

高等動物ゲノム配列と染色体構造の統合をめざす複製タイミングの高精度地図作成

●池村 淑道

国立遺伝学研究所進化遺伝研究部門

＜研究の目的と進め方＞

高等脊椎動物の染色体バンド領域は、S期内の複製時期やGC%のMbレベルの区分構造と関係し、遺伝子密度や発現様式ならびに組み換え頻度等を異にするゲノムの機能ドメインと考えられるようになってきた。生物学的意味に富んだバンド領域と塩基配列とを直接的に関係づけ、核内配置とも関係づけて統合的に理解することは、ゲノム配列解読後のゲノム研究の主要な課題の一つである。進化的には、S期内の複製時期の区分化が確立した後に、温血脊椎動物において、S期の早期に複製する領域がGC-richになり、GC%の巨大な区分構造が形成されたと推定されている。これが温血脊椎動物のバンド構造が進化的に形成された分子レベルでの基盤と考えられる。本研究では、ヒトゲノム配列の広領域を対象に複製時期の高精度地図を作成し、GC%の解析と合わせて、ゲノム配列とバンド領域の統合的な理解をめざす。

複製時期の転換の部位やGC%の区分境界については、ゲノム配列レベルで限定できるが、そこには複製時期の転換機構と関係した特徴的な性質が潜んでいる可能性が考えられる。複製時期の転換領域では、S期の前半側で開始した複製フォークが、後期側のフォークと出会うまで、進行を休止する可能性が指摘されている。複製の休止は、組換えを含むDNA傷害の頻度を上昇させる。複製時期やその転換領域とSNP頻度の関係も解析する。

光学顕微鏡レベルの研究により、複製時期の転換点は染色体バンドの境界と関係すると推定されている。複製時期の転換点について塩基配列レベルの知見が得られれば、現在の染色体構造が形成されてきた進化過程について、分子レベルの視点での基礎知見が得られる。比較ゲノムの視点から、ヒトとマウス染色体とのsynteny領域を解析し、複製時期の転換領域とsynteny領域の組み換え部位との関係を明らかにする。

＜研究開始時の研究計画＞

2000と2001年度の研究の当初計画

1) ヒト21番染色体についての複製時期の測定。

高等脊椎動物ゲノムの複製は、平均の大きさが200kb程度のレプリコンの単位で起き、数個から数十個の連続したレプリコンがクラスターとして同調的に複製を開始する。理研から、ヒト21番染色体について、平均200kb程度の間隔で、STSマーカーのPCRプライマーの分与を受け、この染色体の全域での複製時期の測定を行なう。我々が採用している複製時期の測定法では、プロモデオキシウリジンでゲノムDNAを60分程度標識した後、セルソーターを用いて、DNA含量を指標に細胞周期により6分画する。免疫沈降法によりプロモデオキシウリジンで標識された新生鎖の精製を行った後、複製時期を測定する部位のプライマーを用いた定量的PCRを行い、ゲル電気泳動後に各S期分画のバンドを定量し、着目部位の複製時期を特定する。

2) 複製時期やその転換部位とSNP頻度の関係や転換部位

に存在する遺伝子類の解析。

数個から数十個の連続したレプリコンがクラスターとして同調的に複製をしており、このMbレベルのクラスターが染色体バンド領域と関係する。S期前半と後半の複製時期の差は、レプリコンクラスター間での複製の開始時期の差を反映している。バンド境界で起きる複製時期の転換については、二つの機構が提唱されてきた。第一は、S期前半に複製を開始したRバンド側の複製フォークが、バンド境界においては進行を一時停止し、1～2時間程度後に複製を開始するGバンド側のフォークと合体するとの機構である。第二のモデルでは、前半に複製を開始したRバンド側のフォークが、バンド境界においては、他の前期複製フォークよりも数倍程度長い領域の複製を行うことで、後期に複製を開始するGバンド側のフォークとの合体を完了する。フォークの進行の休止は、DNA損傷の確率を上昇させ、組み換えや突然変異の頻度を上昇させる。第二の機構であっても、特別に長い距離を複製することになり、DNA損傷の修復機構を考えた場合、変異や組み換えが起りやすい可能性が考えられる。このような特殊事情から、複製の転換部位はゲノム上で弱い領域と考えられてきた。SNP頻度分布と複製時期やその転換部位との関係を知り、転換部位に位置する遺伝子類の特徴を解析する。

