

機関番号：32689

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2008～2013

課題番号：20114003

研究課題名(和文) 遺伝情報収納のダイナミクス

研究課題名(英文) Dynamics of the genome compaction in the cell nucleus

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) 97,100,000円、(間接経費) 29,130,000円

研究成果の概要(和文)：細胞核における遺伝子・DNAの収納原理を探究した。最大の成果として、出芽酵母の間期染色体の構造を決定する主要な因子がDNA物性と細胞核の大きさであることを解明した。また、同一配列DNAを有するヌクレオソーム間の集合能は、互いに異なるDNAを有するヌクレオソーム間の集合能よりも強いことを見出した。以上から、遺伝子・DNAの核内収納において、DNA物性、ヌクレオソームの選択的集合能、細胞核のサイズが決定的に重要な因子であることが明らかになった。また、メチル化されるDNA配列のほとんどは、メチル化後、高次構造または物性の変化を示すことが分かり、DNAの核内収納におけるメチル化の関与も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We explored the principle that governs the packaging of DNA in the cell nucleus. The biggest finding was as follows: in yeast, the paths of nucleosomal arrays and the chromatin architectures are determined principally by the physical properties of genomic DNA and the size of the nucleus. The second biggest finding was that DNA sequence-based selective association occurs between nucleosomes with identical DNA sequences. Thus, physical properties of DNA, DNA sequence-based selective association between nucleosomes and the nucleus size are critical determinants in the genome compaction in the nucleus. Furthermore, we also found that most of the methylation introduced into DNA induces changes in conformation or physical-properties of the methylated sites, indicating some role of DNA methylation in the genome compaction in the nucleus.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝情報の収納 細胞核 クロマチン 染色体 核内局在 遺伝子発現 DNAメチル化 細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスの発展と相俟って、遺伝子発現関連の研究の大勢がヒストン修飾・DNA修飾とクロマチン構造の関係、ならびにこれらの修飾と遺伝子発現制御の関係の解明に向かっていった(この状況は今も変わらない)。しかしながら、細胞周期の間期においてゲノム全体がどのようなクロマチン構造をとっているのか、言い換えれば、長大なゲノムDNAが細胞核内でどのように折り畳まれているかは、全く未解明であった。このような状況下、この謎を解く手がかりのひとつとして、DNAの物理的特性が注目され始めていた。

研究開始当初、我々は既に4bpの分解能でDNAの柔軟特性(硬さ・柔らかさの特性)をゲノムワイドに解析できる手法を完成させていた。そこで、この方法を用いてゲノムDNAの柔軟特性を詳細に検討し、この特性とヌクレオソームの配置やクロマチン構造との関係、さらには遺伝子発現との関係を明らかにして、遺伝情報が細胞核の中に収納される際に使われる原理を解明しようとした。

## 2. 研究の目的

遺伝情報収納のメカニズムやダイナミクスを解明する、あるいはそのための手がかりを得ることを目的として、多面的な研究を展開する。特に、真核生物ゲノムDNAの核内収納や染色体内配置を司る原理、ならびにそれに密接に関わっていると考えられる、ゲノムDNAの柔軟特性、ヌクレオソームの自己集合能、およびメチル化DNAの高次構造・物性について解析する。さらに、遺伝情報収納と遺伝子発現活性の関係についても解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) クロマチン構造モデリング

出芽酵母の間期クロマチンを対象とした。柔軟性の異なる約500bpのDNA断片を5種類用意し、DNAの柔軟性と持続長の間関係を明らかにした。次に、この関係からクロマチン内のすべてのリンカーDNAの持続長を算出した。そして、得られたデータと既に報告のあったヌクレオソームの配置データ(Segal *et al.*: *Nature* 442, 772-778, 2006; Kaplan *et al.*: *Nature* 458,362-366, 2009; Brogaard *et al.*:

