2015). The POLD3 subunit of DNA polymerase delta can promote translesion synthesis independently of DNA polymerase zeta. *Nucleic Acids Res* **43**, 1671-1683. (査読有り)
4. Shimizu, N., Ooka, M., Takagi, T., Takeda, S., and *Hirota, K. (2015). Distinct DNA Damage Spectra Induced by Ionizing Radiation in Normoxic and Hypoxic Cells. *Radiat Res* **184**, 442-448. (査読有り)
5. Tada, K., Kobayashi, M., Takiuchi, Y., Iwai, F., Sakamoto, T., Nagata, K., Shinohara, M., Io, K., Shirakawa, K., Hishizawa, M., Shindo, K., Kadowaki, N., Hirota, K., Yamamoto, J., Iwai, S., Sasanuma, H., Takeda, S and *Takaori, A. (2015). Abacavir, an anti-HIV-1 drug, targets TDP1-deficient adult T cell leukemia. *Sci Adv* **1**, e1400203. (査読有り)
6. Hoa, N.N., Akagawa, R., Yamasaki, T., Hirota, K., Sasa, K., Natsume, T., Kobayashi, J., Sakuma, T., Yamamoto, T., Komatsu, K., Kanemaki, M., T. Pommier, Y., Takeda, S., *Sasanuma, H. (2015). Relative contribution of four nucleases, CtIP, Dna2, Exo1 and Mre11, to the initial step of DNA double-strand break repair by homologous recombination in both the chicken DT40 and human TK6 cell lines. *Genes Cells* **20**, 1059-1076. (査読有り)
7. Asada, R., Takemata, N., Hoffman, C.S., Ohta, K., and *Hirota, K. (2015). Antagonistic controls of chromatin and mRNA start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor. *Mol Cell Biol* **35**, 847-855. (査読有り)
8. Kobayashi, K., Fujii, T., Asada, R., Ooka, M., and *Hirota, K. (2015). Development of a targeted flip-in system in avian DT40 cells. *PLoS One* **10**, e0122006. (査読有り)
9. Kobayashi, S., Kasaishi, Y., Nakada, S., Takagi, T., Era, S., Motegi, A., Chiu, R.K., Takeda, S., and *Hirota, K. (2015). Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end joining. *Oncogene* **34**, 4403-4411. (査読有り)
10. Al Abo, M., Dejsuphong, D., Hirota, K., Yonetani, Y., Yamazoe, M., Kurumizaka, H., and *Takeda, S. (2014). Compensatory functions and interdependency of the DNA-binding domain of BRCA2 with the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex. *Cancer Res* **74**, 797-807. (査読有り)
11. Hirota, K., Tsuda, M., Murai, J., Takagi, T., Keka, I.S., Narita, T., Fujita, M., Sasanuma, H., Kobayashi, J., and *Takeda, S. (2014). SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 plays a critical role in preventing chromosome loss. *Genes Cells* **19**, 743-754. (査読有り)
12. Mohiuddin, Keka, I.S., Evans, T.J., Hirota, K., Shimizu, H., Kono, K., Takeda, S., and *Hirano, S. (2014). A novel genotoxicity assay of carbon nanotubes using functional macrophage receptor with collagenous structure (MARCO)-expressing chicken B lymphocytes. *Arch Toxicol* **88**, 145-160. (査読有り)
13. Sabouri, S., Kobayashi, M., Begum, N.A., Xu, J., Hirota, K., and *Honjo, T. (2014). C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for efficient class switch recombination and gene conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2253-2258. (査読有り)
14. Yamamoto, K.N., Hirota, K., Takeda, S., and *Haeno, H. (2014). Evolution of pre-existing versus acquired resistance to platinum drugs and PARP inhibitors in BRCA-associated cancers.

PLoS One 9, e105724. (査読有り)

15. Taoka, M., Ishikawa, D., Nobe, Y., Ishikawa, H., Yamauchi, Y., Terukina, G., Nakayama, H., Hirota, K., Takahashi, N., and *Isobe, T. (2014). RNA cytidine acetyltransferase of small-subunit ribosomal RNA: identification of acetylation sites and the responsible acetyltransferase in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 9, e112156. (査読有り)
16. Saito, Y., Takeda, J., Adachi, K., Nobe, Y., Kobayashi, J., Hirota, K., Oliveira, D.V., Taoka, M., and *Isobe, T. (2014). RNase MRP cleaves pre-tRNASer-Met in the tRNA maturation pathway. *PLoS One* 9, e112488. (査読有り)
17. Saito, Y., Takeda, J., Okada, M., Kobayashi, J., Kato, A., Hirota, K., Taoka, M., Matsumoto, T., Komatsu, K., and *Isobe, T. (2013). The proteasome factor Bag101 binds to Rad22 and suppresses homologous recombination. *Sci Rep* 3, 2022. (査読有り)
18. Fujita, M., Sasanuma, H., Yamamoto, K.N., Harada, H., Kurosawa, A., Adachi, N., Omura, M., Hiraoka, M., Takeda, S., and *Hirota, K. (2013). Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks. *PLoS One* 8, e60043. (査読有り)
19. Kikuchi, K., Narita, T., Pham, V.T., Iijima, J., Hirota, K., Keka, I.S., Mohiuddin, Okawa, K., Hori, T., Fukagawa, T., Essers, J. Kanaar, R. Whitby, M. C. Sugawara, K. Taniguchi, Y. Kitagawa, K. *Takeda, S. (2013). Structure-specific endonucleases xpf and mus81 play overlapping but essential roles in DNA repair by homologous recombination. *Cancer Res* 73, 4362-4371. (査読有り)
20. Miyoshi, T., Ito, M., Kugou, K., Yamada, S., Furuichi, M., Oda, A., Yamada, T., Hirota, K., Masai, H., and *Ohta, K. (2012). A central coupler for recombination initiation linking chromosome architecture to S phase checkpoint. *Mol Cell* 47, 722-733. (査読有り)
21. Murai, J., Yang, K., Dejsuphong, D., Hirota, K., Takeda, S., and *D'Andrea, A.D. (2011). The USP1/UAF1 Complex Promotes Double-Strand Break Repair through Homologous Recombination. *Mol Cell Biol* 31, 2462-2469. (査読有り)
22. Qing, Y., Yamazoe, M., Hirota, K., Dejsuphong, D., Sakai, W., Yamamoto, K.N., Bishop, D.K., Wu, X., and *Takeda, S. (2011). The Epistatic Relationship between BRCA2 and the Other RAD51 Mediators in Homologous Recombination. *PLoS Genet* 7, e1002148. (査読有り)
23. Takaku, M., Tsujita, T., Horikoshi, N., Takizawa, Y., Qing, Y., Hirota, K., Ikura, M., Ikura, T., Takeda, S., and *Kurumizaka, H. (2011). Purification of the human SMN-GEMIN2 complex and assessment of its stimulation of RAD51-mediated DNA recombination reactions. *Biochemistry* 50, 6797-6805. (査読有り)
24. Yamamoto, K.N., Hirota, K., Kono, K., Takeda, S., Sakamuru, S., Xia, M., Huang, R., Austin, C.P., Witt, K.L., and *Tice, R.R. (2011). Characterization of environmental chemicals with potential for DNA damage using isogenic DNA repair-deficient chicken DT40 cell lines. *Environ Mol Mutagen* 52, 547-561. (査読有り)
25. Yamamoto, K.N., Kobayashi, S., Tsuda, M., Kurumizaka, H., Takata, M., Kono, K., Jiricny, J., Takeda, S., and *Hirota, K. (2011). Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 6492-6496. (査読有り)

《学会発表》

1. SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase RNF4 required for genome maintenance regulates stability of the histone variant H2A.Z Kouji Hirota international symposium on chromatin structure, dynamics and function Awaji Yemebutai 2015 08.23-26 (ポスター、国際)
2. The regulation of *Schizosaccharomyces Pombe* fbp1 gene transcription through local higher order genome structure by transcription regulators Ryuta Asada and Kouji Hirota International

Symposium Chromatin Structure, Dynamics and Function Awaji Yemebutai 2015 08.23-26
(一般口頭、国際)

3. The regulation of *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene transcription through local DNA looping structure by transcription regulators Ryuta Asada and Kouji Hirota Pombe 2015, 2015 June 21-26 Kobe (ポスター、国際)
4. 分裂酵母 *fbp1* の転写抑制時のクロマチン再構築機構の解明(ポスター、国内)
5. 梅田 未来、廣田 耕志 バイオコンファレンス2015 2015.11.06 首都大学東京
6. DNA修復経路欠損細胞を用いたタバコに含まれる化学物質の遺伝毒性評価
7. 大岡正人 高沢浩則 武田俊一 廣田耕志 バイオコンファレンス 2015.11.06 首都大学東京(ポスター、国内)
8. 分裂酵母 $fbp1$ の転写抑制時のクロマチン再構築機構の解明
9. 梅田 未来、廣田 耕志 日本分子生物学会年会 2015.12.01 神戸国際展示場 (ポスター、国内)
10. 酸素の有無による電離放射線照射時の DNA 損傷の種類解析 大岡正人 清水直登 高木季代 武田俊一 廣田耕志 日本分子生物学会年会 2015.12.03 神戸国際展示場 (一般口頭、国内)
11. 分裂酵母 *fbp1* 遺伝子の転写活性化における Gcn5HAT とクロマチンリモデリング因子 Snf21 および Snf22 の機能の解析 足立朗 廣田耕志 日本分子生物学会年会 2015.12.04 神戸国際展示場 (ポスター、国内)
12. 分裂酵母 *fbp1* におけるゲノム高次構造変化による遺伝子発現精密制御機構の解明 浅田隆大、廣田耕志 日本分子生物学会年会 2015.12.03 神戸国際展示場(一般口頭、国内)
13. Capability of proofreading-exonuclease-deficient replicative DNA polymerase δ to perform translesion DNA synthesis Kouji Hirota, Masataka Tsuda, Mohiudin, Toshiki Tsurimoto, Zvi Livneh, Shigenori Iwai, Julian Sale, and Shunichi Takeda 日本分子生物学会年会 2015.12.01 神戸国際展示場 (招待、国内)
14. PAR 結合蛋白質 ALC1/CHDL1 と XRCC1 による単鎖切断修復 廣田耕志、安井明、荻朋男、原田浩、中村純、Yves Pommier, 武田俊一 染色体ワークショップ 2016. 01.12 宮城松島 (一般口頭、国内)
15. RNF4 による H2A.Z を介した染色体制御機構の解明 高木 季代、廣田 耕志 染色体ワークショップ 2016. 01.12 宮城松島(ポスター、国内)
16. 分裂酵母 *fbp1* におけるゲノム高次構造変化による遺伝子発現精密制御機構の解明 浅田隆大、廣田耕志 染色体ワークショップ 2016. 01.12 宮城松島(ポスター、国内)
17. SUMO 化蛋白質を認識する RING 型ユビキチンリガーゼ RNF4 による、スピンドルアセンブリチェックポイント(SAC)活性維持と染色体ロスの防止 廣田耕志、高木季代、津田雅貴、村井純子、Keka Islam, 成田岳雄、藤田真梨、笹沼博之、小林純也、武田俊一 SUMO 研究会 2016.01.22 大阪関西学院大(招待、国内)
18. 分裂酵母 *fbp1* におけるクロマチン構造変化を利用した遺伝子発現制御機構の解明 浅田隆大、廣田耕志 酵母遺伝学フォーラム 26年 9月1日 東京大学 (ポスター、国内)
19. SUMO 化タンパク質を認識する RING 型ユビキチンリガーゼ RNF4 による、スピンドルアセンブリチェックポイント(SAC)の活性維持と染色体ロスの防止 廣田耕志、高木季代、津田雅貴、村井純子、Keka Islam, 成田岳雄、藤田真梨、笹沼博之、小林純也、武田俊一 分子生物学会 26年 11月26日 横浜 (招待、国内)
20. Tup family corepressor と CCAAT-binding factor によるクロマチン構造変化の拮抗的な

- 制御が mRNA 転写開始点を決定する 浅田隆大、竹俣直道、太田邦史、廣田耕志 分子生物学会 26年11月26日 横浜 (ポスター、国内)
21. SUMO ターゲットユビキチンリガーゼ(STUbL)、RNF111 は複製ストレストランスに重要な役割を果たす 川澄遼太郎、廣田耕志 分子生物学会 26年11月27日(招待、国内)
 22. 損傷乗り越え PrimPol と損傷乗り越えポリメラーゼ Pol ζ / η の関係 小林香、廣田耕志、武田俊一 分子生物学会 26年11月27日 横浜 (ポスター、国内)
 23. 複製ポリメラーゼ δ POLD3/p66 サブユニットはポリメラーゼ ζ 経路と独立に損傷乗り越えに寄与する 廣田耕志、村井純子、Guillaume Guilbaud、津田雅貴、成田岳雄、西原佳那、笹沼博之、釣本俊樹、Julian Sale、武田俊一 染色体ワークショップ 26年12月15日 広島(一般口頭、国内)
 24. 分裂酵母 fbp1 におけるクロマチン構造・ゲノム高次構造変化による遺伝子発現制御機構の解明 浅田隆大、竹俣直道、Charles Hoffman、太田邦史、廣田耕志 染色体ワークショップ 26年12月15日 広島(一般口頭、国内)
 25. RNF4 は染色体ロスを防止する 染色体ワークショップ 高木季代、津田雅貴、村井純子、武田俊一、廣田耕志、 26年12月15日 広島(ポスター、国内)
 26. 損傷乗り越えにおける PrimPol と損傷乗り越えポリメラーゼ Pol ζ / η の関係 小林香、武田俊一、廣田耕志 染色体ワークショップ 26年12月15日 広島(ポスター、国内)
 27. ニワトリ B リンパ球 DT40 細胞を用いた遺伝毒物学手法による有害化学物質の検出法の開発と、その応用による抗がんシズ化合物のスクリーニング MMS 研究会 (山梨) 2013年 5月31日 廣田耕志 (招待、国内)
 28. 遺伝子シナジーを作用原理とする抗がん治療薬品の探索 Biotech 2013 (お台場) 2013年5月8日 廣田耕志 (招待、国内)
 29. クロマチンリモデリング因子 ALC1 は PARP 経路による酸化ダメージ DNA 損傷トランスに必須の役割を果たす 遺伝研研究会 (静岡) 2013年9月20日 廣田耕志 (一般口頭、国内)
 30. 染色体断裂はいつも DNA 2 重鎖切断が原因とは限らない 日本癌学会 (横浜) 2013年10月4日 廣田耕志 (招待、国内)
 31. クロマチンリモデリング因子 ALC1 は PARP 経路による酸化 DNA 損傷トランスに必須の役割を果たす 第36回日本分子生物学会 (神戸) 2013年12月16日 廣田耕志 (招待、国内)
 32. SUMO-targetted Ubiquitin Ligase RNF4 Guards Genome Stability by suppressing error-prone Homologous Recombination 第35回日本分子生物学会 (博多) 2012年12月14日 (招待、国内)
 33. 環境化学物質の発がん性の評価方法 (大分) CERI 講演会 2012年 7月 (招待、国内)
 34. SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 guards genome stability by suppressing error-prone homologous recombination
 35. 放生研放医研国際シンポジウム (京都) 2012年11月29日 (一般口頭、国内)

《和文総説》

1. DNA 損傷修復の概念提起からメカニズム解明へ 廣田耕志 武田俊一 医学の歩み (2015) 255, p857-859

2. 酵母 SRG1, mlonRNA による遺伝子発現制御 浅田隆大 廣田耕志 実験医学増刊 (2015) 33, p3272-3273
3. シスプラチン耐性の分子機構 血液内科 65(4) 498-503 2012年 笹沼博之 廣田耕志 武田俊一
4. シスプラチンの効果を妨害するメカニズムの解明 月刊化学 2011年6月号 廣田耕志

《アウトリーチ活動、社会貢献》

プレスリリース

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2014/150202_2.html

<http://www.tmu.ac.jp/news/topics/10011.html>

http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2013/130404_1.htm

講演など

1. 一般人向けの放射線影響の講義 首都大 (2015年 6月)
2. 日比谷高校 HSS 講義 高校生のための放射線の生態影響の講義 (2014年 6月24日)
3. 社会人を対象としたリカレント教育プログラム講師 発酵の化学。(2014年 8月23日)
4. 首都大学東京オープンユニバーシティ講師 放射線影響について一般人に講義した (2013年 11月)

卵母細胞核小体によるヘテロクロマチン構築機構の解明



大串 素雅子

公募研究 代表者（平成 24~25 年度）

京都大学白眉センター

【研究目的】

核小体はタンパク質合成を担うリボソーム構築に関わる細胞小器官として古くから知られているが、近年それ以外の機能も示唆されており核小体の成分、機能については不明な点が多い。我々はマウス卵母細胞核小体がクロマチン構造を制御することで染色体構造の維持、安定な伝播に関与することを示唆した。本研究では卵母細胞核小体に含まれる因子を同定し染色体構造維持、安定な伝播に関与する因子を同定することを目的としている。

【研究成果】

通常、細胞内でタンパク質・RNA の機能解析を行う際は最低でも 1×10^4 ~ 5 レベルの細胞数が必要とされる。しかし、マウス卵母細胞は一個体から約 30–50 個しか採取できず圧倒的な材料不足に悩まされる。そこで胚性幹（ES）細胞という個体を形成する全ての細胞になる能力を持ちかつ無限に増殖する細胞から卵母細胞を誘導し、哺乳類卵母細胞を自在に大量に生み出せる系を確立することを共同研究で行うこととした。共同研究者たちはマウス ES・iPS 細胞を試験管内で始原生殖細胞様細胞へと分化させた後に雌マウスの卵巣に移植することで卵子の分化誘導に成功した（Hayashi et al., 2012）。この研究によりマウスにおいて以前より容易に卵母細胞の数を得ることが可能となり、哺乳類における雌性生殖細胞の分化過程等をより詳細に解析することが可能となった。

マウス卵母細胞核小体は受精直後のペリセントロメアヘテロクロマチンの構築に必須である（Ogushi and Saitou, 2010）。マウス卵母細胞核小体は主にタンパク質より構成されていることが判明したので、マウスの卵母細胞核小体を顕微操作により大量に単離し、質量分析でその構成因子の同定を試みた。質量分析により 49 個のタンパク質を同定し、そのうち核小体に局在するものは NUCLEOLIN, NUCLEOPLASMIN2, SSRP1, NOLC1 の 4 種類であった。興味深いことに、卵母細胞核小体にはリボソームタンパク質は存在せずリボソーム RNA プロセッシングに関わるタンパク質である NUCLEOLIN のみが存在した。また卵母細胞核小体タンパク質として同定されてきたタンパク質のほとんどはヒストン H2A/H2B シャペロン機能を持っていた

(NUCLEOLIN, NUCLEOPLASMIN2, SSRP1)。つまり、卵母細胞核小体はクロマチンのペリセントロメア構造構築をヒストン H2A/H2B を介して行っている可能性を示唆している。さらに核小体構造のない卵母細胞に NUCLEOPLASMIN2 のみを発現させるだけで核小体構造を再構築し、クロマチン高次構造の異常も回復できることを明らかにした。一つのタンパク質によって一つの細胞小器官を構築できるという初めての発見であり、これらの所見をまとめ現在投稿中である。(Ogushi et al., 投稿中)。

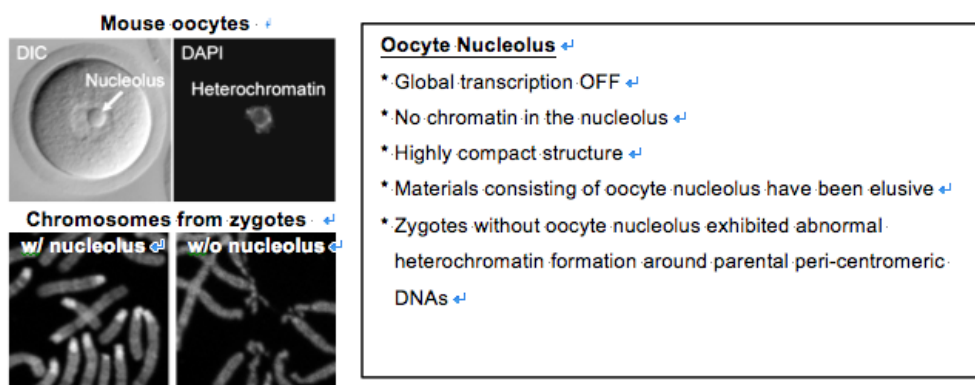


Fig. 1 Mouse oocyte nucleolus is required for peri-centromeric heterochromatin formation in zygotes.

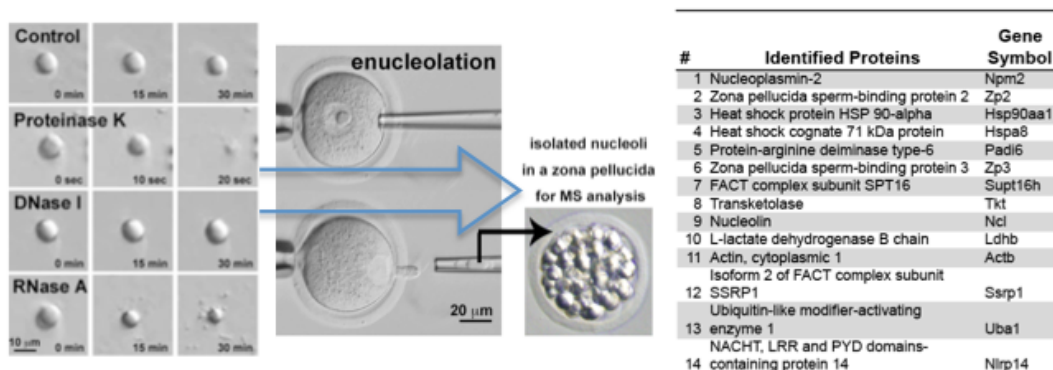


Fig. 2 Proteins are major components of the oocyte nucleolus and performed MS analysis using isolated nucleoli in mice

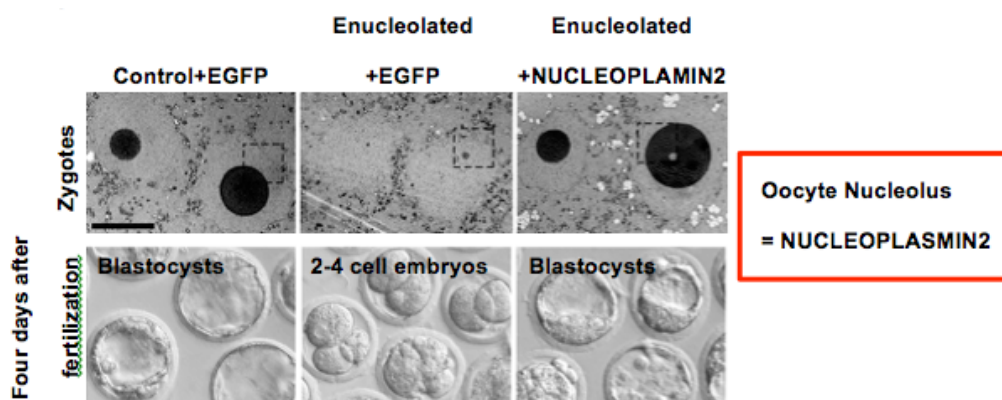


Fig. 3 Expression of NPM2 alone is sufficient to reconstitute the nucleolus structure and to rescue the defect caused by loss of the oocyte nucleolus in early embryonic development.

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. *Hayashi, K., Ogushi, S., Kurimoto, K., Shimamoto, S., Ohta, H., and *Saitou, M. (2012). Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 338, 971-975. (査読あり)
2. *Kyogoku, H., Ogushi, S., and Miyano, T. (2012). Nucleoli from two-cell embryos support the development of enucleolated germinal vesicle oocytes in the pig. *Biol. Reprod.* 87, 113. (査読あり)
3. Jitsukawa, M., Kyogoku, H., Ogushi, S., and *Miyano, T. (2012). Effects of proteasome inhibitors on the nucleolar size of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 58, 162-166. (査読あり)

《学会発表》

1. Ogushi S, “Nucleoplasmin2 in the maternal nucleolus is the critical factor for the higher-chromatin organization after fertilization.” 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月13日(招待、国際)
2. Ogushi S, “Maternal nucleolus governs the higher chromatin organization after fertilization.” SRD-NIAS the 2nd Japan-Czech Joint Symposium “Understanding the Germ Cell Potential”、東京、2012年9月10日(招待、国際)
3. Ogushi S, “The maternal nucleolus controls the chromatin organization at the zygote's first cell cycle.” Biomodulation Symposium “From Germplasm to Cloning”、韓国、2013年6月5日(招待、国際)

《受賞(本人)》

1. 2013年9月 日本繁殖生物学会奨励賞「哺乳類卵母細胞の核小体の機能解析」

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 京都大学ジュニアキャンパス2012“生命って何?～生命の始まりから終わりまで～”、中学生、京都、2012年9月23日
2. 兵庫県立明石高校の「生命科学探究類型」コース授業「マウスの解剖を通して生命倫理を考える」、高校生、兵庫、2013年1月18日

《学会の主催》

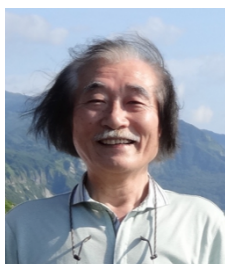
1. 第105回日本繁殖生物学会サテライトシンポジウムSRD-NIAS The 2nd Japan-Czech Joint Symposium“Understanding the Germ Cell Potential”、国際、2012年9月10日、東京
2. 「生殖細胞研究の現場から」白眉センター&応用哲学・倫理学教育研究センターシンポジウム「ライフサイエンスの現場と政策的・倫理的課題～生殖・再生医療の現在～」、国内、2013年4月13日、京都

(平成 24~25 年度)

非コード DNA 領域によるゲノム複製タイミング制御機構の解明

(平成 26~27 年度)

非コード DNA 領域による染色体複製制御機構の解明



升方 久夫

公募研究 代表者 (平成 24~27 年度)

大阪大学大学院理学研究科

【研究目的】

遺伝情報を維持するための重要な染色体機能である DNA 複製の開始とその制御に必要な領域は、ほぼすべて非コード DNA 領域に存在する。染色体上に存在する数百から数万個所の複製開始点は S 期の特定時期に複製するよう巧妙に制御されている。本研究では、複製タイミングと核内局在制御に関わる非コード DNA を同定し、その分子メカニズムを明らかにすることが目的である。

【研究成果】

(1) 複製開始を制御する非コード DNA の同定と分子メカニズムの解明

複製開始点を制御する非コード DNA を同定するため、分裂酵母染色体腕部の後期複製開始点断片を初期開始点近傍に挿入し、初期複製の阻害機能を検出した。この解析法により、後期タイミング制御配列としてタンデム 2 コピーのテロメア様配列を同定した。テロメア結合因子 Taz1 は、テロメア末端に加えて、上記のテロメア様配列に依存して後期複製開始点に局在し、複製制御に重要な役割を果たす。ゲノムワイド解析により、染色体上の約 150 個の後期複製開始点のうち半数は Taz1 ならびに Taz1 に結合する Rif1 によりタイミング制御されることを明らかにした。また、残りは Taz1 に依存せず Rif1 に依存する開始点である。これらの解析により分裂酵母染色体内部にある後期複製開始点制御には、非コードテロメア様配列とテロメアタンパク質がきわめて重要な役割を果たすことを示した。

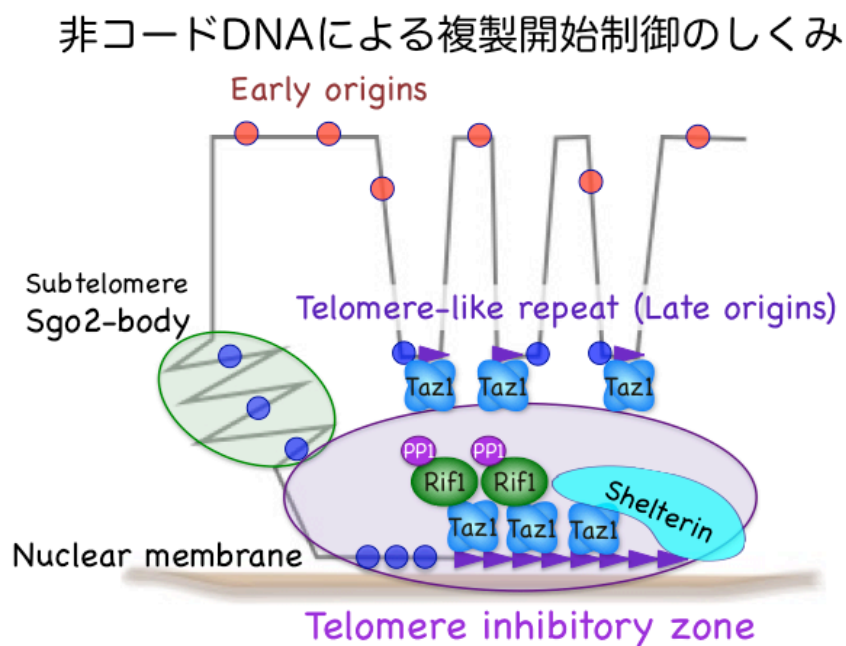
(2) シュゴシタンパク質によるサブテロメア領域の複製開始制御の発見

分裂酵母染色体のテロメアに隣接する約 100 kb のサブテロメア領域に存在する多数の複製開始点は初期複製を抑制されている。末端から約 40 kb までは Taz1-Rif1 が局在し制御すると考えられるが、さらに内側約 100 kb までの広範囲サブテロメアの複製制

御機構は不明である。M 期キネトコアで染色体均等分配に働くシュゴシンタンパク質 (Sgo2)が間期特異的に上記領域に結合することから、計画班員加納純子博士との共同研究により Sgo2 の複製開始への関与を解析した。Sgo2 は、Bub1 によるヒストン H2AS121 リン酸化に依存して染色体末端から 20-100 kb 領域に結合し、初期複製を抑制することを見いだした。ChIP 解析から DDK 依存的 Sld3 の結合段階が Sgo2 により制御されることを示した (加納純子班員、太田邦広班員との領域内共同研究)。

(3) テロメア因子による複製開始点の核内局在制御機構の解析

複製タイミングと核内局在配置の関連が古くから観察されているが分子メカニズムは不明である。初期あるいは後期開始点近傍に lacO リピートを挿入し LacI-GFP をライブ観察した。後期開始点のみが高頻度で核膜に局在し、さらに後期開始点制御に必要なテロメア配列に依存して G1/S 期特異的にテロメアに隣接することを発見した。染色体内部の非コードテロメア配列に依存して、テロメア結合因子 Taz1、Rif1 が後期開始点の核内局在に寄与することを示した。



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Kanke, M., Kodama, Y., Takahashi, TS., Nakagawa, T., *Masukata, H. (2012). Mcm10 plays an essential role in origin unwinding after loading of the CMG components. *EMBO J.* 31, 2182-2194. (査読有り)
2. Higashi, TL., Ikeda, M., Tanaka, H., Nakagawa, T., Bando, M., Shirahige, K., Kubota, Y., Takisawa, Masukata, H., *Takahashi, TS. (2012). The prereplication complex recruits XEco2 to chromatin to promote cohesin acetylation in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol.* 22, 977-988. (査読有り)
3. Handa, T., Kanke, M., Takahashi, TS., Nakagawa, T., *Masukata, H. (2012). DNA polymerization-independent functions of DNA polymerase epsilon in assembly and progression of the replisome in fission yeast. *Mol Biol Cell* 23, 3240-3253. (査読有り)
4. Tazumi, A., Fukuura, M., Nakato, R., Kishimoto, A., Takenaka, T., Ogawa, S., Song, J., Takahashi, TS., Nakagawa, T., Shirahige, K., *Masukata, H. (2012). Telomere-binding protein Taz1 controls global replication timing through its localization near late replication origins in fission yeast. *Gene Dev.* 26, 2050-2062. (査読有り)
5. Tazumi, A., *Masukata, H. (2012). Telomere-binding proteins play roles in control of replication timing. *Cell Cycle* 11, 4492-4493. (査読有り)
6. Nanbu, T., Takahashi, K., Murray, IM., Hirata, N., Ukimori, S., Kanke, M., Masukata, H., Yukawa, M., Tsuchiya, E., *Ueno, M. (2013). Fission yeast RecQ helicase Rqh1 is required for the maintenance of circular chromosomes. *Mol Cell Biol.* 33, 1175-1187. (査読有り)
7. Ruan, K., Yamamoto, TG., Asakawa, H., Chikashige, Y., Masukata, H., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. (2015). Meiotic nuclear movements in fission yeast are regulated by the transcription factor Mei4 downstream of a Cds1-dependent replication checkpoint pathway. *Genes Cells* 20, 160-172. (査読有り)
8. Ruan, K., Yamamoto, TG., Asakawa, H., Chikashige, Y., Kimura, H., Masukata, H., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. (2015). Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Sci Rep.* 5, 12720. (査読有り)
9. Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Takigawa, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., Masukata, H., Kanoh, J. (2016). Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nat Comm.* 7, Article number: 10393. (査読有り)
10. Kawasoe, Y., Tsurimoto, T., Nakagawa, T., Masukata, H., Takahashi, TS. (2016). MutSa maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading. *eLIFE* 12;5. pii: e15155. doi: 10.7554/eLife.15155. (査読有り)
11. Onaka, AT., Toyofuku, N., Inoue, T., Okita, AK., Sagawa, M., Su, J., Shitanda, T., Matsuyama, R., Zafar, F., Takahashi, TS., Masukata, H., Nakagawa, T. (2016). Rad51 and Rad54 promote noncrossover recombination between centromere repeats on the same chromatid to prevent isochromosome formation. *Nucl Acids Res.* 44, 10744-10757. (査読有り)

