

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究（B）
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22380188
 研究課題名（和文） 発生・分化過程における哺乳類染色体の普遍的構築原理とその意義
 研究課題名（英文） General principle and importance of organization of chromosome structures during mammalian development and cell differentiation
 研究代表者
 奥村 克純（OKUMURA KATSUZUMI）
 三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
 研究者番号： 30177183

研究成果の概要（和文）：哺乳類染色体の構築における DNA メチル化の役割について研究した。マウスセントロメアヘテロクロマチン領域のメチル化阻害は、転写活性ヒストン H3.3 の蓄積後にユークロマチン様ヒストン修飾が増加し、鎖の領域の転写活性化を誘導すること、複製タイミングが S 期中期や後期から初期に移行することを見出し、DNA のメチル化がセントロメア周辺ヘテロクロマチンの適切な編成に不可欠であることを示した。また、DNA 低メチル化によって DNA 複製フォークの減速、停止を通して DNA 損傷が起こることを発見し、その複製依存的 DNA 損傷誘導機構モデルを提案した。本研究によって、DNA 低メチル化→DNA 損傷→細胞死・細胞機能異常→DNA 変異・細胞のがん化・老化という可能性を提唱する。

研究成果の概要（英文）：In mammals, DNA methylation is an important epigenetic mark that is associated with chromosome construction. Using a DNA methylation inhibitor, we found that reduced levels of DNA methylation were associated with the activation of transcription from centromere regions and a shift in replication timing of the pericentromeric regions from middle/late S to early S phase through depositing histone H3.3 on pericentromeric heterochromatin prior to the accumulation of the euchromatic histone modification, suggesting that DNA methylation is essential for proper organization of pericentromeric heterochromatin in differentiated mouse cells. We also found that DNA methyltransferase 1 knockdown or inhibition causes replication fork stalling and replication-associated DNA damages. We propose that replication stress in the course of passive DNA demethylation could be a source of spontaneous mutations and genomic instability during tumorigenesis and aging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：染色体，ゲノム，DNA 複製，複製フォーク，クロマチン，エピジェネティクス，DNA メチル化，DNA 損傷

1. 研究開始当初の背景

（1）哺乳類ゲノムは極めて長大で、各染色体

上に多数存在する ori から複製が開始するマルチレプリコン構造をとっている。DNA 複製は、各 ori を起点にゲノム上を両方向に進行し(複製フォーク)、隣り合う ori からの複製フォークすべてがつながって完結する。胚発生の初期には、染色体上のすべての ori は同調的に活性化され、全ゲノムの複製は短時間のうち完結するが、分化した体細胞では、細胞分裂周期の複製期である S 期は 6 時間から 10 時間にもおよび、ゲノム上の個々の遺伝子領域は、それぞれ S 期の決まった時間帯に複製する(複製タイミング)。しかも近接する ori は、同じ時間帯にまとまって活性化されて複製を開始する。すなわち、染色体上では数百 kb から数 Mb(数十万から数百万塩基対)の、「複製タイミングドメイン(複製ドメイン、レプリコンクラスター)」ともいうべきまとまりを形成している。

(2) 複製ドメインの形成は、ゲノム DNA のクロマチンとしての存在状態、つまり、DNA のメチル化やヒストンのメチル化、アセチル化状態というクロマチン構造のエピジェネティックな修飾制御とも密接に関係していると考えられる。

(3) 染色体ゲノムがモザイク的に構築されているという(分化した体細胞における)このような「複製タイミングドメイン」の概念は、染色体構築の基本原則であり、染色体バンド構造とマクロなレベルで一致することもあって、古くから提唱され、種々の方法で解析されてきた。複製フォークの進行過程の可視化については、1960 年代にファイバーオートラジオグラフィによる方法が開発され(Huberman ら *PNAS*; Cairns, *J Mol Biol*, 1966), DNA ファイバー上にレプリコンクラスターの存在を初めて示した。1980 年代に蛍光検出法が提案され、半年を必要としたデータ取得までの時間が 1 日に短縮、また解像度も大きく改善され、さらに、私たちを含むいくつかのグループが、技術開発・改良を加えた。すなわち、DNA 分子を引き伸ばす方法の開発(Bensimon ら *Science*, 1997), 特定のゲノムを可視化できる FISH 法との組み合わせにより、複製フォークの進行速度の定量解析を可能にした。また、複製ドメインについては、特に最近進展が著しいゲノムチップやゲノムタイリングアレイ技術により、培養細胞レベルでの「複製ドメイン」の詳細が明らかになりつつある(Karnani ら *Methods Mol Biol*, 2009)。

(4) ゲノムの複製タイミングや核内のクロマチン構造が、エピジェネティックな修飾による制御を受ける証拠も、私たちの研究を含め蓄積されている(Lande-Diner ら *Mol Cell*, 2009)。

