

平成21年 5月29日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19710165

研究課題名（和文） S期タンパク質結合プロファイリングによるゲノム動態の解明

研究課題名（英文） The elucidation of genomic dynamics by profiling of S-phase related protein binding to the chromatin.

研究代表者

加納 豊（KANOH YUTAKA）

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員

研究者番号：90450593

研究成果の概要：ヒト細胞の全ゲノムの1%において多くの複製開始領域（例；7q31.1領域）の同定に成功した。また、複製活性の高い領域がほぼ、遺伝間に存在していることが判明した。さらに、今回、同定したいくつかの点で、DNA合成に関わる複製フォークを構成するタンパク質 RPA34 や MCM4 が結合していた。本研究成果は、すぐにでも全ゲノムでの解析が可能である。また、これらの結果は、これまで哺乳類細胞で研究することができなかった複製フォークの解析の可能性を示唆している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学

キーワード：DNA複製 複製開始点 複製フォーク マイクロアレイ ChIP-Chip

1. 研究開始当初の背景

生物はその遺伝情報の母体であるゲノム DNA を代謝（複製、分配、転写など）することにより生命活動を維持している。このゲノム DNA はクロマチンと呼ばれる様々な機能的なタンパク質と複合体を形成しており、それらのタンパク質が適材適所で DNA を反応させることにより種々の機能をはたす。そして、ヒトなどの高等真核生物では、その反応の中でも細胞周期の多くの時間を裂いて DNA の複製を行う。しかし、この長い DNA 合成期（S 期）中でも様々なタンパク質が DNA との種々の反

応を行っているため、複製は様々な DNA 代謝と競合または協調しながら進行していく。DNA 複製は他の DNA 代謝に従属的に機能すること多いが、その従属性が失われると生物にとって致命的な事象を引起す。DNA 複製プロセスはチェックポイント制御、染色体接着、組換え、修復、クロマチン修飾などと密接に関連していることが明らかになってきている。これらの事象は、DNA 複製プロセスはただ単に DNA 配列を正確に複製することだけがその目的ではなく、他の様々な染色体動態の制御と深く関連していることを示している。

2. 研究の目的

DNA 複製を中心とした染色体動態の制御機構を解明するためには、局所的に解析するだけでは、その制御機構のコンセンサスを得ることは難しい。そこで、染色体動態の中心機能を果たすタンパク質の挙動をゲノムワイドに追跡する手段を用いることで、解決ができる。その手法として、ゲノム情報が少ない酵母などでは、よく ChIP-Chip 法が用いられてきた。しかし、ゲノムの情報量が大きいヒトなどの高等真核生物でこの手法は困難であった。そこで DNA 複製を中心とした染色体動態の制御機構を解明するために、高等真核生物での ChIP-Chip 法の確立を第一の目的とした。

DNA 複製は、複製開始点より開始し、複製フォークに種々のタンパク質が集合することにより進行していく。しかし、哺乳類細胞において、その複製開始点の同定は数えるほどしか進んでいない。それは、一部の真核生物をのぞいて DNA 配列のコンセンサス（共通配列）が保存されていないからである。一方で複製開始点の同定は、DNA 複製と他の染色体代謝との関連性を解明することに必要である。そこで、DNA 複製を解析するにあたり DNA の合成や DNA 複製関連タンパク質のゲノム上での配置等を同定するために、上記の ChIP-Chip 法を用いて決定することを目指した。

3. 研究の方法

哺乳類細胞での ChIP-Chip 法を確立するあたり、がん細胞であるが同調などが容易なこと、などから HeLa S3 細胞を用いて方法論の確立を始めた。まず、染色体のどの領域から複製を開始するかどうかを決定するために、細胞を 2.5mM Thymidine により S 期に集積させた後に、リリースする。次に polymerase α の阻

害剤である 5mM Aphidicolin と Thymidine のアナログである、30 μ M

Bromo-deoxyuridine (BrdU) を添加することにより、細胞が次の細胞周期の S 期に入っただけで Aphidicolin の作用で DNA 複製が阻害される。それまでに DNA 合成がされた領域、つまり複製開始点を含む領域を、BrdU により標識した。次に細胞から DNA を精製後、超音波により DNA を切断し、BrdU が含まれる DNA をその比重差から CsCl 超遠心により分離した。さらに精製度を向上させるために BrdU 抗体により免疫沈降した。これを、*in vitro* transcription により偏り無く増幅後、biotin ラベルした。この DNA をヒトの ENCODE アレイ (1%のヒトゲノムを高密度 (35bp) にカバーするマイクロアレイ) にハイブリダイズし、解析を行った。