3) 複製時期と核内配置との関係の解析。

S期の前半に複製するゲノム領域は細胞核の比較的中心部に、後半に複製する領域は細胞核の比較的边缘部に位置することが知られている。ゲノムDNAの核内配置を決めている分子機構を解析する。

2003年度の研究の当初計画

1) ヒト11番染色体長腕部の複製時期地図の作成と、複製時期の区分化や複製時期の転換領域の生物学的な意味の研究。

複製時期の区分化の生物学的ならびに進化的な意味を知る目的で、高等脊椎動物種間でsyntenyが転換する部位と複製時期の転換部位との関係を解析する。

2) セントロメアDNAの複製タイミングの測定。

GC%が明瞭に高い領域はS期の前期に、明瞭に低い領域は後半に複製しているが、詳細に見ると、21番染色体のセントロメア近傍には、比較的GC%が高いのにS期のとても遅い時期に複製している部位が見出された。テロメアの近傍領域でも、GC%と複製時期との関係が崩れる部位が見出されている。染色体の機能的に重要なセントロメア部分の複製タイミングを測定する。

3) ゲノムの全域を対象にした複製時期地図作成のための、複製時期測定法の改良。

DNAチップを用いた複製時期の能率的な測定法を開発する。

〈研究期間の成果〉

2000と2001年度の研究成果

1) ヒト21番染色体についての複製時期の測定。

全塩基配列が決定されたヒト21番染色体長腕 (34 Mb) の全域を対象に、詳細な複製時期地図をゲノム配列レベルで作成した (1)。理研のゲノム科学総合センターとの共同研究として、約100個のSTS部位に着目して複製時期の測定を行った。S期前半と後半の複製領域がRとGバンド領域に対応することが判明し、複製時期がS期前半から後半に明瞭に転換している領域を約10箇所、塩基配列レベルで特定できた。また、GC含量の区分境界と複製時期の転換部位とが密接に関係することも明らかになり、これらの転換部位をバンド境界の構造上ならびに機能上の要件を満たす部位として塩基配列レベルで特定した。S期の早い時期に複製する領域ほど遺伝子密度が高いことも明らかになった (1)。

2) 複製時期やその転換部位とSNP頻度の関係や転換部位に存在する遺伝子類の解析。

S 期前半に複製を開始したRバンド側の複製フォークが、後半に複製を開始するフォークと出会う部位であり、複製の転換部位はゲノム上で弱い領域の可能性が考えられる。研究の開始時にはこれらの領域には遺伝子が存在せず、反復配列や偽遺伝子類が主に存在するであろうと予想していた。21番染色体で特定した転換部位に着目したところ、その近傍では遺伝子密度が低いことが判明したが、少数ながら遺伝子が存在することも確認した。興味深いことに、転換部位には病因遺伝子、特に脳神経疾患遺伝子および癌関係遺伝子が集中して存在するとの予想外の知見を得た (1)。例えば、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の代表例であるAPP、家族性筋萎縮性側索硬化症FALSの原因遺伝子SOD1、てんかん症と関係したグルタミン酸レセプターGluR5の遺伝子GRIK1を見出した。

3) 複製時期と核内配置との関係の解析。

DNA複製と遺伝子発現を活発に行っている分裂間期の核において、染色体DNAが高度に組織化された核内配置をとっており、その配置自体が複製の時期や遺伝子発現に深く関わっている。S期の前半に複製するゲノム領域は細胞核の比較的中心部に、後半に複製する領域は細胞核の比較的外縁部に位置することが知られている。高等動物染色体の高度に組織化された核内配置を決定する情報は、基本的には塩基配列に担われるが、その配列の実体と配置決定の分子機構は未知に残されてきた。三重鎖ならびにこの形成に伴って生じる単鎖は、生理条件下で他のDNA配列やRNAと配列特異的な対合を起こすことが可能であり、核内配置を決める機構として重要と考えられる。ヒトゲノム上には、数百bpの大型ポリプリン/ポリピリミジン配列が、数万コピー程度存在するが、その多くは試験管系では三重鎖を形成する能力を持つと推定されている。ヒトゲノム上に頻度高く存在する (AG/TC)_n や (GAA/TTC)_n や (GGAA/TTCC)_n 等を蛍光プローブとして、ヒトの未変性間期核に対する *in situ* ハイブリダイゼーション実験を行ったところ、配列特異的に特徴的なfoci状のハイブリダイゼーション像を得た (2)。複数のRNaseで処理した未変成核も同様なシグナルを与えるのに対して、単鎖特異的なヌクレアーゼ処理核ではシグナルは完全に消失しており、核内に存在する単鎖DNAを検出していることが示された。興味深いことに、DNAとRNAのハイブリッド鎖に特異的に作用する