《学会発表》

1. Masukata H, "Activation of replication origins and involvement of telomere proteins in timing control" DNA Replication of Eukaryotic Genome Meeting, Les Treilles, France, 2012年7月2-7日 (招待、国際)
2. Masukata H, "Control of global replication timing by telomere-binding proteins in fission yeast", The 8th 3R Symposium, 淡路夢舞台、2012年11月25-28日 (招待、国際)
3. 升方久夫「Replication timing program in fission yeast」第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11-14日 (招待、国内)

4. Masukata H, "Replication timing control by telomere proteins" The 21th IGM-Human Genome Meeting, Singapore, 2013 年 4 月 12-15 日 (招待、国際)
5. Masukata H, "Replication timing program in fission yeast", The 7th International Fission Yeast Meeting, London, UK, 2013 年 6 月 24-29 日 (招待、国際)
6. Masukata H, "Replication timing control by centromere and telomere binding proteins", 酵母エピジェネティックミーティング、福井、2013 年 9 月 2-4 日 (口頭発表、国際)
7. Masukata H, "Replication timing control by chromatin proteins", Eukaryotic DNA Replication and Genome maintenance, Cold Spring Harbor, 2013 年 9 月 9-13 日 (Chair、招待、国際)
8. 升方久夫 "Regulation of replication program in fission yeast: Replicator, initiator and Regulators" 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3-6 日 (招待、国内)
9. Masukata H, "Control of DNA replication and nuclear localization by chromatin proteins" 第 9 回 3R Symposium、御殿場、2014 年 11 月 17-21 日 (招待、国際)
10. 升方久夫 「分裂酵母 Replication origin の活性化を制御するしくみ」 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日 (招待、国内)
11. Masukata H, "Replication timing control by telomere-adjacent nuclear localization in fission yeast" The 8th International Fission Yeast Meeting、神戸、2015 年 6 月 21-26 日 (招待、国際)
12. Masukata H, "Replication timing control by telomere-adjacent nuclear localization" Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance, Cold Spring Harbor, NY, USA、2015 年 9 月 1-5 日 (口頭発表、国際)
13. 小川志帆、升方久夫 「テロメア結合タンパク質による DNA 複製の時空間的制御機構」 第 38 回日本分子生物学会年会ワークショップ、神戸、2015 年 12 月 1 日-4 日 (招待、国内)
14. Masukata T, "Control of replication timing and subnuclear localization by telomere binding proteins in fission yeast" DNA Metabolism, Genomic Stability and Disease, Cold Spring Harbor Asia, Suzhou, China, 2016 年 6 月 13-17 日 (招待、国際)
15. Masukata T, "Control of subnuclear localization and replication timing by telomere binding proteins in fission yeast" FASEB Science Research Conferences, Yeast Chromosome Structure, Replication and Segregation, Snowmass, Colorado, USA、2016 年 7 月 31 日-8 月 5 日 (招待、国際)

《図書》

1. 升方久夫 “ベーシック分子生物学”、化学同人、2014 年 11 月

(平成 24~25 年度)

染色体を折り畳むための DNA 領域の分子機能

(平成 26~27 年度)

バクテリアの核様体形成を促進する rDNA 領域の分子機能



仁木 宏典

公募研究 代表者 (平成 24~27 年度)

情報・システム研究機構国立遺伝学研究所

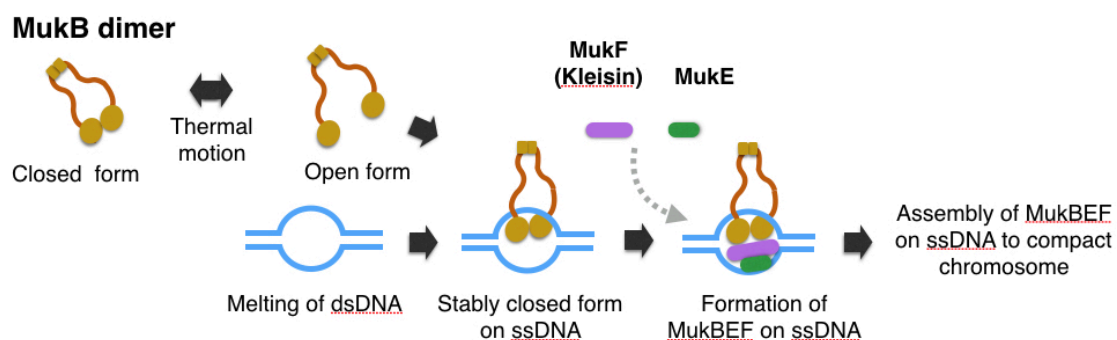
【研究目的】

原核生物では真核生物と同様にトポイソメラーゼとコンデンシンにより染色体 DNA は凝縮される。バクテリアコンデンシンは複製起点の近傍に結合して、染色体 DNA の凝縮し、この作用により複製した新生鎖の解離が促進される。本研究では、バクテリアコンデンシンがどのようにして特定の DNA を認識し結合するのか、そして染色体の凝縮を起こすのかについて研究を行った。

【研究成果】

コンデンシンのコアユニットである MukB は SMC ファミリーのタンパク質で、このファミリーはリング構造をとることが大きな特徴である。そして、このリングに DNA を通した、いわゆるトポロジカル DNA 結合すると考えられている。SMC ファミリーの一つであるコヒーシンではすでにトポロジカル結合が明らかになっているが、他方コンデンシンではトポロジカル結合の有無が議論になっている。コヒーシンのトポロジカル結合の解明に用いられたトポロジカル結合アッセイを初めてコンデンシンに適用し、この問題を調べた。精製した大腸菌のコンデンシン MukB とそのサブユニット MukE, MukF を使って実験を行った。このアッセイ法の結果、直鎖状 DNA は反応に加えた量の 1%未満しか回収できなかったのに対して、環状 DNA は 4%以上も回収できた。また、環状一本鎖 DNA はさらに効率よく 10%以上も回収できた。基質 DNA のトポロジーに依存して結合すること、一本鎖 DNA 選択的にトポロジー結合することが明らかとなった。このアッセイではトポロジカル結合に ATP は必要としない。また MukB は単体で結合し、サブユニット因子の添加はトポロジカル結合に特に影響を与えることはなかった。ゲルシフト法による DNA 結合能の実験では、サブユニット添加は MukB の DNA 結合を阻害する。したがって、トポロジカル結合は通常の DNA 結合とは分子機構が異なっていることも示唆され、今後この点はさらに解明する必要がある。

枯草菌 rDNA の欠失変異株で染色体 DNA の凝縮の異常、特に新生鎖の解離が阻害されることを見出した。遺伝学的な実験の結果、rDNA はリボゾームの生産とは別に新生鎖の解離に働くことを明らかにした。この機能はシスに作用し、また転写活性も必要としていた。転写によって生じた一本鎖 DNA にコンデンシンがトポロジカル結合するという仮説を立てた。これを確かめるために、コンデンシン複合体のサブユニットである ScpB にタグをつけ、プラスミドを持たせた枯草菌から温和な条件でタグ付き ScpB をコンデンシン複合体を精製した。プラスミドに rDNA を持たせた時に、ScpB と共に回収されるプラスミド DNA の数が増加することから、rDNA 領域に枯草菌のコンデンシンはトポロジカル結合するものと考えられる。バクテリアでは、染色体の複製起点の周辺に rDNA が複数、散在する。従来、これは細胞の増殖速度に合わせて rRNA を大量に生産するため、遺伝子量効果も見込まれる位置に集まっていると解釈されてきた。さらにこの rRNA 遺伝子の特性はコンデンシンのローディングの場としても利用しているらしい。



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Niki, H., and Yano, K. (2016) In vitro topological loading of bacterial condensin MukB on DNA, preferentially single-stranded DNA rather than double-stranded DNA. *Sci Rep.* 6: 29469 (査読有り)
2. Yano, K., Masuda, K., Akanuma, G., Wada, T., Matsumoto, T., Shiwa, Y., Ishige, T., Yoshikawa, H., Niki, H., Inaoka, T., et al. (2016). Growth and sporulation defects in *Bacillus subtilis* mutants with a single *rrn* operon can be suppressed by amplification of the *rrn* operon. *Microbiol.* 162, 35–45. (査読有り)
3. Yano, K., Wada, T., Suzuki, S., Tagami, K., Matsumoto, T., Shiwa, Y., Ishige, T., Kawaguchi, Y., Masuda, K., Akanuma, G., Nanamiya, H., Niki, H., Yoshikawa, H., Kawamura, F. (2013). Multiple rRNA operons are essential for efficient cell growth and sporulation as well as outgrowth in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 159, 2225-2236. (査読有り)
4. Keyamura, K., Sakaguchi, C., Kubota, Y., Niki, H., and Hishida, T. (2013). RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 288, 29229–29237.

《学会発表》

1. 矢野晃一、仁木宏典「リボソーム RNA 遺伝子の新たな機能：核様体の分離に働くリボソーム RNA 遺伝子」第 33 回染色体ワークショップ、宮城県松島町、2016 年 1 月 12-14 日、(一般口頭、国内)
2. 矢野晃一、仁木宏典「リボソーム RNA 遺伝子の新たな機能：枯草菌の核様体分離には複数コピーのリボソーム RNA 遺伝子が必要である」2015 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、滋賀、2015 年 8 月 27-28 日、(一般口頭、国内)
3. 仁木宏典、矢野晃一「バクテリアの rRNA 遺伝子の新たな役割—複製新生鎖分離のための染色体凝縮への寄与」第 87 回日本遺伝学会、宮城、2015 年 9 月 24-26 日、(一般口頭、国内)
4. 矢野晃一、仁木宏典「バクテリアの rRNA 遺伝子の新奇の機能—複数コピーの rRNA 遺伝子の核様体分離への寄与」第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、静岡、2015 年 10 月 19-21 日 (ポスター、国内)
5. 矢野晃一、仁木宏典「枯草菌 rRNA 遺伝子の新奇機能—複製新生鎖分離における複数コピーの rRNA 遺伝子の寄与」平成 27 年度細菌細胞の増殖と代謝研究会、静岡、2015 年 11 月 6-7 日 (招待口頭、国内)
6. NIKI, H., and YANO, K. “Topological loading of bacterial condensin complex, MukBEF, on circular single-stranded DNA” Gordon Conference on Chromosome Dynamics, Waterville Valley, USA, 2015 年 6 月 28-7 月 3 日、(一般ポスター、国際)
7. 矢野晃一、仁木宏典「RNA 代謝と核様体の凝縮」第 32 回染色体ワークショップ、広島県廿日市市、2014 年 12 月 15-17 日、(一般口頭、国内)
8. NIKI, H. “RNA metabolism and nucleoid condensation” The 9th 3R Symposium together with National Institute of Genetics 2014 International Symposium, 御殿場市、2014 年 11 月 17-21 日、(招待口頭、国際)

《和文総説》

1. 仁木 宏典、14 章 バクテリアにおける非コード DNA 領域の機能、「ゲノムを司るインターメア (小林 武彦 編)」化学同人 (2015), ISBN978-4-7598-1724-9

《学会の開催》

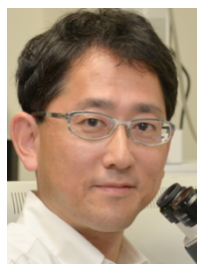
1. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、静岡、2015 年 10 月 19-21 日

(平成 24~25 年度)

SMC 複合体による姉妹染色分体の構造変換制御

(平成 26~27 年度)

細胞周期を通じた染色体構造変換における非コード DNA 領域の役割



広田 亨

公募研究 代表者 (平成 24~27 年度)

公益財団法人がん研究会がん研究所

【研究目的】

DNA の複製から分配までが順序立てて進行することは安定したゲノムの継承の基本であるが、非コード DNA 領域に生じやすい複製後の絡まりや複製の遅滞は姉妹染色分体間に未解構造を残し、ゲノム不安定性を誘導することが指摘されている。本研究では、クロマチンの構造制御に必須の役割を担う SMC タンパク質複合体の機能を基軸として、複製の進行と姉妹染色分体の形成がどのように連携して進められるのかを明らかにすることを目的とした。

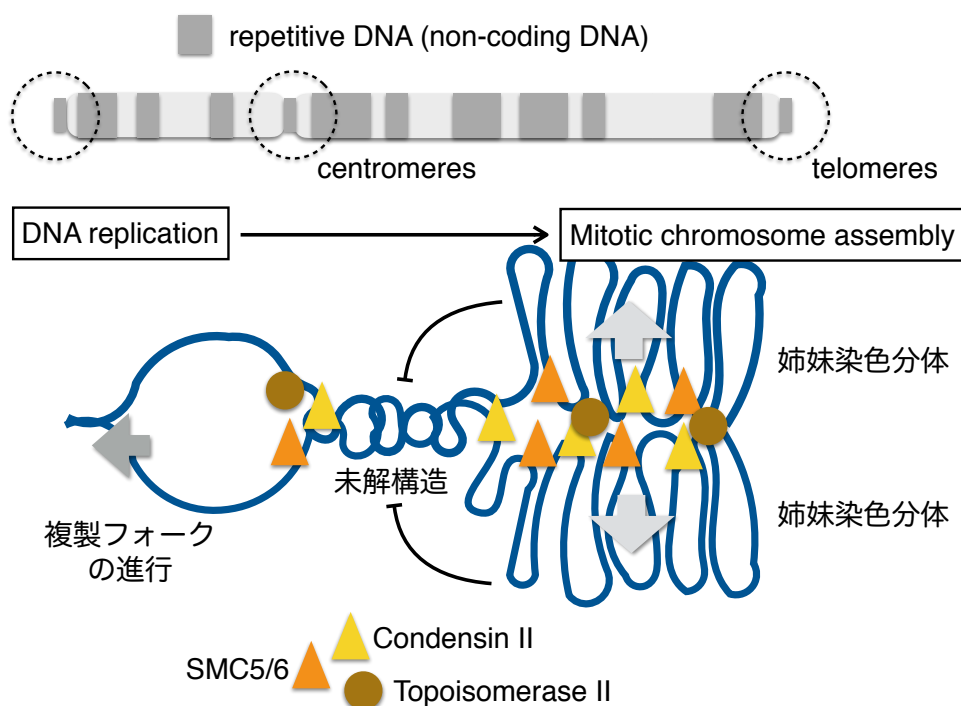
【研究成果】

真核生物には 6 つの SMC タンパク質があり、SMC1/3 はコヒーシン、SMC2/4 はコンデンシンの構成因子として、それぞれ、姉妹染色分体の結合、クロマチンの凝縮を促進する。SMC5/6 については、その酵母変異体が致死であり、やはり重要な役割を担っていると予測されていたがその機能は不明であった。われわれはヒト細胞で、細胞周期同調下に SMC5/6 複合体のノックダウンを効率よく行う実験系を整え、この複合体がスムーズな複製の進行に必要であることを見出した。特に、SMC5/6 の機能は、セントロメアおよびテロメアといった繰り返し配列の多い非コード領域においては不可欠であった。このことから、非コード DNA 領域の複製過程の遅滞が、M 期における姉妹染色分体間の「未解構造」となって染色体構築異常や分離異常の原因となることが示唆された。つまり、非コード DNA 領域の細胞周期を通じた構造変換は、細胞がゲノムの安定性を保つための鍵であることが示唆された。

次いで、M 期染色体の形態を解析すると、SMC5/6 の欠損細胞では染色体軸索のコイル状変化を特徴とする染色体を形成することがわかった。特に、セントロメアやテロメアには、未解構造に起因すると思われる異常な構造が生じて、染色体分離異常を誘発し

た。ChIP-sequence解析と、独自に確立した染色体スプレッドと免疫染色法を組み合わせた解析を行い、このSMC5/6の欠損細胞でみられる染色体構造異常は、トポイソメラーゼII α (トポ2) の動態異常と関連があることを突き止めた。

さらに、DNA複製の進行異常との関連性を検討するために、人為的染色体凝縮法、BrdU標識法、免疫染色法を組み合わせた実験を行い、SMC5/6複合体によるDNA複製進行の促進は、複製直後にトポ2のクロマチン結合を、そしてトポ2結合がコンデンシンの軸索への局在を促すことが、M期における染色体の適正な構築（姉妹染色分体の形成）に必要であることを見出した。これらの観察から、セントロメアやテロメアといった非コード領域の複製が、M期までには完了することが必要で、そのためにはSMC5/6が不可欠な役割を担っていることが明らかとなった。SMC5/6とトポ2とコンデンシンの三者が協調して、複製後の構造維持からM期染色体の構築に必要なクロマチン構造をつくるという作業仮説が導き出された。



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Takahashi, M., Wakai, T., *Hirota, T. (2016) Condensin I-mediated mitotic chromosome assembly requires association with chromokinesin KIF4A. *Genes Dev.* 30: 1931-1936. (査読有り)
2. *Tanaka, K., *Hirota, T. (2016). Chromosomal instability: A common feature and a therapeutic target of cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1866: 64-75. (査読有り)
3. Abe, Y., *Hirota, T. (2016). System-level deficiencies in Aurora B control in cancers. *Cell Cycle* 15: 2091-2092. (査読有り)
4. Nagasaka, K., Hossain, J.M., Roberti, J.M., *Ellenberg, J., *Hirota, T. (2016). Sister chromatid resolution is an intrinsic part of chromosome organization in prophase. *Nat Cell Biol.* 18: 692-699. (査読有り)
5. Abe, Y., Sako, K., Takagaki, K., Hirayama, Y., Uchida, K.S.K., Herman, J., DeLuca, J.G., *Hirota, T. (2016). HP1-assisted Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors. *Dev Cell.* 36: 487-497. (査読有り)
6. Takahashi, M., Tanaka, K., Wakai, T., *Hirota, T. (2016). Phosphoproteomic analysis of human mitotic chromosomes identified a chromokinesin KIF4A. *Biomed Res.* 37: 161-165. (査読有り)
7. Nagasaka, K., *Hirota, T. (2015). Clarifying the role of condensins in shaping chromosomes. News and Views. *Nat Cell Biol.* 17: 711-713. (査読無し)
8. Minamino, M., Ishibashi, M., Nakato, R., Akiyama, K., Tanaka, H., Kato, Y., Negishi, L., Hirota, T., Sutani, T., Bando, M., *Shirahige, K. (2015). Escol acetylates cohesin via a mechanism different from that of Esco2. *Curr Biol.* 25: 1694-706. (査読有り)
9. Gallego-Paez, L.M., Tanaka, H., Bando, M., Takahashi, M., Nozaki, N., Nakato, R., *Shirahige, K., *Hirota, T. (2014). Smc5/6-mediated replication progression contributes to chromosome assembly in human cells. *Mol Biol Cell.* 25 (2): 302-317. (査読有り)
10. Ando, K., Ozaki, T., Hirota, T., *Nakagawara, A. (2013). NFBFD1/MDC1 is phosphorylated by Plk1 and controls G2/M transition through the regulation of Topoisomerase II alpha-mediated decatenation checkpoint. *PLoS One.* 8 (12): e82744. (査読有り)
11. *Earnshaw, W. C., Allshire, R. C., Black, B. E., Bloom, K., Brinkley, B. R., Brown, W., Cheeseman, I. M., Choo, K. H. A., Copenhaver, G. P., DeLuca, J. G., Desai, A., Diekmann, S., Erhardt, S., Fitzgerald-Hayes, M., Foltz, D., Fukagawa, T., Gassmann, R., Gerlich, D. W., Glover, D. M., Gorbsky, G. J., Harrison, S. C., Heun, P., Hirota, T., Jansen, L. E. T., Karpen, G., Kops, G. J. P., Lampson, M. A., Lens, S. M., Losada, A., Luger, K., Maiato, H., Maddox, P. S., Margolis, R. L., Masumoto, H., McAinsh, A. D., Mellone, B. G., Meraldi, P., Musacchio, A., Oegema, K., O'Neill, R. J., Salmon, E. D., Scott, K., Straight, A. F., Stukenberg, P. T., Sullivan, B. A., Sullivan, K. F., Sunkel, C. E., Swedlow, J. R., Walczak, C. E., Warburton, P. E., Westermann, S., Willard, H. F., Wordeman, L., Yanagida, M., Yen, T. J., Yoda, K., Cleveland, D. W. (2013). Esperanto for Histones: CENP-A, not CenH3, is the centromeric histone H3 variant. Commentary. *Chromosome Res.* 21(2): 101-106. (査読有り)
12. Itoh, G., Sugino, S., Mizuguchi, M., Kanno, S., Amin, MA., Iemura, K., Ikeda, M., Yasui, A., Hirota, T., *Tanaka, K. (2013). The nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis. *Cancer Sci.* 104(7): 871-879. (査読有り)
13. 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. (2012). HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature* 489: 313-317. (査読有り)

14. Shindo, N., Kumada, K., *Hirota, T. (2012). Separase-sensor reveals dual roles for separate coordinating cohesin cleavage and cdk1 inhibition. *Dev Cell* 23: 112-123. (査読有り)

《学会発表》

1. Toru Hirota “A system level deficiency of the chromosomal passenger complex in cancer cells” The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA) Nagoya, 2015.10.08 (招待、国内)
2. Toru Hirota “An origin of chromosome missegregation in mitosis” The 27th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul (Korea), 2015.09.21-23 (招待、海外)
3. 広田 亨 「がん細胞における染色体制御システムの破綻：明かされつつある染色体不安定性の分子背景」新学術領域・がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動・公開シンポジウム, 東京, 2015.09.09 (招待、国内)
4. 広田 亨 「がんと染色体」第 70 回日本臨床細胞学会細胞検査士教育セミナー, 神戸, 2015.09.06 (招待、国内)
5. Toru Hirota “Dynamic deformation of kinetochores controls mitotic progression” The 4th Dynamic Kinetochose Workshop, Copenhagen (Denmark) 2015.05.18-22. (招待、海外)
6. 広田 亨 “HP1-assisted Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors” 国際高等研究所研究プロジェクト「クロマチンデコーディング」研究会, 京阪奈市, 2015.03.20 (招待、国内)
7. Toru Hirota “Control of chromosome structure outside mitosis” 2014 Asia GenomeCheck Conference, Suwon (Korea) 2014.03.07. (招待、海外)
8. Toru Hirota “An origin of chromosome missegregation in mitosis” The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, 2014.11.27. (招待、国内)
9. Toru Hirota “A molecular lesion of chromosome missegregation in mitosis” The 73rd Japanese Cancer Association, Annual Meeting, Yokohama, 2014.09.26. (招待、国内)
10. 広田 亨 「ライブ・セル・イメージングがもたらすがん研究の新展開」第 11 回日本病理学会カンファレンス, 神戸市, 2014.08 (招待、国内)
11. Toru Hirota “Smc5/6-mediated regulation of replication progression contributes to mitotic chromosome assembly” The 18th IMCB Symposium: SMC from molecule to disease, Tokyo, 2013.11.29. (招待、国内)
12. Toru Hirota “Cell cycle regulation of chromosome structure that maintains genomic instability” The 72nd Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Yokohama, 2013.10.03. (招待、国内)
13. Toru Hirota “What makes kinetochores so dynamic?” The 3rd Dynamic Kinetochose Workshop, Porto (Portugal), 2013.05.14-17. (招待、海外)
14. 広田 亨 「がん細胞における異数性の発生要因を考える」第 8 回新潟横断的消化器疾患研究会, 新潟市, 2013.03.23. (招待、国内)
15. Toru Hirota “How cells ensure separation of sister chromatids in mitosis” The 1st International Symposium on Molecular Medicine. Suwon (Korea), 2013.02.28. (招待、海外)
16. Toru Hirota “How cells ensure separation of sister chromatids in mitosis” CNRS Jacques Monod Conference on Cell cycle, Roscoff, France, 2012.09.07. (招待、海外)
17. Toru Hirota “How chromosomes are assembled in mammalian cells” Symposium on sister chromatid cohesion, Vienna, 2012.08.24. (招待、海外)

18. Toru Hirota “Dual functions of separase ensure switch-like initiation of anaphase” Joint Spring Meeting of BSCB/BSCB/JSDB. Coventry (United Kingdom), 2012.04.17. (一般口演、海外)

《図書》

1. Uchida, KSK, and *Hirota, T. (2016) Spindle assembly checkpoint: its control and aberration. DNA Replication, Recombination and Repair - Molecular Mechanisms and Pathology. Hanaoka and Sugawara ed. pp 429-447.
2. Nagasaka, K., Gallego-Paez, L.M., Hirota, T. (2011) Mitosis and Meiosis: Molecular control of chromosome separation. Review. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd. (査読有り)

《和文総説》

1. 小西 惇、松高 愛、広田 亨 (2015) 染色体不安定性の成因. 細胞 47 (5): 5-8. (査読無し)
2. 高橋元子、進藤軌久、広田 亨 (2014) ライブ・セル・イメージング解析を用いた細胞分裂研究法: バイオセンサーによる酵素活性の時空間的解析. 実験講座. Surgery Frontier, 21 (2): 205-209. (査読無し)
3. 進藤軌久、広田 亨 (2013) 第1部 エピジェネティクスの分子機構: 「ヒストン修飾とその制御: ヒストンのリン酸化」イラストで徹底理解するエピジェネティクスキーワード事典: 分子機構から疾患・解析技術まで (牛島俊和, 真貝洋一編集), 東京, 羊土社 p.61-66 (査読無し)
4. 進藤軌久、広田 亨 (2013) 第2部 生命現象とエピジェネティクス「その他の染色体制御」イラストで徹底理解するエピジェネティクスキーワード事典: 分子機構から疾患・解析技術まで (牛島俊和, 真貝洋一編集), 東京, 羊土社 p.116-122 (査読無し)
5. 高橋元子、広田 亨 (2013) What's New in SURGERY FRONTIER (第79回) 細胞周期の最新知見「リン酸化による染色体凝縮の制御: コンデンシンに焦点をあてて」 Surgery Frontier, 20 (4): 420-424 (査読無し)
6. 進藤軌久、広田 亨 (2013) 細胞分裂の仕組みに迫る: 染色体分離のキー酵素separaseの活性の可視化と作用機序の解明. バイオサイエンスとインダストリー, 71 (3): 229-233 (査読無し)
7. 阿部優介、広田 亨 (2013) ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期2013 がん治療と生命現象の解明をめざして: (第1章) 高等動物における細胞周期制御 Greatwallによるリン酸化バランス調節に基づくM期開始制御. 実験医学 31 (2): 175-181 (査読無し)

《特許などその他成果》

発明者: 広田 亨、阿部 優介

発明の名称: HP1の機能に着目した抗がん剤のスクリーニング方法及び評価系

出願番号: 特願2016-035505 平成28年2月26日

発明者: 広田 亨、進藤軌久、熊田和貴

発明の名称: 細胞観察用蛍光プローブ及びこれを使用する方法

出願番号: 特願2014-010635 平成26年1月26日

《受賞(若手)》

1. Lina M. Gallego-Paez (大学院生) UNESCO-L’Oreal International Fellows 「=若手」
2. 高橋元子 (大学院生) 第38回日本分子生物学会若手優秀発表賞 「=若手」
3. 長坂浩太 (大学院生) 赤池ジャーナル賞 「=若手」

《アウトリーチ活動、社会貢献》

[アウトリーチ活動]

江東区高校生向けサマースクール「がん教育」平成25年7月25日
県立栃木高等学校創立記念講演会「細胞の不思議に魅せられて」平成25年11月13日
都立日比谷高校・細胞生物学講義「染色体動態の制御とその破綻」平成27年7月23日
第70回細胞検査士教育セミナー「がんと染色体」平成27年9月6日
江東区高校生向けサマースクール「がん教育」平成28年7月28日
小山市穂積公民館・講演会「知っておこう がんのこと」平成28年10月15日

[マスメディアによる情報発信]

記事「がん医療を拓く—ふぞろいを狙い撃つ」平成24年10月 ロハスメディカル
江東区高校生向けサマースクール「がん教育」平成25年7月26日 東京新聞
研究の情報発信については、Abe et al. Dev Cell 2016のプレスリリースを行い、日経産業新聞、日刊工業新聞、日本科学新聞に平成28年3月8日付けで記事が掲載されました。また日経メディカルCancer Review誌（平成28年3月20日発刊号）にも取り上げていただきました。

《学会の主催》

1. がん若手研究者ワークショップ、国内、平成27年9月2日～9月5日、蓼科高原

転写因子 ATF7 を介した、ストレスによるテロメアの長さの変化と老化の促進



前川 利男

公募研究 代表者（平成 24-25 年度）
理化学研究所

【研究目的】

ストレスで活性化される転写因子 ATF7 がどのような因子と複合体を形成して、テロメアの長さの調節を制御しているのか、その分子メカニズムを明らかにする。また、ストレスでテロメアの長さがどのように変化するのか、変化したテロメアの長さは次世代に影響を与えるのか等も ATF7 のノックアウトマウスを用いて解析する。

【研究成果】

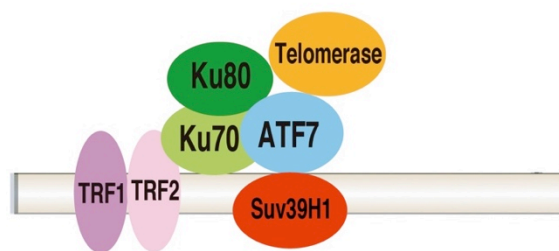
転写因子 ATF7 は TGACGTCA (CRE 配列) に特異的に結合する転写因子であり、テロメアはこの配列を持たないので ATF7 は直接テロメアには結合できない。そこで、HeLa 細胞を用いて ATF7 複合体を精製し、MAS 解析を行った。その結果、ATF7 は Ku70/Ku80 と複合体を形成して、染色体末端のテロメアに結合し、テロメラーゼをリクルートしてテロメアの長さを調節していることが分かった。即ち、TNF- α や UV 刺激等のストレスによって ATF7 が p38 によってリン酸化されると、ATF7 は Ku70/80 及びテロメラーゼから解離し、テロメアにテロメラーゼをリクルートできなくなるので、テロメアの短縮が起こる。これまで、ストレスによって老化が促進されることはよく知られているが、そのメカニズムを示すことができたと考えている。

また、野生型マウスの雄親にストレスを与えると子供のテロメアの長さが短く成り、このテロメアの短縮が次世代に受け継がれることも見つけた。この現象は ATF7 のノックアウトマウスを用いた実験では見られなかったので、この次世代に受け継がれる現象は ATF7 依存的であることが分かった。この分子メカニズムをマウスの精子を用いて詳しく解析した結果、ストレスによって ATF7 がリン酸化されるとヒストンメチル化酵素である Suv39H1 と共にテロメアから解離し、その結果 H3K9me3 のレベルが低下し、サブテロメア領域から発現される非コード RNA が発現上昇して、卵子に運ばれることが明らかに成った。

次に、マウスの自然免疫系を担うマクロファージでは、ATF7 はヒストン H3K9 のジ

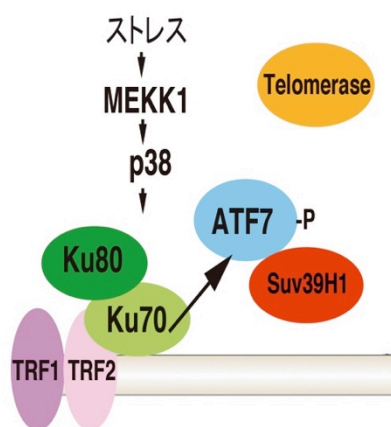
メチル化酵素 G9a をリクルートして Cxcl2 や Stat1 の転写を抑制している。マウスを LPS で刺激すると ATF7 がリン酸化されてプロモーター領域から外れ、H3K9 のジメチル化が減少して転写が活性化される。この活性化は3週間以上持続して、細菌感染を抑制することを発見した。これまで、自然免疫には記憶のような現象は無いと考えられてきたが、長期に渡って細菌感染を抑制する効果から、部分的な記憶に相当するのではないかと考えている。

テロメアの長さの維持



テロメアの長さの維持

ストレスによるテロメアの長さの短縮



テロメアの長さの短縮

↓
次世代への影響

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Liu, Y., Maekawa, T., Yoshida, K., Furuse, T., Kaneda, H., Wakana, S., Ishii, S. (2016). ATF ablation prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 478:696-702. (査読有り)
2. Liu, B., Maekawa, T., Chatton, B., Ishii, S. (2016). In utero TNF- α treatment induces telomere shortening in young adult mice in an ATF7-dependent manner. *FEBS Open Bio*, 6:56-63. (査読有り)
3. Yoshida, K., Maekawa, T., Zhul, Y., Renard-Guillet, C., Chatton, B., Inoue, K., Uchiyama, T., Ishibashi, K., Yamada, T., Ohno, N., Shirahige, K., Okada-Hatakeyama, M., Ishii, S. (2015). The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory. *Nature Immunology*, 16:1034-1043. (査読有り)
4. Seong, K., Maekawa, T., Ishii, S. (2012). Inheritance and memory of stress-induced epigenome change: roles played by the ATF-2 family of transcription factors. *Genes to Cells* 17:249-263. (査読有り)