*Nature* 486,496-501, 2012)から、全染色体の間期クロマチン像をモデリングした。

### (2) コンピュータプログラム

基本的に独自に開発した。

### (3) ゲノムDNAの染色体内配置・遺伝子の核内局在

FISH法を用いた解析を中心とした。

### (4) ヌクレオソームの自己集合

試験管内でオリゴヌクレオソームを再構成し、様々な条件下で凝縮させ、得られた構造を原子間力顕微鏡(AFM)で解析した。

### (5) DNAの高次構造・物性解析

基本的に非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用い、一部はAFMを用いた。

### (6) 遺伝子発現解析

各種レポーターアッセイシステムを用いた。

### (7) クロマチン解析

間接末端標識法やDNase I フットプリント法など、一般的な解析法を用いた。

### (8) 核内イオン環境の改変

マイクロインジェクション法を用いた。

### (9) 細胞培養・ES細胞の肝細胞への分化誘導

常法に従った。

## 4. 研究成果

### (1) 真核生物ゲノムの核内収納原理

本研究では、出芽酵母のゲノムDNAを解析対象として、ゲノムDNAが細胞核に収納される際の基本原理を探究した。すべてのリンカーDNAの持続長を解明し、このデータとDNAおよびヌクレオソームに関する構造データを用いて、16本ある染色体の間期構造をそれぞれ35,000回以上シミュレーションした。次いで、直径2 $\mu$ mの球(半数体細胞の核の大きさに相当)に納まる構造標品だけを選別した。次に染色体内の2点間距離に注目し、実測値(計29)と上記標品から求めた予測値を比較した。その結果、染色体上のあらゆる範囲において、予測値と実験値とがよい一致を示すことが示された。以上より、出芽酵母の間期染色体構造を決定する主要な因子は、DNAの物理的特性、ヌクレオソームの配置、細胞核の大きさであることが判明した。なお、ヌクレオソームの配置はDNAの物性で決まることも解明した(Kimura and

Ohyama, 2008)。したがって、出芽酵母の間期染色体の構造を決定する主要な因子は、DNA 物性と細胞核の大きさであると結論した (Kimura *et al.*, 2013)。

#### (2) ゲノム DNA の柔軟特性

ゲノム DNA の柔軟特性は、遺伝子の核内収納に深く関わっていると考えられる。本研究では、ヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫を対象として、各ゲノム DNA の柔軟性地図を作成した。その結果、以下の点が明らかになった。各ゲノムには異常に柔軟な領域 (SPIKE と命名) と異常に硬い領域 (rSPIKE と命名) が存在する。SPIKE も rSPIKE も、解析したすべてのゲノムに存在するが、高等な生物ほど SPIKE の出現頻度が高い傾向にある。SPIKE も rSPIKE も、主要な構成成分は、それぞれ柔軟または硬い特性を有する非反復配列である。SPIKE は、遺伝子のエキソン領域には存在しない。以上から、SPIKE と rSPIKE は、真核生物ゲノムの折り畳みにおける重要な構造因子であるという仮説を提唱した (Kimura *et al.*, 2013)。現在、SPIKE の生細胞内ダイナミクスを解析するために、*lacO/LacI-GFP* 法を用いた解析を継続実施している。

#### (3) 染色体内でのゲノム DNA の配置

ヒト 2 番ならびに 21 番染色体内 DNA の数十領域を FISH 法により可視化し、各染色体内での DNA の空間配置を解析した。FISH シグナル間の距離を測定し、 $x$  軸に 1D 距離 (塩基配列から計算される直線上の距離)、 $y$  軸に 3D 距離 (空間上の直線距離) をとってデータをプロットすると、間期と分裂期、2 番と 21 番の別なく全て直線関係が得られた。非常に興味深いことに、21 番に関する 2 本の直線の傾きはほぼ同じで、2 番では間期の直線の傾きの方が分裂期のそれより小さいという結果であった。これらの結果は染色体の折り畳みに関して様々な暗示をしている。詳細な解析を鋭意継続実施中である。

#### (4) ヌクレオソームの自己集合能

我々は、生理的濃度の  $Mg^{2+}$  が存在する系では、二本鎖 DNA が自身と同じ塩基配列をもつ他の二本鎖 DNA に選択的に会合する性質があることを世界で初めて報告した (Inoue *et al.*: *Biochemistry* 46, 164-171, 2007)。DNA の

自己集合は、ゲノム DNA の折り畳み、減数分裂時の染色体対合、体細胞における相同染色体・相同クロマチンの対合や相互作用など、様々な現象に関与している可能性がある。今回我々は、601 配列、603 配列、ならびにアフリカツメガエルの 5S rDNA 配列を用いて、同一配列 DNA を構成要素とするヌクレオソーム同士が選択的に相互作用するかどうかを調べた。まず、上記 DNA を様々な組み合わせで各種の DNA 鋳型を作製した。次にこれらの上にオクタまたはテトラヌクレオソームを再構成し、さらにこの系に各種濃度の  $Mg^{2+}$  を添加し、どのような凝縮体が形成されるかを AFM で観察した。その結果、同じ DNA 配列をもつヌクレオソーム同士がオリゴヌクレオソームのなかで優先的に会合することが明らかになった。さらに、モノヌクレオソーム間の相互作用を解析しても同様の結果が得られた。以上から、ヌクレオソームおよび DNA の自己集合は、上記の様々な現象を推進するドライビングフォースになっていることが強く示唆された (Nishikawa *et al.*, 2013)。

