

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06129

研究課題名(和文) 哺乳類のDNA複製タイミング制御におけるゲノムとエピゲノムの機能的リンク

研究課題名(英文) A link between genome and epigenome for regulation of replication timing

研究代表者

SHARIF JAFAR (SHARIF, Jafar)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・専任研究員

研究者番号：00577968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類のゲノムは、3次元において転写が活発に起きるユークロマチンと転写が抑制されるヘテロクロマチンに分離される。ユークロマチンはS期の初期に複製し、ヘテロクロマチンは後期に複製されるが、この現象は「複製タイミング」と呼ばれる。本研究は、複製タイミングを決定するDNA配列及びエピジェネティック修飾を明らかにすることを目的とする。本研究から、SINE (short interspersed nuclear elements) という転移因子が、ヒストンH2Bモノユビキチン化(H2Bub)をリクルートし、ユークロマチンにおける早期複製タイミングの決定に寄与していることが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Replication timing defects have been linked with increased DNA damage, chromosomal translocations, and inappropriate cellular differentiation. By understanding the molecular mechanisms that regulate replication timing, it might be possible to therapeutically address the above cellular defects.

研究成果の概要(英文)：The vertebrate genome is organized into transcriptionally active euchromatin and inactive heterochromatin. During the S-phase, euchromatin replicates early and heterochromatin replicates late, and this phenomenon is known as replication timing. In this project, I sought to identify the genetic and epigenetic features that regulate replication timing. I found that SINE (short interspersed nuclear elements) retrotransposons that are enriched in euchromatin, play a role to regulate early replication timing. Mechanistically, SINEs promote the deposition of histone H2B monoubiquitination (H2Bub), a transcription-coupled epigenetic mark, in euchromatin. Furthermore, SINEs mediate a crosstalk between H2Bub and the chromatin insulator protein CTCF, and this crosstalk plays a role for regulation of early replication timing. Taken together, my research reveals a previously unknown mechanism mediated by SINEs and H2Bub for regulation of replication timing.

研究分野：Epigenetics

キーワード：Replication timing SINE H2Bub CTCF

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類のゲノムは、3次元において転写が活発に起きるユークロマチンと転写が抑制されるヘテロクロマチン領域に分離される。DNA複製が起きるS期では、ユークロマチンが早期に複製し、ヘテロクロマチンは後期に複製されるが、この現象を「DNA複製タイミング」と呼ぶ。DNA複製タイミングの異常は、DNA損傷や染色体転座、細胞分化の異常などに関わっている。これらの細胞機能の異常に対する臨床的なアプローチをデザインするためには、DNA複製タイミングの分子メカニズムを詳細に理解する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ユークロマチンとヘテロクロマチンを特徴付けるDNA配列及びそれを認識するエピゲノム修飾に着目し、DNA複製タイミングの分子基盤を解明することである。

3. 研究の方法

本研究では、マウスのES(胚性幹)細胞を用い、Hi-C(核内3次元構造を決定する手法)やrepli-seq(DNA複製タイミングを決定する方法)を行った。さらに、転移因子などの特定のゲノム配列をノックインし、それらの配列の機能を解析した。前述した転移因子と相互作用するエピジェネティック修飾を決定し、遺伝子ノックアウト方法を用いてそれらのエピジェネティック修飾経路を阻害した。

4. 研究成果

筆者は、ユークロマチンとヘテロクロマチンに局在するDNA配列が、DNA複製タイミングの決定に何らかの影響を持つと考えた。そこで、哺乳類ゲノムに点在するSINE(short interspersed nuclear element)という転移因子に着目し、SINEはユークロマチン領域に濃縮していることを見出した。興味深いことにSINE転移因子は、活発に転写する遺伝子のイントロン部位に局在する傾向を示した。転写活性が高い遺伝子のイントロンには、ヒストンH2Bモノユビキチン化(H2Bub)というエピジェネティック修飾が存在する。筆者の解析から、SINEが豊富に挿入された遺伝子には、SINE挿入の少ない遺伝子よりも、より高いレベルのH2Bubが濃縮されることが示唆された。SINE転移因子とH2Bub濃縮との関連性を明らかにすべく、マウスのES細胞で人工的SINE配列を新たにノックインした。驚くべきことに、SINE配列のノックインにより、H2Bubの濃縮が約10倍高くなった。これらの結果から、SINE転移因子とH2Bubとの間に明確な機能的なリンクが存在することが示された。