(5) このように「複製ドメイン」に関する研究は、染色体の構築原理と次世代への遺伝情

報の継承という点で本質的に重要であるため、世界レベルで競争的に研究が進められている。しかしながら、発生初期には ori が均一に活性化されると考えられるゲノム上に複製タイミングドメインが、いつどのようなメカニズムで形成され、確立されるか、ドメイン内の ori の活性化はどのように進行するのか、このようなドメインの形成にはどのような意義があるのか、すなわち、ドメインの形成異常が次の世代の細胞にどのように影響するか、また、そもそも発生初期には ori は本当に均一に活性化され、ドメインは存在しないのか、培養細胞レベルの話であり、個体ではどのように進行するのか、個体や組織を形成できる胚性幹細胞(ES 細胞)や話題の iPS 細胞、成体由来体性幹細胞やがん幹細胞では、ドメインはどんな状態にあるのか、等々についての知見は皆無に等しい。

2. 研究の目的

(1) 哺乳類の培養細胞レベルで「複製ドメイン」を特定し、一つのドメイン内での ori の活性化やレプリコンの複製過程を明らかにする。胚発生に伴う「複製タイミングドメイン」の解析法の確立とその解析を行い、どの段階で「複製ドメイン」が形成されるかを、クロマチンのエピジェネティックな修飾変化との関連性で明らかにする。

(2) さらに、クロマチンの修飾を担うタンパクのノックダウン等により、ドメイン形成メカニズムを明らかにするとともに、損傷試薬等を用いて「複製ドメイン」形成異常のメカニズムを明らかにする。

(3) また、個体レベルの解析として、ゼブラフィッシュを用い、その解析手法にチャレンジする。

3. 研究の方法

本研究に用いた方法を以下に列挙する。

(1) 分子コーミングを用いた複製フォーク進行速度および ori 間の距離の蛍光顕微鏡イメージング可視化解析

(2) RNA/DNA-FISH 法による遺伝子発現の蛍光顕微鏡イメージング可視化解析

(3) 各種ヒストン修飾特異的モノクローナル抗体を用いた蛍光顕微鏡イメージング可視化解析

(4) 各種 siRNA をもちいた遺伝子ノックダウン法

(5) クロマチン免疫沈降(ChIP) 法による DNA 損傷マーカーである γ -H2AX 蓄積領域の濃縮、メチル化 CpG の豊富な遺伝子領域のリアルタイム PCR による定量法

(6) ChIP により回収された γ -H2AX 蓄積領域を次世代シーケンサーにより網羅的に配列を解読する ChIP-sequence 解析、およびバイオインフォーマティクス

(7) ゼブラフィッシュの胚発生過程におけるハロゲンカヌクレオシドによる複製標識と DNA ファイバーの作製、さらに蛍光顕微鏡

下でイメージング

4. 研究成果

ゲノム上の DNA 複製ドメインの構築に関し、DNA メチル化によるエピジェネティック制御について以下の際立った成果を得ることが出来た。今後は、これらの成果を踏まえて、複製ドメインの構築原理におけるエピジェネティック制御の意義について更なる研究を展開する。

(1) ヘテロクロマチンドメインのマウスセントロメア領域の DNA メチル化の役割

マウスのセントロメア領域は minor satellite repeat (MiSat), major satellite repeat (MaSat) から構成され、高度に DNA がメチル化されている。DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) を使って、メチル化を阻害した結果、MiSat と MaSat の転写が活性化され、DNA のメチル化レベルの減少がセントロメア領域のヘテロクロマチンの転写活性に関与していることがわかった。また、転写活性を持った MaSat にはアセチル化ヒストン H4、ジメチル化またはトリメチル化 H3K4 といったユークロマチン様ヒストン修飾が増加していた。時空間的な解析により、ユークロマチン様ヒストン修飾の蓄積は処理後 2 回目の S 期に生じ、MaSat の複製タイミングが S 期中期や後期から初期に移行することと一致した。さらに転写活性ヒストン H3.3 がユークロマチン様ヒストン修飾の蓄積よりも先行することを見出した。これらの結果は、DNA のメチル化は分化したマウスの細胞のセントロメア周辺ヘテロクロマチンの適切な編成に不可欠であることを示唆している(図 1)。