《学会発表》

1. Maekawa T “ATF7 mediates stress-induced telomere shortening” International Symposium for RIKEN Epigenetics Program 2016, Saitama, Wako, Feb.15-16, 2016 (ポスター、国際)
2. Yoshida K “The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory” International Symposium for RIKEN Epigenetics Program 2016, Saitama, Wako Feb.15-16, 2016 (ポスター、国際)
3. Binbin Liu, TNF- α treatment in fathers programs telomere shortening in mouse offspring, 第38回日本分子生物学会、神戸市、2015年12月1-4日、(ポスター、国内)
4. 前川利男「転写因子 ATF-7 を介したストレスによるテロメアの長さの制御」第38回日本分子生物学会、神戸市、2015年12月1-4日 (ワークショップ、国内)
5. 吉田圭介、「ATF7 はエピジェネティック記憶を通じて、自然免疫記憶を制御する」第38回日本分子生物学会、神戸市、2015年12月1-4日、(ポスター、国内)
6. 前川利男「転写因子ATF-7を介したストレスによるテロメアの長さの制御」第37回日本分子生物学会、横浜市2014年11月25-27日 (ポスター、国内)
7. 前川利男「転写因子ATF-7を介したストレスによるテロメアの長さの制御」第36回日本分子生物学会、神戸市2013年12月3-6日 (ポスター、国内)
8. 前川利男「ストレスによるエピゲノム変化の遺伝」日本エピジェネティクス研究会、奈良市、2013年5月30-31日 (招待、国内)
9. 前川利男「転写因子 ATF-7 を介したストレスによるテロメアの長さの制御」理研シンポジウム、茨城県つくば市、2013年5月11-12日 (主催、国内)
10. 吉田圭介「マクロファージの炎症時におけるATF-7の機能解析」第35回日本分子生物学会、福岡市、2012年12月11-14日 (ポスター、国内)
11. 前川利男「転写因子ATF-7を介したストレスによるテロメアの長さの制御」第35回日本分子生物学会、福岡市、2012年12月11-14日 (ポスター、国内)

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 平成12年4月20-21日、研究所内一般公開、一般の方々に研究室の研究内容と成果を公表。

2. 平成 13 年 4 月 19-20 日、研究所内一般公開、一般の方々に研究室の研究内容と成果を公表。
3. 平成 14 年 4 月 18-19 日、研究所内一般公開、一般の方々に研究室の研究内容と成果を公表。
4. 平成 15 年 4 月 17-18 日、研究所内一般公開、一般の方々に研究室の研究内容と成果を公表。
5. 平成 16 年 4 月 22-23 日、研究所内一般公開、一般の方々に研究室の研究内容と成果を公表。

(毎年参加者は 1500 名以上)

CpG アイランドを制御する CXXC タンパク質の機能解析



伊藤 伸介

公募研究 代表者（平成 24~25 年度）
理化学研究所・統合医科学研究センター

【研究目的】

CpG アイランド (CGI) は、高い GC 含量、高密度の CpG ジヌクレオチドをもつゲノム領域であり、多くの哺乳動物遺伝子のプロモーターとして機能するため、遺伝子発現制御において非常に重要な非コード DNA である。しかしながら、CGI の機能制御メカニズムはあまり理解されていない。本研究では、CGI に結合する CXXC ドメインをもつタンパク質 (CXXC タンパク質) に焦点を当てて解析して、CGI による遺伝子発現調節のメカニズムを解明し、CGI の生物学的意義を理解することを目的とした。

【研究成果】

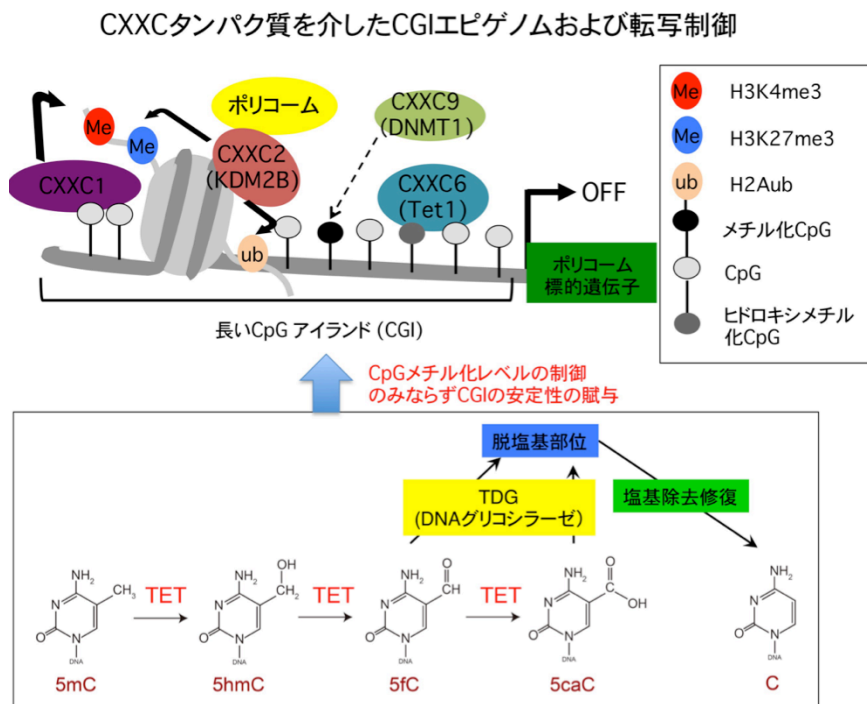
CGI は、エピジェネティック修飾のプラットフォームとして機能して遺伝子発現調節を含む複数の生命現象を制御している。CXXC タンパク質は CGI に結合し、CGI 特有のエピジェネティック修飾を確立することに寄与する。

CGI は一般的にメチル化シトシン (5mC) をもたないが、CXXC ドメインを有する TET ファミリータンパク質が DNA 脱メチル化することによって 5mC の除去に貢献している。TET は、メチル基を連続的に酸化し、酸化的 DNA 脱メチル化の中間産物である 5hmC、5fC、5caC を合成する。これらの中間産物は、酸化的 DNA 損傷と類似した構造をもち、且つ比較的安定に存在するため、その存在意義の解明を目指した。本研究では、5fC や 5caC は、塩基除去修復酵素 TDG により迅速に除去されない場合、DNA 複製を阻害し、細胞死を誘導することを明らかにした。CpG アイランド (CGI) は 5mC を積極的に排除する傾向にあるが、5mC は酸化的 DNA 脱メチル化により 5caC に変換され、TDG により迅速に除去されることにより安定に維持されていることを示唆するものである。一方で、5hmC は DNA 複製に対して阻害的には働かないため、エピジェネティック修飾として機能することも示唆され、CGI の機能制御に貢献すると考えられる。

他方、CXXC タンパク質 KDM2B は、転写抑制因子ポリコーム群と安定なタンパク質複合体を形成する。本研究では、CXXC ドメインを介して KDM2B はポリコーム複合体を CGI にリクルートし、ポリコームによる転写抑制ドメインを導入することを明らかに

した。この発見は、ポリコーム複合体の作用機序に関する定説を覆すものであった。また、ChIP-seqデータセットをインフォマティクス解析して、CGIを長さにより分類することにより、1000bp以上の長いCGIは、ポリコーム複合体のターゲットとなりやすいことを明らかにした。

これらの研究成果は、CXXCタンパク質を介したCGIの機能制御の一端を解明するものである。



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Kondo, T., Ito, S., *Koseki, H. (Co-fast) (2016). Polycomb in Transcriptional Phase Transition of Developmental Genes. *Trends Biochem Sci.* 41:9-19. (査読有り)
2. *Ito, S., *Kuraoka, I. (*Co-corresponding) (2015). Epigenetic modifications in DNA could mimic oxidative DNA damage: A double-edged sword. *DNA Repair* 32: 52-57. (査読有り)
3. Shibutani, T., *Ito, S., Toda, M., Kanao, R., Collins, LB., Shibata, M., Urabe, M., Koseki, H., Masuda, Y., Swenberg, JA., Masutani, C., Hanaoka, F., Iwai, S., *Kuraoka, I. (*Co-corresponding) (2014). Guanine- 5-carboxylcytosine base pairs mimic mismatches during DNA replication. *Sci Rep.* 4:5220. (査読有り)
4. Blackledge, NP., Farcas, AM., Kondo, T., King, HW., McGouran, JF., Hanssen, LLP., Ito, S., Cooper, S., Kondo, K., Koseki, Y., Ishikura, T., Long, HK., Sheahan, TW., Brockdorff, N., Kessler, BM., Koseki, H., *Klose, RJ. (2014). Variant PRC1 complex dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell* 157: 1-15. (査読有り)
5. Sharif, J., Endo, TA., Ito, S., Ohara, O., *Koseki, H. (2013). Embracing change to remain the same: conservation of polycomb functions despite divergence of binding motifs among species. *Curr Opin Cell Biol.* 25: 305-313. (査読有り)

《学会発表》

1. 伊藤伸介「哺乳動物における DNA メチル化のダイナミクス」日本化学会第 93 春季年会、滋賀、2013 年 3 月 22 日 (招待、国内)
2. 伊藤伸介「Tet タンパク質による酸化的 DNA 脱メチル化経路の解析」大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪、2012 年 9 月 28 日(招待、国内)
3. 伊藤伸介「Tet タンパク質を介した DNA 脱メチル化経路の解析」第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会、東京 2012 年 5 月 14 日 (招待、国内)

《図書》

1. 古関明彦、伊藤伸介、増井修、Jafar Sharif 一目でわかる臨床遺伝学 第2版 メディカルサイエンスインターナショナル 2014年10月

《和文総説》

1. ポリコーム複合体によるエピゲノム制御、伊藤伸介, 古関明彦、細胞工学 (秀潤社)、9、847-851、2015年
2. DNAの脱メチル化、伊藤伸介、イラストで徹底理解する エピジェネティクス キーワード事典 (羊土社)、2013年

染色体の核内高次構築を支配する非コード領域とそれを制御するタンパク質の解析



正井 久雄

公募研究 代表者 (平成 24~27 年度)
公益財団法人 東京都医学総合研究所

【研究目的】

本研究では、申請者が最近発見した染色体複製タイミングドメインをゲノムワイドで制御する Rif1 タンパク質による、染色体構築の制御機構の解明を目的とする。Rif1 が染色体上の特定の領域に結合するメカニズムとその様式を生化学的に解明する。又、遺伝子改変マウス、細胞を用いて Rif1 が複製以外の染色体ダイナミクス、発生・分化の過程に及ぼす影響を更に詳細に解析する。

【研究成果】

① Rif1 タンパクの G4 構造への結合による染色体ドメイン構造形成メカニズム

複製タイミングの制御因子として同定した核内因子 Rif1(図 1,2)を解析した結果、以下の知見を得た。

- 1) 染色体上の Rif1 結合部位は G-stretch を含む保存配列を有し、この配列に依存して染色体に結合する(図 3)。
- 2) Rif1 結合配列はこの保存配列に依存して G4 構造を形成する(図 4)。
- 3) 分裂酵母及び動物細胞の Rif1 タンパク質は G4 構造に特異的に結合する。
- 4) Rif1 は多量体を形成し、複数の DNA 分子に同時に結合することができる。これは細胞内で多くの染色体繊維を束ねて染色体ドメインの形成する Rif1 の能力を反映する可能性がある(図 5)。
- 5) Rif1 は核膜面に強く association しているが、これは C 端 29aa に依存する。C 端 29aa は多量体形成にも必要である。
- 6) 転写により in vitro で Rif1 結合配列は G4 様構造を形成し Rif1 はそれに結合す

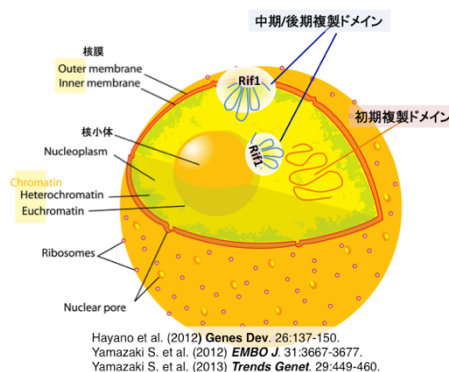


図 1 Rif1 は核膜上の核骨格結合領域に結合し、クロマチンループ構造の形成を介して複製抑制ドメインを形成する。

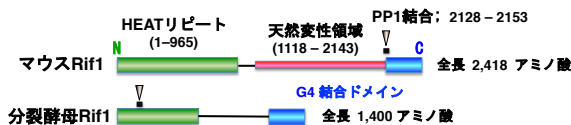


図 2 Rif1 タンパク質の構造の模式図
Rif1 は N 端側に HEAT リピート (緑色) を、C 端側に DNA 結合ドメイン (青色) を有する。動物細胞の Rif1 は中央に天然変性タンパク質領域を有する。PP1 フォスファターゼ結合部位も保存される。C 端領域は多量体化にも必要とされる。

る。細胞内においても非コード領域の転写により G4 構造が形成される可能性がある。

② 動物細胞 Rif1 による遺伝子クラスターの発現制御機構、個体発生における役割の解析

1) Rif1 は転写にも大きな影響を与える(図6)。数 100kb から Mb にわたる広範な遺伝子クラスター領域の転写を抑制する。影響を受ける遺伝子群の中には Zscan4a 等の 2 細胞期遺伝子群が含まれる。

2) Rif1 の欠失は ES 細胞から三胚葉への分化を阻害するとともに、人工多能性幹 (iPS) 細胞の形成能を低下させた。これらから、Rif1 は染色体ドメイン構造の制御を介して細胞分化やリプログラミング時の遺伝子発現プログラムの変換に寄与することが示唆された。

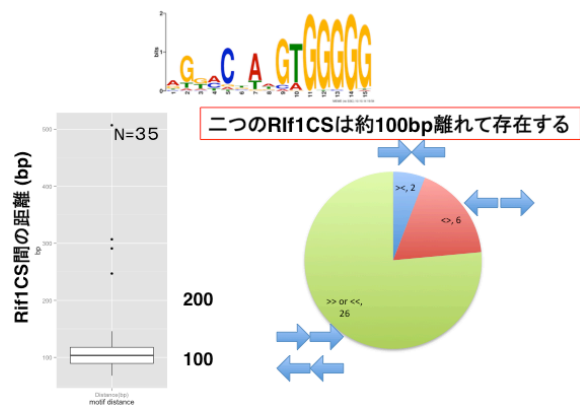


図3 Rif1 結合領域に保存された配列 RIF1CS

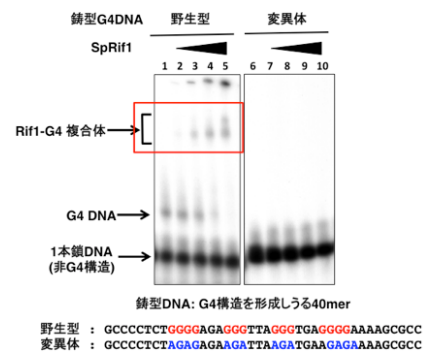


図4 Rif1 は G4 構造特異的に結合する。

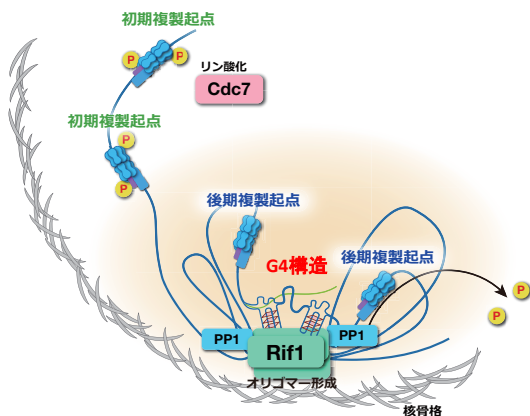


図5 Rif1によるクロマチンドメイン制御のモデル
Rif1 は、核骨格において複数のクロマチン繊維に結合しクロマチンループの形成に貢献する。これにより複製や転写を抑制する染色体機能ドメインを形成する可能性がある。

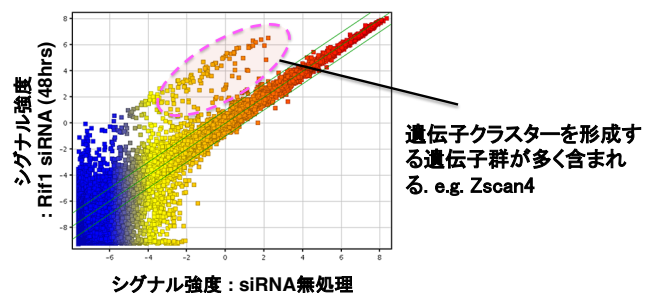


図6 ES 細胞において Rif1 をノックダウンすると一群の遺伝子の発現が誘導される。Rif1 ノックダウンにより誘導される一群の遺伝子のなかには Zscan4 などの遺伝子クラスターを形成するものが多く含まれる。

【研究発表】

《主な発表論文等》

- 1 Kitamura, R., Fukatsu, R., Kakusho, N., Cho, Y-S., Taniyama, C., Yamazaki, S., Toh, G-T., Yanagi, K., Arai, N., Chang, H-J. and *Masai, H. (2011) Molecular mechanism of activation of human Cdc7 kinase: Bipartite interaction with Dbf4/ASK stimulates ATP binding and substrate recognition." *J. Biol. Chem.* 286: 23031-23043. (査読有り)
- 2 Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S., Kakusho, N. and *Masai, H. (2011) Pre-firing binding of Mrc1 defines the early-firing origins which are selectively hyper-activated upon loss of fork stabilizing factors in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 31: 2380-2389. (査読有り)
- 3 Uno, S and *Masai, H. (2011) Efficient expression and purification of human replication fork-stabilizing factor, Claspin, from mammalian cells: DNA binding activity and novel protein interactions. *Genes to Cells*, 16: 842-856. (査読有り)
- 4 Matsumoto, S., Hayano, M., Kanoh, Y. and *Masai, H. (2011) Multiple pathways can bypass the essential role of fission yeast Hsk1 kinase in DNA replication initiation." *J. Cell Biol.* 195: 387-401. (査読有り)
- 5 Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S., Shrahige, K. and *Masai, H. (2012) Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast. *Genes and Development* 26: 137-150. (査読有り)
- 6 Yamazaki, S., Ishii, A., Kanoh, Y., Oda, M., Nishito, Y. and *Masai, H. (2012) Rif1 protein is a key regulator of the genome-wide DNA replication timing in human cells. *EMBO J.* 31: 3167-3177. (査読有り)
- 7 Barkley, L.R., Palle, K., Durando, M., Day, T.A., Gurkar, A., Kakusho, N., Li, J., Masai, H., *Vaziri, C. (2012) c-Jun N-terminal Kinase (JNK)-Mediated Rad18 Phosphorylation Facilitates Polη Recruitment to Stalled Replication Forks. *Mol. Biol. Cell.* 23: 1943-1954. (査読有り)
- 8 Moriyama, K., Yoshizawa-Sugata, N., Obuse, C., Tsurimoto, T. and *Masai, H. (2012) EBNA1-dependent recruitment of Orc on OriP of Epstein-Barr virus with purified proteins: Stimulation by Cdc6 through Its direct interaction with EBNA1. *J. Biol. Chem.* 287: 23977-23994. (査読有り)
- 9 Ito, S., Ishii, A., Kakusho, N., Taniyama, C., Yamazaki, S., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., and *Masai, H. (2012) Mechanism of cancer cell death induced by depletion of an essential replication regulator. *PLoS One*, 7: e36372. (査読有り)
- 10 Uno, S., You, Z., and *Masai, H. (2012) Purification of replication factors using insect and mammalian cell expression systems. *Methods*, 57: 214-221. (査読有り)
- 11 Oda, M., Kanoh, Y., Watanabe, Y., and *Masai, H. (2012) Regulation of DNA replication timing on human chromosome by a cell-type specific DNA binding protein SATB1. *PLoS One* 7: e42375. (査読有り)
- 12 Miyoshi, T., Kugou, K., Yamada, S., Ito, M., Furuichi, M., Oda, A., Hirota, K. and Masai, H. and *Ohta, K. (2012) A central coupler for recombination initiation linking chromosome architecture to S-phase checkpoint. *Mol. Cell* 47, 722-733. (査読有り)
- 13 Suzuki, T., Tsuzuku, J., Hayashi, A., Shiomi, Y., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Kodama, T., Nishitani, H., Masai, H. and *Yamamoto, T. (2012) Inhibition of DNA damage-induced apoptosis through Cdc7-mediated stabilization of Tob. *J. Biol. Chem.* 287: 40256-40265. (査読有り)
- 14 Yamada, M., Watanabe, K., Mistrik, M., Mailand, N., Lee, M-H., Masai, H., Lukas, J. and *Bartek, B. (2013) ATR-Chk1-APC/C^{Cdh1}-dependent stabilization of Cdc7-ASK(Dbpf4) kinase complex is required for DNA damage bypass under replication stress. *Genes and Development* 27: 2459-2472. (査読有り)
- 15 You, Z., De Falco, S., Pisani, F.M. and *Masai, H. (2012) MCM helicase interacts with primase and stimulates its priming activity. *PLoS One* 8: e72408 (査読有り)

- 16 Aria, V., De Felice, M., Di Perna, R., Uno, S., Masai, H., Syvaioja, J.E., van Loon, B., Hubscher, U., *Pisani, F.M. (2013) The Human Tim/Tipin Complex Directly Interacts with DNA Polymerase {epsilon} and Stimulates its Synthetic Activity. *J. Biol. Chem.* 288: 12742-12752. (査読有り)
- 17 Jeffery, D.C., Wyse, B.A., Rehman, M.A., Brown, G.W., You, Z., Oshidari, R., Masai, H., *Yankulov, K.Y. (2013) Analysis of epigenetic stability and conversions in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a novel role of CAF-I in position-effect variegation. *Nucleic Acids Res.* 41: 8475-8488. (査読有り)
- 18 Tanikawa, M., Wada-Hiraike, O., Yoshizawa-Sugata, N., Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Miyamoto, Y., Sone, K., Ikeda, Y., Kashiyama, T., Oda K, Kawana K, Katakura Y, Yano T, Masai, H., Roy AL, Osuga, Y., *Fujii, T. (2013) Role of multifunctional transcription factor TFII-I and putative tumour suppressor DBC1 in cell cycle and DNA double strand damage repair. *Br. J. Cancer.* 109: 3042-3048. (査読有り)
- 19 Bellelli, R., Castellone, M.D., Guida, T., Limongello, R., Dathan, N.A., Merolla, F., Cirafici, A.M., Affuso, A., Masai, H., Costanzo, V., Grieco, D., Fusco, A., Santoro, M., and *Carlomagno, F. (2014) NCOA4 Transcriptional Coactivator Inhibits Activation of DNA Replication Origins. *Mol. Cell* 55: 123-137. (査読有り)
- 20 Jeffery, D., Kakusho, N., You, Z., Gharib, M., Wyse, B., Drury, E., Weinreich, M., Thibault, P., Verreault, A., Masai, H. and *Yankulov, K. (2015) CDC28 phosphorylates Cac1p and regulates the association of Chromatin Assembly Factor I with chromatin. *Cell Cycle* 14: 74-85. (査読有り)
- 21 Kotaro Koiwai, Takashi Kubota, Nobuhisa Watanabe, Katsutoshi Hori, Osamu Koiwai and *Hisao Masai (2015) Definition of the transcription factor TdIF1 consensus binding sequence through genome-wide mapping of its binding sites." *Genes to Cells* 20: 242-254. (査読有り)
- 22 Zech, J., Godfrey, E.L., Masai, H., Hartsuiker, E. and *Dalgaard, J.Z. (2015) The DNA-Binding Domain of *S. pombe* Mrc1 (Claspin) Acts to Enhance Stalling at Replication Barriers. *PLoS One* 10: e0132595. (査読有り)
- 23 Iguchi, T., Aoki, K., Ikawa, T., Taoka, M., Taya, C., Yoshitani, H., Toma-Hirano, M., Koiwai, O., Isobe, T., Kawamoto, H., Masai, H. and *Miyatake, S. (2015) BTB-ZF Protein Znf131 Regulates Cell Growth of Developing and Mature T Cells. *J. Immunol.* 195:982-993. (査読有り)
- 24 Yutaka Kanoh, Seiji Matsumoto, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Nobuaki Kono, Claire Renard-Guillet, Koji Masuda, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, Katsuhiko Shirahige, and *Hisao Masai (2015) Rif1 binds to G-quadruplexes and suppresses replication over long distances. *Nature Struct. Mol. Biol.* 22: 889-897. (査読有り)
- 25 Zhiying You, Koji L. Ode, Haruhiko Takisawa, and *Hisao Masai (2016) Characterization of conserved arginine residues on Cdt1 that affect licensing activity and interaction with Geminin or Mcm complex. *Cell Cycle* 15:1213-26. (査読有り)
- 26 Tanaka T, Nishito Y, *Masai H. (2016) Fork restart protein, PriA, binds around oriC after depletion of nucleotide precursors: Replication fork arrest near the replication origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470: 546-551. (査読有り)
- 27 Tanaka H, Muto A, Shima H, Katoh Y, Sax N, Tajima S, Brydun A, Ikura T, Yoshizawa N, Masai H., Hoshikawa Y, Noda T, Nio M, Ochiai K, *Igarashi K. (2016) Epigenetic Regulation of the Blimp-1 Gene (Prdm1) in B Cells Involves Bach2 and Histone Deacetylase 3. *J. Biol. Chem.* 291: 6316-6330. (査読有り)
- 28 Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H., *Hasegawa M. (2016) Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1δ Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *J. Biol. Chem.* 291: 5473-5483. (査読有り)

- 29 Chi-Chun Yang, Masahiro Suzuki, Shiori Yamakawa, Syuzi Uno, Ai Ishii, Satoshi Yamazaki, Rino Fukatsu, Ryo Fujisawa, Kenji Sakimura, Toshiki Tsurimoto, *Hisao Masai (2016) Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication in human cells. *Nat Commun.* 7:12135. (査読有り)
- 30 Matsumoto, S., Kanoh, Y., Shimmoto, M., Hayano, M., Ueda, K., Fukatsu, R., Kakusho, N., *Masai, H. (2017) "Checkpoint-independent Regulation of Origin Firing by Mrc1 through Interaction with Hsk1 kinase." *Mol Cell Biol.* In press (査読有り)
- 31 Toteva, T., Mason, B., Kanoh, Y. Brøgger, P. Green, D., Verhein-Hansen, J. Masai, H. and Thon, G. (2017) "Establishment of expression-state boundaries by Rif1 and Taz1 in fission yeast." *Proc Natl Acad Sci USA.* In press (査読有り)

《学会発表》

1. Masai, H., (他 8 名) "Interaction with G-quadruplex structures forms a basis for Rif1-mediated regulation of DNA replication, transcription and chromatin architecture" Cold Spring Harbor Asia conference on DNA Metabolism, Genomic Stability and Human Disease、2016 年 6 月 13-17 日、China (招待講演)
2. Masai, H. "Biological roles of G-quadruplex structures" 14th IGAKUKEN International Symposium IGAKUKEN Summit for Japan and Korea Science Leaders 2016、2016 年 6 月 30 日-7 月 1 日、東京都医学総合研究所 (東京) (招待講演)
3. Masai, H. "グアニン 4 重鎖構造の生物学的意義 Molecular basis of chromosome and genome instability in cancer" HiHA 第 6 回 Workshop Hiroshima Research Center for Healthy Aging、2016 年 7 月 8 日、広島大学 (広島) (招待講演)
4. 正井 久雄 "大腸菌の第二の複製システムから考える複製システムの進化" 日本進化学会 第 18 回東京大会、2016 年 8 月 27 日、東京工業大学大岡山キャンパス (東京) (招待講演)
5. 田中 卓、関 由美香、正井 久雄(講演者) "大腸菌染色体の第二の複製システム" 第 88 回日本遺伝学会大会 ワークショップ、2016 年 9 月 9 日、日本大学 (静岡) (招待講演)
6. 正井 久雄, (他 5 名) "グアニン 4 重鎖の形成と、その認識タンパク質との相互作用" 第 89 回 日本生化学会大会、シンポジウム、2016 年 9 月 26 日、仙台 (宮城) (招待講演)
7. 正井 久雄 "グアニン 4 重鎖構造の生物学的意義 Biological Roles of G-quadruplex" 第 75 回日本癌学会学術総会、シンポジウム、2016 年 10 月 8 日、横浜 (神奈川) (招待講演)
8. 正井 久雄, (他 14 名) "グアニン 4 重鎖構造の普遍的生物学的意義の解明に向けて" 第 39 回日本分子生物学会年会、シンポジウム、2016 年 12 月 2 日、横浜 (神奈川) (招待講演)
9. 加納 豊、松本 清治、深津 理乃、覺正 直子、長澤 和夫、正井 久雄 "Rif1 によるグアニン 4 重鎖構造を介した DNA 複製制御" 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜 (ポスター発表)
10. 松本 清治、加納 豊、新本 美智枝、上野 勝、早野 元詞、工藤 聖美、正井 久雄 "Rif1 過剰発現は染色体分配の障害を誘導し M 期進行を阻害する" 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜 (ポスター発表)
11. 楊 其駿、鈴木 正浩、山川 栞、宇野 修司、石井 愛、山崎 聡志、深津 理乃、藤澤 遼、崎村 建司、釣本 敏樹、正井 久雄 "ヒト Claspin は Cdc7 キナーゼを複製開始反応へとリクルートする" 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜 (ポスター発表)

12. Kanoh, Y., Matsumoto, S., Fukatsu, R., Kakusho, N., Nagasawa, K. and Masai, H. “Rif1 interacts with chromatin through G-quadruplex and regulates DNA replication” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表）
13. Ito, S., Yamada, M., Goto, H., Inagaki, M. and Masai, H. “Cdc7 kinase activates Aurora B kinase by direct phosphorylation in human cells” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表）
14. Kobayashi, S., Fukatsu, R., Kanoh, Y. and Masai, H. “G4 binding domain of fission yeast Rif1 protein” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江
15. Lai, M-S., Kanoh, Y., Foiani, M. and Masai, H. “Replicon dynamics in response to double-strand break formation” 第10回3R国際シンポジウム2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表）
16. Masai, H., Kanoh, Y., Kakusho, N., Fukatsu, R., Ma, Y., Ikeda, K., Nagasawa, K., Matsumoto, S. “Novel higher-order DNA structures containing G-quadruplex structures on both strands of Rif1 binding region play a crucial role in determination of replication timing domain” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表）
17. Matsumoto, S., Kanoh, Y., Shimmoto, M., Hayano, M., Ueda K., Fukatsu, R., Kakusho, N. and Masai, H. “Checkpoint-independent regulation of origin firing by Mrc1 through interaction with Hsk1 kinase” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表、口頭発表）
18. Moriyama, K., Yoshizawa-Sugata, N. and Masai, H. “Multimer formation and G-quadruplex-binding by purified murine Rif1, a key organizer of higher-order chromatin architecture” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表）
19. Nishitomi, T., Matsumoto, S., Kakusho, N. and Masai, H. “Cellular dynamics of G-quadruplex structures and RNA-DNA hybrid in human cells” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表）
20. Seki, Y., Tanaka, T., Kono, N. and Masai, H. “Genome-wide distribution of G-quadruplex structures and RNADNA hybrids on the E. coli genome” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表）
21. Tanaka, T., Seki, Y., Nishito, Y. and Masai, H. “Genome-wide dynamics of PriA and RecA on the Escherichia coli chromosome” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13-17日、松江（ポスター発表）
22. Chi-Chun Yang, (他9名) and Masai, H. “Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication in human cells” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表）
23. Yoshizawa-Sugata, N. and Masai, H. “Early zygotic gene expression and organized differentiation are regulated by a conserved chromatin binding protein Rif1 in mouse ES cells” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表、口頭発表）
24. You, Z. and Masai, H. “Potent DNA strand reannealing activity may explain the absence of DNA helicase activity of the Mcm2~7 complex” 第10回3R国際シンポジウム、2016年11月13日-17日、松江（ポスター発表）
25. Masai, H. “Rif1 タンパク質、及びその染色体上結合領域に形成されるグアニン4重鎖構造の生化学的解析/Biochemical characterization of Rif1-G-quadruplex interactions, basis of Rif1-mediated generation of chromatin architecture” 第33回染色体ワークショップ/第14回核ダイナミクス研究会、2016年1月12日-14日、松島一の坊（宮城県）（口頭発表）
26. 正井 久雄、加納 豊、松本 清治、覺正 直子、深津 理乃、森山 賢治、河野 暢明、飯

