

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651185

研究課題名(和文)ゲノムにおける高頻度組換え部位の形成基盤：新視点からの解析

研究課題名(英文) A novel study to identify DNA determinants that generate the meiotic recombination hotspots

研究代表者

大山 隆(Ohyama, Takashi)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：60268513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、減数分裂期組換え現象においてDNA切断が高頻度に起きる部位(以下DSBホットスポット)が出現する分子的背景を解明することを目的とした。出芽酵母、分裂酵母、マウスの各ゲノムDNAを対象として、DSBホットスポットのDNA物性と高次構造の特徴について解析した。その結果、酵母の場合は、DSBホットスポットが周辺領域に比べて明らかに硬い特性をもち、マウスの場合は、逆に明らかに柔軟な特性をもちていることが明らかになった。さらに、3種の生物全てにおいて、DSBホットスポットの二本鎖DNA崩壊エネルギーが周辺領域のそれに比べて特徴的に高いことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We explored characteristics of the physical properties and conformations of DSB (double-strand break) hotspots on the genomes of yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*) and mouse (*Mus musculus*). When averaged, DSB hotspots of each organism clearly showed a distinctive mechanical property compared to the surrounding regions. However, very interestingly, the properties themselves were opposite between the yeasts and mouse: i.e., DSB hotspots are very rigid in the former while very flexible in the latter. Another physical property to be noted was that DSB hotspots of all the three organisms show distinctively high duplex disruption energy compared to the surrounding regions.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：減数分裂期組換え 高頻度組換え部位 DSBホットスポット 相同組換え 出芽酵母ゲノム 分裂酵母ゲノム マウスゲノム 二本鎖DNA崩壊エネルギー

## 1. 研究開始当初の背景

減数分裂期組換えにおいては高頻度組換え部位が形成されるが、そのような部位に共通する塩基配列は出芽酵母においては見出されていなかった。また、ヒトにおいて 5'-CCNCCNTNNCCNC-3' が高頻度組換え部位の40%程度に見られるモチーフとして報告されていたが (Myers *et al.*: *Nature Genet.* 40, 1124-1129, 2008) あまりにも縮重した配列のため、この配列をもとにゲノム上の高頻度組換え部位を同定することは不可能であった。

一方において、今世紀に入り、DNAの高次構造や物理的特性にも遺伝情報が“隠されている”ことが明らかになり始めていた。以下、このような形で核酸に記されている情報を『高次遺伝情報』と呼ぶことにする。研究開始当初、高次遺伝情報が、クロマチンの構築や遺伝子発現制御など、様々な現象に関与していることが明らかになり始めていた。我々は以前、ヒトのpol II遺伝子 (RNAポリメラーゼIIが転写する) のプロモーター約2,000種を解析し、半数以上のプロモーターに明確なコア配列 (TATAボックス、イニシエーター配列、下流プロモーター配列など) が含まれていないこと、これらの“コアレス (core-less) プロモーター”には、他の領域には見られない、機械的特性 (硬さ・柔らかさの特性) の特異な特徴をもつ小領域が存在すること、TATAボックスやイニシエーターをもつプロモーターの場合、両配列自身がこの特徴をもっていること、コア配列との塩基配列上の相同性を排除した上で、この特性を任意のDNAに付与すると、それらがプロモーターとして機能することなどを見出していた。つまり、DNAの物理的性質が転写機構に関与していることを解明していた (Fukue *et al.*: *Nucl. Acids Res.* 32, 5834-5840, 2004; Fukue *et al.*: *Nucl. Acids Res.* 33, 3821-3827, 2005)。

その後、我々は、ゲノムDNAの機械的特性を最大3bpの分解能で解析できるコンピュータプログラムGEN07を開発した。そこで、これを用いて、出芽酵母第3染色体上に知られている76箇所のDSBホットスポット (DSB: double-strand break; 組換えの開始反応である二本鎖切断が高頻度に起こる部位) (Baudat *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5213-5218, 1997) のうち約10箇所を選択して機械的特性

の解析を行ったところ、これらが特徴的な特性を示すことが明らかになった。

## 2. 研究の目的

出芽酵母、分裂酵母およびマウスの全ゲノムを主な解析対象として、DSBホットスポットの物理的特性を徹底的に調べるとともに、高次構造、クロマチンの特徴などについても解析し、クロマチン内の特定の領域に組換え部位が形成される分子的背景を明らかにする。

