

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18101007

研究課題名(和文) ゲノム学的手法による染色体構築原理の解明

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

研究代表者 白髭 克彦 (SHIRAHIGE KATSUHIKO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：90273854

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：染色体構造、ChIP-chip、ChIP-seq、コヒーシ

1. 研究計画の概要

本申請では、染色体の各機能領域（姉妹染色分体間接着部位、複製開始点、セントロメア、ヘテロクロマチン、ユークロマチン、テロメア等）の分子構築及び、各染色体機能の分子的連携機構を理解するためのシステム構築を狙う。そのため、細胞周期の中でも特に動的な過程である複製と分配に焦点を当て、染色体の複製から分配へといたる動態をゲノム学的手法（ChIP-chip法）を用いて明らかにする。具体的には、出芽酵母および、分裂酵母の全染色体（14Mb）を対象に、S期からM期の細胞周期進行に従う、および、各種ストレスによって誘導される染色体結合蛋白の動態を解析する。蛋白の機能分化、より複雑な染色体構造の分子的基盤の解明という点で、分裂酵母を用いた解析は重要である。数十の染色体結合タンパクの動態を解析し、その上で、個々のタンパクの動態プロファイルの相関性から、染色体動態を体系的に理解するための新たな情報処理技術の開発を行う。開発したシステムを用いて、複製および分配を司る染色体上の機能領域の特異性とその連携に焦点を当て、蛋白複合体、蛋白機能、機能部位、機能的連携を予測し、実験的検証を行う。

2. 研究の進捗状況

出芽酵母および分裂酵母の約30の染色体結合タンパクの細胞周期動態をChIP-chip法により解析し、その解析データを元に、個々のタンパクの動態プロファイルを可視化するための情報パイプラインを構築した。情報パイプラインの構築にあたっては、チップ上の塩基配列より、繰り返し配列を全てマスクし、最終的な情報解析から除去する、また、

実際のデータから、ノイズの原因となる配列を明らかにし、それを計算から除去する等の処理を行い、徹底的にバックグラウンドノイズを排除した結果、S/N比を従来以上に改善したタンパク結合プロファイルを得ることを可能にした。このようにしてChIP-chipデータの可視化ソフトを出芽酵母、分裂酵母について開発した。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している

(理由)

解析データを元に、各タンパクプロファイル間の相関解析を行い、結合プロファイルの類似性から、出芽酵母、分裂酵母染色体の構築、機能的連携について以下の成果を主たるものとして得ているため。

(1) Smc5/6複合体が、DNA二重鎖切断部位へ結合すること、および、その結合がMre11、Rad53に依存すること。さらに、同じ複合体がDNA損傷の有無にかかわらず染色体に結合し、その結合密度が染色体の長さに依存すること。これら、非DNA損傷時のSmc5/6複合体の染色体への結合はセントロメアを含むコヒーシ結合部位と一致し、コヒーシローダーScp2によって結合が促進されること(Mol. Cell, 2006)。

(2) DNAトポイソメラーゼIおよびIIのプロファイル解析を行い、TopIが複製フォークの近傍で、TopIIは複製フォークおよび、S期特異的に遺伝子のプロモータ領域に局在し、両者がフォークの伸長反応を協調的に促進すること。また、top2の欠損がDNA損傷を引き起こし、チェックポイントを活性化することを発見した(Genes and Development, 2007)。

(3) DNAチップを用いた遺伝学的相互作用のスクリーニング法を新たに確立し、姉妹染色分体間接着確立因子Eco1と遺伝学的に相互作

用する因子をスクリーニングした結果、Rad61、Pds5 を同定した。Rad61 の局在解析から、このタンパクが新規コヒーシンサブユニットであることを明らかにするとともに Eco1 による接着確立分子機構の一端を明らかにした (Curr. Biol., 2009)。

(4) 姉妹染色分体間接着確立因子の相互依存性; 姉妹染色分体間接着確立因子である Ctf4、Ctf18 の両者が複製フォーク構成因子の一部として機能しており、Ctf18 の結合が Ctf4 に依存していること、また、Ctf18 が PCNA をフォークにローディングするために機能することを発見した (Mol. Cell., 2006)。

(5) G2 期の DNA 損傷により一度解除された姉妹染色分体間接着が再確立すること、および長期にわたる DNA 損傷により損傷特異的にリクルートされるヒストン H2AX の局在が損傷部位を遙かに超え、時には染色体全体のヒストン H2A と置換されることを見いだした (Science, 2007)。

(6) 分裂酵母染色体の複製開始点の構成を明らかにした (Embo J, 2008)。これらの研究成果は最終年度に向けデータベースとして解析ソフトと共に公開していく予定である。