- 田 啓介、長澤 和夫、増田 晃士、Claire Renard-Guillet、白髭 克彦、山崎 聡志、吉沢直子 "Interaction with G-quadruplex structures forms a basis for Rif1-mediated regulation of DNA replication, transcription and chromatin architecture" BMB2015、2015年12月1-4日、神戸（ワークショップ講演）（招待、国内）
27. 山崎 聡志、小野 富男、松嶋 夢叶、篠田 陽、森山 賢治、吉沢 直子、今西 美智子、古市 貞一、正井 久雄「動物細胞のDNA複製、発生・分化におけるCdc7キナーゼとRif1タンパクの機能」BMB2015、2015年12月1-4日、神戸（ワークショップ講演）
 28. 森山 賢治、深津 理乃、覺正 直子、正井 久雄 "Multimer formation and G-quadruplex-binding by Rif1, a key organizer of higher-order chromatin architecture, containing a HEAT/ARM repeat domain" BMB2015、2015年12月1-4日、神戸（ワークショップ講演）
 29. 加納 豊、松本 清治、深津 理乃、覺正 直子、森山 賢治、飯田 圭介、長澤 和夫、正井 久雄「DNA複製を制御するためのRif1とG-quadruplexとの相互作用によるクロマチン再編成の基礎形成」BMB2015、2015年12月1-4日、神戸（ワークショップ講演）
 30. 松本 清治、加納 豊、新本 美智枝、早野 元詞、深津 理乃、覺正 直子、正井 久雄「分裂酵母Mrc1によるDNA複製開始プログラムのチェックポイント非依存的調節機構」BMB2015、2015年12月1-4日、神戸（一般口頭発表およびポスター発表）
 31. 吉沢 直子、小野 富男、山崎 聡志、進藤 真由美、西藤 泰昌、正井 久雄「Rif1によるES細胞の遺伝子クラスターの発現及びリプログラミングの制御」BMB2015、2015年12月1-4日、神戸（一般口頭発表およびポスター発表）
 32. 高井 裕子、正井 久雄「Mcm2~7複合体のDNAヘリカーゼ活性はそのアニーリング活性によってマスクされている」BMB2015、2015年12月1-4日、神戸（ポスター発表）
 33. 楊 其駿、鈴木 正浩、山川 栞、宇野 修司、山崎 聡志、釣本 敏樹、正井 久雄 "Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication and is regulated by intra-molecular looping" BMB2015、2015年12月1-4日、神戸（ポスター発表）
 34. 関 由美香、田中 卓、正井 久雄「大腸菌染色体のoriC-DnaA非依存的複製開始領域とその分子機構の解析」BMB2015、2015年12月1-4日、神戸（ポスター発表）
 35. Hisao Masai, Yutaka Kanoh, Taku Tanaka, Kenji Moriyama, Yumika Seki, Seiji Matsumoto, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Satoshi Yamazaki, Yumeka Matsushima, Naoko Yoshizawa, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa "Roles of G-quadruplex structures in regulation of DNA replication." Cold Spring Harbor Meeting EUKARYOTIC DNA REPLICATION & GENOME MAINTENANCE Sept 1-5, 2015, Cold Spring Harbor, New York (Session chair and invited speaker). (招待、国際)
 36. Yutaka Kanoh, Seiji Matsumoto, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Nobuaki Kono, Claire Renard-Guillet, Koji Masuda, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, Katsuhiko Shirahige, Hisao Masai "Rif1 binds to G-quadruplex and suppresses replication over a long distance." Cold Spring Harbor Meeting "EUKARYOTIC DNA REPLICATION & GENOME MAINTENANCE" Sept 1-5, 2015, Cold Spring Harbor, New York (poster presentation)
 37. Satoshi Yamazaki, Jiao Sima, Yumeka Matsushima, Kenji Moriyama, Naoko Yoshizawa, Sara Buonomo, David M. Gilbert, Hisao Masai "Roles of Rif1 in regulation of DNA replication, transcription and DNA repair." Cold Spring Harbor Meeting EUKARYOTIC DNA REPLICATION & GENOME MAINTENANCE Sept 1-5, 2015, Cold Spring Harbor, New York (poster presentation)
 38. Chi-Chun Yang, Masahiro Suzuki, Shiori Yamakawa, Syuzi Uno, Satoshi Yamazaki, Toshiki Tsurimoto, Hisao Masai "Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication and is regulated by intra-molecular looping." Cold Spring Harbor Meeting EUKARYOTIC DNA REPLICATION & GENOME MAINTENANCE Sept 1-5, 2015, Cold Spring Harbor, New York (poster presentation)

39. Hisao Masai, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Yutaka Kanoh, Kenji Moriyama "Interaction of Rif1 and G-quadruplex forms a basis of Rif1-mediated chromatin regulation." The 8th international fission yeast meeting (Pombe2015) June 21-25, 2015, Kobe, Japan (invited speaker). (招待、国際)
40. Seiji Matsumoto, Yutaka Kanoh, Michie Shimmoto, Motoshi Hayano, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Hisao Masai "Checkpoint-independent regulation of origin activation program by fission yeast Mrc1." The 8th international fission yeast meeting (Pombe 2015) June 21-25, 2015, Kobe, Japan (poster presentation)
41. Yutaka Kanoh, Seiji Matsumoto, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Nobuaki Kono, Claire Renard Guille, Koji Masuda, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, Katsuhiko Shirahige, Chi-Chun Yang, Masahiro Suzuki, Shiori Yamakawa, Syuzi Uno, Satoshi Yamazaki, Toshiki Tsurimoto, and Hisao Masai "Rif1 binds to G-quadruplex and suppresses replication over a long distance." The 8th international fission yeast meeting (Pombe2015) June 21-25, 2015, Kobe, Japan (poster presentation)
42. 正井 久雄 医療のパラダイムシフト～ 情報革命とバイオメディカル革命のシステム融合 ～ (かながわサイエンスパーク 3 階KSP ホール) 2015年3月26日 (招待講演) (招待、国内)
43. 正井 久雄 「染色体DNA複製プログラムの制御機構」 大阪大学蛋白質研究所セミナー 「染色体伝承の分子背景：複製から染色体分離まで」 2014年9月25-26日 (招待講演) (招待、国内)
44. Hisao Masai, You Zhiying, Koji L. Ode, Naoko Kakusho, Rino Fukatsu, and Haruhiko Takisawa "Regulation of mammalian Mcm helicase complexes," 第87回日本生化学会大会 シンポジウム 2014年10月15-18日 京都 (招待講演) (招待、国内)
45. Yutaka Kano, Seiji Matsumoto¹, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho¹, Nobuaki Kohno, Claire Renard-Guillet, Koji Masuda, Naoko Yoshizawa, Satoshi Yamazaki, Yumeka Matsushima, Kenji Moriyama, Katsuhiko Shirahige, and Hisao Masai "Regulation of DNA replication program in fission yeast and human cells" 9th 3R meeting, November 17-20, 2013, Gotemba, JAPAN (Invited platform presentation)
46. 正井 久雄 第37回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜)ワークショップ「ゲノムDNA複製制御のメカニズム：生物種を超えた統一像と多様性 (Conserved mechanisms and diversity of genome DNA replication: from bacteria to human)」 2014年11月25-27日 横浜 (オーガナイザー)
47. 正井 久雄、田中 卓、加納 豊、山崎 聡志、松本 清治、吉沢 直子、松嶋 夢叶 "染色体DNA複製プログラムの制御機構と起源・進化" The 2nd Symposium of Cell Cycle Control and Cell Fate (第2回 細胞周期制御と細胞運命 シンポジウム) 2014年2月13-14日 浜松 (招待特別講演) (招待、国内)
48. Hisao Masai "Regulation of replication program in fission yeast and human cells." 2014年5月16日 Peking University (特別講演)
49. Hisao Masai "Mechanisms of temporal and spatial regulation of DNA replication" 延世大学・医学研 Joint Symposium 2014年6月19-22日 (韓国、ソウル及び安東回口村)
50. 正井久雄 「非コード領域に配列特異的に結合することによりDNA複製・修復・組換えを制御する染色体制御因子Rif1」 新学術領域「ゲノムを支える非コードDNA領域の機能」 班会議2014年7月14-16日 (神奈川県, 湯河原)
51. 正井久雄 "Mrc1/Claspinの分子内相互作用による活性制御および新規機能"九州大学大学院薬学研究院 招聘研究セミナー 2014年8月29日
52. Hisao Masai "Regulation of DNA replication program in fission yeast and human cells" Marco Foiani (Italy, Milan) 教授の招聘により IFOM Foundation – F.I.R.C. Institute of Molecular Oncology Foundationで講演 (Italia, Milan) 2014年9月16日 (Invited lecture)

53. 正井 久雄 第87回日本生化学会大会シンポジウム「ゲノムを支えるDNAヘリカーゼの動態を探求する新たな研究展開」2014年10月15-18日 京都（オーガナイザー）
54. Satoshi Yamazaki, Tomohiro Iguchi, Shoichiro Miyatake, and Hisao Masai “Global regulation of replication, transcription and DNA repair by Rif1 protein” 9th 3R meeting, November 17-20, 2014, Gotemba, JAPAN (Poster presentation)
55. Zhiying You, Koji L. Ode, Haruhiko Takisawa, and Hisao Masai “Characterization of crucial arginine residues on Cdt1 that affect licensing activity and interaction with Geminin or MCM complex” 9th 3R meeting, November 17-20, 2014, Gotemba, JAPAN (Poster presentation)
56. Mong Sing Lai, Yutaka Kanoh, Marco Foiani, and Hisao Masai “Mechanisms controlling replicon dynamics following double-strand break formation” 9th 3R meeting, November 17-20, 2014, Gotemba, JAPAN (Poster presentation)
57. Yang Chi-Chun, Masahiro Suzuki, Shiori Yamakawa, Syuzi Uno, Satoshi Yamazaki, Toshiki Tsurimoto, and Hisao Masai “Regulation of Claspin functions through intramolecular interactions” 9th 3R meeting, November 17-20, 2014, Gotemba, JAPAN (Poster presentation)
58. 松本 清治、新本 美智枝、早野 元詞、加納 豊、上田 恭祐、覺正 直子、深津 理乃、正井 久雄 「分裂酵母Mrc1によるチェックポイント依存のおよび非依存的複製開始制御機構」第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 横浜（ワークショップ口頭発表）
59. 吉沢 直子、小野 富男、山崎 聡志、進藤 真由美、西藤 泰昌、正井 久雄 「Rif1がつくるクロマチン構造と多能性幹細胞における機能」第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 横浜（ワークショップ口頭発表）
60. 田中 卓、関 由美香、西藤 泰昌、正井 久雄 「大腸菌染色体のDnaA-oriC非依存性複製に必要とされるゲノム領域」第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 横浜（ワークショップ口頭発表）
61. 加納 豊、松本 清治、河野 暢明、正井 久雄 「Rif1は保存されたコンセンサス配列を介しクロマチンへ結合することにより広範囲複製起点抑制効果を発揮する」第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 横浜（ポスター発表）
62. 松嶋 夢叶、深津 理乃、覺正 直子、正井 久雄 「細胞周期を通してのRif1の核内挙動」第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 横浜（ポスター発表）
63. 山崎 聡志、井口 智弘、宮武 昌一郎、正井 久雄 「核内染色体高次構築を制御するRif1の機能解析」第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 横浜（ポスター発表）
64. 小祝 孝太郎、鈴木 雅弘、久保田 隆史、正井 久雄 “Physiological functions and chromatin binding sites of a novel transcription factor, TdIF1”第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 横浜（ポスター発表）
65. 森山 賢治、深津 理乃、遠藤 堅太郎、正井 久雄 「染色体高次構造を制御するRif1タンパク質の分子形態と生化学的解析」第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 横浜（ポスター発表）
66. 金原 良樹、西村 浩平、高橋 達郎、Zhiying You、正井 久雄、Alessandro Costa、鐘巻 将人 “Biochemical and structural analyses of the MCM8-9 complex” 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 横浜（ポスター発表）
67. Hisao Masai "Cell cycle and chromatin regulators in stem cell regulation" The Gene and Immunotherapy conference, March 21-22, 2013, Ho chi Min City, Vietnam (Invited lecture)（招待、国際）
68. Hisao Masai "A personal reflection on the Replicon Theory: from R1 plasmid to replication timing regulation in human cells" Symposium" Half a Century With Replicon Theory for Genome Stability and Instability" (The 50th anniversary of the replicon theory), March 25-28, 2013, Pasteur Institute, Paris, France (Invited lecture)（招待、国際）

69. Hisao Masai "Control of origin firing timing in fission yeast cells" EMBO Conference "Pombe 2013 7th International Fission Yeast Meeting", June 24-29, 2013, London UK (Chairperson, invited speaker) (招待、国際)
70. Matsumoto, S., Ueda, K., Hayano, M., Kanoh, Y., Shimmoto, M., Masai, H. "Regulation of DNA replication in fission yeast by Hsk1 kinase through physical and functional interactions with Mrc1" 7th International Fission Yeast Meeting, 2013年6月24-29日, London, UK (poster presentation)
71. Zhiying You, Koji L. Ode, Haruhiko Takisawa, Hisao Masai (2013) "Characterization of crucial arginine residues on Cdt1 that affect licensing activity and interaction with Geminin or MCM complex." Eukaryotic DNA replication and Genome Maintenance Meeting, Sept. 9-14, 2013, CSHL, USA (poster presentation)
72. Matsumoto, S., Shimmoto, M., Hayano, M., Ueda, K., Kanoh, Y., Masai, H. "Checkpoint-independent regulation of initiation at replication origins in fission yeast by Mrc1" Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, 2013年9月9-13日, New York, USA (poster presentation)
73. Hisao Masai "Introduction" Symposium, 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Sept. 14-16, 2013 (Invited lecture)
74. Hisao Masai, Yutaka Kanoh, Satoshi Yamazaki, Motoshi Hayano, Naoko Yoshizawa, Kenji Moriyama, Yumeka Matsushima, Naoko Kakusho, Rino Fukatsu "Chromatin architecture that regulates replication timing of eukaryotic chromosomes."第86回日本生化学会大会事務局 インターナショナルセッション『Assembly and architecture of protein complexes regulating inheritance and stable maintenance of genome』 2013年9月14-16日 福岡 (招待講演) (招待、国内)
75. 正井 久雄「イントロダクション」 第36回(2013年)日本分子生物学会年会, ワークショップ『レプリコン仮説50周年: 染色体複製装置の形成とその活性の時空間制御』オーガナイザー 2013年12月3-6日 福岡
76. 正井 久雄、山崎 聡志、Lai Mongsing、Foiani Marco、吉沢 直子、加納 豊、松本 清治、森山賢治、覺正 直子、深津 理乃、松嶋 夢叶、河野 暢明、Renard-Guillet Claire "Rif1: a potential global regulator of DNA replication, DNA repair, and recombination." 第36回(2013年)日本分子生物学会年会, ワークショップ『DNA二重鎖切断のend-resectionと修復機構の選択・制御』 2013年12月3-6日 福岡 (招待講演) (招待、国内)
77. 山崎 聡志、正井 久雄「核内染色体高次構築を制御するRif1の生体内における機能解析」第36回(2013年)日本分子生物学会年会 ワークショップ, 2013年12月3-6日, 神戸(ポスター発表)
78. 加納 豊、正井 久雄「複製開始制御プログラムを確立するRif1の機能制御」 第36回(2013年)日本分子生物学会年会, 2013年12月3-6日, 神戸(ポスター発表)
79. 吉沢 直子、正井 久雄「Rif1のES細胞での未分化能維持、および体細胞のリプログラミングにおける機能解析:クロマチン構造制御因子としての可能性」 第36回(2013年)日本分子生物学会年会, 2013年12月3-6日, 神戸(ポスター発表)
80. 田中 卓、正井 久雄「大腸菌PriAタンパク質はフォーク停止を誘発されるとoriC領域に結合する」第36回(2013年)日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日 神戸 (ポスター発表)
81. Mong Sing Lai, Ylli Doksan, Hisao Masai, Marco Foiani "Mechanisms Controlling Terminal Fork Integrity Following Double Strand Break Formation." 第36回(2013年)日本分子生物学会年会, 2013年12月3-6日, 神戸(ポスター発表)
82. 正井久雄: Rif1タンパク質によるDNA複製タイミングの制御 第29回染色体ワークショップ 平成24年1月25-27日 秋保温泉(仙台)(口頭発表)

83. Hisao Masai “Cdc7, a kinase regulating multiple aspects of chromosome dynamics” The 3rd Japan-Korea Joint Symposium on Life Science, 2012. 2.17, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science (Invited speaker)
84. Hisao Masai “Anti-cancer strategy targeting DNA replication factors: Cdc7 kinase as a novel cancer therapy target.” The 14th A-IMBN Annual Conference, 2012. 3.1-3.2, Bangkok, Thailand (Invited Speaker) (招待、国際)
85. 正井久雄 「染色体の核内高次構築を支配する非コード領域とそれを制御するタンパク質の解析」新学術領域「非コードDNA」 班会議 平成24年7月25—27日、御殿場
86. Hisao Masai “Regulation of replication program in fission yeast and human cell.” Department of Biological Science, Florida State University, September 26, 2012, Tallahassee, Florida (Invited lecture)
87. Hisao Masai, Hiroko Fujii, Naoko Kakusho, Sayuri Ito, Satoshi Yamazaki, and Naoko Yoshizawa “Cell cycle regulation of mouse embryonic stem cells: E2F- and Emi1-mediated positive feedback regulation.” 4th Southeast Stem Cell Consortium Workshop at Florida State University, September 28-29, 2012, Tallahassee, Florida (Invited lecture)
88. Hisao Masai “Regulation of replication fork in maintenance of genomic integrity” (2012 Arthur Kornberg Memorial Award Lecture) 15th A-IMBN Annual Conference, October 23, 2012, Shanghai (Invited lecture)
89. Zhiying You and Hisao Masai “ACTIVATION AND REGULATION OF MCM HELICASE” A-IMBN Annual Conference, October 23, 2012, Shanghai (Invited presentation)
90. Hisao Masai, Satoshi Yamazaki, Yutaka Kanoh, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Naoko Yoshizawa, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, and Michie Shimmoto “Regulation of replication program in fission yeast and human cells.” 8th 3R meeting, November 25-28, 2012, Awajishima (Invited speaker) (招待、国際)
91. Zhiying You, Koji L. Ode, Haruhiko Takisawa, Hisao Masai “Identification of crucial arginine residues on Cdt1 that affect both licensing activity and interaction with Geminin.” 8th 3R meeting, November 25-28, 2012, Awajishima (poster presentation)
92. Satoshi Yamazaki and Hisao Masai “Rif1 regulates the replication timing domains on the human genome.” 8th 3R meeting, November 25-28, 2012, Awajishima (poster presentation)
93. Koji Masuda, Claire Renard-Guillet, Yutaka Kanoh, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Takashi Sutani, Katsuhiko Shirahige, and Hisao Masai “Role of Rif1 in replication origin timing regulation in *S. pombe*.” 8th 3R meeting, November 25-28, 2012, Awajishima (poster presentation)
94. Hisao Masai “Regulation of replication program in fission yeast and human cells” 1st Igakuken Symposium on “Regulation of Chromosome Cycle” November 29, 2012, Igakuken, Tokyo (Invited lecture)
95. 早野 元詞、加納 豊、松本 清治、正井 久雄 「分裂酵母Rif1によるDNA複製プログラムの制御」第35回(2012年)日本分子生物学会年会 ワークショップ, 2012年12月11-14日 福岡 (口頭発表)
96. Yutaka Kanoh, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto Satoshi Yamazaki and Hisao Masai “The functional analyses of Rif1, essential for establishment of origin firing program.” 15th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (ポスター発表)
97. 森山賢治, 吉沢直子, 小布施力史, 釣本敏樹, 正井久雄 「精製したCdc6はEBNA1と直接結合し、EBNA1に依存したOrc (origin recognition complex) のEBウイルスoriPへの結合を促進する」第35回(2012年)日本分子生物学会年会, 2012年12月11-14日 福岡 (ポスター発表)
98. 松本清治、上田恭祐、早野元詞、加納豊、新本美智枝、正井久雄 「分裂酵母Hsk1キナーゼによるMrc1を介したDNA複製制御の分子機構の解析」 第35回(2012年)日本分子生物学会年会, 2012年12月11-14日 福岡 (ポスター発表)

99. 山崎聡志、吉沢直子、深津理乃、覺正直子、加納豊、正井久雄「ヒトRif1タンパク質による核内クロマチン構築と複製タイミングドメインの制御」第35回(2012年)日本分子生物学会年会 ワークショップ, 2012年12月11-14日 福岡 (口頭発表)
100. 吉沢直子、覺正直子、山崎聡、深津理乃、正井久雄「Rif1はクロマチン高次構築を制御してES細胞特異的な核内構造を形成する」第35回(2012年)日本分子生物学会年会 ワークショップ, 2012年12月11-14日 福岡 (口頭発表)
101. 岩崎理紗、田中卓、嶋田 睦、神田大輔、正井久雄「微生物Cdc7-Dbf4キナーゼ複合体の大量発現・精製・結晶化の試み」第35回(2012年)日本分子生物学会年会, 2012年12月11-14日 福岡 (ポスター発表)
102. 正井久雄「解体再構成的アプローチから合成生物学・生命現象シミュレーションへ: DNA複製をモデルとして」第85回日本生化学会大会 シンポジウム 2012年12月14-16日 福岡 (招待講演)
103. Hisao Masai, Seiji Matsumoto, Motoshi Hayano, Yutaka Kanoh, Michie Shimmoto, Naoko Kakusho, and Satomi Kudo: "Regulation of replication program in fission yeast." The 6th International Fission Yeast Meeting, 2011.6.25-29, Boston, USA (招待講演) (招待、国際)
104. Seiji Matsumoto, Motoshi Hayano, Yutaka Kanoh, Michie Shimmoto, Naoko Kakusho, and Hisao Masai: "Mrc1 Marks Early-Firing Origins and Coordinates Timing and Efficiency of Initiation." The 6th International Fission Yeast Meeting, 2011.6.25-29, Boston, USA (poster presentation)
105. Motoshi Hayano, Yutaka Kanoh, Seiji Matsumoto and Hisao Masai: "Rif1 is a global regulator of site selection and timing of replication origin firing." The 6th International Fission Yeast Meeting, 2011.6.25-29, Boston, USA (口頭発表)
106. 正井久雄: 招待講演「DNA 複製制御因子を標的とした制がん戦略: Cdc7 キナーゼ阻害によるがん細胞死誘導」第9回 日本臨床腫瘍学会/日本癌学会/分子標的治療学会合同シンポジウム “基礎から学ぶ次世代の分子標的治療薬と基盤技術” 2011.7.21 (東京) (招待、国内)
107. Satoshi Yamazaki and Hisao Masai: Human Rif1 regulates genome-wide program of DNA replication and transcription. "Dynamic DNA Packaging Across Kingdoms: Chromatin & Beyond" meeting (Biophysical Society), 2011.7.5-8, Asilomar, USA (poster presentation)
108. Valentina Aria, Mariarita De Felice, Vincenzo Sannino, Mariarosaria De Falco, Ulrich Hubscher, Juhani Syvaola, Zhiying You, Hisao Masai, Francesca M Pisani: "Physical and functional interaction of the human Timeless and Tipin proteins with DNA polymerase epsilon and the MCM complex." Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, 2011.9.6-10, New York, USA (poster presentation)
109. Kanji Furuya, Izumi Miyabe, Naoko Kakusho, Hisao Masai, Hironori Niki, Antony M Carr: "DDK phosphorylates checkpoint clamp component Rad9 and promotes its release from damaged chromatin." Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, 2011.9.6-10, New York, USA (poster presentation)
110. Yutaka Kanoh, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Katsuhiko Shirahige, Hisao Masai: "Regulation of the origin firing program by Rif1 in fission yeast. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance." 2011.9.6-10, New York, USA (poster presentation)
111. Masako Oda, Yutaka Kanoh, Yasumasa Nishito, Ichiro Hiratani, David M Gilbert, Hisao Masai: "Regulation of DNA replication timing on a human chromosome by cell type specific DNA binding protein SATB1." Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, 2011.9.6-10, New York, USA (poster presentation)
112. Syuzi Uno, You Zhiying, Hisao Masai: "Efficient expression and purification human Claspin from mammalian cells: DNA binding activity and novel protein interactions." Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, 2011.9.6-10, New York, USA (poster presentation)

113. Satoshi Yamazaki, Ai Ishii, Masako Oda, Hisao Masai: "Human Rif1 protein, a key regulator of the genome-wide DNA replication program." Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, 2011.9.6-10, New York, USA (poster presentation)
114. Hisao Masai, Satoshi Yamazaki, Yutaka Kanoh, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Naoko Kakusho: "Regulation of replication program in fission yeast and human cells." Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, 2011.9.6-10, New York, USA (口頭発表)
115. 鈴木亨、正井久雄、山本雅: Cdc7 依存的な Tob 分解抑制による DNA 損傷細胞の生存維持機構 第 70 回 日本癌学会学術総会, 2011.10.3-5, 名古屋 (一般口頭発表)
116. Yoshizawa, N., Kakusho, N., Yamazaki, S., Fukatsu, R. and Masai, H.: "The maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells by Rif1, a potential regulator of replication domains." Joint CSH-Asia / ISSCR Conference on Cellular Programs & Reprogramming, 2011.10.24-28, Suzhou, China (poster presentation)
117. 山崎聡志, 正井久雄: 「ヒト Rif1 タンパク質によるゲノムワイド DNA 複製タイミグドメインの制御機構」 DNA 複製・組換えワークショップ 2011, 2011.10.25-27, 福岡 (口頭発表)
118. 正井久雄, 深津理乃, 北村亮, 覺正直子, 山崎聡志: 「Dbf4/ASK サブユニットによる Cdc7 キナーゼの活性化機構」 DNA 複製・組換えワークショップ 2011, 2011.10.25-27, 福岡 (口頭発表)
119. Zhiying You, Sara De Falco, Francesca M. Pisani, 正井久雄: 「MCM 複合体による DNA プライマーゼ活性の促進」 DNA 複製・組換えワークショップ 2011, 2011.10.25-27, 福岡 (口頭発表)
120. 正井久雄: 招待講演 「真核細胞の核内染色体高次構造構築を制御するメカニズム」 バイオコンファレンス 2011, 2011.11.11, 首都大学東京 (南大沢、東京)
121. Hisao Masai: 招待講演 Regulation of the replication program in fission yeast and human cells Seminar, 2011.11.25, Hong Kong University of Science and Technology (招待講演) (招待、国際)
122. Yoshizawa, N., Kakusho, N., Yamazaki, S., Fukatsu, R. and Masai, H.: "The maintenance of undifferentiated state in mouse embryonic stem cells by Rap1 interacting factor-1 (Rif1), a potential regulator of chromatin architecture in nuclei." 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (口頭発表)
123. Masahiro Suzuki, Rima Kitazumi, Shoichiro Miyatake, Takahiko Hara, Kenji Sakimura, Osamu Koiwai & Hisao Masai: "Tdif1, a component of a cell cycle-specific histone deacetylase complex, is required for production of definitive erythrocytes." 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (ポスター発表)
124. Yamazaki, S. and Masai, H.: "Rif1 protein is a critical regulator of a novel epigenetic mark, DNA replication timing domain, in human cells." 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (口頭発表)
125. Masaki Furuichi, Tomoichiro Miyoshi, Seiji Matsumoto, Kunihiro Ohta, and Hisao Masai: "Hsk1-dependent phosphorylation of Rec7 in the Rec7-Rec24 complex is required for initiation of meiotic homologous recombination." 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (ポスター発表)
126. Syuzi Uno, You Zhiying and Hisao Masai: "Efficient expression and purification of human Claspin from mammalian cells: stimulation of ssDNA annealing on Y-fork structure and novel protein interactions." 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (口頭発表)
127. Taku Tanaka and Hisao Masai: "Detection of chromosomal fragile sites: application of specific PriA binding to arrested replication forks in living cells." 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (ポスター発表)

128. 森山賢治, 正井久雄: Epstein-Barr ウイルスの潜伏感染期複製起点 oriP への EBNA1 に依存したヒト ORC と Cdc6 の結合 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (ポスター発表)
129. Seiji Matsumoto, Motoshi Hayano, Yutaka Kanoh, and Hisao Masai: “Bypass pathways of the Hsk1 function suggest plasticity of origin selection in fission yeast.” 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (口頭発表)
130. Yutaka Kanoh, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto and Hisao Masai: “The molecular dissection of Rif1, essential for establishment of origin firing program, in fission yeast.” 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (口頭発表)
131. Masako Oda, Yutaka Kanoh, Yasumasa Nishito, Ichiro Hiratani, David M. Gilbert and Hisao Masai: “Regulation of DNA replication timing on a human chromosome by cell type specific DNA binding protein SATB1.” 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (口頭発表)
132. Hisao Masai, Satoshi Yamazaki, Yutaka Kanoh, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Masako Oda, Naoko Kakusho, Rino Fukatsu, Michie Shimmoto and Naoko Yoshizawa: “Regulation of replication program in fission yeast and human cells.” 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (招待講演)
133. Motoshi Hayano, Yutaka Kanoh, Seiji Matsumoto and Hisao Masai: “Rif1 is a global regulator of site selection and timing of replication origin firing in fission yeast.” 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (ポスター発表)
134. Rino Fukatsu, Ryo Kitamura, Naoko Kakusho, Satoshi Yamazaki, and Hisao Masai: “Molecular mechanism of activation of human Cdc7 kinase: Bipartite interaction with Dbf4/ASK stimulates ATP binding and substrate recognition.” 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (ポスター発表)
135. 古谷 寛治, 白岩 善治, 正井 久雄, 仁木 宏典: “The regulation of checkpoint proteins by checkpoint kinase ATR and DNA replication kinase DDK.” 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (招待講演)
136. 鈴木 亨, 都竹 順子, 林 晃世, 塩見 泰史, 西谷 秀男, 正井 久雄, 山本 雅: “Competition of CDC7/Tob with Cul4-DDB1-Cdt2 E3 complex in DNA damage-induced apoptosis.” 日本分子生物学会総会, 2011.12.13-16, 横浜 (口頭発表)
137. 正井久雄: Rif1 タンパク質による DNA 複製タイミングの制御 第 29 回染色体ワークショップ 平成 24 年 1 月 25-27 日 秋保温泉 (仙台) (口頭発表)

《和文総説》

1. 早野 元詞、加納 豊、松本 清治、正井 久雄 (2012) 「テロメア結合因子 Rif1 は、染色体複製タイミングを決定する。」 細胞工学、HOT PRESS、VOL31 460-462.
2. 山崎 聡志、正井 久雄 (2012) 「Rif1 タンパク質はヒトゲノム複製タイミングドメインを決定する。」 実験医学、Current Topics 30(18): 2974-78. 2012
3. 加納 豊、松本 清治、正井 久雄 (2015) 「Rif1 はグアニン 4 重鎖構造を介して染色体に結合し、広範囲に複製を抑制する」カレントトピックス 実験医学 羊土社
4. 加納 豊、松本 清治、正井 久雄 (2015) 「Rif1 はグアニン 4 重鎖構造を形成する DNA を介して染色体へ結合し複製の開始を広範囲にわたり抑制する」ライフサイエンス 新着論文レビュー 2015 年 11 月 4 日公開 <http://first.lifesciencedb.jp/archives/11870>

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 正井 久雄 2014(平成26年度)年度 第7回 都医学研 都民講座「ゲノムの増えるしくみとその起源・進化：生命の起源から地球外可能性まで」において司会と講演。2015年1月16日 津田ホール。
2. 正井 久雄 高校生向け公開講座「ゲノムの調べ」において演奏など。文部科学省新学術研究領域「ゲノムを支える非コードDNA 領域の機能」主催 2015年2月8日 横浜情報文化センター 情文ホール。
3. 正井久雄 日本分子生物学会 講師派遣事業 分子生物学講座 平成25年7月23日 日比谷高校 東京

非コード DNA の相同染色体の認識と対合における役割



丁 大橋

公募研究 代表者 (平成 24~27 年度)
国立研究開発法人情報通信研究機構
未来 ICT 研究所フロンティア創造総合
研究室

【研究目的】

減数分裂期前期における相同染色体の対合・組換えは生命の継承と繁栄、多様性を創出するにもっとも重要なプロセスで、その失敗が染色体分配の異常を引き起こし、子孫の絶滅をもたらす。本研究は分裂酵母における非コード RNA による対合の分子機構を解明するとともに、相同組換え非依存的相同染色体の相互認識・対合機構の解析を目的としている。

【研究成果】

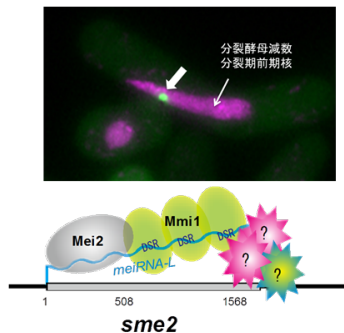
- (1) 分裂酵母第 2 染色体の *sme2* 遺伝子座がロバストな対合サイトである。*sme2* 遺伝子座から減数分裂期特異的に転写される non-coding RNA である *meiRNA-L* が *sme2* 遺伝子座に集積した RNA ドットをつくり、相同染色体の早期相互認識に寄与することを明らかにした。研究成果をまとめた論文が「サイエンス」誌で発表した。
- (2) *sme2* 遺伝子座のロバストな対合の分子メカニズムを解析するために、分裂酵母 GFP ライブラリ及び YFP ライブラリのデータベースから、核内蛍光ドットを示すものを検索し、*sme2* ローカスと共局在を示すタンパク質(*smp* タンパク質)を 10 個同定した。同定したタンパク質が全部 RNA 結合タンパク質で、お互いに共局在を示すが、相互依存関係がない。さらに、*sme2* ローカス以外にも顕著な染色体結合サイトが複数ある。遺伝子破壊および条件的シャットオフを行い、*sme2* サイトの対合活性に影響を与える *Smp* タンパク質を 5 つ同定した。それらのタンパク質の内、4 つが *exosome* に依存した減数分裂寄与 mRNA の分解に必要なタンパク質で、残りの一個が RNAi 非依存的セントロメアのヘテロクロマチンの形成に必要な因子である。
- (3) 新規な対合サイトを発見するために、ゲノムワイドに 100kb 以内の距離間隔で *lacO* リピートを染色体に挿入し、高頻度に対合する染色体サイトを捜査するアプローチをとった。すでに分裂酵母のゲノム上約 30 箇所に *lacO* リピート挿入したので、新規に約 100 か所均一分布した場所に *lacO* リピートを挿入した。その結果、分裂酵母の全ゲ

ノムをカバーするような LacO/lacI-GFP ライブラリを作成した。このライブラリは対合の研究のみならず核染色体ダイナミクス研究にも有用なツールとして利用できる。

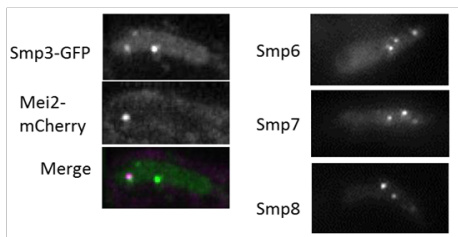
(4) Smp タンパク質の染色体結合サイトを同定するために、3つの Smp タンパク質の栄養増殖期および減数分裂期の染色体結合サイトを ChIP-seq 法により同定した。働く経路が大きく違うにもかかわらず、ChIP-Seq の解析結果、共通する染色体結合サイトは *sme2* ローカス以外にも、数百箇所があった。同定した染色体結合サイトをヒントにゲノムワイド LacO/lacI-GFP ライブラリと組み合わせ、Smp タンパク質の *sme2* ローカス以外のドット状染色体結合サイトを1番と3番染色体上にそれぞれ一個を同定した。今後、この三つの場所の相同染色体の相互認識と対合における影響を解析する予定である。

非コードDNAの相同染色体の認識と対合における役割

1、分裂酵母第2染色体の*sme2*遺伝子座がロバストな対合サイトで、そこから転写される非コードmeiRNA-Lが数種類のタンパク質を含むRNAドットをつくり、相同染色体の早期相互認識に寄与する (Science 2012、Nucleus 2012).