RNaseHでは、foci状のシグナルの位置が明瞭に変化するプローブも存在した (2)。RNAの関係する三重鎖ないしは、三重鎖形成に伴って生じる単鎖DNAとRNAのハイブリッド鎖が核内配置と関係する可能性が考えられる。

三重鎖DNAに対する特異的モノクローナル抗体を用いて上述のfoci状シグナルとの位置関係を解析したところ、明瞭なcolocalization が判明した。間期核内でのセントロメア部位との相対配置を解析したところ、ポリプリン/ポリピリミジン配列と同様に、三重鎖特異抗体もセントロメアの近傍部位に強いシグナルを与え、空間的には、三重鎖構造がセントロメアの近傍に集中して存在することが明らかになった。分裂中期については、未変性ならびに変性条件下での染色体において、大半のFISHシグナルはセントロメアから離れた位置に検出されていた。分裂間期に見られるセントロメアとの近接が、ゲノム配列上の近接ではなく、空間上の接近であることが判明した。ヒトMHC領域の複製時期の転換領域に見出した大型のポリプリン/ポリピリミジン配列をプローブとしても同様な結果が得られた。染色体の種類によって、セントロメアに空間に近接する三重鎖の配列が異なっていることも判明している (2)。

2003年度の研究成果

1) ヒト11番染色体長腕部の複製時期の測定と、複製時期の区分化や複製時期の転換領域の生物学的ならびに進化学的な意味の研究。

ヒト11番染色体長腕 (11q) の約80 Mbの全域を対象に、190箇所のSTS部位の複製タイミングを解析し、11q全域の詳細な複製タイミング地図を塩基配列レベルの精度で作成した。複製タイミングがS期前半から後半に明瞭に転換している領域を約20箇所特定し、21番染色体と同様に、S期前半と後半の複製領域がRとGバンド領域に対応することを明かにした。11番と21番の両染色体とも、GC%が明瞭に高い領域はS期の前期に、明瞭に低い領域は後半に複製していたが、GC%が中間レベルである領域は、GC%が同一レベルであっても、前半に複製する例も後半の例もあった。複製の制御に係わる複製起点部位の性質を反映すると考えられるが、複製時期がクロマチン構造とも関係していることを考慮すると、GC%では表現出来ない、より複雑な配列上の特徴が潜んでいる可能性が考えられる。

11番染色体長腕の複製時期の転換部位には、BCL1 (cyclin D 1 遺伝子) やFGF4をはじめとする癌関係遺伝子群、フェニルケトン尿症に対するPTSなどが複製時期転換領域に存在していた。複製時期の転換領域では、DNA複製フォークの進行が休止する可能性が指摘されており、組み換え頻度が上昇していると予想されてきた。染色体転座や遺伝子増幅と関係した癌関係遺伝子が、この領域に局在することと関係すると考えられる。着目の転換領域には、転座や遺伝子増幅と関係のない病因遺伝子類も存在していた。バンド領域は複製時期と関係するだけではなく、クロマチン構造の粗密度と関係することも知られている。従って、染色体バンド境界においてはクロマチン構造の粗密度が転換している可能性が考えられる。バンド境界の持つこれらの特殊事情が、病因と関係する可能性を考えている。この現象に一般性が存在するならば、病因の分子機構を知る手がかりを与えるだけでなく、あらたな病因遺伝子を能率的に探索する方法としても有効と予想している。

SNPコンソシアムのデータベースを参照したところ、SNPの密度はS期の後半に複製する領域の方が高いことが

判明した。さらに、後半側でも複製時期を転換する部位にSNPの高密度領域が頻度高く出現するとの知見を得た。ヒト21番と11番染色体について、マウス染色体とのsyntenyを解析したところ、syntenyの切断部位が複製時期の転換部位の近傍に位置する例が多く見出された(1)。染色体転座が高頻度にかかる領域が、複製時期の転換部位に存在するとの知見との関連が興味深い。