タンパク質の染色体上での挙動を追跡するために、上記の Aphidicolin により同調した細胞をホルマリンによりタンパク質と DNA を架橋した。超音波により細胞の溶解と染色体の剪断を行い、架橋されたタンパク質 (RPA や MCM) に対して効率よく認識することができる抗体により免疫沈降した。タンパク質が結合していた DNA を脱架橋後、精製した。精製したタンパク質を BrdU のアレイ解析により有意に検出されたサイトとその他のネガティブコントロールとしてのサイトの Primer をデザインし、定量 PCR による検定を行った。

4. 研究成果

本研究では、まず当時まだ確立されていなかった哺乳類細胞での ChIP-Chip 技術の確立を行った。これまで、申請者が報告してきた論文において、そのマテリアルは容易に細胞数が得やすい出芽酵母であった。しかし、哺乳類細胞では同様の数の細胞数を得ること

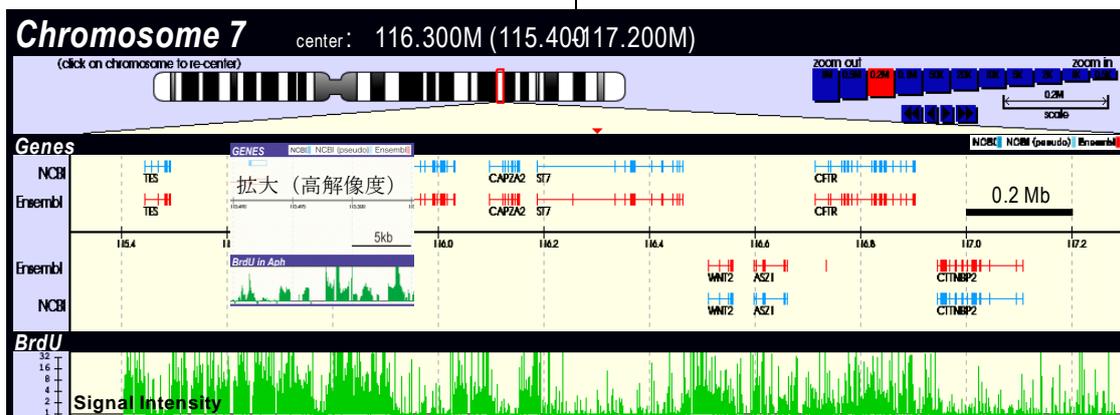


図1 ヒト7番染色体 q31.2 における複製プロファイルと遺伝子配置

BrdU が取り込まれた初期複製領域 (Aphidicolin 添加により標識領域を初期複製のみに限定) をマイクロアレイ (ENCODE アレイ) 上で検出。複製開始領域は、遺伝子間の領域に局在しており、ORF 領域での開始シグナルは弱い。横軸はゲノム上での配置、縦軸は DNA 複製により取り込まれた BrdU 量のシグナル強度を示す。