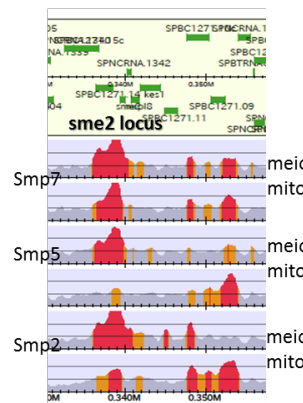
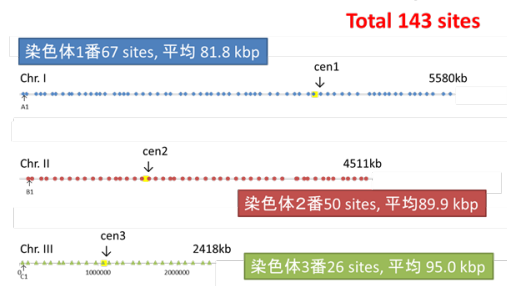


2、GFPライブラリ及びYFPライブラリのデータベースから、核内蛍光ドットを示すものを検索し、*sme2*ローカスと共局在を示すタンパク質(smpタンパク質)を10個同定した。その中、5個が*sme2*のロバスト対合に寄与する。



3、新規な対合サイトを発見するために、ゲノムワイドに100kb以内の距離間隔でlacOリピートを染色体に挿入したLacOライブラリ

Genome-wide insertion of lacO arrays



4、Chip-seq法によるSmpタンパク質の染色体結合の解析結果とLacOライブラリをあわせて、*sme2*以外2つ主なSmpドットが1番と3番染色体それぞれ一個あることを判明した。今後、この三つの場所の相同染色体の相互認識と対合における影響を解析する予定。

【研究発表】

《主な発表論文等》

- 1 [Ding DQ](#), Hiraoka Y (2016) Visualization of a Specific Genome Locus by the lacO/LacI-GFP System. In *Fission Yeast: A Laboratory Manual* 236-241 (Edited by Iain Hagan, Antony Carr, Agnes Grallert and Paul Nurse, Cold Spring Harbor Laboratory Press) (査読なし)
- 2 [Ding DQ](#), Haraguchi T, *Hiraoka Y (2016) A cohesin-based structural platform supporting homologous chromosome pairing in meiosis. *Curr Genet.* 62:499-502. (査読有り)
- 3 [Ding DQ](#), Matsuda A, Okamasa K, Nagahama Y, Haraguchi T, *Hiraoka Y (2016) Meiotic cohesin-based chromosome structure is essential for homologous chromosome pairing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* 125:205-214 (査読有り)
- 4 Matsuda A, Chikashige Y, [Ding DQ](#), Ohtsuki C, Mori C, Asakawa H, Kimura H, Haraguchi T, *Hiraoka Y (2015). Highly condensed chromatins are formed adjacent to subtelomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast. *Nat Commun.* 6:7753 (査読有り)
- 5 [Ding DQ](#), Haraguchi T, *Hiraoka Y (2013) The role of chromosomal retention of noncoding RNA in meiosis. *Chromosome Res.* 21:665-72. (査読有り)
- 6 [Ding DQ](#), Haraguchi T, *Hiraoka Y (2012) Chromosomally-retained RNA mediates homologous pairing. *Nucleus* 3:516-9 (査読有り)
- 7 [Ding DQ](#), Okamasa K, Yamane M, Tsutsumi C, Haraguchi T, Yamamoto M, *Hiraoka Y (2012) Meiosis-specific noncoding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. *Science* 11:732-6 (査読有り)
- 8 Yamashita A, Shichino Y, Tanaka H, Hiriart E, Touat-Todeschini L, Vavasseur A, [Ding DQ](#), Hiraoka Y, Verdel A, *Yamamoto M (2012) Hexanucleotide motifs mediate recruitment of the RNA elimination machinery to silent meiotic genes. *Open Biol.* 2:120014 (査読有り)

《学会発表》

- 1 Ding “3D-SIM Analysis of Linear Element Structure in Fission Yeast” EMBO Meiosis Conference 2015 St Catherine’s College, Oxford, UK 2015.09.01 (ポスター、国際)
- 2 丁大橋「相同染色体認識における非コードDNAの役割」新学術領域研究「非コードDNA」の第9回領域会議 淡路島夢舞台 2015.08.05 (一般口頭、国内)
- 3 Ding “3D-SIM Analysis of Meiotic Chromosome Structure in Live Cells of *S. pombe*” 第8回分裂酵母国際会議 神戸生田神社会館 2015.06.22 (ポスター、国際)
- 4 丁大橋「分裂酵母減数分裂期前期染色体構造の解析」第37回日本分子生物学会年会 神奈川県横浜市みなとみらい 2014.11.26 (ポスター、国内)
- 5 平岡泰「A role for chromosomal RNA bodies in fission yeast meiosis」第37回日本分子生物学会年会 神奈川県横浜市みなとみらい 2014.11.27 (招待、国内)
- 6 丁大橋「相同染色体対合における非コードDNAの役割」新学術領域研究「ゲノムを支える非コードDNA領域の機能」2014年第7回領域会議 神奈川県湯河原 2014.7.14 (一般口頭、国内)
- 7 Ding “Fine structures of meiosis-specific chromosome and homologous chromosome pairing in *S. pombe*” Gordon Research Conferences Meiosis, Colby-Sawyer College, New London, NH, USA 2014.6.2 (ポスター、国際)
- 8 丁大橋「分裂酵母減数分裂期前期染色体構造の3D-SIM解析」「ゲノムを支える非コードDNA領域の機能」公開シンポジウム インターメアによる染色体制御機構 東京大学山上会館、東京都、2014.1.9 (一般口頭、国内)
- 9 Ding “Live and 3D structured illumination microscopy revealed dynamic and highly organized

- meiotic specific chromosome architectures in fission yeast” The 4th Xiamen Winter Symposium Xiamen, University Xiamen, China, 2013.12.9 (招待、国際)
- 10 丁大橋「分裂酵母減数分裂期前期染色体構造の3D-SIM解析」第31回染色体ワークショップ・第12回核ダイナミクス研究会、ホテルおかだ、神奈川県足柄下郡 2013.12.26 (一般口頭、国内)
 - 11 丁大橋「相同染色体認識における非コードDNAの役割」ゲノムを支える非コードDNA領域の機能第5回領域会議 湘南国際村 2013.8.17 (一般口頭、国内)
 - 12 Ding “Fine structures of meiosis-specific chromosome and homologous chromosome pairing in *S. pombe*” 7th International Fission Yeast meeting University London, UK. 2013.6.24 (ポスター、国際)
 - 13 平岡泰「核内RNAボディーが相同染色体の認識に果たす役割」第30回染色体ワークショップ・第11回核ダイナミクス研究会、淡路夢舞台国際会議場、兵庫県、2012.12.19 (一般口頭、国内)
 - 14 丁大橋「分裂酵母減数分裂期染色体構造の相同染色体対合における役割」第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場 2012.12.12 (招待、国内)
 - 15 平岡泰「減数分裂特異的な非コードRNAが相同染色体を認識する」第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場 2012.12.12 (招待、国内)
 - 16 丁大橋「相同染色体における非コードDNAの役割」ゲノムを支える非コードDNA領域の機能第3回領域会議 御殿場静岡 2012.7.26 (一般口頭、国内)

《和文総説》

1. 丁大橋、平岡泰 (2012) 「非コードRNAが相同染色体の相互認識を担う」、実験医学、30(16)、2617-2619
2. 丁大橋・平岡泰 (2012) 「減数分裂前期の相同染色体の認識と対合に非コードRNAが関与する」、ライフサイエンス 新着論文レビュー (2012年6月15日) <http://first.lifesciencedb.jp/archives/5031>

《受賞(本人)》

1. 平成25年度情報通信研究機構内部表彰 成績優秀表彰 優秀賞個人

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 情報通信研究機構未来ICT研究所2012年施設一般公開講演会、相同染色体対合のメカニズムを解く：染色体のお見合いをライブで観る、2012年7月28日

疾患と相関する進化的に保存された機能性非コード領域の 情報工学的網羅探索法の開発



高橋 広夫

公募研究 代表者 (平成 26-27 年度)
千葉大学大学院園芸学研究科

【研究目的】

本研究では、第一に、様々な動植物ゲノムに適用可能な機能性非コード領域を同定する方法論を開発し応用すること、第二に、同定された機能性非コード領域の機能的実験と規則性を見いだすこと、第三に、非コード領域と疾患と関わりを明らかにすることである。

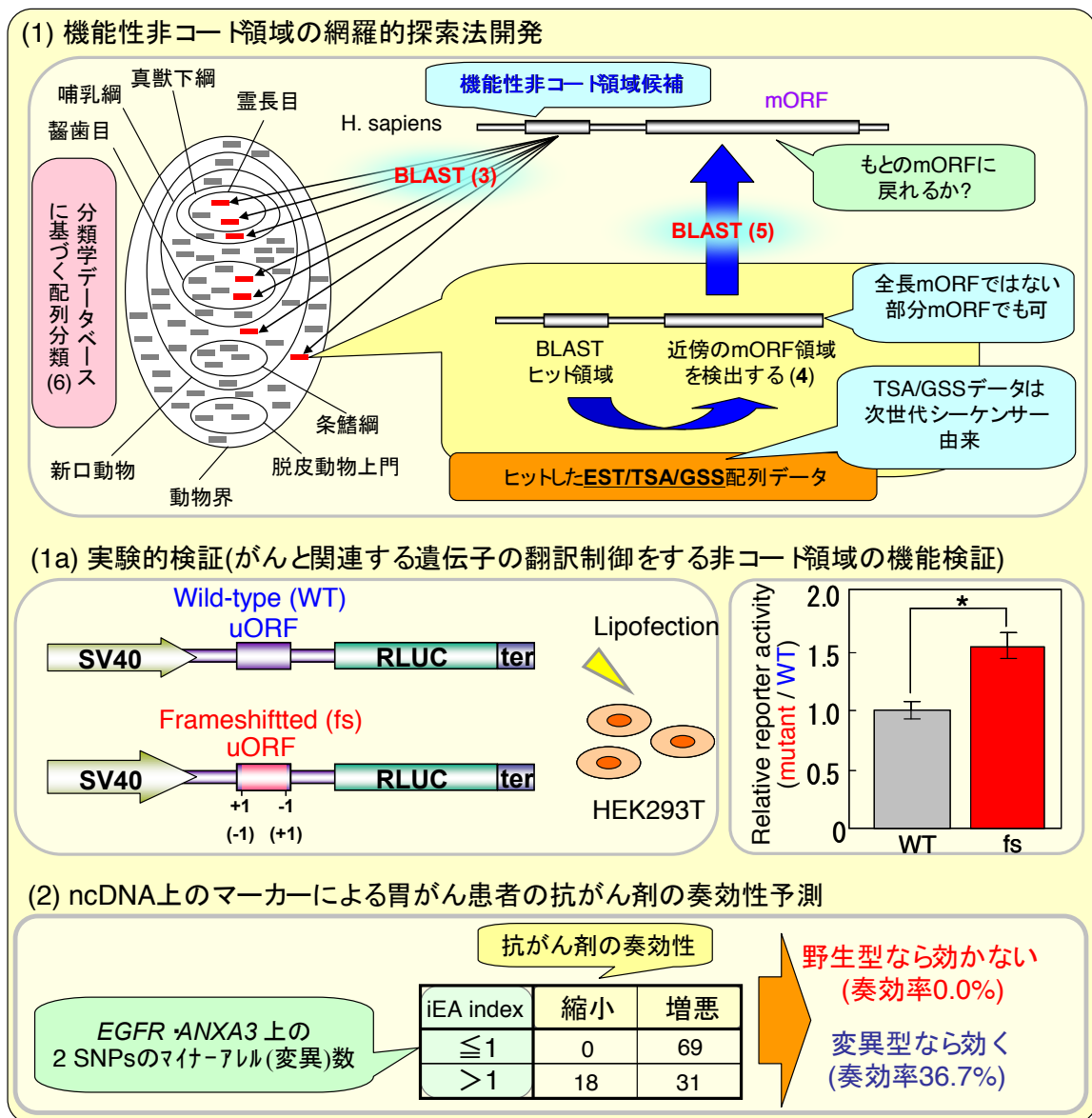
【研究成果】

(1) ゲノム網羅的な非コード領域(分子種)同定に基づくアプローチ

機能性非コード領域の網羅的同定法(アルゴリズム)である ESUCA (Evolutionary search for upstream open reading frames with conserved amino acid sequences)法を開発し、ヒトをはじめとした様々な動植物ゲノムに応用することで、200グループ以上の新規上流ORF(非コード型分子種の一つ)の同定に成功した(論文準備中)。一部の分子については、実験的な検証を行い、翻訳制御機能を有する13個の上流ORFを同定している(Ebina et al. 2015, NAR; Noh et al. 2015, Plant Biotechnol)。これらの実験的に機能検証を行った上流ORFペプチドの配列規則を、深尾班の遠藤博士との共同解析することにより、嵩高いアミノ酸や塩基性アミノ酸が、上流ORFの翻訳抑制機能において重要な役割をしていることが予測された。また、同定された全ての分子種の進化保存範囲を定量化することで、非コードの機能性分子は、タンパク質とは異なり、より近縁種のみに進化的に保存されている場合が多いことが示唆された。この中でも、動物界に広範囲にわたって進化的に保存されている上流ORFは、疾患関連タンパク質の翻訳を制御している可能性が示唆された。この中でも、特に、がん原遺伝子のPTP4A1は、ヒトだけでなく脊椎動物に広く進化的に保存されていた。そこで、ヒト培養細胞HEK293Tを用いた一過性発現系により、PTP4A1の上流ORFがアミノ酸配列依存的に翻訳制御機能を持つことを証明した(論文準備中)。

(2) 疾患データ解析に基づく非コード領域上の多型解析

非コード領域上には多数の多型が存在し、多型の中でも、一塩基多型(SNP)は、診断に有用なバイオマーカーとして有望とされている。臨床データとして、がん症例からの10万SNP情報と、抗がん剤の副作用・副作用との関連性を解析した。結果として、抗がん剤イリノテカンの副作用である下痢の発現とKCNQ5 rs9351963が相関すること(Takahashi et al. 2015, PLoS ONE)、フッ化ピリミジン系抗がん剤を投与した胃癌症例における奏効性と多型のセット(ANXA3 rs2867461、EGFR rs2293347)が相関すること(Takahashi et al. 2015, BMC Cancer)を発見した。これらは、いずれもアミノ酸置換を伴わない多型である。



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. *Maeda R., Tamashiro H., Takano K., Takahashi H., Suzuki H., Saito S., Kojima W., Adachi N., Ura K., Endo T., and Tamura T. TBP-like protein (TLP) disrupts the p53-MDM2 interaction and induces long-lasting p53 activation, *J. Biol. Chem.* in press. (査読有り)
2. Maruta T., Ogawa T., Tsujimura M., Ikemoto K., Yoshida T., Takahashi H., Yoshimura K., and *Shigeoka S. (2016) Loss-of-function of an Arabidopsis NADPH pyrophosphohydrolase, AtNUDX19, impacts on the pyridine nucleotides status and confers photooxidative stress tolerance, *Sci. Rep.*, 6, 37432 (査読有り)
3. Matsumura Y., Ohbayashi I., Takahashi H., Kojima S., Ishibashi N., Keta S., Nakagawa A., Hayashi R., Saéz-Vásquez J., Echeverría M., Sugiyama M., Nakamura K., *Machida C. and *Machida Y., (2016) A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and a putative small subunit processome in leaf polarity establishment of *Arabidopsis*, *Biol. Open* 5:942-954. (査読有り)
4. *Miyasaka H., Ogata T., Tanaka S., Ohama T., Kano S., Fujiwara K., Hayashi S., Yamamoto S., Takahashi H., Matsuura H., and Hirata K. (2016) Is chloroplastic class IIA aldolase a marine enzyme? *ISME J.* 10:2767-2772. (査読有り)
5. *Machida C., Nakagawa A., Kojima S., Takahashi H., and Machida Y. (2015) The complex of ASYMMETRIC LEAVES (AS) proteins plays a central role in antagonistic interactions of genes for leaf polarity specification in Arabidopsis. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, 4(6): 655-671. (査読有り)
6. *Takahashi H., Kaniwa N., Saito Y., Sai K., Hamaguchi T., Shirao K., Shimada Y., Matsumura Y., Ohtsu A., Yoshino T., Doi T., Takahashi A., Odaka Y., Okuyama M., Sawada J., Sakamoto H., and Yoshida T. (2015) Construction of possible integrated predictive index based on EGFR and ANXA3 polymorphisms for chemotherapy response in fluoropyrimidine-treated Japanese gastric cancer patients using a bioinformatic method. *BMC Cancer*, 15(1): 718. (査読有り)
7. Noh A. L., Watanabe S., Takahashi H., Naito S., and *Onouchi H. (2015) An upstream open reading frame represses expression of a tomato homologue of Arabidopsis ANAC096, a NAC domain transcription factor gene, in a peptide sequence-dependent manner. *Plant Biotechnol.*, 32(2): 157-163. (査読有り)
8. Jo A., Mitani S., Shiba N., Hayashi Y., Hara Y., Takahashi H., Tsukimoto I., Tawa A., Horibe K., Tomizawa D., Taga T., Adachi S., Yoshida T., and *Ichikawa H. (2015) High expression of EVI1 and MEL1 is a compelling poor prognostic marker of pediatric AML. *Leukemia*, 29(5): 1076-1083. (査読有り)
9. Kumasaka M. Y., Yajima I., Iida M., Takahashi H., Inoue Y., Fukushima S., Ihn H., Takeda K., Naito Y., Yoshikawa T. and *Kato M. (2015) Correlated expression levels of endothelin receptor B and Plexin C1 in melanoma. *Am. J. Cancer Res.*, 5(3): 1117-1123. (査読有り)
10. Ebina I., Takemoto-Tsutsumi M., Watanabe S., Koyama H., Endo Y., Kimata K., Igarashi T., Murakami K., Kudo R., Osumi A., Noh A. L., Takahashi H., Naito S., and *Onouchi H. (2015) Identification of novel Arabidopsis thaliana upstream open reading frames that control expression of the main coding sequences in a peptide sequence-dependent manner. *Nucleic Acids Res.*, 43(3): 1562-1576. (査読有り)
11. Takahashi A., Nakayama R., Ishibashi N., Doi A., Ichinohe R., Ikuyo Y., Takahashi T., Marui S., Yasuhara K., Nakamura T., Sugita S., Sakamoto H., Yoshida T., Hasegawa T., and *Takahashi H. (2014) Analysis of gene expression profiles of soft tissue sarcoma using a combination of knowledge-based filtering with integration of multiple statistics. *PLoS ONE*, 9(9): e106801. (査読有り)
12. *Takahashi H., Sai K., Saito Y., Kaniwa N., Matsumura Y., Hamaguchi T., Shimada Y., Ohtsu A., Yoshino T., Doi T., Okuda H., Ichinohe R., Takahashi A., Doi A., Odaka Y., Okuyama M., Saijo N., Sawada J., Sakamoto H., and Yoshida T. (2014) Application of a combination of a knowledge-based algorithm and 2-stage screening to hypothesis-free genomic data on

irinotecan-treated patients for identification of a candidate single nucleotide polymorphism related to an adverse effect. *PLoS ONE*, 9(8): e105160. (査読有り)

《学会発表》

1. Ishibashi N., Kojima S., Kojima M., Sakakibara H., Takahashi H., Machida C., and Machida Y. "AS2 and BOB1 synergistically regulate cytokinin levels and the establishment of leaf adaxial-abaxial polarity through the ETT/ARF3-IPT3 pathway in *Arabidopsis thaliana*" International Symposium on Auxins and Cytokinins in Plant Development - ACPD2014, Hotel Pyramida, Prague, Czech Republic, 2014年6月29日-7月4日 (口頭、国際)
2. Kojima S., Takahashi H., Ishibashi N., Handayani A., Matsumura Y., Machida Y., and Machida C. "ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) and AS2 regulate the expression of AtIPT3 through AUXIN RESPONSE FACTOR3 / ETTIN function during leaf development in *Arabidopsis thaliana*" Auxins and Cytokinins in Plant Development-ACPD2014, Hotel Pyramida, Prague, Czech Republic, 2014年6月29日-7月4日 (ポスター、国際)
3. Takahashi H., Nakagawa A., Ishibashi N., Kojima S., Machida Y., and Machida C. "Knowledge-based bioinformatic analyses of microarrays predict that epigenetic regulator AS1-AS2 controls cell division through ETTIN in leaf adaxial-abaxial patterning" 25th International Conference on Arabidopsis Research - ICAR2014, University of British Columbia, Vancouver, Canada, 2014年7月28日-8月1日 (口頭、国際)
4. Nakagawa A., Takahashi H., Ito T., Kojima S., Machida Y., and Machida C. "Chemical genetic analyses infer that AS1-AS2 controls cell division through ETTIN in leaf adaxial-abaxial and medio-lateral patterning" 25th International Conference on Arabidopsis Research - ICAR2014, University of British Columbia, Vancouver, Canada, 2014年7月28日-8月1日 (ポスター、国際)
5. 高橋広夫・高橋アンナ・竹本まり子・蝦名績・木俣香織・五十嵐卓哉・工藤凜・大角有里沙・内藤哲・尾之内均「5'非翻訳領域にコードされた種間保存性ペプチドの網羅的探索・進化保存性評価手法の開発と様々な種への応用」第66回日本生物工学会大会、北海道大学、札幌、2014年9月9-11日 (ポスター、国内)
6. Takahashi H., Takahashi A. "Analysis of gene expression profiles of soft tissue sarcoma using a combined method of knowledge-based filtering and integration of multiple statistics" Computational Models in Biology and Medicine 2014, Max Planck Institute for Biology of Ageing, Cologne, Germany, 2014年9月18-19日 (ポスター、国際)
7. Takahashi H., Takahashi A., Takemoto M., Ebina I., Kimata K., Igarashi T., Kudo R., Osumi A., Naito S., and Onouchi H. "Bioinformatic identification method of evolutionary ranges for potential functional molecules on genomes" The Problem of the Origin of Life, Bach Institute of Biochemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 2014年9月22-26日 (ポスター、国際)
8. 小島晶子・石橋奈々子・香田佳那・小嶋美紀子・高橋広夫・榊原均・町田泰則・町田千代子「シロイヌナズナの葉の向背軸性の確立における AS1-AS2-ETT 経路を介したサイトカイニン合成遺伝子の制御」第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学、東京、2015年3月16-18日 (口頭、国内)
9. 伊藤卓馬・中川彩美・石橋奈々子・高橋広夫・小島晶子・町田泰則・町田千代子「シロイヌナズナの葉の向背軸形成における AS1-AS2 による KRP5 遺伝子発現の抑制機能の解明」第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学、東京、2015年3月16-18日 (口頭、国内)
10. 玉井元樹・中川彩美・伊藤卓馬・大賀一臣・高橋広夫・小島晶子・町田泰則・町田千代子「ケミカルバイオロジーによるシロイヌナズナの葉の向背軸形成に関わる因子の探索」第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学、東京、2015年3月16-18日 (ポスター、国内)
11. 高橋広夫・高橋アンナ・林憲哉・内藤哲・尾之内均「翻訳制御に関わる種間保存性 uORF

- ペプチドの網羅的探索・進化保存性評価手法の開発と動植物ゲノムへの応用」第 17 回日本 RNA 学会年会、ホテルライフオーツ札幌、札幌、2015 年 07 月 15-17 日 (ポスター、国内)
12. 香田佳那・石橋奈々子・小嶋美紀子・中川彩美・高橋広夫・榊原均・町田泰則・町田千代子・小島晶子「シロイヌナズナの葉の向背軸極性分化における ETT 下流因子 IPT3 遺伝子の役割の解明」第 56 回日本植物生理学会年会、東京、2015 年 3 月 16-18 日 (ポスター、国内)
 13. Takahashi H., Takahashi A., Hayashi N., Satoshi N., Onouchi H., "Bioinformatic identification method of evolutionary ranges for potential functional non-coding molecules on genomes" Non-coding DNA and Chromosomal Integrity -toward the finding of Intermeres-, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan, 2015 年 8 月 7-8 日 (ポスター、国際)
 14. Nakagawa A., Takahashi H., Kojima S., Machida Y. and Machida C. "Chemical genetic analyses infer that AS1-AS2 protects developing leaves from camptothecin influence by repressing ARF3 and KRP5" 2015 FASEB - Science Research Conferences (SRC) Mechanisms in Plant Development August 2015, Vermont Academy, Saxtons River, VT USA, 2015 年 08 月 2-7 日 (ポスター、国際)
 15. Takahashi H., Takahashi A., Hayashi N., Naito S., Onouchi H. "Bioinformatic identification method of evolutionary ranges for potential functional non-coding molecules on genomes", The First International Conference on Hybridized Agriculture, Sojo University, Kumamoto, Japan, 2016 年 10 月 21-24 日 (ポスター、国際)
 16. 高橋広夫・小島晶子・中川彩美・町田泰則・町田千代子「植物オミックス解析におけるデータクレンジングとデータマイニングー葉の発生分化機構解明への応用ー」第 79 回日本植物学会大会、朱鷺メッセ、新潟、2015 年 09 月 06-08 日 (口頭、国内)
 17. 小島晶子・石橋奈々子・香田佳那・小嶋美紀子・高橋広夫・榊原均・町田泰則・町田千代子「シロイヌナズナの葉の向背軸性確立における AtIPT3 の解析」第 79 回日本植物学会大会、朱鷺メッセ、新潟、2015 年 09 月 06-08 日 (口頭、国内)
 18. 中川彩美・高橋広夫・伊藤卓馬・小島晶子・町田泰則・町田千代子「ケミカルバイオロジーによるシロイヌナズナの葉の向背軸性の確立における AS1-AS2 と共に働く因子の解析」第 79 回日本植物学会大会、朱鷺メッセ、新潟、2015 年 09 月 06-08 日 (口頭、国内)
 19. 町田千代子・中川彩美・高橋広夫・玉井元樹・小島晶子・町田泰則「シロイヌナズナの葉の軸形成における AS1-AS2-ETT 経路の役割」第 79 回日本植物学会大会、朱鷺メッセ、新潟、2015 年 09 月 06-08 日 (口頭、国内)
 20. 高橋広夫・坂本裕美・吉田輝彦「知識ベース手法と統計手法の組み合わせに基づく方法論の開発と臨床データ解析への応用」第 47 回化学工学会秋季大会、北海道大学、札幌、2015 年 09 月 09-11 日 (口頭、国内)
 21. 中川彩美・高橋広夫・伊藤卓馬・玉井元樹・小島晶子・町田泰則・町田千代子「シロイヌナズナの葉の向背軸形成に関わる転写因子 AS1-AS2 による CDK inhibitor 遺伝子の発現抑制機能の解明」第 38 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、神戸、2015 年 12 月 1-4 日 (ポスター、国内)
 22. 林憲哉・高橋広夫・内藤哲・尾之内均「リボソームアレストを引き起こす被子植物 uORF の探索」第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学、盛岡、2016 年 03 月 18-20 日 (口頭、国内)
 23. 小島晶子・石橋奈々子・香田佳那・小嶋美紀子・高橋広夫・中川彩美・榊原均・町田泰則・町田千代子「シロイヌナズナの葉の向背軸性確立における AS1・AS2-ETT 経路を介したサイトカイニン生合成制御の解析」第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学、盛岡、2016 年 03 月 18-20 日 (口頭、国内)

24. 中川彩美・ヴィアループラデル シモン・高橋広夫・小島晶子・町田泰則・町田千代子「シロイヌナズナの葉の向背軸形成におけるエピジェネティックレギュレーター AS1-AS2 と TOP1 α の役割の解明」第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学、盛岡、2016 年 03 月 18-20 日 (口頭、国内)
25. 香田佳那・石橋奈々子・小嶋美紀子・中川彩美・高橋広夫・榊原均・町田泰則・町田千代子・小島晶子「シロイヌナズナの AS1・AS2-ETT 経路を介した葉の発生・分化における AtIPT3 とその相同遺伝子の解析」第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学、盛岡、2016 年 03 月 18-20 日(ポスター、国内)
26. 高橋広夫・林憲哉・内藤哲・尾之内均「網羅的に観測された転写産物の横断解析に基づく機能性 ncRNA 領域の同定法開発」第 48 回化学工学会秋季大会、徳島大学、徳島、2016 年 09 月 06-08 日 (口頭、国内)
27. 高橋広夫・林憲哉・尾之内均「種間で保存された上流 ORF 同定のための配列データベース横断解析法の開発と動植物ゲノムへの応用」日本遺伝学会第 88 回大会、日本大学、三島、2016 年 09 月 07-09 日 (口頭、国内)
28. 高橋広夫・中川彩美・伊藤卓馬・小島晶子・町田泰則・町田千代子「シロイヌナズナの葉の細胞分化と分裂の制御機構の解明における発現解析データのデータマイニングの方法の開発」第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (ポスター、国内)
29. 中川彩美・高橋広夫・Simon Vial-Pradel・小島晶子・町田泰則・町田千代子「シロイヌナズナの葉の向背軸分化と細胞周期進行における AS1-AS2 の役割の解析」第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (口頭、国内)
30. 前田亮・玉城寛之・高野和儀・鈴木秀文・高橋広夫・浦聖恵・遠藤剛・田村 隆明「p53-TLP 相互作用：MDM2 の機能抑制による p53 活性化維持機構」第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (ポスター、国内)
31. 町田泰則・松村葉子・大林祝・高橋広夫・小島晶子・中川彩美・氣多澄江・林里香・杉山宗隆・中村研三・町田千代子「シロイヌナズナの葉の背-腹軸分化における核小体と植物固有の AS2 タンパク質複合体の役割」第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (口頭、国内)

《特許などその他成果》

1. 国際特許出願番号：PCT/JP2015/076927、佐々木博己・青柳一彦・高橋広夫「扁平上皮がんに対する化学放射線療法の有効性を評価するための方法」国立研究開発法人国立がん研究センター、国立大学法人京都大学、大塚製薬株式会社、平成 27 年 9 月 24 日

《受賞 (本人) 奨励賞など》

1. 第 11 回 わかしやち奨励賞 応用研究部門 優秀賞「健康寿命延長に資する生命科学ビッグデータ横断解析法の開発」(於名古屋)

セントロメア再編の分子メカニズム



中川 拓郎

公募研究 代表者（平成 26~27 年度）
大阪大学大学院理学研究科

【研究目的】

セントロメアは正確な染色体分配に重要な非コード領域である。多くの場合、セントロメアはリピート配列により構成されるため、それらを介した染色体再編（異常）が起こる染色体脆弱領域でもある。我々は分裂酵母を用いて、セントロメア再編に関与する因子を同定し、その役割を明らかにすることで、リピート配列を介した染色体再編の分子機構の解明を目指している。