3次元ゲノムは、クロマチンループ(loop)やTAD(topologically associating domain)、A/B compartmentなどの高次構造によって形成される。CTCFという因子は、cohesin複合体と協力し、loop及びTAD形成に寄与する。SINE配列には、CTCFをリクルートするDNAモチーフが存在し、実際にゲノム全体で観察されるCTCF結合サイトの半分以上にはSINE配列が局在する。筆者は、SINE配列を認識するCTCF因子が、同様にSINEに濃縮されるH2Bubと相互作用をすると考えた。そこで、マウスのES細胞でH2Bubを枯渇するために、H2Bubを媒介するRNF20というE3ユビキチン化酵素をノックアウト(Rnf20 KO)した。興味深いことに、Rnf20 KO細胞では、SINEにおけるCTCFの結合が顕著に増加した。筆者は、degron方法を用い、マウスのES細胞でCTCFを枯渇した。CTCFを枯渇した細胞では、遺伝子のイントロン部位にH2Bubの増加が観察された。これらの結果は、SINE配列においてH2BubとCTCFとの間に相互作用があることを示唆した。

次に、H2Bubを枯渇した場合(Rnf20 KO)やCTCFを枯渇した場合(Ctcf degron)さらにH2BubとCTCFを同時に枯渇した場合(Rnf20 KO and Ctcf degron)は、DNA複製タイミングにどのような変化が起きるのか、その点を解析した。Repli-seq実験から、H2BubやCTCFのどちらかを枯渇しても、ユークロマチンにおける早期複製タイミングに異常が起きることが見出された。H2Bub及びCTCFを同時に枯渇した細胞でも、同様の早期複製タイミングの異常が観察された。さらに、Hi-C実験から、Rnf20 KOやCtcf degron、そしてRnf20 KO and Ctcf degron細胞では、近傍のコンタクト(cis contacts)が低下することが見出された。

本研究は、複製タイミングを決定する重要な因子としてSINE及びH2Bubを発見し、DNA複製におけるゲノム配列とエピジェネティック修飾の新たな機能を明らかにした。SINE配列は、進化の過程において脊椎動物のゲノムに挿入され、内在性の寄生DNA配列(endogenous parasitic DNA elements)として宿主(host)のゲノムの一部となった。実際に、マウスやヒトのゲノムの約20%がSINE(ヒトの場合はAluと呼ばれる)によって構成される。しかし、これまでの研究では、SINE配列の分子機能がほとんど解明されておらず、SINEやその他の転移因子はガラクタ(junk)DNAに過ぎないとの意見が幅広く支持されていた。本研究では、SINE配列が選択的にユ

ークロマチンに局在することを見出し、さらに、SINE を認識する H2Bub というエピジェネティック修飾を新たに同定し、ユークロマチンにおける転移因子とエピゲノムとの機能的なリンクを発見した。

筆者は、SINE 配列における H2Bub のリクルートは、SINE に結合するもうひとつの因子である CTCF との相互作用を誘導することも見出した。CTCF は、ゲノム高次構造を制御する重要な因子である。実際に、本研究から H2Bub と CTCF との相互作用は、近傍のクロマチン領域同士の間でコンタクト促進することが示された。DNA 複製の際には、特定のゲノム領域の中で複製起点 (origin) が次々と着火する。H2Bub や CTCF の欠損による近傍のコンタクトの低下は、DNA 複製複合体がひとつの複製起点から次の複製起点に移動することを妨げ、結果的にユークロマチンにおける早期複製の異常を引き起こす可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sharif J, Koseki H, Parrish NF	4. 巻 In press
2. 論文標題 Bridging multiple dimensions: roles of transposable elements in higher-order genome regulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Curr Opin Genet Dev	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2023.102035	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takano J, Ito S, Dong Y, Sharif J, Nakajima-Takagi Y, Umeyama T, Han YW, Isono K, Kondo T, Iizuka Y, Miyai T, Koseki Y, Ikegaya M, Sakihara M, Nakayama M, Ohara O, Hasegawa Y, Hashimoto K, Arner E, Klose RJ, Iwama A, Koseki H, Ikawa T	4. 巻 13 (1)
2. 論文標題 PCGF1-PRC1 links chromatin repression with DNA replication during hematopoietic cell lineage commitment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34856-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kikuchi A, Onoda H, Yamaguchi K, Kori S, Matsuzawa S, Chiba Y, Tanimoto S, Yoshimi S, Sato H, Yamagata A, Shirouzu M, Adachi N, Sharif J, Koseki H, Nishiyama A, Nakanishi M, Defossez PA, Arita K	4. 巻 13 (1)
2. 論文標題 Structural basis for activation of DNMT1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34779-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Jiang S, Tang Y, Xiang L, Zhu X, Cai Z, Li L, Chen Y, Chen P, Feng Y, Lin X, Li G, Sharif J, Dai J	4. 巻 65 (7)
2. 論文標題 Efficient de novo assembly and modification of large DNA fragments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci China Life Sci.	6. 最初と最後の頁 1445-1455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11427-021-2029-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------