#### (5) メチル化による DNA の高次構造・物性の変化

DNA の高次構造や物性は、ゲノムの収納機構や様々な遺伝現象に関わっていることが知られている。本研究では、メチル化が DNA の高次構造や物性に及ぼす影響について調べた。生体内でメチル化の標的となる配列は、CG、CHG または CHH (H は A、T または C) 内のシトシン残基である。そこで、これらの配列の両鎖または片鎖にメチル基を導入し、メチル化されたシトシンが平均 10.5 bp の周期で出現するように短鎖 DNA を合成した。これらを DNA リガーゼにより連結し、末端を放射標識して解析に用いた。ここでは、両鎖にメチル基が存在する場合をホモメチル、片鎖のみに存在する場合をヘミメチルと呼ぶ。メチル基をもたない DNA を対照として用い、非変性ポリアクリルアミドゲル内での泳動挙動を解析した。その結果、CAG/CTG (ホモメチルとヘミメチル)、CAA/TTG、CTA/TAG、CTT/AAG、CAT/ATG、CAC/GTG の計 7 つのケースでは、メチル化により DNA の高次構造が変化することが明らかになった。また、変化の程度はメチル化された配列

により異なることと、CAG/CTG ではホモメチルの方がヘミメチルよりも変化が大きいことが明らかになった。CG 配列の場合、メチル化された DNA 断片は、対照断片に比べて、若干速く泳動されることが分かり、メチル化により DNA が硬くなると推察された。残りの CCG/CGG、CTC/GAG、CCA/TGG、CCT/AGG、CCC/GGG はメチル化による影響を受けないことが明らかになった (Shimooka *et al.*, 2013)。

次に、生体内で実際にメチル化されている配列の割合を調べた。解析には、ヒト ES 細胞とシロイヌナズナを対象として行われたゲノムワイドなメチローム解析のデータを用いた (Lister *et al.*: *Cell* 133, 523-536, 2008; Lister *et al.*: *Nature* 462, 315-322, 2009)。解析の結果、CHG と CHH 配列の場合、生体内でメチル化される配列の大部分は、ヒト ES 細胞でもシロイヌナズナでもメチル化によって構造が変化する配列であることが明らかになった。この結果と CG 配列のメチル化により DNA 物性が変化することを考え合わせると、DNA のメチル化による高次構造と物性の変化が生体内で積極的に利用されている可能性が強く示唆された (Shimooka *et al.*, 2013)。

#### (6) ベント DNA によるクロマチン内転写活性化機構

先行研究で負の超らせんを擬態した (NS-like) ベント DNA には転写を活性化する能力があることを明らかにしていた。出芽酵母を用いた解析で、今回まず以下の機構を明らかにした。NS-like ベント DNA は、ヒストンコアとの親和性が高く、近傍のヌクレオソーム内のヒストンを自身の側にスライドさせることができる。したがって、プロモーターの上流に NS-like ベント DNA が存在すると、プロモーター領域がヌクレオソームフリーになりやすい。その結果、プロモーター領域に転写因子が結合しやすくなり、転写が活性化する (Tanase *et al.*, 2010)。

次に、この機構にレポーターの核内局在が関与しているか否かについて検討した。解析には、我々の研究室で構築した NS-like ベント DNA、T20 を用いた。今回の解析で、一過的遺伝子発現系ではレポータープラスミドは T20 の有無にかかわらず核内 (COS-7 細胞と HeLa 細胞を使用) に一様に分布すること

が明らかになり、T20 がレポーターの核内局在を介して転写を活性化している可能性はないことが明らかになった。また、HeLa 細胞株およびマウス ES 細胞株、後者を分化させて得た肝細胞株、ならびにそれらの対照株 (T20 の代わりに直線状 DNA をもつ) を用いた安定的遺伝子発現系においても、テスト株と対照株の間でレポーター遺伝子の局在プロファイルに有意な違いは認められなかった。以上の結果から、T20 がレポーター遺伝子の核内局在に作用して転写を活性化するという可能性は否定された。すなわち、本研究により NS-like ベント DNA はヌクレオソームスライディングのみによって転写を活性化できることが明らかになった (Udagawa *et al.*, 2012)。