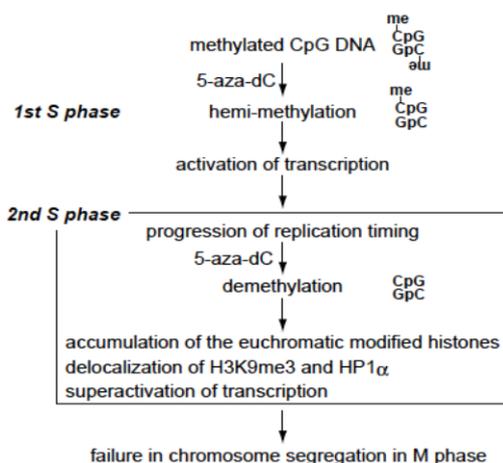


図 1. 5-aza-dC 処理によって誘導されるエピジェネティクス変化モデル

(2) DNA 低メチル化に伴う DNA 損傷誘導機構モデルの提唱

DNMT1 特異的 siRNA や DNMT 阻害剤で処理した細胞を用い、その詳細なメカニズムを解析した。DNMT1 ノックダウン細胞では γ -H2AX foci が形成され、S 期核で顕著に増加したことから、複製依存的に DNA 二本鎖切断が誘導されることが示唆された。さらに、DNMT1 ノックダウン細胞では複製フォーク進行が減速すること、複製起点からの複製フォークの進行は、DNMT1 ノックダウン細胞または 5-aza-dC 処理細胞では左右非対称となることがわかり、DNMT 阻害剤でも同様の結果が得られた。一方、UHRF1 ノックダウンにより、DNMT1 ノックダウンによる DNA 損傷レベルが有意に減少し、同時に複製フォーク進行速度も有意に回復した。以上の結果から、受動的脱メチル化後の DNA 損傷誘導は、DNA メチル化レベルの減少過程で一時的に生じるヘミメチル化 DNA に結合して解離できなくなった UHRF1 に複製フォークが衝突することが原因というモデルを提唱した(図 2)。さらに、モデルの検証として、5-aza-dC 処理後、少なくとも一度は S 期を通過させた細胞をその次の G1 期に同調し、ChIP-リアルタイム PCR 法により UHRF1 が結合している遺伝子領域を定量解析して、5-aza-dC 処理により生じたヘミメチル化 DNA 領域に UHRF1 が結合したままになるモデルを支持する結果を得た。また、ヘミメチル化 DNA の生成についてもヘアピンバイサルファイト法で確認した。

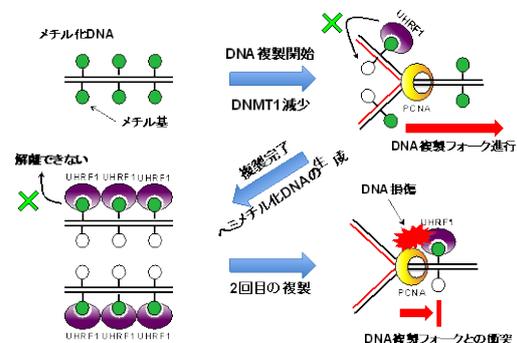


図 2. DNA 低メチル化によって生じる DNA 損傷モデル

(3) DNA メチル化レベルの低下により誘導される DNA 損傷遺伝子領域を網羅的に同定し、その領域の特徴を明らかにした。すなわち、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により DNA 損傷マーカーである γ -H2AX 蓄積領域を濃縮し、メチル化 CpG の豊富な遺伝子領域の定量をリアルタイム PCR により行い、それらの領域に DNA 損傷が誘導されていることを示した。さらに、ChIP により回収された γ -H2AX 蓄積領域を次世代シーケンサーにより網羅的に配列を解読する ChIP-sequence 解析を行った結果、損傷領域として同定された遺伝

子領域の多くに CpG island が近接していることを明らかにした(表 1)。

表 1. ChIP-Sequence 解析によって同定された DNA 損傷領域

遺伝子記号	濃縮率	機能 (関連する疾患)
DUX4	4.85	DUX4 はメチル化 CpG の豊富な D4Z4 リピート配列に含まれ、顔面肩甲上筋筋ジストロフィー (FHM) の発症の原因遺伝子と考えられている。
MCL1	3.59	白血球細胞の生存に必要であると報告されている。(骨髄性白血病)
MIR595	4	卵細胞内で染色体崩壊が見られる miRNA regions (22個) の 1 つとして同定されている。
NEAT1	10.77	パラスペクルを構成する ncRNA。NEAT1 の発現低下、パラスペクルの欠損は多能性のマーカーとなり得る。
SMAD7	4.1	SMAD7 過剰発現は T 細胞白血病/リンパ腫の TGF- β 1 依存性増殖抑制を阻害する。
ZFP36L2	3.72	ZFP36L1 と ZFP36L2 の欠損は胸腺発生異常と T 細胞性リンパ芽球性白血病を惹起する。
FN1	4.49	フィブロネクチンという細胞外マトリックスの一つで、急性骨髄性白血病由来の樹状細胞で高発現することが知られている。
CTGF	4.75	血管新生に関わり、関節リウマチ患者の線維芽細胞で高発現する。
EYA4	3.47	自然免疫に関与するリン酸化酵素の一つとして知られる。
SEMA3C	7.04	神経成長因子の方向性を決定するガイダンス因子でセマフォリンというタンパク質の一種。
ADAM9	5.39	ROS 依存的な ADAM9 の高発現は前立腺がんの生存と増殖に関連する。
FCGR2A	5.9	川崎病、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患に関連する。