2) セントロメアDNAの複製タイミングの測定。

名古屋大の舩本らの作成したセントロメアを持つ小型化染色体を保持する細胞株と、同じセントロメア配列を持ちながら自律染色体にならず、宿主の染色体ヘインテグレートしてしまった細胞株について、セントロメア領域のDNA複製タイミングを測定した。自律複製する染色体のセントロメア領域のDNA複製タイミング(S期後半に複製)は、宿主の染色体ヘインテグレートしてしまった同じ配列のDNA複製タイミング(S期前半から中間で複製)とは明らかに異なっていた。複製タイミングの違いでキネトコア構造が形成されたか、キネトコア構造が形成された後、複製タイミングの違いが生じたかについては不明であり、セントロメアタンパク質の解析を含めた今後の解析が必要である。これと関連したセントロメア機能の研究として、CENP-Iがセントロメア機能に必須であることを、DT40株を用いた染色体工学的な方法で証明した(3)。

3) ゲノムの全域を対象にした複製時期地図作成のための、複製時期測定法の改良。

我々が行ってきた、定量的なPCRを用いた複製時期の測定法は、多大な作業と費用を必要とするため、ゲノム全域を対象にすることは困難であり、より効率的な方法の確立が重要になる。DNAチップを用いた方法が有効に思えるので、この点の技術開発を試みた。複製時期の測定では、ハロゲン(Br, I, Cl, F)化ヌクレオチドを複製時期特異的にDNAに取り込ませ、ハロゲンの種類別に検出する方法が有用である。各ハロゲン化ヌクレオチドに対して特異性の高いモノクローナル抗体の作成を試みたが、良い特異抗体は得られなかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

我々のグループは、染色体バンド境界の例を、MbレベルでのGC%モザイクの区分境界および複製時期の転換部位として、世界に先駆けてゲノム配列レベルで特定してきた。11番と21番染色体長腕の全域を対象にするようなゲノム規模での複製時期の測定を行ったのは、申請者らが最初であり、我が国の特徴ある研究として発展させている。この成果に関係した記事が、Science (294, 2282, 2001)で紹介されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

定量的なPCRを用いた複製時期の測定法は、多大な作業と費用を要するため、異なったハロゲンヌクレオチドを用いたDNA標識を併用した、DNAチップ法の探索的な研究開発を試みたが旨くいかなかった。英国のSanger研究所のグループは異なったDNAチップ法の開発を試み、有用と思える方法の開発に成功している。彼らは、我々が報告したヒト11番染色体の測定結果を、DNAチップ法で追試し、ほぼ同様な結果を得ており、彼らのDNAチップ法の正当性の根拠として報告している。これらの事情で、我々のグループは新規測定法の開発を中止した。

〈今後の課題〉

複製時期の転換領域に見出した脳神経疾患の遺伝子類の大半について、それら遺伝子の5'側が複製時期の後半側に、3'側が前半側に属することが判明した。複製時期はクロマチンの粗密度と関係することが知られている。着目の脳神経系の遺伝子類の場合、それらの遺伝子領域のクロマチン構造が、複製の最終回で形成された構造を保持していると考えた場合、5'側が密な構造であり、3'側が粗な構造で、遺伝子内でクロマチン構造が転換している可能性が考えられる。クロマチン構造上のこの特殊な状況は、脳神経疾患の発症機構と関係する可能性が考えられる。ゲノムの広範囲領域でのクロマチンの粗密度の解析を行い、病因遺伝子と位置との関係を知ることが重要に思える。

GC%が明瞭に高い領域はS期の前期に、明瞭に低い領域は後半に複製していたが、GC%が中間レベルである領域は、GC%が同一レベルであっても、前半に複製する例も後半の例もあった。複製の制御に係わる複製起点部位の性質を反映すると考えられるが、複製時期がクロマチン構造とも関係していることを考慮すると、GC%では表現出来ない、より複雑な配列上の特徴が潜んでいる可能性が考えられる。この問題の解決には新規な情報学的な解析が重要となる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文／プロシーディング(査読付きのものに限る)

203061509. Watanabe, Y., Fujiyama, A., Ichiba, Y., Hattori, M., Yada, T., Sakaki, Y. and Ikemura, T. Chromosome-wide assessment of replication timing for human chromosomes 11q and 21q: disease-related genes in timing-switch regions. Human Molecular Genetics, 11, 13-21, 2002.
303201544. Ohno, M., Fukagawa, T., Lee, L.S. and Ikemura, T. Triplex-forming DNAs in the human interphase nucleus visualized in situ by polypurine/polypyrimidine DNA probes and antitriplex antibodies. Chromosoma, 111, 201-213, 2002.
204151604. Nishihashi, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Ikemura, T., Regnier, V., Dodson, H., Earnshaw, W. C. and Fukagawa, T. CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells. Developmental Cell, 2, 463-476, 2002.