【研究成果】

1. Rad51は非交叉型組換えを起こすことで同腕染色体の形成を抑制する

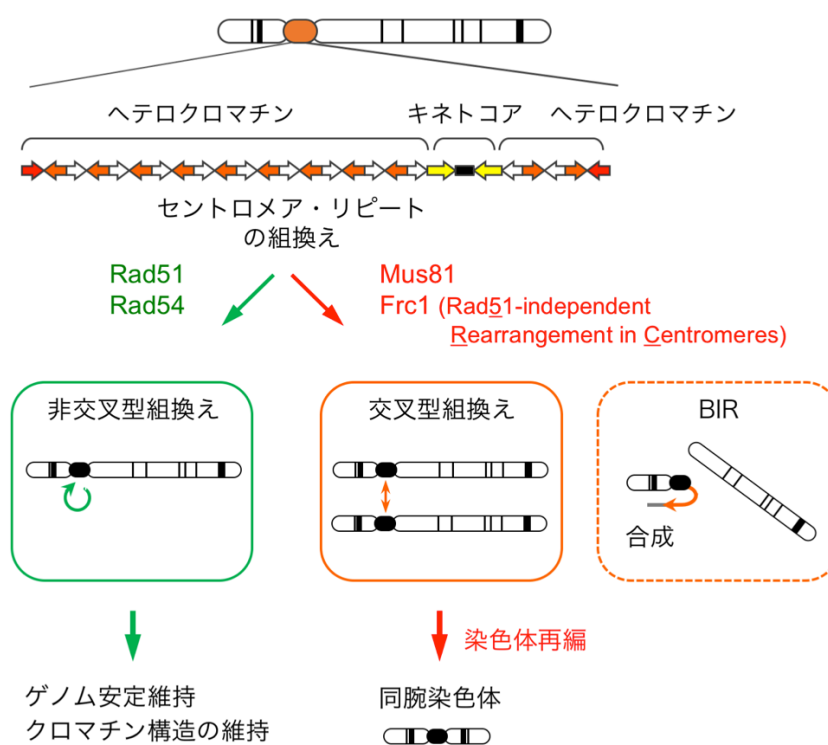
分裂酵母セントロメアの逆向きリピート配列を介して染色体再編が起きると、左右の染色体腕が同一となった同腕染色体ができる。我々はこれまでにRad51が同腕染色体の形成を抑制することを明らかにした。しかし、どのようにして相同組換え因子が染色体再編を抑制するのかが謎である。そこで、我々はセントロメア・リピート間の組換えを詳細に調べたところ、染色体再編とは逆に、Rad51はリピート間の組換え、特に非交叉型組換えに必要であることが分かった。そこで、交叉型組換えを起こすMus81を破壊したところ*rad51*欠失株での染色体再編が減少した。一方、DNA二重鎖切断により染色体再編を誘発した場合とは異なり、Break-induced replication (BIR)に働くPolδのCdc27/Pol32サブユニットを変異しても*rad51*欠失株の染色体再編には影響が見られなかった。これらの結果から、セントロメアで自然発生的にDNA組換えが始まったとき、Rad51が非交叉型組換えを促進することで、交叉型組換えによる染色体再編が起きないようにしていると考えられる。興味深いことに、*rad51*欠失株はセントロメアの転写サイレンシングにも欠損を示したことから、Rad51による組換えは染色体再編の抑制だけでなく、クロマチン構造の維持にも働く可能性が考えられる。

2. 相同組換え欠損細胞での染色体再編に必要な新規因子Frc1の同定

分裂酵母と同様、ヒトの相同組換え因子BRCA1、BRCA2が変異したときも染色体再編が高頻度に起こる。そして、乳がんや卵巣がんを発症する。したがって、相同組換え

欠損細胞で起きる染色体再編の仕組みを明らかにすることは医学的見地からも重要である。そこで、我々は分裂酵母*rad51*欠失株に突然変異を導入し、染色体再編の発生頻度が低下したクローンを単離した。次世代シーケンスなどにより原因遺伝子を特定し、それをFrc1 (Rad51-independent Rearrangements in Centromeres)と名付けた。*frc1*破壊株は複製阻害剤やDNA損傷に高い感受性を示した。また、*frc1 rad51*二重変異株はそれぞれの単独変異株より更に高い感受性を示した。これらの結果から、染色体再編に携わるFrc1はRad51と異なるDNA修復経路で機能すると考えられる。

セントロメア再編の分子メカニズム



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Onaka AT, Toyofuku N, Inoue T, Okita AK, Sagawa M, Su J, Shitanda T, Matsuyama R, Zafar F, Takahashi TS, Masukata H, Nakagawa T. (2016) Rad51 and Rad54 promote noncrossover recombination between centromere repeats on the same chromatid to prevent isochromosome formation. *Nucleic Acids Res.* 44:10744-10757. (査読有り)
2. Kawasoe Y, Tsurimoto T, Nakagawa T, Masukata H, Takahashi TS. (2016). MutSu maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading. *eLife.* 5:e15155 (査読有り)
3. Blaikley EJ, Tinline-Purvis H, Kasperek TR, Marguerat S, Sarkar S, Hulme L, Hussey S, Wee BY, Deegan RS, Walker CA, Pai CC, Bähler J, Nakagawa T, Humphrey TC. (2014). The DNA damage checkpoint pathway promotes extensive resection and nucleotide synthesis to facilitate homologous recombination repair and genome stability in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 42:5644-5656. (査読有り)

《学会発表》

1. 沖田暁子、Dayalini Weerasekara、升方久夫、中川拓郎「ヘテロクロマチンによるセントロメア領域での染色体異常の抑制」第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会、千葉県木更津市、2017年1月11-13日（口頭発表、国内）
2. 沖田暁子、Dayalini Weerasekara、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「ヘテロクロマチンのH3K9me修飾はTREX因子Mlo3による染色体再編を抑制する」第39回日本分子生物学会年会、神奈川県横浜市、2016年11月30-12月2日（ポスター発表、国内）
3. Nakagawa T, Onaka AT, Okita AK, Su J, Zafar F, Takahashi T, Masukata H. Rad51 and Rad54 promote noncrossover recombination between centromere repeats to prevent isochromosome formation. The 10th 3R Symposium 島根県松江市、2016年11月13-17日（口頭発表とポスター発表、国内）
4. Weerasekara D, Okita AK, Masukata H, Nakagawa T. Heterochromatin suppresses break-induced replication in centromeres. The 10th 3R Symposium 島根県松江市、2016年11月13-17日（ポスター発表、国内）
5. 中川拓郎「分裂酵母セントロメアでの染色体再編の分子機構」国立遺伝学研究所・研究集会「生物ゲノム安定維持の分子機構」静岡県三島市、2016年10月24-25日（口頭発表、国内）
6. 中川拓郎、大仲惇司、高橋達郎、升方久夫「Rad51とRad54はセントロメア・リピート間での非交叉型組換えを誘導することで同腕染色体の形成を抑制する」第88回日本遺伝学会大会、静岡県三島市、2016年9月7-10日（口頭発表、国内）
7. 大仲惇司、片平泰弘、井上卓大、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「Rad51依存的組換えによるセントロメア・リピート間のSSAの抑制」第38回日本分子生物学会年会、兵庫県神戸市、2015年12月1-4日（口頭発表、国内）
8. 蘇傑、沖田暁子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「分裂酵母CENP-Tヌクレオソームがセントロメアにおける同腕染色体形成を促進する」第38回日本分子生物学会年会、兵庫県神戸市、2015年12月1-4日（ポスター発表、国内）
9. 豊福直子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「分裂酵母セントロメアで起こる染色体再編の分子メカニズム」第38回日本分子生物学会年会、兵庫県神戸市、2015年12月1-4日（ポスター発表、国内）
10. 沖慶太郎、豊福直子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「セントロメア領域での染色体再編に必要な新規因子の同定」第38回日本分子生物学会年会、兵庫県神戸市、2015年12月1-4日（ポスター発表、国内）

11. 沖田暁子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「ヘテロクロマチン構造がセントロメアでの染色体再編を抑制する」第23回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、静岡県焼津市、2015年10月19-21日（口頭発表、国内）
12. 豊福直子、沖慶太郎、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「セントロメアで起きる染色体再編の分子メカニズム」第23回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、静岡県焼津市、2015年10月19-21日（ポスター発表、国内）
13. 中川拓郎「分裂酵母セントロメアで起きる染色体再編の分子メカニズム」国立遺伝学研究所・研究集会「染色体 DNA の安定維持の分子メカニズム」静岡県三島市、2015年10月1-2日（招待、国内）
14. 蘇傑、沖田暁子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「分裂酵母 CENP-T ヌクレオソームがセントロメアにおける同腕染色体形成を促進する」日本遺伝学第87回大会、宮城県仙台市、2015年9月24-26日（口頭発表、国内）
15. 中川拓郎「セントロメアで起きる染色体再編の分子メカニズム」新学術領域研究「ゲノム支援」2015年度拡大班会議、京都府京都市、2015年8月27-28日（口頭発表、国内）
16. 沖慶太郎、豊福直子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「セントロメア再編の分子メカニズム」新学術領域研究「ゲノム支援」2015年度拡大班会議、京都府京都市、2015年8月27-28日（ポスター発表、国内）
17. Okita A, Takahashi T, Masukata H, Nakagawa T 「Heterochromatin suppresses gross chromosomal rearrangement in centromere」 International Symposium 「Non-coding DNA and Chromosomal Integrity」、兵庫県淡路市、2015年8月7-8日（ポスター発表、国内）
18. 中川拓郎「セントロメア再編の分子メカニズム」新学術領域研究「ゲノムを支える非コードDNA領域の機能」第9回領域会議、兵庫県淡路市、2015年8月5-6日（口頭発表、国内）
19. 中川拓郎「H3K9 methylation in heterochromatin suppresses gross chromosomal rearrangement (GCR) in centromere in mitotic cells」8th International Fission Yeast Meeting、兵庫県神戸市、2015年6月21-26日（口頭発表、国内）
20. Su J, Takahashi T, Masukata H, Nakagawa T. 「CENP-T histone-fold protein suppresses translocation in fission yeast」8th International Fission Yeast Meeting、兵庫県神戸市、2015年6月21-26日（ポスター発表、国内）
21. 大仲惇司、片平泰弘、沖田暁子、浅井麗伊、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「Rad51-independent recombination between centromere repeats causes gross chromosomal rearrangement in fission yeast」8th International Fission Yeast Meeting、兵庫県神戸市、2015年6月21-26日（ポスター発表、国内）
22. Zafar F, Okita A, Onaka A, Su J, Asai R, Takahashi T, Masukata H, Nakagawa T 「Fission yeast CENP-S,X and FANCM suppress gross chromosomal rearrangement in centromere by regulating recombination between centromere repeats」Keystone Symposium “DNA Replication and Recombination”, Whistler, Canada, 2015年3月1-6日（ポスター発表、国外）
23. 豊福直子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「Identification of the genes required for centromere rearrangement in fission yeast by pooled linkage analysis」東京都千代田区、2015年1月20-21日（ポスター発表、国内）
24. 大仲惇司、片平泰弘、井上卓大、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「分裂酵母セントロメアにおける相同組換えの制御機構」第37回日本分子生物学会年会、神奈川県横浜市、2014年11月25-27日（口頭発表、国内）

25. 佐川みなみ、真木賢太郎、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「DNA複製因子MCMによるセントロメアのクロマチン制御」第37回日本分子生物学会年会、神奈川県横浜市、2014年11月25-27日（ポスター発表、国内）
26. Okita A, Takahashi T, Masukata H, Nakagawa T「Heterochromatin suppresses gross chromosomal rearrangement in centromere」The 9th 3R symposium、静岡県御殿場市、2014年11月17-21日（ポスター発表、国内）
27. Zafar F, Okita A, Asai R, Takahashi T, Masukata H, Nakagawa T「CENP-SX and Fm11 suppress gross chromosomal rearrangement in centromeres through preventing crossover between centromere repeats」The 9th 3R symposium、静岡県御殿場市、2014年11月17-21日（ポスター発表、国内）
28. Nakagawa T, Zafar F, Okita A, Onaka A, Takahashi T, Masukata H「Suppression of gross chromosomal rearrangement (GCR) in centromere in fission yeast」The 9th 3R symposium、静岡県御殿場市、2014年11月17-21日（口頭発表、国内）
29. 中川拓郎「セントロメアでの染色体再編の制御機構」国立遺伝学研究所・研究集会「染色体DNAの安定維持の分子メカニズム」静岡県三島市、2014年11月6-7日（招待、国内）
30. 中川拓郎「分裂酵母セントロメアで起きる染色体再編の分子機構」日本遺伝学第86回大会、滋賀県長浜市、2014年9月17-19日（招待、国内）
31. 豊福直子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「セントロメア再編の分子メカニズム」新学術領域「ゲノム支援」2014年度拡大班会議、兵庫県神戸市、2014年8月20-21日（ポスター発表、国内）
32. 中川拓郎「セントロメア再編の分子メカニズム」第7回「非コード」新学術領域会議、神奈川県足柄下郡湯河原町、2014年7月14-16日（口頭発表、国内）

《受賞（本人）》

1. 大阪大学総長奨励賞 2015 研究部門

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 熊本大学リエゾンラボ研究会／リーディングプログラム：HIGO最先端研究セミナー、平成28年4月13日、英語による研究セミナー、約20名

ゲノムワイド解析による複製開始複合体形成制御と クロマチン制御連携の解明



藤田 雅俊

公募研究 代表者 (平成 26-27 年度)

九州大学薬学研究院

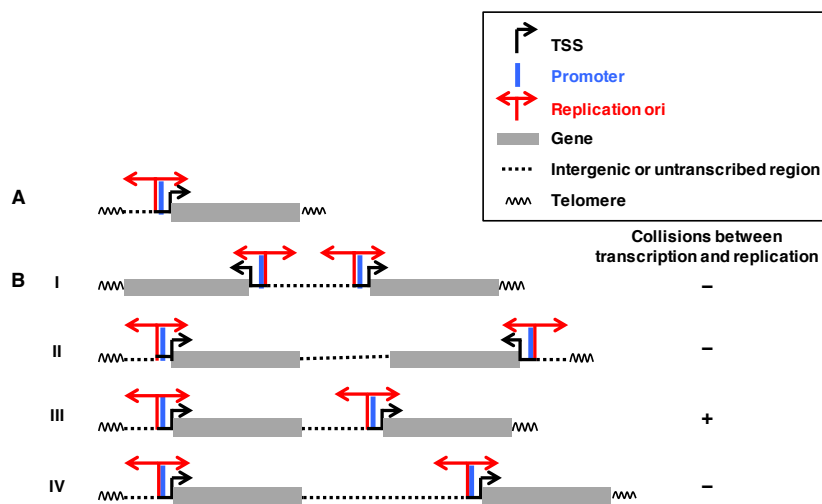
【研究目的】

ヒト細胞系において、①複製開始複合体 (pre-RC) 因子、②それらと関連しているクロマチン制御因子(新規ヒストンシャペロン GRWD1 など)、③ヒストンやその修飾、そして④クロマチン構造、などの時空間的關係・連携を、非コード領域を含めゲノムワイドに解析し、ライセンス及び複製制御とクロマチン制御の有機的連携に対するより普遍的なモデルを得ることを目的とした。

【研究成果】

ゲノムワイドに pre-RC 形成部位 (CDC6 および MCM7 ChIP-Seq) およびクロマチン構造 (FAIRE-Seq による chromatin openness) を調べ、これらのデータを既存の複製開始部位のゲノムワイドデータ、各種ヒストン修飾や転写因子の ChIP-Seq データ、各遺伝子の転写量のデータ、あるいは遺伝子の organization 等と比較検討することにより、以下のことが示されつつある。①pre-RC はプロモーター近傍に形成されやすく、オープンなクロマチン構造によりある程度形成が促進される。②しかしながら、pre-RC が発火して実際に複製開始点となるかどうか、より強くオープンなクロマチン構造に影響される。結果として、複製開始点はプロモーター近傍 (転写開始点の上流) に存在しやすい。なお、MCM 活性化因子である CDC45 や GINS のタンパク質量が、複製開始反応において rate-limiting であることは酵母細胞では明確に示されており、ヒト細胞でも同様であることが示唆されている。また、酵母細胞でもオープンなクロマチン構造が GINS 等の集積を促進していると予想されている。③一般的に、転写量が多い遺伝子では、chromatin openness が増加している。したがって、転写が活性な遺伝子では、プロモーター近傍に複製開始点が存在する。④このことによって、転写が活性な遺伝子領域で、複製と転写の衝突が避けやすくなる (下図参照)。なお、複製と転写の衝突は DNA ダメージとなることが知られている。⑤プロモーターの上流に向かう複製フォークは、もしすぐ近くに転写が活性な遺伝子が head-to-tail に存在する場合、その転写と衝突してしまう可能性がある。そこで、インターメアを含む非転写領域が一定の長

さ存在していることが重要となる（下図参照）。⑥染色体脆弱部位として知られている幾つかの巨大遺伝子領域において、pre-RCの形成効率は通常の活性な遺伝子領域と較べてそこまで低くないが、発火する複製開始点はやはりプロモーター近傍に存在する（結果として、複製開始点の存在頻度は低くなる）。そのため、下流に向かうフォークがカバーする領域が広く、結果として遺伝子の後半領域で転写と逆方向から来るフォークが衝突してしまう可能性が考えられる。⑦上記したようなシンプルな複製開始点決定モデルは、多細胞生物細胞のように多様に分化し転写が活性な遺伝子が著しく変化する細胞においては、ゲノムの安定性を維持するために有用なシステムであると考えられる。以上の結果の一部はすでに論文発表し（Sugimoto et al. 2015, NAR）、残りを投稿準備中である。



活性な遺伝子のプロモーター近傍（転写開始点の上流）に可塑的に複製開始点を形成することにより転写と複製の衝突頻度を下げ得ることを示すシンプルなモデル図

G4構造やある種の転写因子などにより pre-RCの形成部位にある程度の特異性があることは確かと思われるが、可塑的（あるいは受動的）にオープンなクロマチン構造を持つプロモーター近傍（転写開始点の上流）に複製開始点を形成すると、転写と複製の衝突頻度を下げ得ることを示している。A. 一つの遺伝子のみを持つ仮想的な最小染色体を示す。この遺伝子が転写している場合、転写開始点の上流から複製を開始すると最も衝突を回避できる。B. 二つの遺伝子を持つ場合。これらが head-to-head あるいは tail-to-tail で存在する場合も（B I 及び B II）、同様の制御機構で衝突を回避できる。しかしながら、head-to-tail で存在する場合は（B III）、複製と転写の衝突が起きてしまう（この場合、右の複製開始点からの左方向へのフォークと左の遺伝子の転写が衝突）。しかしこの場合も、二つの遺伝子の間に一定の長さ（論理的には左の遺伝子長以上の長さ）の非転写領域（intergenic region や不活性な遺伝子等）があれば、衝突を回避できる（B IV）。このようなシンプルな制御は、多細胞生物細胞のように多様に分化し転写が活性な遺伝子が著しく変化する細胞においては、ゲノムの安定性を維持するために有用なシステムであると考えられる。

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Sugimoto, N., Maehara, K., Yoshida, K., Yasukouchi, S., Osano, S., Watanabe, S., Aizawa, M., Yugawa, T., Kiyono, T., Kurumizaka, H., Ohkawa, Y., *Fujita, M. (2015) Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding protein that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture. *Nucleic Acids Res.* 43: 5898-5911. (査読有り)

《学会発表》

1. 杉本のぞみ、會澤誠大、吉田和真、前原一満、大川恭行、藤田雅俊 「ヒト細胞におけるpre-RC形成とfiringの時空間的制御のゲノムワイド解析」 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ワークショップ、神戸、2015年12月1-4日（招待、国内）
2. Sugimoto N, Yoshida K, Maehara K, Ohkawa Y, Fujita M “Genome-wide analysis for spatiotemporal regulation of the pre-RC formation and firing in human cells” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic DNA replication and genome maintenance、米国、2015年9月1-5日（口頭発表、国際）
3. 杉本のぞみ、前原一満、吉田和真、安河内周平、渡邊心也、會澤誠大、清野透、胡桃坂仁志、大川恭行、藤田雅俊 「Novel histone chaperone GRWD1 regulates chromatin structure genome wide to promote replication licensing」 第37回日本分子生物学会年会ワークショップ、横浜、2014年11月25-27日（招待、国内）
4. Sugimoto N, Maehara K, Yoshida K, Yasukouchi S, Watanabe S, Aizawa M, Kiyono T, Kurumizaka H, Ohkawa Y, Fujita M “Genome-wide relationship between pre-replication complex formation and chromatin status” The 9th 3R Symposium、御殿場、2014年11月17-21日（招待、国際）
5. 藤田雅俊 「複製開始複合体形成制御とクロマチン制御連携のゲノムワイド解析」 大阪大学蛋白質研究所セミナー 「染色体伝承の分子背景：複製から染色体分離まで」、大阪2014年9月25-16日（招待、国内）

DNA 合成に干渉する非コード配列での複製フォーク適応機構の研究



釣本 敏樹

公募研究 代表者 (平成 26~27 年度)
九州大学理学研究院

【研究目的】

非コード領域には、脆弱部位、組換えホットスポット、ヘテロクロマチン、テロメア、セントロメア等、通常と違う特性を持つ配列があり、DNA 複製の進行に干渉することが知られている。染色体が安定に維持されるには、これら領域での複製フォークの機能適応が重要である。本課題では DNA 合成干渉を示すヒト非コード配列でのヒト複製関連因子の挙動を解析し、非コード配列において複製フォークがどのようにして機能的適応をしているかを解明する。

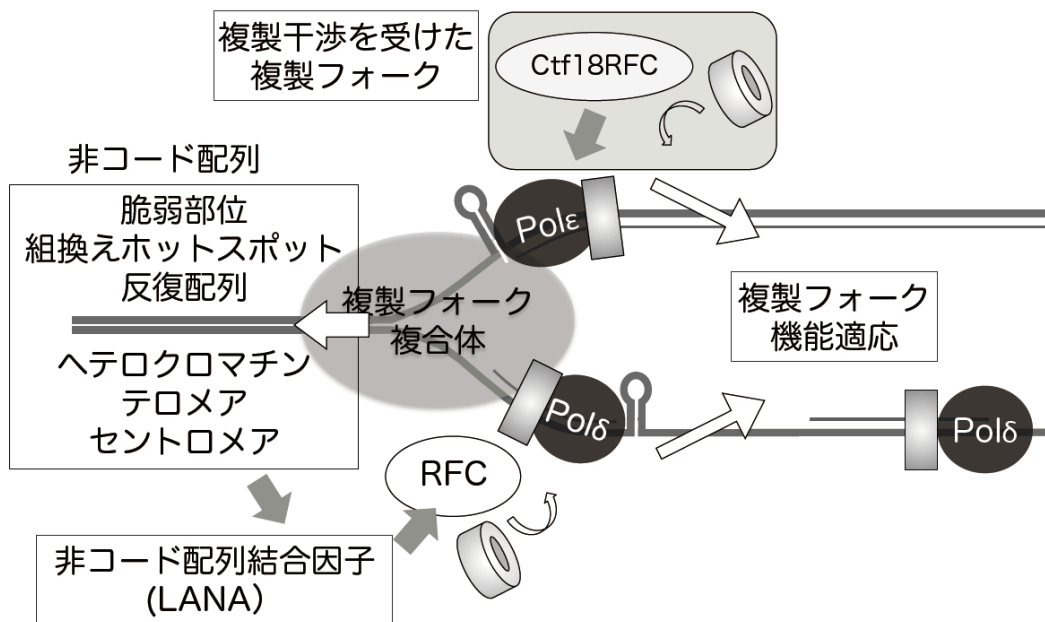
【研究成果】

DNA 複製干渉を示すと思われる非コード配列を単離し、出芽酵母 YCp ベクターおよび SV40 ウイルス複製開始点を持つ pcDNA ベクターに挿入した。前者では出芽酵母野生株でのプラスミド安定性を指標に複製干渉の測定を行ったが、十分に有意差がある結果が得られなかった。これに対して後者のプラスミドを SV40T 抗原を発現するヒト培養細胞に一過的に導入し、回収された DNA の制限酵素 DpnI に対する感受性を利用して、複製干渉の程度の定量が可能になった。その結果、脆弱領域由来のイントロン配列、セントロメア由来のアルフォイド配列および Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) の末端反復配列では複製能が約半分になる複製干渉を見出した。

このウイルス由来の反復配列については、ウイルス核抗原 LANA が結合するとともに宿主複製因子 RFC に強く結合することが明らかになった。我々の解析で、LANA と RFC の結合によって、複製クランプ PCNA が効率よく末端反復配列 DNA にロードされることを明らかにした(PNAS. 2014, 111, 11816-11821)。このことより、複製干渉を示すウイルスの末端反復配列に複製因子 RFC が特異的にリクルートされ、複製干渉を軽減する機構の存在が考えられた。

また染色体接着、DNA 損傷応答に要求される第 2 の PCNA ロードー Ctf18-RFC が、複製 DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) と複合体を形成することに着目し、この複合体の機能を解析した。その結果、生理的塩濃度下では、Ctf18-RFC は Pol ϵ と複合体となって PCNA ロードーとして機能すること、さらに Pol ϵ が非 DNA 合成モードの時に PCNA

ローディング活性を持つことを明らかにした (revise 中)。また、この複合体形成は、出芽酵母でも高度に保存され、両者の複合体形成能は、酵母の DNA 損傷抵抗性、および染色体安定性の維持に重要であることを示した(Genes Cells. 21, 482-491)。以上より、Ctf18-RFC は複製フォーク複合体の 1 要素として振る舞い、Pole が染色体接着部位、DNA 損傷、複製干渉などによって合成を中断した時に、新たに PCNA を装着し、Pole の DNA 合成を回復するしくみが想定される。



要約：非コード配列での複製干渉に対して、CTF18RFC/Pol ε、RFC/LANA等の複合体形成によって新たにPCNAのローディングが行なわれて複製を継続。

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Kawasoe Y, Tsurimoto T, Nakagawa T, Masukata H, *Takahashi TS. MutS α maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading. *Elife*. 5, 2016, e15155. (査読あり)
2. Yang CC, Suzuki M, Yamakawa S, Uno S, Ishii A, Yamazaki S, Fukatsu R, Fujisawa R, Sakimura K, Tsurimoto T, *Masai H. Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication in human cells. *Nat Commun*. 7, 2016, 12135. (査読あり)
3. *Hirota K, Tsuda M, Mohiuddin, Tsurimoto T, Cohen IS, Livneh Z, Kobayashi K, Narita T, Nishihara K, Murai J, Iwai S, Guilbaud G, Sale JE, Takeda S. In vivo evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase δ . *Nucleic Acids Res*. 44, 2016, 7242-7250. (査読あり)
4. Kawakami H, Ohashi E, Tsurimoto T, *Katayama T. Rapid Purification and Characterization of Mutant Origin Recognition Complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol*. 7, 2016, 521. (査読あり)
5. Okimoto H, Tanaka S, Araki H, Ohashi E, *Tsurimoto T Conserved interaction of Ctf18-RFC with DNA polymerase ϵ is critical for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*. 21, 2016, 482-491. (査読あり)
6. Kawakami H, Ohashi E, Kanamoto S, Tsurimoto T, *Katayama T. Specific binding of eukaryotic ORC to DNA replication origins depends on highly conserved basic residues. *Scientific Reports* 5, 2015, 14292 (査読あり)
7. Hirota K, Yoshikiyo K, Guilbaud G, Tsurimoto T, Murai J, Tsuda M, Phillips LG, Narita T, Nishihara K, Kobayashi K, Yamada K, Nakamura J, Pommier Y, Lehmann A, Sale JE, *Takeda S. The POLD3 subunit of DNA polymerase δ can promote translesion synthesis independently of DNA polymerase ζ . *Nucleic Acids Res*. 43, 2015, 1671-1683. (査読あり)
8. Masuda Y, Tsurimoto T, Maki S, Katayama T, Furukohri A, *Maki H. Short CCG repeat in huntingtin gene is an obstacle for replicative DNA polymerases, potentially hampering progression of replication fork. *Le HP, Genes Cells*. 20, 2015, 817-833. (査読あり)
9. Takeishi Y, Iwaya-Omi R, Ohashi E, *Tsurimoto T. Intramolecular Binding of the Rad9 C Terminus in the Checkpoint Clamp Rad9-Hus1-Rad1 Is Closely Linked with Its DNA Binding. Takeishi Y, Iwaya-Omi R, Ohashi E, Tsurimoto T. *J Biol Chem*. 290, 2015, 19923-19932. (査読あり)
10. *Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, Tsurimoto T. Interaction between Rad9-Hus1-Rad1 and TopBP1 activates ATR-ATRIP and promotes TopBP1 recruitment to sites of UV-damage. *DNA Repair (Amst)*. 21, 2014, 1-11. (査読あり)
11. Sun Q, Tsurimoto T, Juillard F, Li L, Li S, De León Vázquez E, Chen S, *Kaye K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA recruits the DNA polymerase clamp loader to mediate efficient replication and virus persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111, 2014, 11816-11821. (査読あり)
12. Nakao S, Zhang S, Vaara M, Syväoja JE, Lee MY, Tsurimoto T, Karran P, *Oda S. Efficient long DNA gap-filling in a mammalian cell-free system: a potential new in vitro DNA replication assay. *Biochimie*. 95, 2013, 320-328. (査読あり)
13. *Strzalka W, Bartnicki F, Pels K, Jakubowska A, Tsurimoto T, Tanaka K. RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen. *J. Exp. Bot*, 64, 2013, 859-869. (査読あり)

《学会発表》

1. Tsurimoto T, Ohashi E, Fujisawa R, Takeishi Y クランプ・ローダー系による進行障害時の複製フォークの機能制御第 38 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2015 年 12 月 1-4 日 神戸 (招待、国内)

2. Ohashi E, Takeishi Y, Tsurimoto T. Rad9 C 末端によるチェックポイントクランプ Rad9-Hus1-Rad1 の機能制御機構 第 38 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2015 年 12 月 3 日 神戸 (口頭、国内)
3. Rad9 C 末端による Rad9-Hus1-Rad1(9-1-1)の DNA 損傷応答制御機構 Ohashi E, Takeishi Y, and Tsurimoto T. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2015 年 10 月 19 日 焼津 (口頭、国内)
4. Ryo Fujisawa, Ohashi E, Tsurimoto T. Pole に結合した Ctf18-RFC の PCNA ローディング過程の解析. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2015 年 10 月 20 日 焼津 (口頭、国内)
5. Ryo Fujisawa, Ohashi E, Tsurimoto T. Functional significance of the interaction between the second PCNA loader Ctf18-RFC and Pole CSHL Workshop: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance. 2015 年 9 月 2 日 Cold Spring Harbor NY (ポスター、国際)
6. Ohashi E, Takeishi Y, Tsurimoto T. Multiple roles of Rad9 C-tail in the checkpoint clamp Rad9-Hus1-Rad1. CSHL Workshop: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance. 2015 年 9 月 3 日 Cold Spring Harbor NY (ポスター、国際)
7. Tsurimoto T, Fujisawa R, Ohashi E, Tanaka S, Araki H, Sun Q, Kaye K. Novel mechanisms of PCNA loader complexes to specify their functions. 2014 年 11 月 20 日 The 9th 3R Symposium Gotemba, Shizuoka Japan (招待、国際)
8. Ohashi E, Takeishi Y, Tsurimoto T. The ATR activation through the accumulation of the checkpoint factors and their interactions at the site of DNA damage, 2014 年 11 月 20 日 The 9th 3R Symposium Gotemba, Shizuoka Japan (口頭、国際)
9. Fujisawa R, Tsurimoto T. Interaction of Ctf18-RFC with DNA polymerase ϵ specifies their functional sites for the active PCNA loading, 2014 年 11 月 19 日 The 9th 3R Symposium Gotemba, Shizuoka Japan (ポスター、国際)
10. Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, Tsurimoto T. DNA 損傷応答因子 ATR-ATRIP, Rad9-Hus1-Rad1, TopBP1 の 3 者間結合による ATR 活性化機構 第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2014 年 11 月 27 日 横浜 (口頭、国内)
11. Kawakami H, Kawanishi T, Ohashi E, Tsurimoto T, Katayama T, 出芽酵母 ORC 複合体の分子内外クロストークの同定 第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2014 年 11 月 27 日 横浜 (口頭、国内)
12. Fujisawa R, Tsurimoto T ヒト Ctf18-RFC は Pole と複合体となって機能的に PCNA をロードする 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 27 日 横浜 (口頭、国内)
13. Takeishi Y, Ohashi E, Tsurimoto T The C-terminal of Rad9 associates to the core ring structure of the checkpoint clamp, Rad9-Hus1-Rad1, and regulates its DNA binding activity. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 横浜 (ポスター、国内)
14. Tsurimoto T, Okimoto H, Ryo Fujisawa, Ran Taguri, Ohashi E, Tanaka S, Araki H DNA ポリメラーゼ ϵ と PCNA ローダー Ctf18-RFC のホロ複合体形成とその機能 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2013 年 12 月 3 日 神戸 (招待、国内)
15. Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, Tsurimoto T Rad9-TopBP1 間の結合は ATR の活性化を介して TopBP1 の DNA 損傷部位への局在を促進する 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2013 年 12 月 3 日 神戸 (口頭、国内)
16. Okimoto H, Tanaka S, Araki H, Ohashi E, Tsurimoto T. Roles of loader proteins for coupling between replication and chromosome maintenance. International Conference "Coupling of replication, repair and transcription, and their common mechanism of chromatin remodeling" 2014 年 02 月 05 日 京都 (招待、国際)
17. 沖本寛子、藤澤遼、田栗蘭、大橋英治、田中誠司、荒木弘之、釣本敏樹 ヒトから酵母まで保存された Pole/Ctf18-RFC 間相互作用 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2013

11月13日-15日 仙台 (口頭、国内)

18. 大橋英治、武石幸容、上田聡、釣本敏樹 ヒト TopBP1-Rad9 結合に寄る ATR 活性化を介した TopBP1 の DNA 損傷部位への局在促進 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2013 11月13日-15日 仙台 (口頭、国内)
19. Okimoto H, Tanaka S, Araki H, Ohashi E, Tsurimoto T. Functions of the C-terminal of the chromosome cohesion PCNA loader, Ctf18-RFC. Workshop: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance. 2013 年 9月11日 Cold Spring Harbor NY (ポスター、国際)
20. Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, Tsurimoto T Interaction of Rad9-Hus1-Rad1 with TopBP1 through CK2 sites in Rad9 triggers the cycle of ATR-activation and their accumulation for establishment of the ATR-dependent checkpoint signal CSHL Workshop: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance. 2013 年 9月11日 Cold Spring Harbor NY (ポスター、国際)