(4) 複製フォークの進行を指標として胚発生に伴う複製ト・メインの形成過程を明らかにするためにゼブラフィッシュの発生系を導入し、卵から発生期にある細胞に対してハロゲン化ヌクレオシドを取込ませ、DNA フェイバー上に複製フォークを可視化することに初めて成功した。

(5) その他、分子コーミング法に用いるガラスコーティング法の改良に成功した。

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 5 件)

- ① 染色体複製と高次エピゲノム: 奥村克純, 細胞工学, 編者査読有, **31**(8), 909-916 (2012)
<https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ab6saikb&vo=31&nu=8>
- ② 核内ゲノムダイナミクスの可視化: 細胞核—構造と機能, 伊藤正男ら編, 奥村克純, 生体の科学, 編者査読有, **62**(5), 500-501(2011)
<http://ej.islib.jp/ejournal/2425101228.html>
- ③ 核マトリックスとゲノムダイナミクス: 細胞核—構造と機能, 伊藤正男ら編, 奥村克純, 生体の科学, 編者査読有, **62**(5), 400-401(2011)
<http://ej.islib.jp/ejournal/2425101185.html>
- ④ The histone chaperone facilitates chromatin transcription (FACT) protein maintains normal replication fork rates: T. Abe, K. Sugimura, Y. Hosono, Y. Takami, M. Akita, A. Yoshimura, S. Tada, T. Nakayama, H. Murofushi, K. Okumura, S. Takeda, M. Horikoshi, M. Seki, T. Enomoto. *J. Biol.*

Chem., 査読有, **286**(35): 30504-30512 doi: 10.1074/jbc.M111.264721

- ⑤ Cell cycle-dependent accumulation of histone H3.3 and euchromatic histone modifications in pericentromeric heterochromatin in response to a decrease in DNA methylation levels: K. Sugimura, Y. Fukushima, M. Ishida, S. Ito, M. Nakamura, Y. Mori, K. Okumura. *Exp. Cell Res.*, 査読有, **316**(17): 2731-2746 (2010) doi: 10.1016/j.yexcr.2010.06.016

[学会発表] (計 22 件)

- ① DNA メチル化レベル低下により DNA 損傷が誘導されるゲノム領域の同定: 吉村健, 奥村克純. 日本分子生物学会第 35 回年会 (2012. 12. 11-14) 福岡国際会議場 福岡市
- ② Identification of Damaged DNA Regions Induced by Decreased DNA Methylation Levels ~DNA Methylation Defects might Induce Lifestyle Diseases or Genetic Diseases~: T. Yoshimura and K. Okumura, The Fourth International Workshop on Regional Innovation Studies (IWRIS2012), Proceedings, pp.20-22. Tsu, Japan (2012.10.11-12)
- ③ UHRF1 は受動的 DNA 脱メチル化後の DNA 損傷誘導に関与する: 杉村和人, 杉浦健太, 来馬啓介, 緒方正人, 奥村克純. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年會 (2012.5.14-15) 東京一ツ橋学術総合センター 東京都
- ④ UHRF1 is involved in DNA damage induction after passive DNA demethylation: K. Sugimura, K. Sugiura, H. Nakabayashi, K. Kuruma, M. Ogata, K. Okumura. The 63rd Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology (2011.6.27-29) Sapporo
- ⑤ 受動的 DNA 脱メチル化後の DNA 損傷誘導には UHRF1 が関与する: 杉村和人, 杉浦健太, 中林裕貴, 来馬啓介, 緒方正人, 奥村克純. 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年會 (2011.5.19-20) 熊本市
- ⑥ DNA メチル化阻害による転写抑制型クロマチンから転写活性型クロマチンへの転化: 杉村和人, 緒方正人, 奥村克純. 日本農芸化学会 2011 年度大会シンポジウム「遺伝子動態解析技術の進歩と発現制御」企画及び講演 (2011.3.25-28) 京都市 (震災のため開催中止, 要旨集発行)
- ⑦ DNMT1 ノックダウンによる DNA 損傷誘導には UHRF1 が関与する: 杉村和人, 杉浦健太, 中林裕貴, 栗谷健志, 緒方正人, 奥村克純. 第 33 回日本分子生物学会年會・第 83 回日本生化学会大会合

同大会 (2010.12.7-10) 神戸市
他, 15 件。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 克純 (OKUMURA KATSUZUMI)
三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
研究者番号：30177183

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

杉村 和人 (SUGIMURA KAZUTO)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90452226