#### (7) 遺伝子の発現活性と核内局在

マウス ES 細胞の肝細胞への分化に伴う遺伝子の核内局在の変化について FISH 法を用いた解析を行った。対象は、未分化関連遺伝子 (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *Nanog*) と肝細胞特異的遺伝子 (*Cyp7 1*, *Pck1*, *Tat*, *Tdo2*) である。前者はいずれも分化誘導により発現が抑制され、後者は活性化する。解析の結果、肝細胞における遺伝子の核内配置は発現活性よりも遺伝子密度や GC 含量によって規定されていることが強く示唆された。したがって、今回解析対象とした特徴的な遺伝子でも、核内配置に関しては、通常の遺伝子と同様の要因に従うことが推察された (Udagawa and Ohyama, 2014)。

#### (8) 核内イオン環境の変化によるマウス ES 細胞の分化

従来、ES 細胞の分化誘導は、外部環境 (培養条件) を変化させることで行われてきた。今回我々は、細胞核の内部環境の変化が細胞分化の誘導因子になるか否かについて検討した。各種濃度のカチオン水溶液をマイクロインジェクション法によってマウス ES 細胞の核に一定量注入して経過観察し、分化の有無を調べた。その結果、通常培養下のマウス ES 細胞が偶発的に分化する割合は 2% 程度であるのに対し、特定のカチオン水溶液を注入した細胞では、溶液の濃度によっては分化が有意に促進されることが明らかになった。なかには 15% 以上の分化率を示すケースも見られた。今回の結果は、細胞核内における特

定カチオンの急激な濃度上昇が細胞分化の誘導因子になることを示している。この現象はクロマチンの局所的な凝縮・脱凝縮に関係している可能性がある。

#### (9) その他

リン酸飢餓、傷害応答性の遺伝子である S-like リボヌクレアーゼが食虫植物の捕虫・消化器官では構成的に発現していることと、少なくとも *Drosera adelae* (モウセンゴケの一種) の場合、当該器官においてその遺伝子がエピジェネティックな制御を受けて発現に有利な遺伝子の収納状態になっていることがほぼ明らかになった (Nishimura *et al.*, 2013, 2014)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

- (1) Nishimura, E., Jumyo, S., Arai, N., Kanna, K., Kume, M., Nishikawa, J., Tanase, J. and Ohyama, T. Structural and functional characteristics of S-like ribonucleases from carnivorous plants. *Planta* (in press) 査読有。
- (2) Udagawa, K. and Ohyama, T. Positions of pluripotency genes and hepatocyte-specific genes in the nucleus before and after mouse ES cell differentiation. *Genet. Mol. Res.* **13**, 1979-1988 (2014) 査読有. DOI: 10.4238/2014.March.24.2
- (3) Nishikawa, J. and Ohyama, T. Selective association between nucleosomes with identical DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1544-1554 (2013) 査読有. DOI: 10.1093/nar/gks1269
- (4) Nishimura, E., Kawahara, M., Kodaira, R., Kume, M., Arai, N., Nishikawa, J. and Ohyama, T. S-like ribonuclease gene expression in carnivorous plants. *Planta* **238**, 955-967(2013) 査読有. DOI: 10.1007/s00425-013-1945-6
- (5) Shimooka, Y., Nishikawa, J. and Ohyama, T. Most methylation-susceptible DNA sequences in human embryonic stem cells undergo a change in conformation or flexibility upon methylation. *Biochemistry* **52**, 1344-1354 (2013) 査読有. DOI: 10.1021/bi301319y
- (6) 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

(7) 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

(8) Nishikawa, J., Shimooka, Y. and Ohyama, T. Intrinsic homology-sensing and assembling property of chromatin fiber. In Bernstein, H. and Bernstein, C. (eds.), *Meiosis*. InTech (2013) 査読無. DOI: 10.5772/56548

(9) Udagawa, K., Kimura, H., Tanabe, H. and Ohyama, T. Nuclear localization of reporter genes activated by curved DNA. *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 431-437 (2012) 査読有. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.022

(10) Tanase, J., Mitani, T., Udagawa, K., Nishikawa, J. and Ohyama, T. Competence of an artificial bent DNA as a transcriptional activator in mouse ES cells. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 37-47 (2011) 査読有. DOI: 10.1007/s11033-010-0075-5

(11) Tanase, J., Morohashi, N., Fujita, M., Nishikawa, J., Shimizu, M. and Ohyama, T. Highly efficient chromatin transcription induced by superhelically curved DNA segments: the underlying mechanism revealed by a yeast system. *Biochemistry* **49**, 2351-2358 (2010) 査読有. DOI: 10.1021/bi901950w

(12) 大山隆, 木村元, 下岡保俊. ゲノム DNAはいかにして折り畳まれるか—DNA物性とゲノム収納—. *実験医学増刊号「細胞核—遺伝情報制御と疾患」* **27**, 2715-2722 (2009) 査読無.