《図書》

1. 釣本敏樹 教科書「遺伝学」桂勳編 第4章 分子遺伝学 pp. 57-89、培風館 2017年

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 九州大学理学部先端自然科学講演会 (リカレント教育) 「染色体の成立ちと伝承」、福岡県高等学校理科部会、九州大学理学部 (箱崎キャンパス)、平成27年8月10日
2. 九州大学理学部「次世代科学者養成講座 (ESSP)」生物学科主任講師、九州、山口地区高校生、九州大学理学部、平成24-27年度 8月-3月

《学会の主催》

1. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「染色体伝承の分子背景」国内 2014年9月26日 吹田市

セントロメアサイズを規定する分子機構の解析



深川 竜郎

公募研究 代表者 (平成 26~27 年度)
大阪大学生命機能研究科

【研究目的】

我々は、人工動原体を作成する過程で、予想外にもセントロメアのサイズが通常の 3 から 5 倍程度に巨大化している細胞が見いだした。本研究では、このセントロメアのサイズが大きくなった細胞を利用して、「セントロメア領域のサイズを規定する分子機構」の解明を目的として研究を進めた。

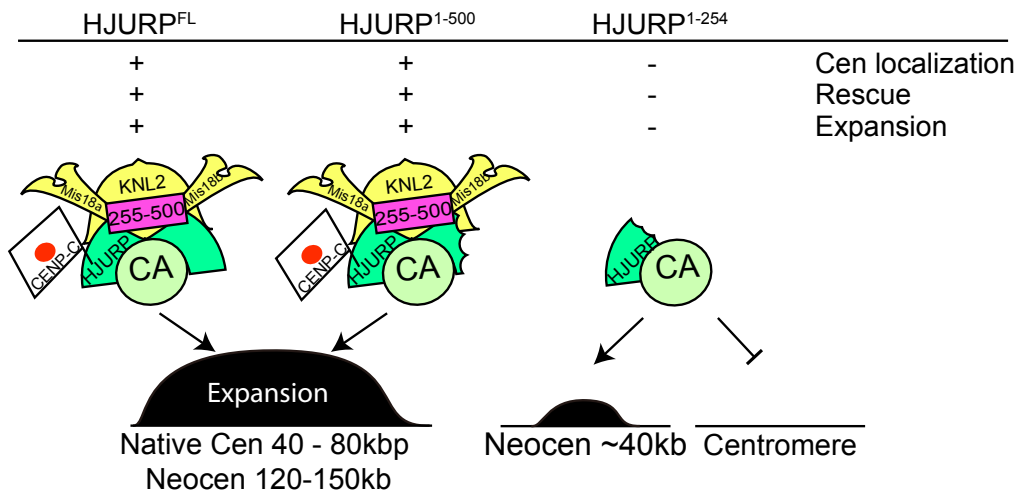
【研究成果】

染色体分配に必須なセントロメアは、典型的な非コード DNA 領域である。セントロメアの上には、動原体構造が形成され紡錘体微小管と結合する。我々は、動原体の形成機構を知る目的で、LacO-LacI のシステムと染色体工学を併用して人工動原体を作成してきた。その研究過程で、予想外にもセントロメアのサイズが通常の 3 から 5 倍程度に巨大化している細胞が見いだし、セントロメアのサイズが増大しうることを見出した。本研究では、この細胞を用いて「セントロメア領域のサイズを規定する分子機構」の解明を進めた。

はじめに、セントロメアを巨大化させる因子の同定を試み、HJURP タンパク質と呼ばれる CENP-A のシャペロン分子が、セントロメアを巨大化させる機能があることを突き止めた。そこで、HJURP のノックアウト細胞を作成してその機能ドメインを明らかにすることと、それら機能ドメインとセントロメア巨大化機能と関連を研究した。その結果、HJURP の N 末端領域 (1-254 アミノ酸領域)は、CENP-A と結合できるが、そこにはセントロメア巨大化活性はないことが判明した。一方、255-500 アミノ酸領域は、CENP-A とは結合できないものの、単独でセントロメア局在活性があること明らかにできた。さらに、HJURP の 1-500 アミノ酸領域にセントロメアサイズを巨大化させる活性があることを見い出した。

さらに HJURP の 1-500 アミノ酸領域と結合するタンパク質を検索した結果、KNL2/M18BP1 タンパク質が結合することを見出した。KNL2/M18BP1 タンパク質単独では、セントロメアサイズの巨大化活性はないので、HJURP と KNL2/M18BP1 タンパク質が協調して、セントロメアを巨大化させる活性を発揮していると結論した。セン

トロメアを巨大化する生理的な意義は、未だ不明であるが、通常の細胞ではセントロメアサイズは一定である、HJURP と KNL2/M18BP 1 タンパク質によるセントロメア巨大化活性は何らかのメカニズムで抑制されていると考えている。



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. *Fukagawa, T. (2016). Centromeric chromatin and kinetochore assembly in vertebrate cells. F. Hanaoka, and K. Sugawara (eds.) DNA replication, recombination, and repair: Molecular Mechanisms and pathology, p365-387. (査読あり)
2. Wood, L., Booth, D.G., Vargiu, G., Ohta, S., deLima Alves, F., Samejima, K., Fukagawa, T., Rappsilber, J., *Earnshaw, W.C. (2016). Auxin/AID versus conventional knockouts: distinguishing the roles of CENP-T/W in mitotic kinetochore assembly and stability. *Open Biology* Vol. 6, 150230. (査読あり)
3. Kusakabe, M., Oku, H., Matsuda, R., Hori, T., Muto, A., Igarashi, K., Fukagawa, T., *Harata, M. (2016). Genetic complementation analysis showed distinct contributions of the N-terminal tail of H2A.Z to epigenetic regulations. *Genes Cells* 21:122-135. (査読あり)
4. Satrimafitrah, P., Barman, H.K., Ahmad, A., Nishitoh, H., Nakayama, T., Fukagawa, T., *Takami, Y. (2016). RbAp48 is essential for viability and plays a role for chromosome stability in vertebrate Cells. *Chromosome Res.* 24, 161-173. (査読あり)
5. Furuta, M., Hori, T., *Fukagawa, T. (2016). Chromatin binding of RCC1 during mitosis is important for its nuclear localization in interphase. *Mol Biol Cell* 27: 371-381. (査読あり)
6. Samejima, I., Spanos, C., Alves Fde, L., Hori, T., Perpelescu, M., Zou, J., Rappsilber, J., Fukagawa, T., *Earnshaw WC. (2015). Whole proteome genetic analysis of dependencies in assembly of a vertebrate kinetochore. *J Cell Biol.* 211: 1141-1156. (査読あり)
7. Amakawa, Y., Sakata, Y., Hoki, Y., Arata, S., Shioda, S., Fukagawa, T., Sasaki, H., *Sado, T. (2015). A new Xist allele driven by a constitutively active promoter is dominated by Xist locus environment and exhibits the parent-of-origin effects. *Development* 142: 4299-4308. (査読あり)
8. Nagpal, H., Hori, T., Furukawa, A., Sugase, K., Osakabe, A., Kurumizaka, H., *Fukagawa, T. (2015). Dynamic changes in the CCAN organization through CENP-C during cell-cycle progression. *Mol Biol Cell* 26: 3768-3776. (査読あり)
9. Perpelescu, M., Hori, T., Toyoda, A., Misu, S., Monma, N., Ikeo, K., Obuse, C., Fujiyama, A., *Fukagawa, T. (2015). HJURP is involved in the expansion of centromeric chromatin. *Mol Biol Cell* 26: 2742-2754. (査読あり)
10. *Fukagawa, T. (2015). Cell Division: A New Role for the Kinetochore in Central Spindle Assembly. *Curr Biol.* 25: R554-557. (査読あり)
11. Ohta, S., Wood, L., Toramoto, I., Yagyū, K., Fukagawa, T., *Earnshaw, W.C. (2015). CENP-32 is required to maintain centrosomal dominance in bipolar spindle assembly. *Mol Biol Cell* 26:1225-1237 (査読あり)
12. Arimura, Y., Shirayama, K., Horikoshi, N., Fujita, R., Taguchi, H., Kagawa, W., Fukagawa, T., Almouzni, G., *Kurumizaka, H. (2014). Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3. *Sci Rep.* 4, 7115. (査読あり)
13. *Fukagawa, T., Earnshaw W.C. (2014). Neocentromeres. *Curr Biol.* 24: R946-947. (査読あり)
14. *Fukagawa, T., Earnshaw W.C. (2014). The centromere: chromatin foundation for the kinetochore machinery. *Dev Cell* 30: 496-508. (査読あり)
15. Hori T, Shang WH, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ikeo K, Molina O, Vargiu G, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw WC, *Fukagawa T. (2014). Histone H4 Lys 20 mono-methylation of the CENP-A nucleosome is essential for kinetochore assembly. *Dev Cell* 29: 740-749. (査読あり)

《学会発表》

1. Fukagawa, T. Specific features of centromeric chromatin for kinetochore assembly. International Conference on Chromatin Regulation in Proliferation and Differentiation, Essen, Germany, 2015年09月02日～2015年09月04日 招待講演 国際
2. Fukagawa, T. Specific features of centromeric chromatin. FASEB meeting on Mitosis: Spindle assembly and function, Big Sky, Montana, USA 2015年06月21日～2015年06月26日 招待講演 国際
3. Fukagawa, T. Centromere Specification and Kinetochore Assembly. 3R symposium, Gotemba, Japan 2014年11月17日～2014年11月21日 招待講演 国内
4. Fukagawa, T. Centromere Specification and Assembly in Vertebrates. Gordon Research Conference on Centromere Biology, Boston, USA 2014年07月27日～2014年08月01日 招待講演 国際

DNA 再複製防止機構からのエスケープとゲノム再編



田中 誠司

公募研究 代表者（平成 26~27 年度）
国立遺伝学研究所 微生物遺伝研究部門

【研究目的】

生物は世代を超えて染色体を安定に維持していくことを保証する機構を備えると同時に、超長期的には、染色体改編のポテンシャルも併せ持つと考えられる。一回の細胞周期につき複製起点の活性化を一度だけに限定する巧妙な制御機構からのエスケープによる染色体改変の原動力となるような非コード領域・配列を同定、その特徴を抽出することで、ゲノムの安定維持・改編に関わるメカニズムを理解することを目指した。

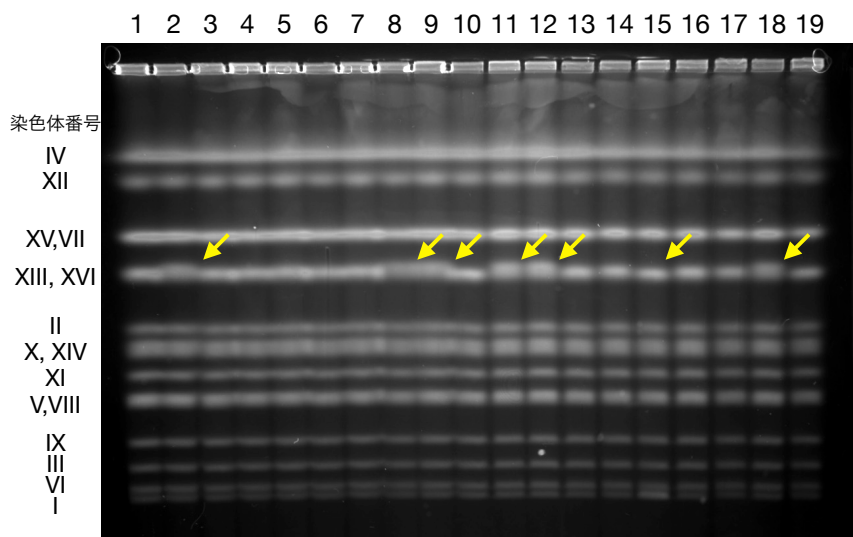
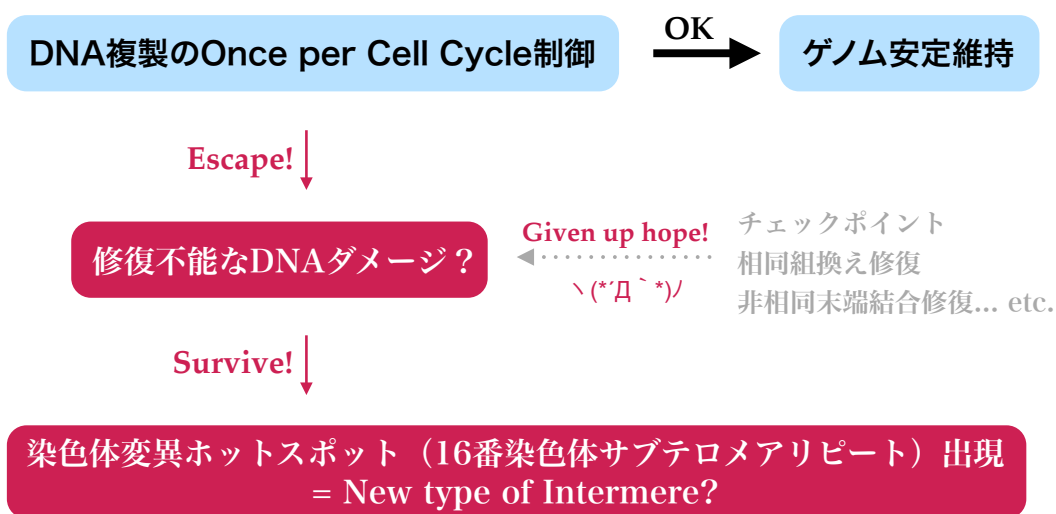
【研究成果】

真核細胞はゲノムの安定維持のために、一回の細胞周期につき複製起点の活性化を一度だけに限定する巧妙な制御機構(=Once per Cell Cycle 制御)を備え、その制御の破綻はゲノムの不安定化を誘導する。通常は複製開始が起こらない G1 期であっても Once per Cell Cycle 制御からのエスケープが超低頻度で起き、部位特異的なゲノム改編の原動力となる可能性を見出したことから、

①まず、このような環境下においてゲノムに現れる脆弱部位を同定し、その特徴を抽出することで、ゲノムの安定維持・改編に関わるメカニズムを理解することを試みた。ある程度効率良く Once per Cell Cycle 制御からのエスケープを誘導するべく、真核細胞のモデル系として、複製開始経路に変異を持つ出芽酵母細胞を用いて解析を行った。ランダムに選択した 50 個のコロニーについてその染色体構成を調べたところ、18 個のクローンにおいて第 16 番染色体右腕末端部に存在する保存されたリピート配列の数が揺らいでいることが分かった（コピー数増：16 個、減：2 個）。このリピートは他の染色体末端にも複数存在するが、染色体の構造変化が見られたのは、該当部位のコピー数の変化のみであったため、この部位を特異的に選択、あるいは他の部位の組換えを抑制する機構が存在することが示唆された。そこで、

②部位特異的なゲノム改編の原動力となる分子メカニズムについての知見を得るべく、DNA2 本鎖切断が起きた時に機能し、ゲノムの恒常性維持に働いていることが知られている、相同組換え因子、非相同末端結合因子、DNA ダメージチェックポイント経路の

因子の変異体を用いて、Once per Cell Cycle 制御からのエスケープによる DNA 複製を誘導した。結果、これらの因子の変異の有無は、細胞生存率にほとんど影響を示さなかった。このことは Once per Cell Cycle 制御からのエスケープで誘導される過剰複製による DNA ダメージについて、これまで知られている DNA 修復系は無力であるという驚くべき結果である。



【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Okimoto H, Tanaka S, Araki H, Ohashi E, Tsurimoto T*. (2016). Conserved interaction of Ctf18-RFC with DNA polymerase ϵ is critical for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 21 (5): 482-491. (査読あり)
2. *Tanaka S, Miyazawa-Onami M, Iida T, Araki H. (2015). iAID: an improved auxin - inducible degron system for the construction of a 'tight' conditional mutant in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 32 (8), 567-581. (査読あり)
3. *Araki H, Makino N, Yagura M, Tanaka Y, Hizume K, Tanaka S. (2013). Molecular mechanism of initiation of chromosomal DNA replication in eukaryotic cells. *Genes Genet Syst.* 88 (6), 334. (査読あり)
4. *Tanaka S, Komeda Y, Umemori T, Kubota Y, Takisawa H, Araki H. (2013). Efficient initiation of DNA replication in eukaryotes requires Dpb11/TopBP1—GINS interaction. *Mol Cell Biol.* 33(13), 2614-2622. (査読あり)
5. Tanaka S, *Araki H. (2013). Helicase Activation and Establishment of Replication Forks at Chromosomal Origins of Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5 (12), a010371. (査読あり)

《学会発表》

1. 田中誠司. 複製開始反応における律速因子の高発現によるサイレンス化拮抗作用. BMB2015 2015/12/1-4. 神戸市 (一般口頭&ポスター、国内)
2. Tanaka S. Dissection of the initiation reaction of DNA replication in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory meeting: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance 2015. 2015/9/1-5. Cold Spring Harbor, NY (USA) (ポスター、国際)
3. Tanaka S. Dissection of the initiation reaction of DNA replication by systematic chromatin immunoprecipitation. EMBO Conference, DNA replication, chromosome segregation and cell division. 2015/7/27-31. London, UK. (ポスター、国際)
4. 田中誠司. ここまで来た! 酵母のタイトな変異体作製法. 第187回酵母細胞研究会例会. 2014.12.12. 東京都文京区 (招待、国内)
5. 田中誠司. 網羅的なChIPによるDNA複製開始反応の詳細な解析. 第37回日本分子生物学会年会 WS 2014/11/25-27. 横浜市 (招待、国内)
6. Tanaka S. Dissection of the initiation reaction of DNA replication by systematic chromatin immunoprecipitation. The 9th 3R symposium. 2014/11/17-21. 静岡県御殿場市 (一般口頭 &ポスター、国際)
7. 田中誠司. DNA複製開始因子によるクロマチン構造変換制御. 大阪大学蛋白質研究所セミナー: 「染色体伝承の分子背景: 複製から染色体分離まで」. 2014/9/25. 大阪府吹田市 (招待、国内)
8. Tanaka S. Dissection of the initiation reaction of DNA replication by systematic chromatin immunoprecipitation. FASEB SRC Yeast Chromosome Structure, Replication and Segregation. Steamboat Springs, 2014/7/13~18. CO, USA. (ポスター、国際)

《図書》

1. Tanaka S, *Araki H. (2015). Chapter 13. Role of CDK in Replication Initiation. Springer international. pp263-278. Ed. Kaplan DL. ISBN 978-3-319-24696-3. 563 pp.
2. Tanaka S, *Araki H. (2013). Chapter 6. Helicase Activation and Establishment of Replication

Forks at Chromosomal Origins of Replication. Cold Spring Harbor perspectives in biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp81-94. Ed. Bell S, Mechali M, Dephamphilis M. ISBN 978-1-936113-48-4. 576pp.

《アウトリーチ活動、社会貢献》

1. 科学研究費委員会 専門委員
2. 公益財団法人山田科学振興財団 研究助成レフェリー

《学会の主催》

1. 第23回 DNA複製・組換え修復ワークショップ世話人、国内、2015.10.19-21. 於 静岡県焼津市

イントロン構造を介した遺伝子発現特異性の制御



谷内 一郎

公募研究 代表者 (平成 26~27 年度)
国立研究開発法人 理化学研究所

【研究目的】

先行研究により、胸腺細胞の分化運命決定に重要である Cd8 遺伝子の再活性化機構にイントロン構造が必要であることを示す結果を得たことから、本研究課題では、イントロン構造がどのようにして遺伝子発現の特異性の制御に関与するかを解明することにより、これまでに知られていない階層での遺伝子発現制御機構を解明することを目的とする。

【研究目的】

胸腺内での T 細胞初期分化過程において、T 細胞抗原受容体 (TCR) の自己抗原認識による細胞内シグナルは重要な役割を果たす。CD8 分子は TCR が I 型 MHC によって提示される抗原を認識する際に補助分子として機能し、その特徴的な動的発現パターンに起因する TCR 信号の持続時間は、CD4 ヘルパー/CD8 キラー系列への細胞運命決定を制御する主要要素と認識されている。しかしながら、CD8 分子の動的な発現パターンの基盤となる分化段階特異的な Cd8 遺伝子の再活性化を制御する遺伝子発現制御機構は良く解っていない。本研究は Cd8 遺伝子に hCD2 をノックインしたレポーターアレルを用いて、まず人為的な polyA 付加シグナルを付与により Cd8 遺伝子の再活性化が障害されることを見出しことに端を発し、その後の Cd8 遺伝子座からのイントロン構造のノックイン等の結果から、Cd8 遺伝子の再活性化にはイントロン構造が必要である結果を得たことから、イントロン構造がどのようにして遺伝子発現の特異性の制御に関与するかを解明することを目的に研究を行った。

その成果として、Cd8 遺伝子座イントロン 1-2 間のスプライシングを制御するスプライシングドナー/アクセプターシグナルへの変異導入の結果から、RNA スプライシングは Cd8 遺伝子の再活性化に必須ではないことが判明した。また人為的な polyA 付加シグナルの付与による Cd8 遺伝子の再活性化の障害は、分化段階特異的な DNA 脱メチル

化の障害と相関することが判明し、イントロン構図が何らかの機序によりエピジェネティクス制御に関与する知見を得た。Cre/loxP の系により分化した CD8 細胞からイントロン構造を除去すると、CD8 の発現低下が誘導されることから、イントロン構造は Cd8 遺伝子の発現維持に必須であることが判明した。

上記の結果は hCD2 レポーターアレルを用いたものであることから、イントロン構造を欠損する変異 Cd8 遺伝子を持つマウスを作製し、解析したところ前駆細胞の段階で CD8 遺伝子が斑らな(variegated)発現低下がみられ、また成熟キラーT細胞でも Cd8 遺伝子の発現低下が観察された。

研究計画では、shRNA ライブラリーを用い、イントロン構造を介した Cd8 遺伝子発現制御に関与する分子の同定も含んでいたが、残念ながら研究期間内では、イントロン構造を認識し、エピジェネティクス制御に転換する分子の同定には至らなかった。

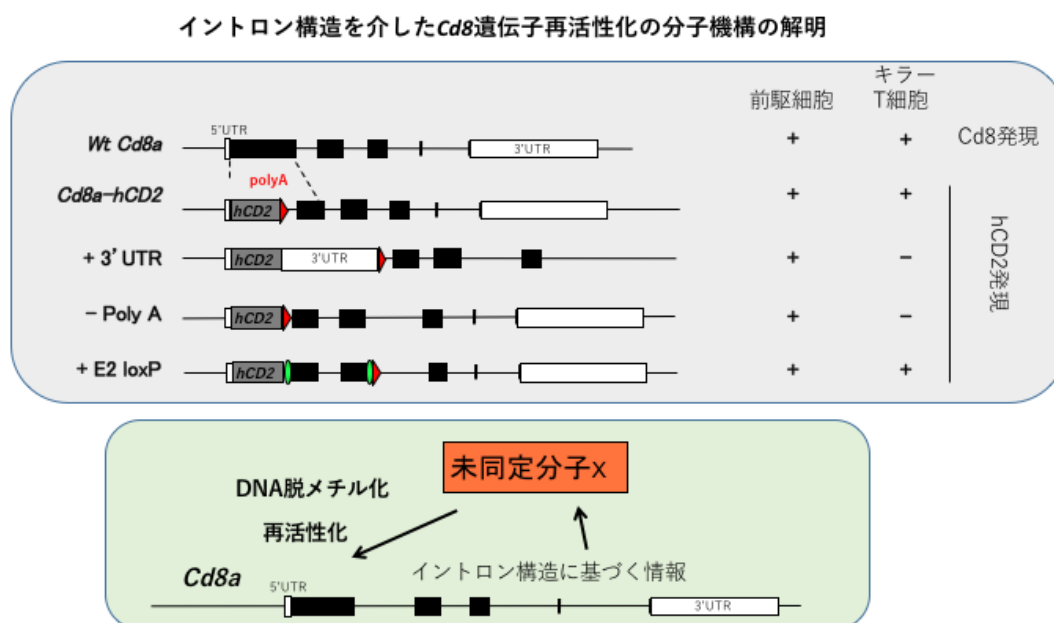


図. Cd8 遺伝子の再活性化にはイントロン構造を介した新規制御機構が関与.

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. Sakaguchi S, Hombauer M, Hassan H, Tanaka H, Naoe Y, Bilic I, mayer H, Bergthaler A, Taniuchi I, *Ellmeier W. (2015). A novel Cd8-cis regulatory element that directs expression in CD44+CD62L+CD8+ T cells and in CD8aa+ dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 97:635-44. (査読有).
2. Mishima Y, Wang C, Miyagi S, Saraya A, Hosokawa H, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Koide S, Negishi M, Sashida G, Naito T, Ishikura T, Onodera A, Nakayama T, Tenen D.G, Yamaguchi N, Koseki H, Taniuchi I, *Iwama A. (2014) Histone acetylation mediated by Brd1 is crucial for Cd8 gene activation during early thymocyte development. *Nat Commun.* 5:5872. (査読有)
3. Sakaguchi S, Hainberger D, Tizian C, Tanaka H, Okuda T, Taniuchi I,*Ellmeier W. (2015) MAZR and Runx factors synergistically repress ThPOK during CD8+ T cell lineage development. *J. Immunol.* 195:2879-87. (査読有)
4. *Taniuchi I (2016) Views on helper/cytotoxic lineage choice from a bottom-up approach. *Immunol Review* 271:98-113. (査読有)
5. Seo W, Muroi, S, Akiyama. K, *Taniuchi I. (2017) Distinct requirement of Runx complexes for TCRβ enhancer activation at distinct developmental stage. *Sci. Reports.* in press.

《学会発表》

1. 谷内 一郎 「ThPOK転写因子によるCD4ヘルパーT細胞分化制御」 第38回 分子生物学会年会 神戸 2015年12月3日 (招待、国内)
2. Taniuchi I. ” Transcriptional Regulation of T Cell Development in the Thymus”. Keystone Symposium. SnowBird, 米国. 2015年3月29日 (招待、国際)
3. Taniuchi I. ” Repression of CCL5 by Runx/Cbfb is essential to prevent lung infiltration”. RUNX2015. Rehovot, イスラエル. 2015年10月18日 (招待、国際)

《和文総説》

1. 谷内 一郎、 「転写因子によるT細胞分化制御機構」 感染・炎症・免疫 45巻、2015、18-29.
2. 谷内 一郎 「転写因子による胸腺細胞分化制御機構」 臨床免疫・アレルギー科 64巻、2015、58-64.

《アウトリーチ活動》

1. 免疫学講義、高校生、東京都立日比谷高校、2013年7月25日
2. 免疫学講義、高校生、東京都立日比谷高校、2014年7月24日
3. 免疫学会 免疫サマースクール講義 大学生/大学院生、淡路国際会議場、2015年7月22日
4. 免疫学講義、高校生、東京都立日比谷高校、2016年7月22日

全ゲノムシーケンスによる肝臓関連の新規機能性非コード領域の探索と機能解析



藤本 明洋

公募研究 代表者（平成 26~27 年度）
理化学研究所統合生命医科学研究センター
（現：京都大学医学研究科）

【研究目的】

がんゲノムの変異は、発がんのメカニズム解明のために、最も重要な研究課題の一つである。次世代シーケンサーの導入により、網羅的変異解析が可能となり、多くのがん種で変異解析が行なわれている。しかしながら、ほとんどの研究が、タンパクをコードするエクソン領域に着目した報告であり、非コード領域の変異や構造異常の包括的解析は、ほとんど報告されていない。我々は、発がんにおいて重要な非コード領域の同定を目指し肝臓がんの全ゲノムシーケンスを解析した。

【研究成果】

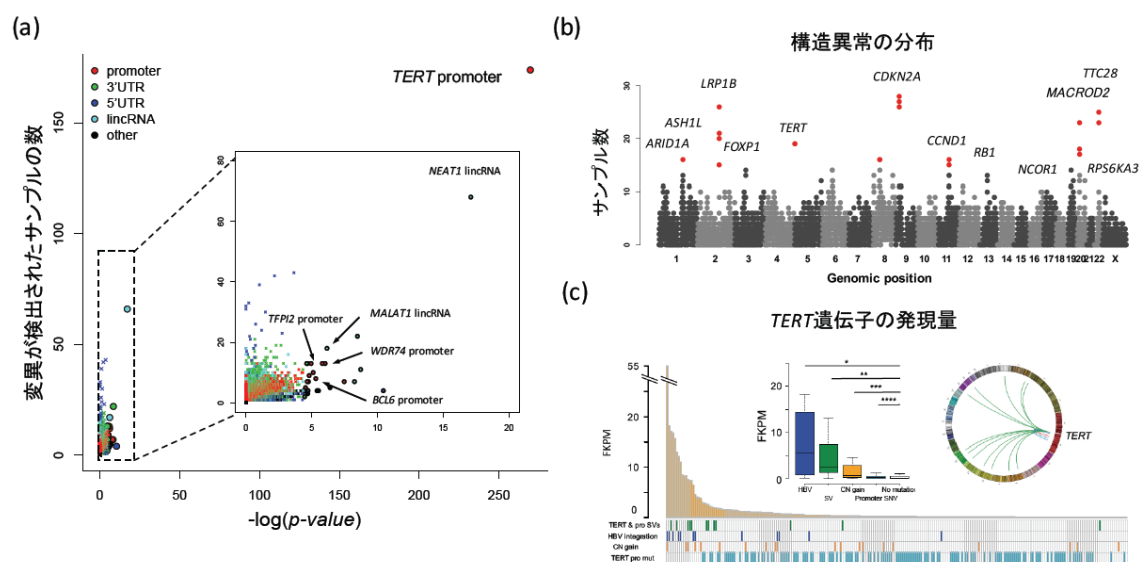
我々は、300 症例の肝臓がんの全ゲノムシーケンスを解析し、点突然変異、挿入・欠失、コピー数変異、構造異常を網羅的に解析した。点突然変異や短い挿入・欠失の数を解析し、有力なドライバー遺伝子候補として 25 遺伝子を同定した。B 型肝炎ウイルスの挿入を検出したところ、*TERT* 遺伝子のプロモーターや *MLL4* 遺伝子に複数サンプルで挿入が検出された。さらに、アデノ随伴ウイルスの *MLL4* 遺伝子や *CCNE1* 遺伝子への挿入も検出された。

非コード領域においては、ノンコーディング RNA (*NETA1*, *MALAT1*) や複数の遺伝子のプロモーター (*TERT*, *BCL6* など) に統計的に有意に多い変異が存在した。また、アノテーション情報を使わずに、変異の集積を解析した結果、CTCF 結合部位や調節部位に変異の集積が観察され、発がんにおいて重要な役割を果たすことが示唆された。

構造異常を詳細に解析したところ、構造異常の数は DNA 複製タイミングと相関し、染色体転座や増幅は複製が早く起こる領域で多く、欠失は複製が遅い領域で多かった。構造異常の集積と特定のパターンの点突然変異の集積 (kataegis と呼ばれる現象) も観察された。構造異常の切断箇所は、数塩基の繰り返しが有意に多く、構造異常の形成にマイクロホモロジー媒介末端結合が働いていることが示唆された。*CDKN2A*、

CCND1、*TERT*、*ASH1L*、*NCOR1*などの遺伝子に複数のサンプルで構造異常が存在していた。構造異常やコピー数変異を考慮したところ、新規遺伝子を含む38遺伝子がドライバー遺伝子候補と考えられた。構造異常と遺伝子発現量の相関を解析したところ、構造異常が遺伝子発現量に影響することが明らかになった。特に、*TERT*遺伝子では、プロモーター領域にHBVの挿入や構造異常が検出され、それらは*TERT*遺伝子の高い発現と相関していた。

この研究により、肝臓がんにおける、非コード領域の変異や構造異常の重要性が示唆された。



(a) 変異が蓄積していた非コード領域。変異しているサンプルの数と検定結果（補正後P値）を示す。(b) 構造異常の分布。(c) *TERT* 遺伝子の発現量と変異。HBVの挿入や構造異常が*TERT* 遺伝子の発現量と関連していた。