## 3. 研究の方法

出芽酵母、分裂酵母およびマウスの各ゲノムに関して、ゲノムワイドの物性マップ [ 機械的特性、二本鎖 DNA の崩壊エネルギー (duplex disruption energy: DDE) 、タンパク質による DNA の変形能、スタッキングエネルギーに関する各マップ ] と高次構造マップ [ ベント DNA 構造、A 型構造、Z 型構造に関する各マップ ] を作成する。次に、これらのマップと DSB ホットスポットとの関係、さらには当該領域のヌクレオソームの位相の特徴について解析する。以上の結果を総合的に解析し、DSB ホットスポットに特徴的なパラメーターを解明する。

## 4. 研究成果

(1) DNAの機械的特性 (硬さ・柔らかさの特性)

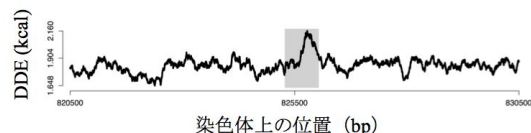
解析には、独自に開発したコンピュータプログラムGEN07を使用した。出芽酵母、分裂酵母およびマウスの全DSBホットスポット (Pan *et al.*: *Cell* 144, 719-731, 2011; Hyppa *et al.*: *PLoS Genet.* 4, e1000267, 2008; Smagulova *et al.*: *Nature* 472, 375-378, 2011) およびそれらの周辺領域の機械的特性を明らかにした。各DSBホットスポットのプロファイルを中心に揃えて重ね、全体の平均的プロファイルを求めたところ、次のような興味深い結果が得られた。出芽酵母と分裂酵母の場合は、DSBホットスポットが周辺領域に比べて明らかに硬い特性をもっていることが、一方、マウスの場合は逆に、明らかに柔軟な特性をもっていることが明らかになった。

(2) 二本鎖DNAの崩壊エネルギー

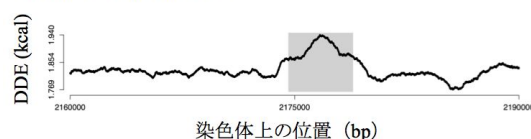
コンピュータプログラムMIUdde.ver12を作成して解析に用いた。機械的特性を解析した

際に用いた方法と同様、全てのDSBホットスポットの平均的プロファイル解析を行った。その結果、出芽酵母、分裂酵母、マウスの3種とも、DSBホットスポットが周辺領域に比べて特徴的に高いエネルギーを示すことが明らかになった。

出芽酵母 (第15染色体)



分裂酵母 (第1染色体)



マウス (第11染色体)

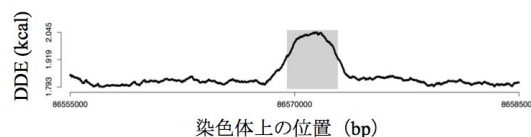


図. DSBホットスポット領域のDDEプロファイルの例

DSBホットスポットは影で示した。

### (3) タンパク質によるDNAの変形能

コンピュータプログラムMIUpid.ver12を作成して解析に用いた。(1)、(2)と同様、平均的プロファイルを取得した。出芽酵母と分裂酵母では、周辺領域に比べてDSBホットスポットは変形に抵抗性を示すが、マウスのDSBホットスポットの場合、逆に、より変形しやすいことが明らかになった。

### (4) スタッキングエネルギー

コンピュータプログラムMIUse.ver12を作成し、平均的プロファイルの解析を行った。出芽酵母と分裂酵母では、DSBホットスポットの周辺領域は相対的にスタッキングエネルギーが低い、マウスDSBホットスポットの場合、DSBホットスポット自体が相対的に低スタッキングエネルギー状態であることが明らかになった。

### (5) ベントDNA構造

コンピュータプログラムGAK12を作成して解析に用いた。現状では、出芽酵母のゲノムを対象とした定性的な解析のみが完了してい

るが、今のところ、ベントDNAの分布とDSBホットスポットの分布との間に相関は見られていない。しかし、ベントDNAの3次元構造との関係など、解析すべきパラメーターがいくつか残っており、結論を下すには尚早と言える。

### (6) A型構造

コンピュータプログラムMIUap.ver12を作成し、平均的プロファイルの解析を行った。出芽酵母と分裂酵母では、DSBホットスポットの周辺領域は相対的にA型構造をとりやすいが、マウスDSBホットスポットの場合、DSBホットスポット自体が相対的にA型構造をとりやすいことが明らかになった。