は現実的ではないため、まずその実験手法の改善から行った。2x10⁸ (酵母の約 1/5) の HeLa 細胞を 2.5mM Thymidine で S 期に同調した HeLa 細胞を BrdU (Thymidine analogue) と複製阻害剤 Aphidicolin (DNA polymerase α の阻害剤) で細胞を処理することにより、初期複製開始点を BrdU ラベルした。まず、BrdU を含まない DNA を除去するために DNA を約数 Kb に断片化し BrdU の比重が Thymidine より小さいことを生かし、CsCl 超遠心により除去した。さらに、精製度を向上させるために BrdU を含む DNA を免疫沈降により回収した。免疫沈降された DNA 量では、マイクロアレイでの解析には不十分であるので、通常増幅するがその時に生じる偏りをなくすために、*in vitro* transcription (IVT) 法を採用した。この増幅された DNA の末端をラベル後、1% のヒトゲノムを高密度 (35bp) にカバーするマイクロアレイにハイブリダイズすることにより検出を行った。その結果、多くの新規初期複製開始領域 (例; 7q31.1 領域) の検出に成功した (図 1)。その分布のほとんどが遺伝子をコードしない領域に存在していた。また、この領域の転写活性 (システム医学生物データベースより) は総じて高いことが分かり、また GCrich であった。さらに Aphidicolin 処理時に複製チェックポイント阻害剤である Caffeine により処理し同様の実験を行った。DNA 複製チェックポイントにより活性が抑制されていた後期複製開始点からの複製開始が確認された。HeLa 細胞では、代表的な後期複製開始点である β -globin 領域からの複製も確認することができた (図 2)。また、今回検出した複製領域が通常細胞周期でも初期であるかどうか、FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) 法を用いた複製タイミング決定法で確認したところ、マイクロアレイの結果同様 S 期初期に複製することが判明した。この結果はマイクロアレイの結果を支持していると考えられる。一方で、近年、同様のマイクロアレイを用いたアメリカの The ENCODE Project Consortium により、DNA 複製のプロファイルが報告されたが (*Nature*. 2007 vol. 447(7146) : 799-816)、ドメインレベルの解析のためその解像度は低かったのに対して (数百 Kb レベル)、当研究においては数 Kb 以上の解像度で解析を行ってきた (図 1)。この程度の解像度が、DNA 複製の開始点レベルで解析において、この程度の解像度が必須であると考えられる。

次に、同定された活性の強い複製開始点 (21q22.11) をモデルに Aphidicolin により停止した複製フォークを構成するであろう RPA34 や MCM4 に対して ChIP を行い、定量 PCR により確認したところ、他の領域に比べ優位に免疫沈降されていることが判明した。さらに、Caffeine 処理で HeLa 細胞においては後

期複製開始点もしくは抑制された β -globin 領域の複製開始点における BrdU の取り込みと RPA34 の結合が増加していた。これらの結果は、今まで不可能だった哺乳類細胞における DNA 複製の開始から複製フォークのまでのタンパク質の挙動を解析する基盤になることを示している。また、Caffeine 処理することにより初期複製開始点の同定のみならず後期複製起点を決定できたことは、初期複製開始点と比較することにより、DNA 複製の開始のメカニズムの解明の一助になりうる。

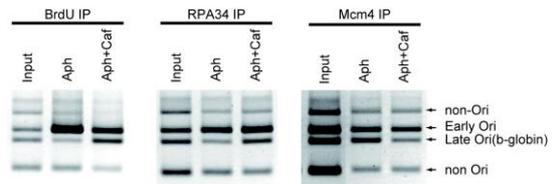


図 2 21q22.11 と後期複製開始点の β -globin の複製活性と複製フォーク関連タンパク質の結合
Aphidicolin 添加もしくは Aphidicolin+Caffeine 添加時に BrdU, RPA34, MCM4 のクロマチン免疫沈降を行い、初期複製開始領域と後期複製開始点領域もしくは非複製開始点領域を増幅する Primer を用い定量 PCR を行った。Caffeine 添加により後期複製開始点からの複製活性の上昇が見られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Jung-Min Kim, Naoko Kakusho, Masayuki Yamada, Yutaka Kanoh, Naofumi Takemoto, Hisao Masai, Cdc7 kinase mediates Claspin phosphorylation in DNA replication checkpoint, *Oncogene*, Vol. 27 p3475-3482, 2008, 査読有
- ② 加納 豊, 正井 久雄, 白髭 克彦, DNA 複製開始と進行のゲノムワイドのプロファイル解析、細胞工学, 秀潤社, Vol. 27, p1008-1012, 2008, 査読無
- ③ 吉田 圭介, 坂東 優篤, 加納 豊, 白髭 克彦, ChIP-chip 法を用いた高等真核生物の染色体構造の解析、実験医学増刊, 羊土社 Vol. 25, p178-184, 2007, 査読無

[学会発表] (計 1 件)

- ① 加納 豊, 藤井 裕子, 正井久雄, 未分化マウス胚性幹細胞における細胞周期制御機構、BMB2007、2T7-8、パシフィコ横浜ヨコハマグラウンドインターコンチネンタルホテル、2007 年 12 月

[その他]
ホームページ等
<http://www.rinshoken.or.jp/CB/index-jp.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 豊 (KANO YUTAKA)
財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号：90450593

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書