【研究発表】

《主な発表論文等》

1. [Fujimoto A](#), Furuta M (equal contribution), Totoki Y (equal contribution), Tsunoda T (equal contribution), Kato M (equal contribution), Shiraishi Y, Tanaka H, Taniguchi H, Kawakami Y, Ueno M, Gotoh K, Ariizumi S, Wardell CP, Hayami S, Nakamura T, Aikata, Arihiro K, Boroevich KA, Abe T, Nagano K, Maejima K, Sasaki-Oku A, Oshawa A, Shibuya T, Nakamura H, Hama N, Hosoda F, Arai Y, Shashi S, Urushidate T, Nagae G, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Ojima H, Hiraoka N, Okusakan T, Kubo M, Marubashi S, Yamada T, Hirano S, Yamamoto M, Ohdan H, Shimada K, Ishikawa O, Yamane H, Chayama K, Miyano S, Aburatani H, Shibata T*, and Nakagawa H*. (2016) Whole genome mutational landscape and characterization of non-coding and structural mutations in liver cancer. *Nat Genet.* 48: 500-509 (査読有り)
2. Alioto TS, Buchhalter I, Derdak S, Hutter B, Eldridge MD, Hovig E, Heisler LE, Beck TA, Simpson JT, Tonon J, Sertier S, Patch AS, Jäger N, Ginsbach P, Drews R, Paramasivam N, Kabbe R, Chotewutmontri S, Diessl N, Previti C, Schmidt S, Brors B, Feuerbach L, Heinold, Gröbner S, Korshunov A, Tarpey PS, Butler AP, Hinton J, Jones D, Menzies A, Raine K, Shepherd R, Stebbings L, Teague JW, Ribeca P, Giner FC, Beltran S, Raineri E, Dabad M, Heath SC, Gut M, Denroche RE, Harding NJ, Yamaguchi TN, [Fujimoto A](#), Nakagawa H, Quesada V, Valdés-Mas R, Nakken S, Vodák D, Bower L, Lynch A, Anderson CL, Waddell N, Pearson JV, Grimmond SM, Peto M, Spellman P, He M, Kandoth C, Lee S, Zhang J, Létourneau L, Ma S, Seth S, Torrents D, Xi L, Wheeler DA, López-Otín C, Campo E, Campbell PJ, Boutros PC, Puente XS, Gerhard DS, Pfister SM, McPherson JD, Hudson TJ, Schlesner M, Lichter P, Eils P, Jones DTW, and Gut IG*. (2015) A comprehensive assessment of somatic mutation detection in cancer using whole genome sequencing. *Nat Commun.* 6, Article number: 10001 (査読有り)
3. Ono A, [Fujimoto A](#), Yamamoto Y, Akamatsu S, Nobuhiko H, Imamura M, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Furuta M, Tsunoda T, Miyano S, Kubo M, Aikata H, Ochi H, Kawakami Y, Arihiro K, Ohdan H, Nakagawa H, Chayama K (2015) Circulating tumor DNA analysis for liver cancers and its usefulness as a liquid biopsy. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 1: 516-534 (査読有り)
4. Shigemizu D, Aiba T, Nakagawa H, Ozaki K, Miya F, Satake W, Toda T, Miyamoto Y, [Fujimoto A](#), Suzuki Y, Kubo M, Tsunoda T, Shimizu W, and Tanaka T (2015) Exome analyses of long QT syndrome reveal candidate pathogenic mutations in calmodulin-interacting gene. *PLoS One* 10: e0130329 (査読有り)
5. Nakagawa H*, Wardell CP, Furuta M, Taniguchi H, [Fujimoto A](#) (2015) Cancer whole-genome sequencing: present and future. *Oncogene* 34:5943-5950 (査読有り)
6. [Fujimoto A](#), Furuta M (equal contribution), Shiraishi Y, Nguyen H, Shigemizu D, Gotoh K, Kawakami Y, Nakamura T, Ueno M, Ariizumi S, Shibata T, Abe T, Boroevich KA, Nakano K, Sasaki A, Kitada R, Maejima K, Tanaka H, Shibuya T, Ojima H, Shimada K, Hayami S, Shigekawa Y, Aikata H, Arihiro K, Ohdan H, Marubashi S, Yamada T, Ishikawa O, Kubo M, Hirano S, Yamamoto M, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Tsunoda T*, and Nakagawa H* (2015) Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity. *Nat Comms.* 6, Article number: 6120 (査読有り)
7. Shiraishi Y, [Fujimoto A](#), Furuta M, Tanaka H, Chiba K, Boroevich KA, Abe T, Kawakami Y, Ueno M, Gotoh K, Ariizumi S, Shibuya T, Nakano K, Sasaki A, Maejima K, Kitada R, Hayami S, Shigekawa Y, Marubashi S, Yamada T, Kubo M, Ishikawa O, Aikata H, Arihiro K, Ohdan H, Yamamoto M, Yamaue H, Chayama K, Tsunoda T, Miyano S, and Nakagawa H* (2014) Integrated analysis of whole genome and transcriptome sequencing reveals diverse transcriptomic aberrations driven by somatic genomic changes in liver cancers. *PLoS One* 9: e114263 (査読有り)
8. Takezawa Y*, Kato K, Oota H, Caulfield T, [Fujimoto A](#), Honda S, Kamatani N, Kawamura S, Kawashima K, Kimura R, Matsumae H, Saito A, Savage PE, Seguchi N, Shimizu K, Terao S,

Yamaguchi-Kabata Y, Yasukouchi A, Yoneda M, Tokunaga K (2014) Human genetic research, race, ethnicity and the labeling of populations: recommendations based on an interdisciplinary workshop in Japan. *BMC Med Ethics* 15: 33 (査読有り)

《学会発表》

1. 藤本明洋 「全ゲノムシーケンスによる肝臓の変異の包括的解析」 東京大学 医科学研究所学 学友会セミナー 2016年3月24日 (招待、国内)
2. 藤本明洋 「ゲノム多様性データの統計解析」 統計数理研究所 共同利用 ゲノム多様性解析ワークショップ 次世代シーケンサーからの大量データの解析事例 2015年12月17日 (招待、国内)
3. 藤本明洋 「次世代シーケンサーの情報解析」 日本人類遺伝学会 エキスパートセミナー 2015年10月17日 (招待、国内)
4. 藤本明洋 「タンパク 3 次構造を考慮した、がんのドライバー遺伝子の検出」 人類遺伝学会 2015年10月16日 (口頭発表、国内)
5. 藤本明洋 「Systematic analysis of mutation distribution in three dimensional protein structures identifies cancer driver genes.」 アメリカ人類遺伝学会 2015年10月10日 (口頭発表、国際)
6. 藤本明洋 「がんゲノム変異解析とドライバー遺伝子の検出」 がんゲノムの数理と情報」 ワークショップ 2015年9月30日 (招待、国内)
7. 藤本明洋 「タンパク 3 次構造を考慮した、がんのドライバー遺伝子の検出」 遺伝学会 2015年9月26日 (口頭発表、国内)
8. 藤本明洋 「Identification of mutation and driver gene in cancer from whole genome sequencing.」 放射線影響研究所 セミナー 2015年5月15日 (招待、国内)
9. 藤本明洋 「次世代シーケンサーからの大量データの解析事例」 統計数理研究所 共同利用 ゲノム多様性解析ワークショップ 「ゲノム多様性データの統計解析」 2014年12月5日 (招待、国内)
10. 藤本明洋 「Whole genome sequence analysis of liver cancers reveals driver events and impact of chronic inflammation on mutational landscape.」 ゲノムテクノロジー第164委員会 2014年12月18日 (招待、国内)
11. 藤本明洋 「次世代シーケンスデータの解析によるマイクロサテライト変異の検出」 人類遺伝学会 2014年11月22日 (口頭発表、国内)
12. 藤本明洋 「Analysis of mutational landscape and genetic heterogeneity in liver cancer with whole genome sequencing.」 アメリカ人類遺伝学会 2014年10月20日 (口頭発表、国際)
13. 藤本明洋 「次世代シーケンスデータの解析によるマイクロサテライト変異の検出」 遺伝学会 2014年9月14日 (口頭発表、国内)
14. 藤本明洋 「Whole Genome Sequence Analysis of Liver Cancers Reveals driver events and Impact of Chronic Inflammation on Mutational Landscape」 日本癌学会 国際シンポジウム 2014年9月25日 (招待、国内)
15. 藤本明洋 「Comprehensive analysis of genetic variation by whole genome sequencing」 放射線影響研究所 セミナー 2014年4月17日 (招待、国内)

《和文総説》

1. 藤本明洋 (2015) 「全ゲノムシーケンス」 炎症と免疫 2015年7月号
2. 藤本明洋, 中川 英刀 (2014) 「肝臓のゲノム解析と発癌メカニズムの解明」 *Medical Science Digest* 2014年11月号

3. 藤本明洋 (2014) 「がんのゲノム解析」 血管医学 2014年9月号
4. 藤本明洋, 角田達彦, 中川英刀 (2014) 「肝がんの網羅的ゲノム解析」 医学のあゆみ 2014年6月7日号
5. 藤本明洋 (2014) 「全ゲノムシーケンス」医学のあゆみ 2014年5月3日号 (創刊3000号記念 キーワード解説)
6. 藤本明洋 (2014) 「毛髪の太さと関連するEDAR遺伝子多型——集団間分化と毛髪形態の進化史」 医学のあゆみ 2014年4月26日号

《受賞 (本人) 》

1. 平成 28 年 2016 年 日本人類遺伝学会 奨励賞 「全ゲノムシーケンス解析手法の開発と肝がんの全ゲノムシーケンス解析」 日本人類遺伝学会 (受賞者氏名: 藤本明洋) (受賞内定)
2. 平成 28 年 2016 年度 日本癌学会奨励賞 「全ゲノムシーケンス解析手法の開発と肝がんの全ゲノムシーケンス解析」 日本癌学会 (受賞者氏名: 藤本明洋) (受賞内定)
3. 平成 28 年 3 月 23 日 第 8 回理化学研究所・研究奨励賞 「Comprehensive analysis of whole genome mutational landscape in liver cancer」 国立研究開発法人 理化学研究所 (受賞者氏名: 藤本明洋)
4. 平成 27 年 11 月 30 日 日本遺伝学会ベストペーパー賞 「Systematic analysis of mutation distribution in three dimensional protein structures identifies cancer driver genes」 日本遺伝学会 (受賞者氏名: 藤本明洋)

III. 研究成果の発信状況

III-1. シンポジウム

<領域主催シンポジウム>

1. 領域終了シンポジウム「ゲノム研究の未来～インターメアと染色体制御～」2016年3月東京都文京区、東大中島記念ホール
2. 国内シンポジウム「インターメアによる染色体制御機構」2014年1月東京都文京区、東大山上会館
3. 国際シンポジウム「インターメアと進化」2013年8月、神奈川県葉山町、湘南国際村センター
4. 国際シンポジウム「Non-coding DNA and Chromosomal Integrity」2015年8月兵庫県淡路島夢舞台国際会議場

<領域共催・後援シンポジウム>

1. 国際シンポジウム 3R(replication, recombination and repair)、静岡県御殿場市御殿場高原ホテル 2014年11月
2. 国際分裂酵母会議 兵庫県神戸市生田神社 2015年6月
3. 第33回染色体WS・第14回核ダイナミクス研究会合同宮城県松島松島一の坊 2016年1月
4. 第23回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 静岡県焼津市 2015年10月
5. 第9回日本エピジェネティクス研究会 年会東京都千代田区学術総合センター 2015年5月
6. 第32回染色体WS・第13回核ダイナミクス研究会広島県廿日市安芸グランドH 2014年12月
7. 第31回染色体WS・第12回核ダイナミクス研究会 神奈川県足柄下郡箱根町ホテルおかだ 2013年11月
8. 第22回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 宮城県仙台市ホテルニュー水戸屋 2013年11月
9. 酵母からのエピジェネティクス研究へのメッセージ 福井県あわら市 2013年9月
10. 第30回染色体WS・第11回核ダイナミクス研究会淡路夢舞台国際会議場 兵庫県淡路市 2012年12月
11. 第29回染色体WS 宮城県仙台市ホテルニュー水戸屋 2012年1月

<領域主催講習会>

1. 「次世代シーケンサー講習会」 東京都目黒区東大駒場キャンパス 2012年8月22日～24日
2. 「人工染色体(HAC)講習会」 2012年2月27日～3月2日 千葉県木更津市かずさDNA研究所

III-2. 領域主催アウトリーチ活動

<市民公開講座等>

1. 市民公開講座「ゲノムの調べ」2015年2月8日横浜情文ホール、神奈川県横浜市
2. 高校生対象「生命科学への誘い」2012年8月より毎年夏休み開催 国立遺伝研（静岡県三島市）、東京大学（東京都文京区）

<領域ニュースレター>

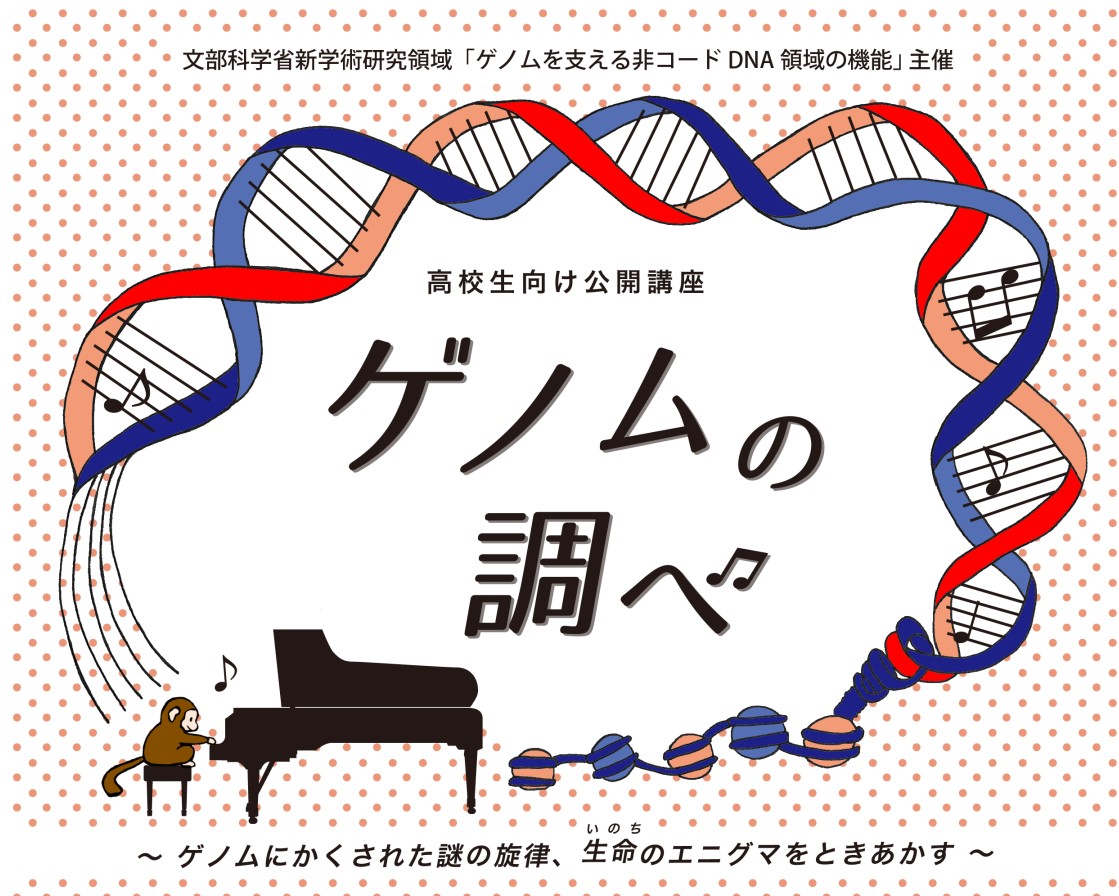
研究内容の紹介、成果報告、領会議報告、研究会の案内などをまとめたニュースレターを年2回、計9号発行した。

<領域で作成し公開しているデータベース>

1. モチーフ分布解析ソフト1 (Polymorphism)
<http://charles.biology.tohoku.ac.jp/pomber/polymorphism/>
2. モチーフ分布解析ソフト2 (Evenness)
<http://charles.biology.tohoku.ac.jp/pomber/evenness/>
3. モチーフ分布解析ソフト3 (Distribution)
<http://charles.biology.tohoku.ac.jp/pomber/distribution/>
4. Yeast rDNA stability DataBase
<http://lafula-com.info/kobayashiken/geldata/index.php>

III-3. 関連資料

<高校生向け公開講座「ゲノムの調べ」のポスター>



講演プログラム

ゲノムの調べ

進行 小林武彦 国立遺伝学研究所
ピアノ演奏 正井久夫 東京都医学総合研究所

講演①チンパンジーゲノムの不思議

古賀章彦 京都大学・霊長類研究所

講演②テロメアの神秘

加納 純子 大阪大学・蛋白質研究所

質問コーナー

入場無料

一般の方の来場も歓迎

※できるだけ事前予約をお願いします。
詳細はホームページをご覧ください。
<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~jnakayam/ncDNA.html>

日時：平成 27 年 2 月 8 日(日)
13:30～15:00(開場 13:00)

場所：横浜情報文化センター
情文ホール
(横浜市中区日本大通 11 番地)



<ニュースレターの表紙>



＜領域会議・国際シンポジウムの様子＞



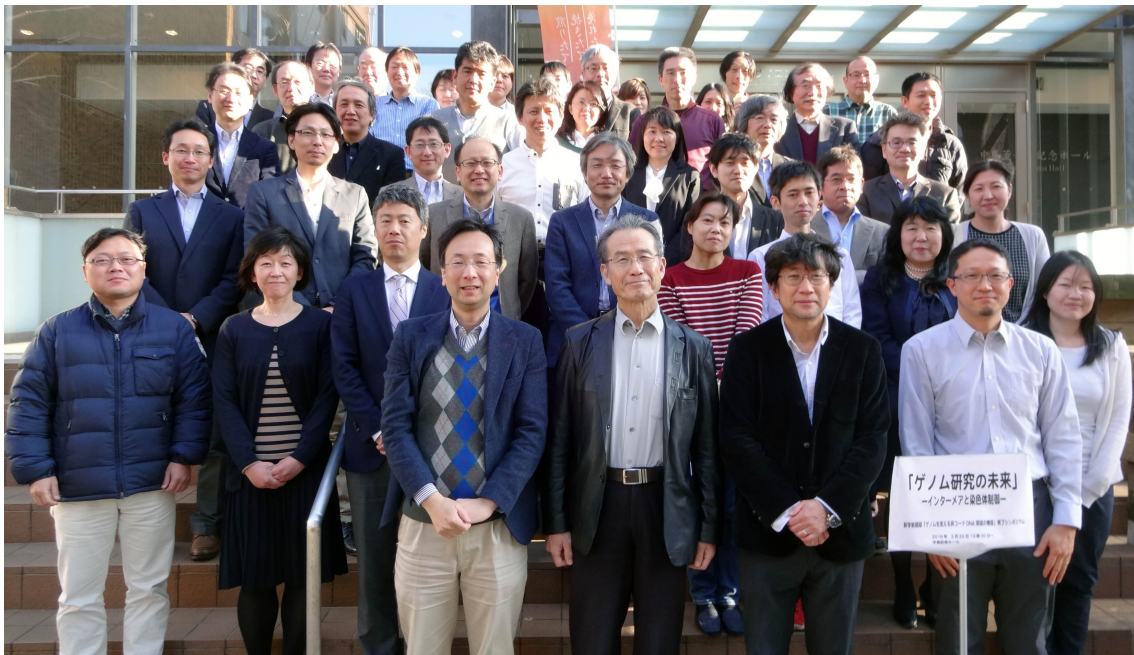
第3回領域会議（於：御殿場高原）



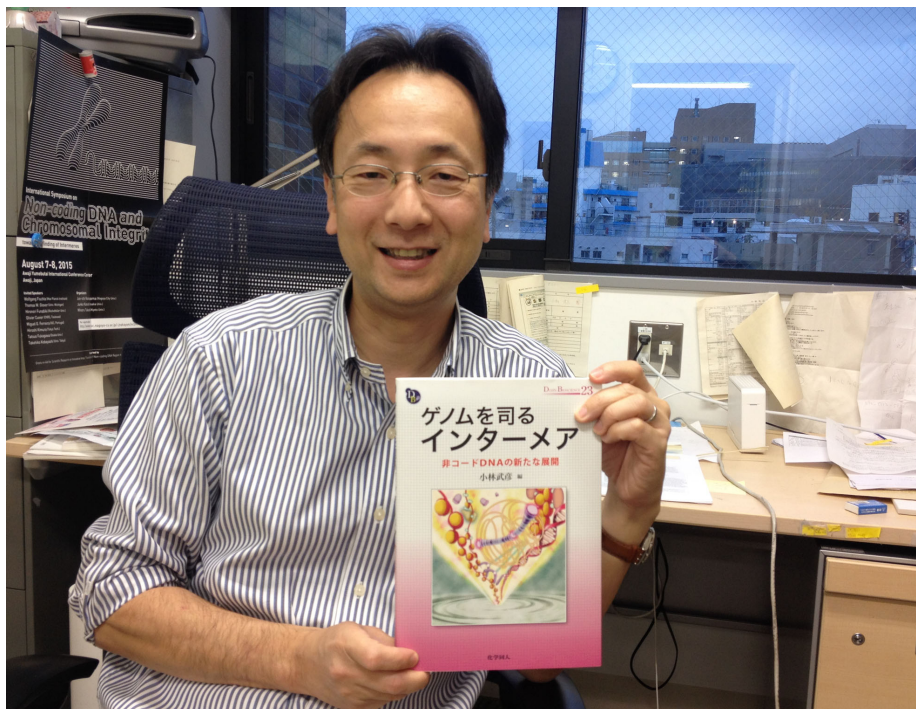
第5回領域会議・第1回国際シンポジウム（於：湘南国際村）



第9回領域会議・第2回国際シンポジウム（於：淡路夢舞台）



終了シンポジウム「ゲノム研究の未来 ～インターメアと染色体～」 (於：東京大学)



ゲノムを司るインターメア (同人化学) を手にする小林代表

IV. 評価

IV-1. 評価者による評価書

柳田充弘（沖縄科学技術大学院大学・教授）

染色体 DNA に存在する大量の非コード DNA 領域の存在意義、特に染色体維持における役割の解明に向けての多面的アプローチを主たる研究目標とし、研究の経過はおおむね順調に成果をあげている。特に代表者の小林は、最大の非コード DNA 領域である rDNA の安定性が細胞老化に与える影響を明らかにした。テロメア依存性の細胞の老化研究に、新たに「rDNA」を加えることにより生殖細胞の老化研究に新たなブレークスルーをもたらした。各班ともにそれぞれの分野で新たな知見をもたらした。班のリーダーが独自の技術基盤を持つことがこの領域の強みであり、また代表者の幅広い関心も反映されて、魅力的な領域に成長してきた。ただ、ドライ系の研究とウエット系の融合はなかなか難しいようで生みの苦しみのままに本領域が終了したのは残念でもあります。計画研究班のみならず公募研究の中にも魅力的な研究が多くあった。そのひとつ、丁らは、相同染色体対合に非コード DNA が重要な役割を果たすことを発見した (Ding et al. 2012 Science)、その作用原理に 5 つ RNA 結合タンパク質が関連することを明らかにし、さらに領域内共同研究により、関連タンパク質の染色体結合部位を詳しく解析した。領域代表者がのべているとおり、非コード RNA が染色体の認識に寄与するという新しい発見であり、DNA 切断に依存しない相同染色体認識に RNA の存在を初めて提示したことで重要な成果である。現在研究費獲得が極めて困難な時代に入っており、この領域のような研究が今後も支持されていくことは将来的に非常に大切であり、研究成果のより魅力的な提示に心がけ生存を続けて頂くことを切に望む次第である。

篠原彰（大阪大学・教授）

新学術領域研究は「非コード DNA」として古典的な染色体構造であるセントロメア、テロメアに加えて、本領域で新規に提案したインタメアの 3 メアの構造、機能、ネットワーク、そして、その破綻による病態を解析する研究領域である。当該分野で実績を上げた計画班メンバーを中心に共同研究のネットワークを作り、5 年間で「非コード DNA」に関する数多くの業績を上げて来ており、その進展は大きく評価できる。特に、次世代 DNA シークエンサを用いたゲノム解析の充実化、特に、情報学との融合を図ることで、当該領域の日本の研究力を世界レベルに引き上げた貢献は大きい。共同研究を柱に、様々な分野の研究者を幅広く取り組んだことから、ヨザルのヘテロクロマチンの研究に見られるように予想外の成果も複数上がっている。また、領域代表者のリーダーシップの

もと、領域内外での共同研究、講習会の実施による技術普及、若手研究者の育成も十分に行われていることも高く評価できる。研究成果は論文発表から見ても十分に上がっていると言える。平成26、27年の論文発表数は22-25年度と比較すると少ない印象を受けるが、近年は高インパクトジャーナルであればあるほど、分野横断的な、大量の成果を要求されるため、領域期間内に実施された共同研究を含めた個々のメンバー研究の大半が論文準備中になっているので、今後、次の2年で、さらなる業績の増加が期待できる。

荒木弘之（国立遺伝学研究所・教授）

本新学術領域では、セントロメア、テロメア以外の染色体の非コード領域に潜む機能配列をインターメアと名付け、その全容を明らかにしようとした。期間前半での精力的なゲノム配列の決定にともなう大量データ解析を、新たな解析手法の導入と公募による解析を得意とする新規メンバーの獲得により可能にしたことは評価される。また、ややもすると通常の機能解析との違いが領域外の人からよく理解されない点を、インターメアに関する書籍を上梓することにより対応しようとするエネルギーには感心する。ただ、まだまだ「インターメア」という用語は一般的ではなく、今後も領域に関与した人たちの努力を期待する。現在、出版あるいは出版しようとしている論文の数も多く、この領域の一般からの評価はこれらの報告が出された後にされることとなるのであろう。

成果からは領域構成員の努力や大きなエネルギーを感じ、高く評価できるものである。しかし、報告書に個々の機能部位やその解析の記述から、インターメアという言葉で括ったとき、何が言えているのであろうか。すぐそこに解があるのかどうかはよくわからないが、このような領域の研究が今後も必要であることは確かである。

柴田武彦（元理化学研究所・主任研究員）

非コード領域研究5年間の報告を通して読んで、この領域研究によって参加メンバーの研究が質量ともに大いに進んだというのが最初の印象でした。本領域が始まった時から、「インターメア」が本当にその中身を持つことができるか気にかかっていました。その定義を “Functional non-coding elements that lie between the centromere and telomere, which we termed “intermeres”.” という形で論文（Fawcett et al. 2014 PLoS One）に載せ発表できたことで、まず、一步を固めたといえるでしょう。「染色体維持機構の破綻が細胞機能に及ぼす影響」課題で、非コード領域の存在が、巨大遺伝子や、rDNA リピートの安定性に働き、更に、老化に影響するという新境地を拓いたこと

は、インターメアという概念の有用性を示したと高く評価できます。更に報告からは、研究目的に沿って編成された研究チームのそれぞれが重要な成果を上げている様子が読み取れます。「非コード機能性配列の解析」では、インターメアの存在を示した上記の論文の他、四重鎖構造を誘導する配列の関わる発見や cis に働く配列の機能が注目されます。「非コード機能性配列のクロマチン構造の解析」の成果ではヘテロクロマチンの構造変化に関わるいくつもの成果が目立ちます。「染色体維持に働く 3 メアネットワークの解析」では、インターメア、セントロメア、テロメア (3 メア) を互いに連携させている因子群の働きを明らかにしたことが評価できると思います。新しい区分の因子リエゾニンの発見もこの一つでしょう。この領域の成果には公募研究の寄与も大きく、「領域内共同研究により」と明記された成果が目立ち全体の取りまとめや領域内連携もうまく機能したといえます。評者の好みかも知れませんが、以上述べましたように、領域研究を行ったことによる効果が明確に現れていると思いました。DNA 配列からインターメアの存在を予測する技術の更なる進歩に加えて、インターメアで括る概念の有用性の深化が更に望まれ、今後、本領域で出た芽を育てる仕掛けの樹立が望まれます。

平野達也 (理化学研究所・主任研究員)

本領域の目的は、ゲノムの大半を占める非コード DNA 領域に焦点をあて、その染色体制御における新たな機能を明らかにしようとする野心的なものであった。その目的の達成にむけて、情報学・進化学・遺伝学・生化学・細胞生物学といった多彩なバックグラウンドをもつ研究者が集められ、これまでにない研究グループが構築されたといっただろう。4つのチームからなる組織体制は元々よく練られたものであった。しかし、中間評価における指摘(例えば、情報解析に携わる研究者の不足等)を真摯に受け止め、後期公募研究として足りない人員を確保するなど、組織運営についてのきめ細かい工夫が施された。その結果、個別研究の総集を超えた優れた成果が生み出されるとともに、領域発足時には予想していなかった新たな方向性をもつ研究の萌芽が芽吹きつつある。これらの共同研究には、大型機器の運用を始めとする技術的な交流にとどまらず、新概念の構築に結びつくような成果も含まれており、こうした努力が決して形だけのものではなかったことを意味している。

発表された研究成果については国際的に評価の高いものが多数あることを指摘しておきたい。しかし一方で、インターメアという新概念を高らしめるような代表的な成果をひとつふたつ発信することができればさらに良かったにちがいない。例えば、大型共同研究としての分裂酵母野生株 (計 32 株) のゲノム解析は、新たな非コード DNA 配

列を抽出するという意味において、本領域のひとつの目玉であった。最低限の解析を終了して論文発表に繋げたことは素晴らしいが、領域をあげての大規模な機能解析に展開するには時間が足りなかったことは残念であった。いうまでもなく、ここで得られた配列情報は、本領域に参加した研究者にとどまらず、広く国際コミュニティーに対して貴重なリソースを提供するものである。今後とも徹底したデータマイニングと機能解析の努力を継続していただきたい。

新学術領域の大きなミッションのひとつは、若手研究者の育成にある。この点について本領域は大きな成果を挙げたと結論したい。伸び盛りの若手 PI にチャンスを与えてその後の昇進の後押しをしたばかりでなく、時代を背負う大学院生・ポスドクの活躍の場を提供したことがうかがえる。高く評価したい。研究成果の発信とアウトリーチ活動についても、積極的な姿勢がうかがえた。

IV-2. 中間および事後評価

IV-2-1. 中間評価

A (研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの進展が認められる)

<総合所見>

本研究領域は、異なる分野の研究者の連携研究により、染色体を制御・維持する機能を担う真核生物ゲノムの大半を占めるタンパク質をコードしていない非コードDNA領域を詳細に解析することで、非コードDNA領域の未知なる機能の解明に取り組むものである。研究領域を構成する各研究組織が、ゲノミクス、構造生物学、生物化学、遺伝学、細胞生物学の手法を、領域内の共同研究によって自在に取り入れることができる体制が整っており、各計画研究も順調に進捗している。リエゾニンの発見など、本研究領域の目的に合致した興味深い研究成果が得られつつあり、全体として期待どおりの進展が認められる。今後、本研究領域が提唱する「インターメア」に関する新規発見や新しい概念の抽出を期待したい。

<評価の着目点ごとの所見>

(1) 研究の進展状況

「異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進」という点については、期待されたとおり生物情報学的視点からの共同研究が数多く進められている。総括班主

催の技術講習会や次世代シーケンサーの共同利用に関しても、領域代表者のリーダーシップにより効率的な運用が図られている。

また、「多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進」状況については、計画研究だけでなく公募研究も組み込む形で多くの共同研究が進められており、研究領域の新たな展開が実感できる。次世代シーケンサーから算出される膨大なデータから重要な情報を抽出する画期的なアイデアや4つの研究階層を統合した新たなパラダイムの構築など、新学術領域として期待される研究成果が得られることを望む。今後は、領域研究における重要性が高い生物情報学を強化することが必要である。

(2) 研究成果

リエゾニンの発見など、本研究領域の目的に合致した興味深い研究成果が得られつつあり、また、人工染色体などの共有ツールの活用も期待できる。研究者間の情報交換・意見交換も活発で、共同研究も数多く進行しており、今後、共同研究成果の論文化が望まれる。

(3) 研究組織

領域代表者のリーダーシップのもと、領域内共同研究や情報交換が順調に行われている点は高く評価できる。また、非常に魅力的なニュースレターを作り、領域内外に向けた情報発信を充実させている点も評価できる。

一方、公募研究をうまく組み込む形で極めて効率的な連携研究体制が実現しているが、異分野融合の観点からは学際性をより高くする工夫が望まれる。

(4) 研究費の使用

特に問題点はなかった。

(5) 今後の研究領域の推進方策

生物情報学の重要性が大きいことから、その点を公募研究により強化するとともに、学際性をより高くする工夫が望まれる。本研究領域が提唱する「インターメア」の定義をより明確にすること、また、インターメアに関する新規発見や新しい概念の抽出が今後の重要な課題と考えられる。

(6) 各計画研究の継続に係る審査の必要性・経費の適切性

いずれの計画研究も順調に進行しており、継続に係る審査の必要はない。

IV-2-2. 事後評価

A (研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの成果があった)

本研究領域は、染色体維持に中心的な機能を持つ非コード反復配列の機能解明を目指してインターメア概念を提唱し、セントロメア、テロメア、インターメアの3メア間のネットワークによる染色体制御の実態解明と、その破綻による疾患の関わり解明を目指し、特に、従来明らかでなかった非コードDNA領域の機能や重要性を、塩基配列のみならず構造、特定領域間の相互関係、病態との関わりまでをも研究対象として、多数の成果を得たことは高く評価できる。

一方、中間評価において指摘された、インフォマティクス専門研究者の導入による学際性の向上に関しては、公募研究での拡充、解析ツールの開発などの取組が行われていたが、本研究領域での成果として説明が不十分であり、更なる工夫が望まれた。次世代シーケンサー等の機器の共同利用を目的としたテクノロジーハブは機能を発揮し、また、計画研究と公募研究の共同研究は活発に行われ、多数の研究成果を生み出した点は、本研究領域における連携による成果と評価できる。さらに、本研究領域に参画した若手研究者がキャリアアップを果たしており、若手研究者の育成に貢献していることも評価できる。

今後、本研究領域の成果を踏まえ、セントロメア、テロメア、インターメアの3メア間のネットワークの実態の更なる実証に向けた研究や、インターメア概念の導入による新たな視点からの染色体維持の機構解明の進展により、本研究領域のより一層の発展が図られることが期待される。

【所見の補足説明（今後の運営の参考）】

本研究領域により、「非コードDNA領域」の機能解析、選択的転写調節機構に新たな展開を与えることや、インターメアの発見にとどまらず、セントロメアやテロメアの特異性、特異性を導き出すことが期待されたが、これらの点について引き続き取り組まれることで、今後の発展が期待されるとの意見があった。