(13) Kimura, H. and Ohyama, T. A common mechanical property shared by yeast nucleosomal DNAs. *J. Adv. Sci.* **20**, 37-40 (2008) 査読有. DOI: 10.2978/jsas.20.37

(14) Kitayama, K., Kamo, M., Oma, Y., Matsuda, R., Uchida, T., Ikura, T., Tashiro, S., Ohyama, T., Winsor, B. and Harata, M. The human actin-related protein hArap5: nucleo-cytoplasmic shuttling and involvement in DNA repair. *Exp. Cell Res.* **315**, 206-217 (2009) 査読有. DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.10.028

(15) 大山隆. DNAの高次構造と物理的特性に印された遺伝情報. *蛋白質核酸酵素* **53**, 1-11 (2008) 査読無.

〔学会発表〕(計 15 件: \*国内学会は割愛した)

(1) 2013 年 12 月. The 2013 ASCB annual meeting (New Orleans) DNA sequence-dependent self-assembling property of chromatin fiber. Nishikawa J., Shimooka Y. and Ohyama T.

(2) 2013 年 8 月. 23<sup>rd</sup> Wilhelm Bernhard Workshop on the cell nucleus (Debrecen) Intrinsic homology-sensing and assembling property of chromatin. Ohyama T.

(3) 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. Ohyama T. (招待講演)

(4) 2012 年 12 月. 2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (San Francisco) Characteristics of DNA in meiotic recombination hotspots. Miura O., Kimura H., Ogake T. and Ohyama T.

(5) 2011 年 8 月. The 22nd Wilhelm Bernhard Workshop (Latvia) The genome folding principle as revealed by modelling of yeast interphase chromosomes. Ohyama T.

(6) 2011 年 8 月. The 22nd Wilhelm Bernhard Workshop (Latvia) The genome folding principle in yeast. Kimura H., Shimooka Y., Nishikawa J., Miura O., Sugiyama S., Yamada S. and Ohyama T.

(7) 2011 年 8 月. The 22nd Wilhelm Bernhard Workshop (Latvia) Structural and physical properties of methylated DNA. Shimooka Y. and Ohyama T.

(8) 2010 年 12 月. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting (Philadelphia) Three-dimensional architecture of chromatin fibers in the interphase nucleus. Kimura H., Shimooka Y., Nishikawa J., Miura O., Yamada S. and Ohyama T.

(9) 2010 年 12 月. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting (Philadelphia) Self-assembly of nucleosomes. Nishikawa J. and Ohyama T.

(10) 2010 年 12 月. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting (Philadelphia) S-like RNase gene expression in carnivorous

plants. Nishimura E., Horiuchi S., Nozaki N. and Ohyama T.

(11) 2009 年 8 月. The Wilhelm Bernhard Workshop 21st International Workshop on the Cell Nucleus (Ustron, Poland) How genomic DNA is functionally folded in a nucleus. Ohyama T., Kimura H., Shimooka Y., Kageyama D., Furuya M., Udagawa K. and Tanase J.

(12) 2009 年 8 月. The Wilhelm Bernhard Workshop 21st International Workshop on the Cell Nucleus (Ustron, Poland) 3D structure of 10 nm chromatin fiber deduced from DNA flexibility. Kimura H., Shimooka Y., Sugiyama S. and Ohyama T.

(13) 2009 年 8 月. The Wilhelm Bernhard Workshop 21st International Workshop on the Cell Nucleus (Ustron, Poland) Localization of transgenes activated by an artificial curved DNA. Udagawa K., Yamamoto T., Fukagawa T. and Ohyama T.

(14) 2009 年 8 月. The Wilhelm Bernhard Workshop 21st International Workshop on the Cell Nucleus (Ustron, Poland) Stable transgene expression based on chromatin engineering. Tanase J., Udagawa K. and Ohyama T.

(15) 2009 年 6 月. 18th Lake Shirakaba Conference (Copenhagen) (招待講演) How genomic DNA is functionally folded in a nucleus. Ohyama T., Kimura H., Kageyama D., Furuya M., Shimooka Y., Udagawa K. and Tanase J.

〔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