一方、本研究開始当初より、ChIP-chip 解析技術をよりゲノム構造のより複雑な高等真核生物に生かすべく試行錯誤を行い、最終的に、ヒト、マウスを含む高等真核生物でも精度の高いタンパク局在解析を行うことを可能にした (Methods in Enzymology, 2006, Genomics, 2007)。このブレイクスルーを得たことにより、ヒト染色体構造の解析も開始し、ヒトにおけるコヒーシンの局在解析を通じて、コヒーシンタンパクの分配に於ける機能とは独立の新しい転写に於ける機能を発見した (Nature, 2008, PLoS Biology, in press)。我々はコヒーシンが二本のクロマチンを束ねる分子であることを考慮した上で、図に示すようなループの形成にコヒーシンが CTCF (図ではオレンジの球) とともに関与していると考えている。このループは発現制御単位を反映しており、染色体上にはこのようにループ状に束ねられた単位が数多く存在していると考えられる。異なるループは核内では空間的に隔てられ、相互作用が不可能であると考えれば、コヒーシンのインスレーター機能を説明できる。また、このループにより、時には数メガも離れて存在するエンハンサーを、空間的にプロモーターの近傍に配置することが可能である。

4. 今後の研究の推進方策

今後は、酵母に加えヒト染色体の動態解析を通して、染色体情報解析システムの開発を引き続き行う。酵母の場合は、最終年度に向けてシステムの公開と現在までに蓄積した数百のタンパク結合プロファイルのデータベース化に重点を置く。酵母、ヒト共に、次世代シーケンサー SoLid の導入を視野にいれ、ChIP-chip 解析と ChIP-seq 解析を併用しながら、今まで以上に網羅性、汎用性の高い解析系を構築する。

最初の3年間に達成したいいくつかの発見のうち、特にコヒーシンの転写に於ける役割 (インスレーター機能) に焦点を当て、その分子機構を明らかにすべく、コヒーシン自身の修飾の動態解析も含め実施する。

5. 代表的な研究成果 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Liu, Z. Zhang, M. Bando, T. Itoh, M. A. Deardorff, D. Clark, M. Kaur, S. Tandy, T. Kondoh, E. Rappaport, N. B. Spinner, H. Vega, L. G. Jackson, K. Shirahige, I. D. Krantz Transcriptional Dysregulation in NIPBL and Cohesin Mutant Human Cells. **PLoS Biology**, 2009 in press, 査読有

② T. Sutani, T. Kawaguchi, R. Kanno, T. Itoh, and K. Shirahige Budding Yeast Wpl1 (Rad61)-Pds5 Complex Counteracts Sister Chromatid Cohesion- Establishing Reaction. *Curr. Biol.* 19, 492-497 (2009), 査読有

③ K. S. Wendt*, K. Yoshida*, T. Itoh*, M. Bando, B. Koch, E. Schirghuber, S. Tsutsumi, G. Nagae, K. Ishihara, T. Mishiro, K. Yahata, F. Imamoto, H. Aburatani, M. Nakao, N. Imamoto, K. Maeshima, K. Shirahige+, J. M. Peters+. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. **Nature**. 451, 796-801. (2008), 査読有 (+shared corresponding authors) (*equally contributed authors)

[その他、新聞掲載] (計10件)

・2008年5月 Nature Digest 誌 Vol. 05No. 5 (p. 32-33) 「遺伝子の転写反応を区切る壁は意外なタンパク質」

・2008年2月14日 発刊 Nature 誌 vol. 451 (p 777-778) Frank Uhlmann, NEWS & VIEWS “Cohesin branches out”

・2008年2月8日 朝日新聞朝刊「遺伝子同士の干渉防ぐ「壁」東工大など発見」

・2008年2月7日 フジサンケイビジネスアイ新聞 「遺伝子「仕切る」タンパク質解明、東工大など」

・2008年2月3日 毎日新聞朝刊「ゲノムの遺伝子仕切って制御」

・2008年1月31日 産経新聞「ヒトゲノム 遺伝子制御の仕組みを解明」

・2008年1月31日 日経産業新聞「遺伝子干渉防ぐたんぱく質 東工大が発見 創薬に期待」

・2008年1月31日 日刊工業新聞「DNA 束ねるリング状たんぱく質 遺伝子区切る“壁”の役割」

・2008年5月4日 発刊 Nature 誌 vol. 441 (p 35-37) Paul Megee, NEWS & VIEWS “Chromosome guardians on duty”

・2007年7月16日 日本経済新聞朝刊 19面「DNA 修復するたんぱく質発見 東工大、がん化の謎さぐる」