### (7) Z型構造

コンピュータプログラムMIUsez.ver12を作成し、平均的プロファイルの解析を行った。出芽酵母と分裂酵母では、DSBホットスポットの周辺領域は相対的にB型構造からZ型構造への転移エネルギーが低い、マウスDSBホットスポットの場合、DSBホットスポット自体が同エネルギーに関して相対的に低エネルギー状態であることが判明した。

### (8) 原子間力顕微鏡 (AFM) を用いたDSBホットスポットの観察

AFMを用いた観察により、DNAの高次構造に関する何らかの情報が得られる可能性がある。例えば、一本鎖への部分的解離や三重鎖構造の形成などは、一目で判断できる。その他、ベントDNA構造の有無(3次元構造までは分からない)も分かるし、場合によっては、十字架構造なども観察可能かもしれない。このような観点から、任意に選んだDSBホットスポットをいくつかPCRで増幅し、AFMで観察した。しかし、これまでのところ、特筆すべき構造は見られなかった。

以上のように、本研究により、塩基配列以外のいくつかのDNAの物性や高次構造がDSBホットスポットの形成と密接に関係していることが強く示唆された。一方、ヌクレオソームの位相等に関しては、これまでの知見以上のものは発見できなかった。

本プロジェクトを開始してから今日に至るまでの間に、いくつかのグループがDSB

ホットスポットに塩基配列モチーフを見出したという報告をしているが（例えば、Smagulova *et al.*: *Nature* 472,375-378, 2011）、それらのモチーフは縮重配列を極めて多く含むだけでなく、ゲノム上のDSBホットスポット以外の領域にも遍在している。そのため、これらのモチーフだけから、ゲノム上の高頻度組換え部位を特定することは依然としてできない。この現況を鑑みるに、本研究で得た知見は、さらなる研究を推進する礎になるものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

（1）Kimura, H., Kageyama, D., Furuya, M., Sugiyama, S., Murata, N. and Ohyama, T.  
Regions with unusually high flexibility occur frequently in human genomic DNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 612-617 (2013) 査読有. DOI: 10.1271/bbb.120850

（2）Kimura, H., Shimooka, Y., Nishikawa, J., Miura, O., Sugiyama, S., Yamada, S. and Ohyama, T.  
The genome folding mechanism in yeast. *J. Biochemistry* **154**, 137-147 (2013) 査読有. DOI: 10.1093/jb/mvt033

〔学会発表〕（計9件）

（1）2013年12月. 第36回日本分子生物学会年会（神戸）  
減数分裂期高頻度組換え部位に特徴的なDNAの物理的特性  
三浦理、大懸俊廣、大山隆

（2）2013年12月. The 2013 ASCB annual meeting (New Orleans)  
Meiotic recombination hotspots have distinctive properties of DNA  
Osamu Miura, Toshihiro Ogake and Takashi Ohyama

（3）2013年8月. 23<sup>rd</sup> Wilhelm Bernhard Workshop on the cell nucleus (Debrecen)  
DNA properties that are distinctive of meiotic recombination hotspots

Osamu Miura, Toshihiro Ogake and Takashi Ohyama

（4）2013年7月. 1st Singapore-Japan-India Joint Symposium on Protein-DNA interactions in prokaryotic nucleoid and eukaryotic chromatin (Singapore)  
Self-organizing and self-assembling properties of chromatin fiber  
Takashi Ohyama (招待講演)

（5）2012年12月. 2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (San Francisco)  
Characteristics of DNA in meiotic recombination hotspots  
Osamu Miura, Hajime Kimura, Toshihiro Ogake and Takashi Ohyama

（6）2012年12月. 第35回日本分子生物学会年会（福岡）  
特殊DNA構造とヌクレオソーム配置の関係：各種生物を用いたゲノムワイドな解析  
大懸俊廣、三浦理、木村元、大山隆

（7）2012年12月. 第35回日本分子生物学会年会（福岡）  
減数分裂期組換えホットスポットのDNA特性  
三浦理、木村元、大懸俊廣、大山隆

（8）2012年6月. 平成24年度日本生化学会関東支部例会（群馬）  
特殊DNA構造のゲノム内分布とヌクレオソーム配置  
大懸俊廣、三浦理、木村元、大山隆

（9）2011年12月. 第34回日本分子生物学会年会（横浜）  
高頻度組換え部位形成の情報基盤：DNA物性から謎を解く  
三浦理、木村元、大懸俊廣、大山隆

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕  
出願状況（計0件）

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大山 隆（Ohyama Takashi）

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：60268513

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし