

3

ncDNA

N E W S L E T T E R

「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」
文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究（研究領域提案型）

2012
December

ncDNA

N E W S L E T T E R



「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究（研究領域提案型）

新学術領域研究

「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」ニュースレター 第3号

2012年12月 発行

編集人 中山 潤一

発行人 小林 武彦

発行所 名古屋市立大学大学院 システム自然科学研究科
中山研究室

TEL / FAX : 052-872-5866

E-mail : jnakayam@nsc.nagoya-cu.ac.jp

領域ホームページ

<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~jnakayam/ncDNA.html>



contents

巻頭言	2
研究成果の紹介	
□ 五感を頼りにトンネルを掘り続ける	4
□ 減数分裂期の相同組換え開始に必須なMde2は、 染色体高次構造の構築と S期チェックポイントを連係させることで、 組換えの場所とタイミングの両方を制御する	6
□ 複製タイミング制御因子Rif1の同定	8
□ タイミングートンネルを抜けるとテロメアであった	10
□ Domain Ties: UHRF1のエピジェネティックコード解読ユニット	12
□ Chp1クロモドメインの核酸結合能は ヘテロクロマチンサイレンシングに必要である	14
学会見聞録	16-17
第3回領域会議	18
コラム	19
編集後記	21

巻頭言

iPSの運命を握る
非コードDNA

10月8日体育の日。日本中は明るい話題に沸き返りました。山中伸弥京大教授ノーベル医学生理学賞受賞。同賞の受賞は利根川進MIT 教授以来、25年ぶりだそうです。特に「同僚」である我々生命科学研究者にとっては、嬉しいニュースです。山中博士とは6年前、ちょうど4つの遺伝子の導入で細胞の初期化に成功したCell の論文を発表した2006年、日本分子生物学会（@名古屋）の内輪の懇親会で始めてお会いしました。第一印象は寡黙な努力家で、日本的な方だと思いました。当時はこんなに大出世されるとは思わなかったので（すいません）、いつもの調子でフランクにいろいろお話しして、ズーズーしくも仕事の相談までしてしまいました。当時私は遺伝研に移ったばかりで、何か新しいことをやりたいと思い、幹細胞の寿命の研究を始めようと考えておりました。それで山中さんに、「そのような研究を今から始めて遅くないですか、どのくらい競争は激しいですか」等々、お聞きしました。山中さんからのお答えは「全然遅くないです、とっても面白いと思います。是非やってください。」と非常にポジティブな励ましを頂きました。そのときはおかげさまでやる気満々でしたが、その後雑事に追われ続けて、6年たった今もまだ始めておりません。誠に申し訳ない限りです。山中博士とは現在も学会の若手教育の活動で時々一緒にしています。その流れを汲んでか、受賞後の記者会見で若手研究者の育成や研究者の雇用条件の改善についてご発言してくださいました。ありがたいです。このお祝いの機運を大切に、日本の生命科学研究を一層発展させたいですね。

さてご存知のように、iPS 細胞は一度分化した細胞を初期化して、違う細胞に再び分化する能力を再獲得させた細胞です。分化能

力という点では胚から得られる幹細胞（ES細胞）に近い性質を持っています。しかしヒトのES細胞は希少なうえに、その使用にあたっては重大な倫理の問題が生じます。その点iPS細胞は基本的にはどこの細胞からも生産することができ、将来的に再生医療の中心を担う「夢の細胞」になる可能性を秘めています。そしてこのiPS技術の確立にも我々の研究班が果たす役割を大きいと考えています。

1つにはゲノムの改変の問題があります。昨今盛んに行われている一卵性双生児（いわゆる双子）のゲノム研究から、生後体細胞分裂の過程でもゲノムの改変（転座やコピー数の増加）が頻繁に起こっていることが判ってきました。つまり双子は子供の時はお互いにそっくりですが、大人になるに従いゲノムがそれぞれ変化して「個性」がより出やすくなるという訳です。このゲノムの変化は時にがん等の疾患に結びつくこともあるかもしれません。体細胞から作るiPS細胞ではエピジェネティックには初期化されますが、このようなゲノムの変化はそのまま引きずることとなります。またiPS細胞を将来的に再生医療に用いる場合には、再分化の過程でさらに新たなゲノムの改変が生じる可能性もあります。似たような話で体細胞核を利用したクローン生物の作成が難しいのも、おそらくはこのようなゲノムの改変の蓄積が原因となっているためかもしれません。我々の研究している非コードDNA領域には改変の引き金となる「ホットスポット配列」があると想定されます。その配列の同定、さらには組換えのメカニズムの解析は、まさに我々の中心テーマです。

もう1つのiPS細胞と我々研究班の接点は、上にも出てきましたエピジェネティックな変

化です。山中4因子による分化細胞の初期化にはクロマチン構造等のエピジェネティックな変化が重要な役割を果たしていると考えられます。我々が研究対象にしている非コードDNA領域は、特殊なクロマチン構造を持つ反復配列が半分以上を占めています。これらの領域は初期化されにくいと予想され、それがうまくいくかどうか、よりES細胞に近いiPS細胞が出来るかどうかの鍵を握っていると考えられます。そしてこの非コード反復配列のクロマチン構造の解明もまた、我々の研究班の目指すところです。

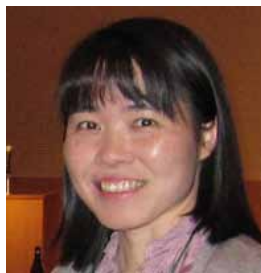
iPS細胞に関する研究は我々のメインテーマではありませんが、我々の研究成果は、今後iPS細胞が切り開く再生医療の成功の鍵を握っていると言っても言い過ぎではないでしょう。当班の研究成果の波及効果として、十分に大きな貢献が出来ると思います。



領域代表
小林 武彦
国立遺伝学研究所

研究成果の紹介

五感を頼りにトンネルを掘り続ける

加納 純子
大阪大学・蛋白質研究所Telomere-nuclear envelope dissociation promoted by Rap1 phosphorylation ensures faithful chromosome segregation.
Fujita I, Nishihara Y, Tanaka M, Tsujii H, Chikashige Y, Watanabe Y, Saito M, Ishikawa F, Hiraoka Y, Kanoh J.
Curr Biol., 22: 932-937 (2012)

10年程前のことです。病院でCT検査を受けた時、上半身をすっぽり覆う狭い筒の中に入った瞬間に、心臓がばくばく鳴り出して気分が悪くなり、すぐに出してもらいました。再現性を取るために受けた2回目の検査でも同じ現象が見られ、途中で断念しました。コントロール実験として、数年後に“広い野原をイメージしながら目を閉じて”筒に入ったところ、気分は悪くなりませんでした。以上のことから、私は自分が閉所恐怖症であると結論しました。2010年、チリの鉱山で落盤事故が起き、33名の人々が地下に閉じ込められました。おそらく世界中のほとんどの人は、湿度98%、気温35度、自然光がないという条件で69日間生活したことに対して過酷だと感じたことでしょう。しかし、私はそのことよりも、最後の小さなカプセルを使った脱出作業の方が何倍も過酷に感じました。このように、実生活では立派な閉所恐怖症の私ですが、研究となると違うようです。

研究の進め方には、大きく分けて二つのパターンがあります。一つは、多くの人が採用しているもので、正統派と言うべきなのかもしれません。ゴールを定めて、それに向かって邁進するタイプ。山にトンネルを掘るとするならば、入り口と出口にダイナマイトを仕掛けて、最短距離を直線的に、かつ、色んな機材を使って精力的に掘り進めます。例えば、M期の制御を知りたい人がM期の途中で止まる変異株を取得して、変異原因遺伝子のM期における機能について解析するというような進め方です。他の人が理解しやすいので、有益な意見（色んな掘削機材＝色んな研究費）がもらえる傾向にあります。それに対して、もう一つの方法は、最初におもしろそうなデータが出て、一体それが具体的に何を意味しているのかわからないけれども、その意味を探るために解析をする進め方です。つまり、入り口にだけダイナマイトを仕掛け、「わあっ、大きな穴があいたぞー！」と拳をあげて興奮し、それを見ていた周りの人も拍手喝采。しかしその後は、出口が定まっていなくて周りは興味を失い、周りからの支援（suggestionや研究費）はほとんど得られることなく、自分だけの力で狭いト

ンネルを掘り進めます。出口の方向が定まらないまま、何度も堅い岩にぶち当たり、何度も方向を変えながら。途中で「あ～、やめておけば良かった」と思っても後の祭り。トンネルが狭くて真っ暗で、引き返すこともできず、どん詰まり状態。大きな不安を背負い、冷や汗をたらだら流しながら、とにかく自分の五感だけを頼りに進み続けます。そして、最後によりく暗いトンネルに太陽の光が差し込んだ時、目からうれし涙がどっと溢れてくることでしょう。そして、山の外の予想もしていなかった美しい景色に感動することでしょう。

大学院時代に受けた教育やこれまでの研究環境の影響が強いのか、私はおもしろい（あるいは意外な）データが出ると、「きっと何かあるに違いない！」と興奮します。そして、一人で孤独なトンネル掘りの旅に出してしまうことが非常に多いのです。今回の論文も、まさにそのパターンでした。分裂酵母の染色体末端テロメアの二本鎖DNA部分には、Taz1というタンパク質が直接結合しています。Taz1と直接結合するタンパク質として、以前、私はRap1を同定しました（Kanoh & Ishikawa, *Curr. Biol.*, 2001）。我々や他のグループの解析により、Rap1がテロメアの主要な機能（テロメアDNA長調節、テロメア末端保護、減数分裂期でのテロメア動態制御など）に必要であることが明らかになりました。しかし、Rap1が具体的にどのようにしてテロメア機能に関与しているのかほとんど明らかにされていませんでした。もやもやしながら年月が過ぎ、ある時私は「テロメアDNAが複製されるS期にTaz1やRap1が修飾されると何かわかるかもしれない」と思い、同調細胞を使ってウエスタンでの両タンパク質のバンドシフトの検出を試みました。そうして私は、Rap1のバンドシフトの“微かな気配”を発見しました。その微か具合と言ったら、当時同じラボにいた大学院生が「けけけ」と失笑するような、多くの人が無視するレベルでした。その後、実験系の改良を重ねた結果、Rap1のバンドシフト（後にリン酸化と判明）が確信できるようになりました。しかし、S期にバンドシフトする

と予想していたのに、どうもS期よりも前にシフトが起こっているようでした。すぐには信じられなかったのですが、M期に停止させた変異株でRap1の強烈なバンドシフトが起こっているのを見た時、ざわざとと全身に鳥肌が立つのがわかりました。そして、うれし涙がぼろり。

M期でのバンドシフト（リン酸化）の検出は、トンネルの入り口に大きな穴が開いただけの状態でした。もちろん私は意気揚々としてトンネルを掘り進めることにしました。当時、テロメアとM期の関係については、わずかに1本論文があるだけで、ほぼ何もわかっていない状態でした。しかも、rap1遺伝子破壊株は体細胞分裂期に元気に増殖できることから、Rap1がM期で何かの機能を果たしているとは想像できませんでした。しばらく行ったところで、「おーい！リン酸化ははまったら怖いから引き返した方がいいんじゃないか～？」と入り口付近で叫んでいる声が聞こえたような気がしました。それでも私は自分の五感を頼りに、閉所恐怖症と戦いながら、狭いトンネルを掘り続けました。その後、何度も堅い岩に進行を妨げられました。まず、Rap1のリン酸化部位を同定するのにかなりの時間を要しました。次に、そのリン酸化によってRap1の性質がどう変化するのかを調べました。しかし、予想はことごとくはずれました。冷や汗が額を流れ、喉がカラカラになり始めた時、ネガコンのつもりで行ったtwo-hybrid assayで、また“気配”を感じました。驚いたことに、Rap1のリン酸化は核膜タンパク質Bqt4との相互作用に影響を及ぼしていたのです。再び全身に鳥肌が立ちました。「M期...、核膜...？」

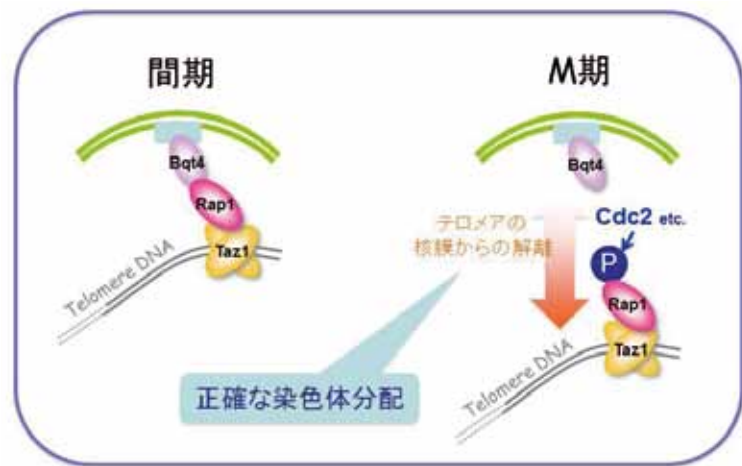
間期では、分裂酵母のテロメアはRap1とBqt4との相互作用を介して核膜内側に配置されていることがわかっていました。しばらくして、ピーンとひらめきました。「ということは...、M期に

テロメアが核膜から離れるためにRap1がリン酸化されるのではないか？」それを実験的に検証したところ、ほぼ予想した通りのデータがゆっくりと出てきました。そして次のようなモデルを提唱しました。核膜崩壊を伴わないclosed mitosisを行う分裂酵母では、M期にRap1がリン酸化されて核膜タンパク質Bqt4から解離し、それによってテロメアの核膜からの解離が促進されます。このM期におけるテロメア（おそらく染色体全体）の核膜からの解離が正常な染色体分離を保障しています。一方、多くの動植物細胞が行うopen mitosisでは、核膜崩壊によって染色体は核膜から自由になります。従って、“染色体の核膜からの解離”がmitosisにおいて普遍的に必要なとされるのではないかと考えました。

このようにして、私はようやく太陽の光を暗いトンネルに入れることができました。しかし、自分で開けた穴が小さ過ぎてなかなか外に出られませんでした。最後は、ラボメンバーに外側から穴を広げてもらい（リバイス実験と一緒にやってもらい）、ようやくトンネルから脱出することができました。最近ノーベル賞を受賞した山中先生のように、はっきりとしたゴールを定めて研究を進めるのも重要でしょう。しかし、偶然の発見をつなぎ合わせて予想もしなかった展開が待っている研究も、サイエンスの発展のためには重要なのではないのでしょうか。

追記

トンネルの入り口付近でトンネル掘りに必要なツール（質量分析、顕微鏡観察）を渡してくださった京都大学の石川先生と情報通信研究機構の平岡先生に御礼申し上げます。

分裂酵母 *S. pombe* (closed mitosis) におけるテロメアのM期制御

研究室のメンバーと一緒に論文のお祝い会にて

研究成果の紹介

減数分裂期の相同組換え開始に必須な Mde2 は、染色体高次構造の構築と S 期チェックポイントを連係させることで、組換えの場所とタイミングの両方を制御する

三好 知一郎

東京大学大学院総合文化研究科
太田邦史教授研究室
(現所属：米ミシガン大学
メディカルスクール)

A central coupler for recombination initiation linking chromosome architecture to S phase checkpoint.
Miyoshi T*, Ito M*, Kugou K, Yamada S, Furuichi M, Oda A, Yamada T, Hirota K, Masai H, Ohta K (*These authors equally contributed to this work)
Mol Cell, 47: 722-33 (2012)



減数分裂における相同染色体間の組換えは、我々真核生物の多様性を生み出す原動力でもあり、また染色体を配偶子に正しく分配するのに必要な大変重要なプロセスです。減数分裂期に入ると DNA が複製され、次いで染色体に「軸」と「ループ」と呼ばれる高次構造が形成されます。ループ部には「組換えホットスポット」という領域が含まれ、この領域で DNA が複製後に切断されます（DNA 二重鎖切断、DSB: DNA double strand break）。その後、切断末端は無傷の相同染色体の相同な DNA 鎖内に侵入し、遺伝的組換えが開始されます（キアズマ形成）。このキアズマ構造は、相同染色体間に物理的な結合を生み出し、モノポーラスピンドルの形成を促し、減数分裂に特有の還元分裂を保障します。従って、DSB 形成に失敗すると、先天的な染色体異常や精子や卵といった配偶子の形成に異常を引き起こしかねません。これまでに、DSB 形成に関わる因子は出芽酵母を中心に数多く単離されてきましたが、DSB 形成が時間・空間的に制御されるメカニズムについては不明な点が多く残されていました。今回、我々は、分裂酵母を用いた解析から、Mde2 という減数分裂特異的なタンパク質が、DNA 複製後に一過的に発現して、ループと軸という質的に異なる 2 つの非コード領域を連結させることで DSB 形成を開始させる、まさしく時間と空間の両方を制御する因子であることを発見しました。

DSB 形成は、Spo11 とよばれる酵母からヒトまで保存された DNA 切断に必須のタンパク質がホットスポットに結合することで開始されます。出芽酵母では、Spo11 以外に 9 つの補助因子が Spo11 の活性化に必要であることが分かっていますが、補助因子が多すぎて、どれがどのような複合体を作り、どうやって Spo11 をリクルートするのか？詳細な分子機構はまだよく分かっていません。もう 1 つの謎は、ループ部に位置するホットスポットに対して、一見無関係に見える軸部も、DSB 形成に重要

な役割を果たすことです。近年でも、当研究室の久郷研究員を中心として、軸部の形成に必須のコヒーシング、DSB の頻度および場所の決定に重要であることを発見しました。分裂酵母においても、Rec10 という軸部構成因子を欠損すると、DSB が殆ど起こりません。なぜホットスポットと物理的に離れた軸部が DSB 制御に必要なのでしょうか？そこで、遅ればせながら Spo11 の補助因子がほぼ出そろいつつあり、かつ軸部構成因子（Rec10）の欠損表現型が顕著である分裂酵母を用いて、上記の問題に取り組みました。

最初に複合体解析から着手しました。その結果、分裂酵母では主に 2 つの DSB 複合体が存在することが分かりました（ちなみに本研究で扱った因子は、いずれも DSB 形成に必須であることを強調しておきます。つまり、ピースが 1 つ欠けただけでも、DSB は起こりません）。1 つは Spo11 ホモログ（Rec12）を含む、Rec6-Rec12-Rec14 からなる DSBC（DSB core）複合体であり、もう 1 つは Rec7-Rec15-Rec24 からなる SFT（seven fifteen twenty-four）複合体です。さらに Mde2 というタンパク質は、両複合体の構成因子と相互作用することから、2 つの複合体を連係させるのではないかと推測されました。さらに、軸部構成因子との相互作用を網羅的に調べたところ、SFT 複合体構成因子と Rec10 の相互作用が検出されました。おそらく SFT 複合体が、軸 - ホットスポット間の物理的な相互作用を生み出す鍵だと予想されました。実際、従来の ChIP 法と ChIP-chip 法を組み合わせた解析から、Rec10 は軸部のみならずホットスポットにも結合しており、後者は SFT 複合体に依存することが分かりました。SFT 複合体と相互作用する Mde2 を欠損しても、同様の結果が得られました。すなわち、Mde2 と SFT 複合体が協調して、軸部とホットスポットを結びつけていたのです。一方で、DSBC 複合体構成因子のいずれかを欠損しても、軸 - ホットス

ポット間の相互作用に変化が見られないことから、この複合体は DSB 形成の最終段階で、染色体上に呼び込まれると予想されました。実際、DSBC 複合体と SFT 複合体の両者を結びつけるであろう Mde2 を欠損した細胞では、DSBC 複合体はホットスポットに結合していませんでした。

興味深いことに、*mde2*⁻ 遺伝子の転写は、S 期チェックポイントが DNA 複製の終了をモニターして、はじめて開始されます。これは当領域班の正井先生のグループが詳しく報告しています。実際、タンパク質レベルで解析してみると、DSB 形成タンパク質の中で唯一、Mde2 のみが DNA 複製後に発現することが分かりました。すなわち、軸 - ホットスポット間の相互作用は、S 期チェックポイントとそのエフェクター分子である Mde2 によって、厳密に時間管理されていたのです。これらの結果を総合すると、次のモデルが考えられます（図 1）。減数分裂期に入ると、DNA 複製を経てループと軸が構成されます。このタイミングを見計らって Mde2 と SFT 複合体が、軸部とループ上に位置するホットスポットを結びつけます。最後に、DSBC 複合体が Mde2 を介して、この特殊な染色体高次構造上に呼び込まれることで DSB を導入し、組換えが開始されるというモデルです。

本研究から、DSB 形成における Mde2 の時空間的制御機構の一端が明らかとなりましたが、次なる課題も見えてきました。Mde2-SFT 複合体がどのようにホットスポットを認識するのか、その分子機構は不明です。おそらくホットスポットには、自身を規定するメタ情報が隠されていると思われます。DNA 配列およびそれに伴うクロマチン構造が候補として考えられます。次に、染色体全域に局在する軸部の中から、どの軸部が特定のホットスポットと結合するのでしょうか？ホットスポットに結合する軸部とそうでないものの間の質的な差は何か？これは 3C 等の染色体高次構造解析的な手法からヒントが得られるかもしれません。

そして最後に、なぜホットスポットと軸部は相互作用する必要があるのでしょうか？その生理的意義も、今後の大きな課題です。偶発的に起こる DSB 損傷の修復過程とは異なり、減数分裂では相同染色体間で組換えを行う必要があります。おそらくそのために特化したメカニズムであろうことは想像できますが、今後実験的な検証が必要です。

最後になりましたが、あらためてラボメンバーに謝辞を述べたいと思います。本研究では、情報解析のためにラボ内で解析チームが編成されました。彼らの努力無くして、ChIP-chip の解析は進まなかったでしょう。そして、本論文のリバイスでは、渡米後対応ができなかった自分に変わって、大学院生の伊藤君が全面的に協力してくれました。彼とは、インターネットを介して毎週末のようにディスカッションを重ねてきました。先日、初夏の陽気あふれるアナーバーで、彼と祝杯をあげた地ビールの味は忘れられません（図 2）。そして、深い洞察と鋭いコメント、雑多なメンバー（失礼）を統括して、正しい研究方針へと導いて下さったボスには、心からお礼を申し上げたいと思います。私は現在、哺乳類ゲノムに散在するジャンク DNA の代名詞でもあるレトロトランスポゾン LINE-1 の転移機構について調べています。今後も非コード DNA 領域の皆さんとディスカッションできる日を楽しみに、研究に励みたいと思います。

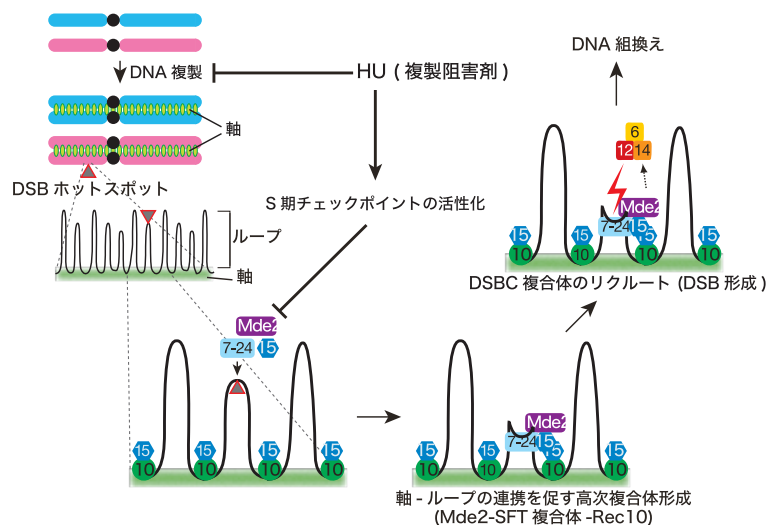


図 1 DSB 形成機構のモデル図
(本文参照)



図 2
筆者と伊藤君で祝杯
(アナーバーのステーキレストランにて)

研究成果の紹介

複製タイミング制御因子 Rif1 の同定

早野 元詞

東京都医学総合研究所
ゲノム動態プロジェクトRif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast.
Hayano M, Kanoh Y, Matsumoto S, Renard-Guillet C, Shirahige K, Masai H.
Genes Dev. 26: 137-150 (2012)

酵母からヒトまでの真核生物における染色体上には巨大なゲノムを安定に複製するために数千～数万の DNA 複製開始起点が存在し、特定の複製起点から決められたタイミングに従って DNA 複製を開始します。この時空間的に制御されたシステムは「複製プログラム」と呼ばれ、細胞の種類や ES 細胞における分化の前後で変化しますがその詳細な制御機構や生物学的な意義は制御因子が不明であったため未だ明らかになっていません。そこで我々は複製タイミングを制御する因子に着目し、今回 Rif1 と呼ばれるテロメア長維持因子が複製プログラムを制御していることを分裂酵母において報告しました¹⁾。Rif1 はサブテロメア、セントロメア、そして腕部に渡り存在する 1083 か所の複製起点のうち、ヒドロキシ尿素 (HU) 存在下において 323 か所の複製タイミングを制御しており、通常の S 期進行中には、*rif1* 欠損細胞では複製タイミングの脱制御が起こり全体として S 期中期へと複製タイミングが収束します (図 1)。さらに最近、マウス及びヒトの細胞においても Rif1 の機能は保存されており、染色体の配置や構造変換を介して複製タイミングを制御している可能性が示唆されています^{2), 3)}。

Rif1 ノックアウトマウスは胎生致死であり、また Rif1 は ES 細胞の未分化状態の維持に必要という報告がされています。一方で分裂酵母においては、*rif1* 欠損細胞は正常に生育し HU や MMS などに対して薬剤感受性も示しません。これらはマウスやヒトにおいて複製タイミングの変化は核内機能制御に重要な役割を担

い、生命の生死において重要であることを示唆していますが、酵母においては少なくとも増殖に影響を与えないために、これがこれまで複製タイミング制御因子が単離されてこなかった原因の一つと言えるかもしれません。我々は分裂酵母 Rif1 を Hsk1 と呼ばれる複製開始制御因子 Cdc7 kinase ホモログとの遺伝学的相互作用によって単離しました。Hsk1/Cdc7 は MCM 複合体をリン酸化し、複製フォーク因子を呼び込む重要な因子で欠損細胞は致死になります。しかしながら、私たちは *hsk1* の温度感受性変異体の生育が DNA 複製チェックポイント因子である Mrc1/Claspin や Cds1/Chk1 の欠損によって部分的に回復できること、さらにこの *hsk1* 欠損細胞も 25°C や、30°C では致死ですが不思議なことに 37°C にすると僅かながら生きてくることを発見し、これら *mrc1* あるいは *cds1* 欠損、37°C の生育条件下ではいずれも複製タイミングの変化を観察しました^{4), 5)}。私たちはこれらのことから *hsk1* 欠損における生育を回復できる因子は複製タイミングを制御する、という仮説を立て遺伝学的スクリーニングを開始しました。

スクリーニングを開始した当初は学位取得のために行っていた Mrc1 の複製タイミング制御解析が混迷を極めていたこともあり、単離される因子の中に Mrc1 の制御機構を明らかにしてくれるものがないかと期待していました。結果的に *rif1* 欠損は *hsk1 mrc1* 欠損の増殖をさらに回復させるため、Mrc1 の複製タイミング機構とは異なる制御機構にあることが示唆されましたが、手

首が腱鞘炎になる前に幸運にも 10,000 個のコロニーをとる頃にいくつか当たりを得ることが出来ました (図 2)。どの遺伝子に変異が入ったかは最終的には次世代シーケンスで確認を行いました。それ以前にゲノム DNA を適当な制限酵素で切って、繋げて、クローニングするという昔ながらの方法で次世代シーケンスと同じ遺伝子の数と遺伝子名を単離しましたので、時間は次世代シーケンスの 10 倍以上かかりますが古い方法も侮ることはできません。

現在の問題点は、Rif1 はサブテロメア領域やセントロメア領域への結合を除き、染色体腕部へ M 期に 344 か所、G1/S 期に 155 か所への結合が見られ、多くは複製起点近傍 1kb 以内に結合していますが複製起点へ直接結合していません。Rif1 のテロメアへの結合はもう一つのテロメア因子である Taz1 に依存しますが、腕部への結合は Taz1 に依存せずどのようにして Rif1 の染色体への結合と複製タイミング制御を行われているのか不明な点が多く残されています。また、Taz1 も腕部のテロメア様配列を認識し、複製タイミングを制御するという興味深い報告が升方先生の研究室からされており⁶⁾、Rif1 との関係も大変興味深いところです。今後複製タイミングの解析が進むに伴い、複製タイミングの生物学的な意義が明らかにされると期待されます。分裂酵母においては実際に *rif1* 欠損において転写のプロファイルが大きく変化しますが細胞の生育に影響を与えないため、複製タイミングと細胞機能との cross-talk はマウスやヒトのシステムを含

めて注意深く観察する必要があります。

最後に、酵母に限らず独自のスクリーニング方法を使った網羅的解析はまだ有効な手段であると思います。実際にスクリーニングで良い結果が得られなかった例もあるので、時間とお金に限りがある学生にとって着地点の見えない実験計画は不安です。しかし、どの実験でも結果的にどうなるかは分からないので目的をもって楽観的に、根気強く網羅的解析にチャレンジしてみるのも面白いかもしれません。研究室では、夜や休みの日になると正井先生が清潔なはずのクリーンベンチの中に頭を突っ込んで酵母のコロニーを至近距離からつづいている姿を目にすることがあります。当然ながらしばしばコンタミも見受けられますが、それでも多くのコロニーをとって細胞の生育をチェックしている姿を拝見すると、まだまだ「Hard Work」という言葉が自分に足りていない気がして反省しています。

【参考文献】

- 1) Hayano, M., et al. *Genes Dev.* 26: 137-150 (2012)
- 2) Cornacchia, D., et al. *EMBO J.* 31: 3678-3690 (2012)
- 3) Yamazaki, S., et al. *EMBO J.* 31: 3667-3677 (2012)
- 4) Hayano, M., et al. *Mol Cell Biol.* 31: 2380-2391 (2011)
- 5) Matsumoto, S., et al. *J Cell Biol.* 195: 387-401 (2011)
- 6) Tazumi, A., et al. *Genes Dev.* 26: 2050-62 (2012)

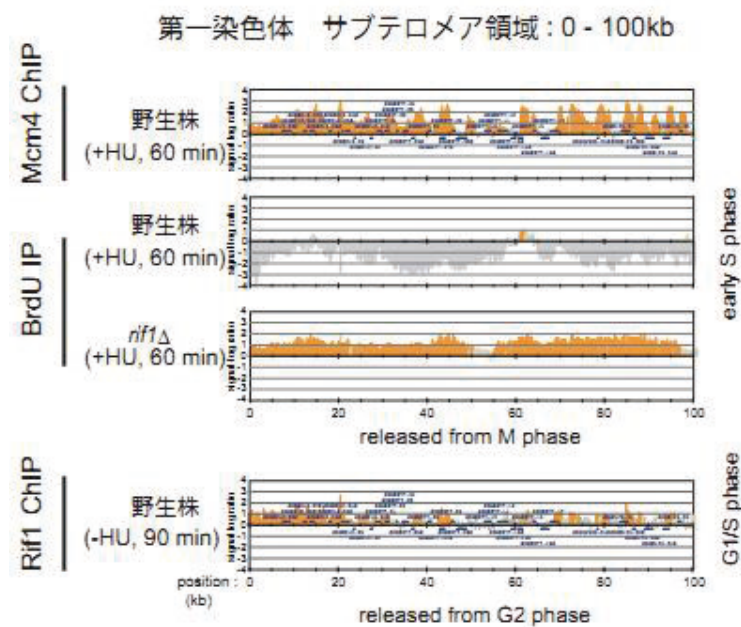


図 1 Rif1 は複製タイミングを制御する。
第一染色体のサブテロメア領域における複製プロファイルと Mcm4, Rif1 の ChIP 結果

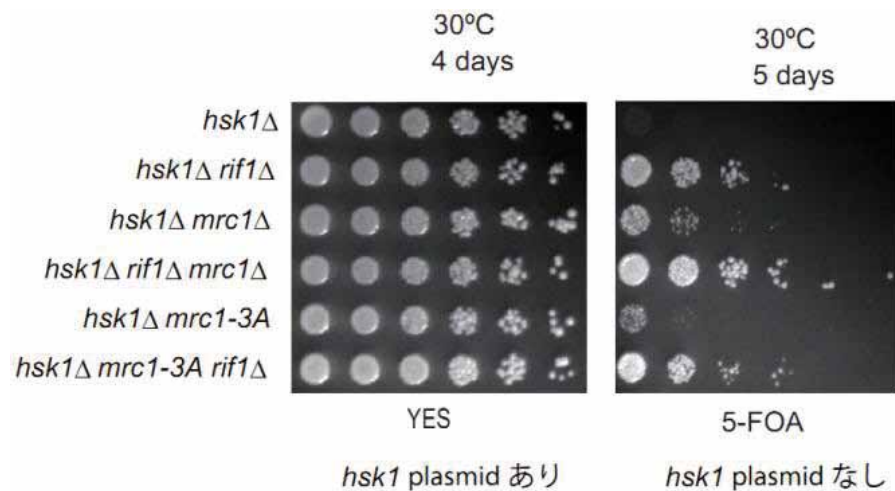


図 2 *hsk1* 欠損による増殖阻害は *rif1* 欠損によって回復できる。

研究成果の紹介

タイミングトンネルを抜けると
テロメアであった

田積 充年
大阪大学大学院理学研究科 生物科学専攻
(* 現旭化成ファーマ研究所)



升方 久夫
大阪大学大学院理学研究科
生物科学専攻

Telomere-binding protein Taz1 controls global replication timing through its localization near late replication origins in fission yeast
Tazumi A, Fukuura M, Nakato R, Kishimoto A, Takenaka T, Ogawa S, Song J, Takahashi TS, Nakagawa T, Shirahige K, and Masukata H.
Genes Dev. 26: 2050-2062 (2012)



真核生物では膨大な量の遺伝情報を含有する染色体 DNA を S 期の限られた時間内に複製するために、多数の複製開始が必要である。興味深いことに個々の複製開始点では S 期のどの時期に複製するかプログラムされている。それぞれの場所の複製タイミングが決まっている理由は完全に明らかではないが、哺乳類では複製タイミングと発生過程での遺伝子発現が相関することが報告されているが、そのしくみはわかっていない。私たちは、分裂酵母をモデル系として、複製開始タイミングを決めているしくみを明らかにしようと考えた。

これまでの網羅的解析から、染色体上の非コード領域に 460 箇所の複製開始点があり、それらの約 2/3 は S 期初期に複製を開始し（初期複製開始点）、1/3 は初期に開始しない（後期複製開始点）。私たちは、複製開始点の近傍に複製タイミングを決めるエレメントが存在するのではないかと考え、その可能性を解析した。分裂酵母の効率よい複製開始点の要件を満たし、複製タイミングが異なる 2 つの複製開始点を用いようと考え、初期複製開始点として我々が詳細に解析を進めてきた *ars2004* を用いたのは必然であるが、同じ第 2 染色体にある後期複製開始点 *AT2088* を選んだのはかなりの偶然性による。

複製タイミングを制御するエレメントは本来制御する複製開始点のみならず、人為的に隣接させた複製開始点にも作用するのではないか。その可能性を調べるため、後期複製開始点 *AT2088* を含む非コード領域 3.6 kb 断片を *ars2004* の隣に挿入し、複製タイミングを解析した。複製伸長を阻害するヒドロキ尿素 (HU) を加えた条件で、チミジンアナログであるブロモデオキシウリジン (BrdU) を取りこませた DNA を、「古典的」CsCl 密度勾配遠心法で分離し、複製 DNA を定量した結果、*AT2088* 断片を隣接させると *ars2004* 領域の複製が大きく減少した。この結果から、*AT2088* 断片 (3.6 kb) には複製タイミングを決める機能 (Replication Timing Control; RTC) があると考えた。RTC 機能に必須の領域を決めるために、3.6 kb から系統的に欠失させた

断片を用い、次いで塩基置換を導入した実験から、タイミング制御に必須な 25 bp の配列を同定した。染色体上本来の *AT2088* でこの配列を欠失させると初期複製を引き起こしたことから、25 bp 配列は *AT2088* の複製タイミング制御に必須であると結論した。

驚いたことに、この必須配列は分裂酵母のテロメア配列をタンデムに 2 つ並べた配列と酷似していた（最後の一文字だけ違う）。これまで分裂酵母テロメア配列が染色体内部にも存在し、何らかの役割を果たすことは報告されていなかった。そこで他の場所にも同様の配列が見られるかを調べるため、最後の一文字の違いを許容する条件で分裂酵母ゲノムを検索したところ、13 箇所の後期開始点の近傍に類似配列が存在した。そのひとつを破壊すると隣接する後期複製開始点が初期に変化した。これらの結果から、一群の後期開始点は近傍にあるテロメア類似配列によってタイミング制御されると結論した。

染色体末端テロメアでは Taz1（ヒト TRF1, TRF2 に相当）がテロメアリピートを認識結合する。クロマチン免疫沈降法による解析で、Taz1 が *AT2088* に局在し、その局在はテロメア類似配列に依存した。さらに *taz1** 遺伝子欠失株で *AT2088* は S 期初期に複製したことから、Taz1 の結合が複製タイミング制御に必要であると結論した。

検出された現象が染色体全体でどれほど普遍的なのかを調べるため、東大白髭研究室において、野生株と *taz1Δ* 株で BrdU 標識した DNA を次世代シーケンサーで解析 (BrdU-seq) した結果、後期複製開始点の約半分に相当する 72 箇所が Taz1 依存的に制御されることが明らかとなった。Taz1 結合との関連を調べるための Taz1-ChIP-seq 解析により、染色体の腕部ユークロマチン領域にある Taz1 依存的開始点 26 個中、16 箇所に Taz1 が局在した。これらは、*AT2088* 同様、近傍に結合する Taz1 によって制御されるのであろう。いっぽう、染色体末端から約 100 kb におよぶサブテロメア領域にある 46 個の後期複製開始点は

Taz1 依存的に制御されるが、個々の開始点近傍にはテロメア配列も Taz1 結合も見られない。これらの制御には、染色体末端のテロメアに結合する Taz1 が関与するのだらうと考えている。今年初めに正井研究室から発表された論文で、分裂酵母テロメア結合タンパク質 Rif1 がグローバルな複製タイミング制御にはたらくことが示された (Hayano et al. 2012)。Taz1, Rif1 の複製タイミング制御における関連を知るため、*taz1Δ* 株と *rif1Δ* 株で初期に複製する開始点を比較したところ、Taz1 依存的後期複製開始点はすべて Rif1 に依存し、さらに後期複製開始点の約 1/3 が Taz1 には依存しないが Rif1 に依存していた。これらの結果から、分裂酵母染色体での複製タイミング制御には Taz1 の結合と、Taz1 とは別のタンパク質の結合が特定の複製開始点を選択し、それらの複製開始過程に Rif1 あるいは Rif1 と相互作用する因子が抑制的にはたらくのではないかと考えている。

Taz1 ないしは Rif1 がどのようにして複製タイミングを制御するかは、いまだ明らかではない。複製因子のクロマチン免疫沈降法による解析結果から、後期複製開始点では、DDK 依存的な Sld3 の結合が抑制されている。興味深いことに、同じステップでの制御は初期複製を促進する場合にも用いられている。ペリセントロメアと *mat* ヘテロクロマチンでは、Swi6（分裂酵母 HP1 タンパク質）が DDK と相互作用して DDK をリクルートし、Sld3 結合を促進することが判明している。Taz1 や Rif1 によるタイミング制御では、どのようなしくみがこのステップを抑制するか、まだ可能性を絞り切れていない。

サブテロメアの複製タイミング制御は、テロメア長制御とリンクするのではないかと考えている。同じ核内にあっても染色体のテロメア長はさまざまであり、短くなったテロメアが選択的にテロメラーゼによって伸長される。テロメア長に比例して多数結合す

るテロメア結合因子がテロメラーゼ結合を制御することが報告されている。いっぽう、テロメアへのテロメラーゼ結合は複製フォーク通過に依存するとの報告があることから、テロメア末端に向かう複製が開始するサブテロメアの複製時期が重要である。短くなったテロメアの内側サブテロメアでは Taz1 による複製タイミング制御が減弱して早いタイミングで複製するようになり、テロメラーゼによるテロメア伸長を引き起こすのではないかと考えている。

染色体内部の複製タイミング制御がどのような意義を持つかはまだよくわかっていない。Taz1 で制御される後期複製開始点の周辺には、通常の細胞周期では発現しないが種々のストレス条件や減数分裂期に発現する遺伝子が多い。これらのしくみに複製タイミング制御が関与する可能性があるのではないか。また上記の領域は遺伝子間領域が広く、ncRNA が高頻度に見いだされる。複製タイミングが ncRNA を介して発現応答にが関わる可能性もあるのではなからうか。また、テロメア配列とテロメア結合タンパク質は、生物種を越えて高度に保存されている。よって、この組合せが染色体内部での特異的領域の制御に普遍的に用いられる可能性は興味深い。

この研究では、タイミング制御に必須な領域にたどりつくまでは、見通しのきかない長いトンネルにいるような状態であり、その先にテロメア配列があるとは想像もしなかった。とりわけ研究開始当初、複製開始点の強弱でタイミングが決まる可能性や、広範囲のクロマチン構造に制御される可能性など、さまざまの可能性をどうやって区別していくか、試行錯誤であった。また、研究終盤で複製開始制御の全容が見えてきてはじめて、もし別の後期開始点を選んでいたら今回の結果には到達できなかったことがわかり、幸運に感謝している。

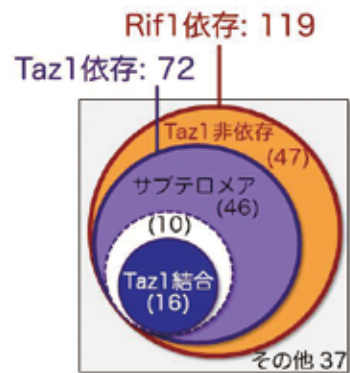


図1 分裂酵母後期複製開始点 (156 個) の制御様式

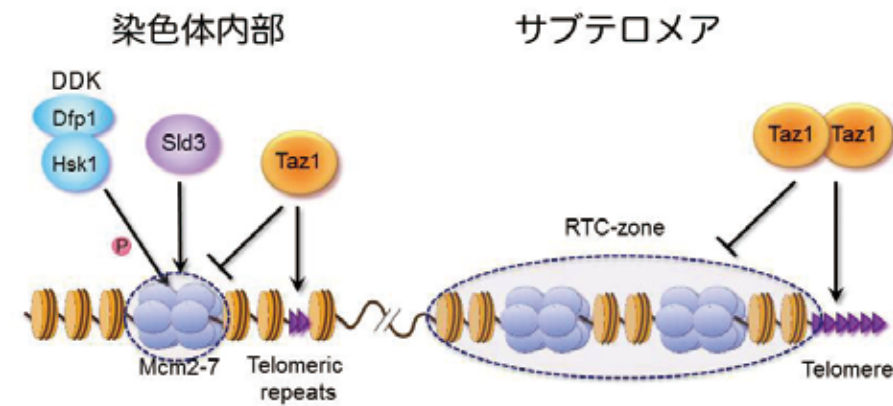


図2 Taz1 の局在と複製タイミング制御

研究成果の紹介

Domain Ties: UHRF1 の
エピジェネティックコード
解読ユニット

有吉 眞理子

京都大学
物質－細胞統合システム拠点

Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1.
Arita K, Isogai S, Oda T, Unoki M, Sugita K, Sekiyama N, Kuwata K, Hamamoto R, Tochio H, Sato M, Ariyoshi M, Shirakawa M.
Proc Natl Acad Sci U S A. 109: 12950-12955 (2012)



エピジェネティクスは、高次の細胞機能を理解する上で最も重要なキーワードの一つであり、エピジェネティックマーカーである DNA メチル化や多様なヒストン修飾をそれぞれ認識する構造モチーフ、ドメインが同定されている。エピジェネティック制御因子には、これらヒストン結合ドメインやメチル化 DNA 結合ドメインを複数含むマルチドメインタンパク質が多く見受けられる。これまでに、個々の機能ドメインの構造機能解析によって、その分子認識機構の一端が明らかにされているが、一方、これらのドメインがいかに連携して複数のエピジェネティックマーカーをゲノム上のコードとして読み取っているのか、そのような視点からの構造機能解析は未だ限られている。最近、私たちのグループは、DNA 維持メチル化に関わる UHRF1 タンパク質のヒストン結合領域とヒストン H3 の複合体の結晶構造を決定し、実際に 2 つのヒストン結合ドメインが 2 つのヒストン残基の修飾状態を組み合わせとして認識していることを明らかにした (Arita *et al.* 2012 *PNAS* 109 12950-12955)。この結晶構造によって、これまでの単独のドメインの構造では知り得なかった複数のドメインからなるエピジェネティックコード解読ユニットの構造基盤の一端を示すことができたと考えている。

UHRF1 のヒストン結合領域 (TTD-PHD) には、16 アミノ酸残基からなるリンカー領域でつながれた tandem Tudor ドメイン (TTD) と PHD finger ドメイン (PHD) が含まれる (図 1)。既に、単独の TTD と PHD は、それぞれ、メチル化されたヒストン H3 の Lys9 (H3K9me) と非修飾状態の Arg2 (H3R2) を認識することがわかっていた。今回の TTD - PHD 領域の構造機能解析の結果から、連結された TTD と PHD が、2 つのヒストン修飾状態を組み合わせとして、単独ドメインよりも強く認識するという新たな知見を得た。さらに、TTD と PHD の相乗的なヒストン

結合において、2 つのドメインをつなぐリンカー領域が、構造と機能、両方の観点から極めて重要な役割を果たしていることがわかった (図 1, 2)。当初、私たちは、このリンカー領域は柔軟なループ領域であり、ドメインをつなぐ紐のようなもの、という先入観を持っていた。比較的短いリンカーでつながれることによって、2 つのドメインが近づいて、ヒストン H3 の N 末端領域にある H3R2 と H3K9me を同時に認識しやすくなる、さらには、ヒストン結合によってドメイン間の立体配置が安定化される、というのが最もありそうなストーリーに思えた。しかし、実際に結晶構造を見てみると、図 1 (左) に示すように、このリンカー領域が単にドメインをつなぐ紐ではなく、TTD と相互作用することによってドメイン間の自由度を適度に保ちつつ、TTD と PHD の空間配置を絶妙にコントロールし、協調的なヒストン H3 認識を可能にしていることが判明した。実際に、TTD とリンカーの相互作用を阻害する変異体では協調的なヒストン結合がおこなない。一方、ヒストン H3 の N 末端テールには α -ヘリックス構造が誘起され、H3R2 と H3K9me の距離が縮まって、TTD と PHD のヒストン結合ポケットにうまく同時に収まっていた (図 1, 右)。興味深いことに、このリンカー領域には、細胞周期依存的にリン酸化される Sers298 が存在する。Ser298 は、ちょうど 2 つのドメインをつなぎ止めている蝶番の部分にあり、この残基のリン酸化によって、TTD とリンカー間の相互作用が不安定化され、TTD と PHD の協調的なヒストン認識を阻害することが予想された。実際に、ヒストン結合への影響を調べてみると、TTD - リンカー相互作用界面の変異体と同様に二つのヒストン修飾の組み合わせ認識ができなくなった (図 2)。このことは、リンカー領域のリン酸化によるヒストン結合モードの制御によって、細胞周期や特定のシグナルに依存して UHRF1 の機能が使い分けられてい

ることを示唆するものと考えている。UHRF1 のリンカー領域による 2 つのドメインの機能制御の意義については、今後、さらに、片鎖メチル化 DNA を認識する SRA ドメインとの関係も含めて研究を進めていきたいと考えている。

最後に、構造生物学の視点からユニークだと考えられる点について、付け加えたい。ヒストン結合、非結合状態にかかわらず、TTD と PHD の間には、顕著なドメイン間相互作用がみられない (図 1, 左)。X 線小角散乱による解析から、ヒストン H3 との結合にかかわらず、ドメイン間にある一定範囲の揺らぎがあることが示されている。もちろん、結晶中でみられた構造が支配的ではあるが、結晶化しやすい安定な複合体と比較すると有意に揺らいでいると結論される。このような分子認識は、いわゆる鍵と鍵穴タイプの厳格な認識機構とは明らかに異なる。また、結合による構造変化、安定化を伴う認識機構とも異なっている。このような分子間相互作用の利点を熱力学的に考察することも可能であろうが、ここでは、結晶化に関する話にとどめる。一般的に、分子構造の均一性が重要な結晶化の過程において、ドメイン間の揺らぎや運動性が高い領域は結晶化を妨げる要因の一つである。そのような点を考慮して、今回の結晶化では、TTD 中にあるフレキシブルなループ領域を欠失させた変異体を用いている。ヒストン結合やドメイン構造に影響しないことを確認した上でのことである。しかし、それほど大きくないとはいえ、TTD-PHD に内在的なドメイン間の揺らぎがあったことを考えると、今回の結晶化がうまくいったのは幸運だったのかもしれない。実際、結晶解析可能な良質の結晶を再現するのは難しかった。数少ないチャンスを逃さずうまく X 線回折データーを得たわけである。

今回の解析から、UHRF1 の二つのヒストン結合ドメインが、つかず、はなれずで、エピジェネティックコードを読み解いてい

ることがわかった (図 2)。近年、UHRF1 の場合と同様に、構造をもたないリンカー領域 (intrinsically disordered region) がアセチル化、リン酸化などの翻訳後修飾の受け皿となって、マルチドメインタンパク質の高次構造や分子会合の切り替え、"fine tuning" を実現している例が多数報告されている。このような状況を考えると、X 線結晶解析が不得意とする動的かつ過渡的な分子認識を含めた構造基盤研究が必須であり、X 線結晶解析とその弱点を相補する NMR、X 線小角散乱、電子顕微鏡等の手法の併用が常套手段となりつつあるのが構造生物学の現状である。本研究は、京都大学工学研究科 有田恭平助教、白川昌宏教授との共同研究である。

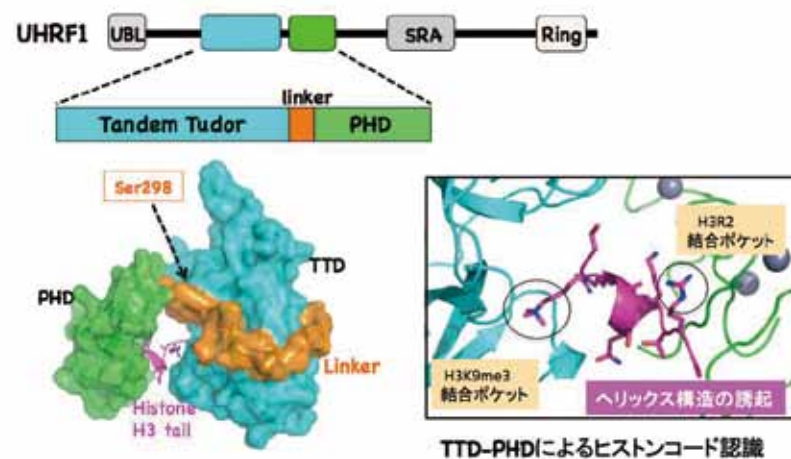


図 1 ヒストン H3N 末テールに結合した TTD-PHD の結晶構造

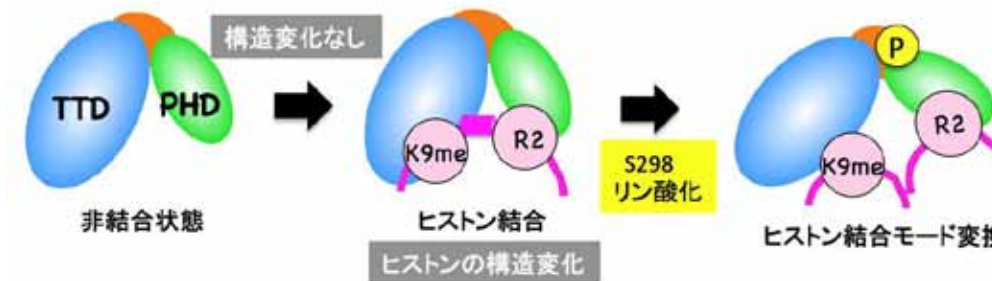


図 2 TTD-PHD による協調的なヒストン修飾認識機構

研究成果の紹介

Chp1 クロモドメインの核酸結合能はヘテロクロマチンサイレンシングに必要である

石田 真由美

理化学研究所
発生・再生科学総合研究センター
クロマチン動態研究チームIntrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing.
Ishida M, Shimojo H, Hayashi A, Kawaguchi R, Ohtani Y, Uegaki K, Nishimura Y, Nakayama J.
Mol Cell. 47: 228-241 (2012)

はじめに

ヘテロクロマチンとは、真核細胞の染色体に存在する高度に凝縮したクロマチン構造で、セントロメアやテロメアなどの染色体機能に重要なドメインである。ヘテロクロマチン領域では、ヒストン H3 の 9 番目のリジンがヒストンメチル基転移酵素 Suv39h（分裂酵母 Ctr4）によってメチル化され（H3K9me）、このメチル化修飾を標的とする HP1（分裂酵母 Swi6、Chp2）がクロモドメインを介して結合することで抑制的なクロマチン構造が形成されている¹⁾。一方分裂酵母には、他の生物種の RNAi 経路で中心的な役割を果たす因子のホモログが存在し、これらがセントロメアヘテロクロマチンのサイレンシングに関与している（図 1）²⁾。ヘテロクロマチンに存在する繰り返し配列は、RNA ポリメラーゼ II によって転写され、RDRC（RNA-directed RNA polymerase complex）によって二本鎖 RNA に変換される。これが、Dicer（分裂酵母 Dcr1）の働きによって短い二本鎖 siRNA に切断された後、Ago1 に取り込まれ一本鎖 siRNA へ変換される。クロモドメインタンパク質 Chp1 は、この一本鎖 siRNA を含む Ago1、Ago1 と Chp1 をつなぐ Tas3 とともに RNA-induced transcriptional silencing（RITS）複合体を形成する^{3, 4)}。この RITS 複合体のターゲットリングがきっかけとなって、Ctr4 による H3K9 のメチル化や Swi6 の結合が起こり、凝縮ヘテロクロマチン構造が形成される。RITS 複合体の標的領域へのリクルートには、Ago1 の持つ短い低分子干渉 RNA（siRNA）を介した新生転写産物への結合と、Chp1 のクロモドメイン（Chp1-CD）による H3K9me への結合の両方が関与していると考えられている。しかし、RNAi 機構とヘテロクロマチン形成の接点については不明な点が多く残されている。本研究では、RNAi 機構を介したヘテロクロマチン形成において中心的な役割を果たす Chp1 に着目して研究を行った。

1. Chp1 のクロモドメインは H3K9me だけでなく RNA にも結合する

Chp1 の中央領域には RNA 認識モチーフ（RRM）が存在する。電気泳動移動度シフトアッセイ（EMSA）の結果、全長の Chp1 タ

ンパク質が、ヘテロクロマチン領域に由来する RNA を含む種々の RNA に結合することがわかった。この RNA 結合に必要な Chp1 の領域を同定するため、各部分タンパク質を用いて EMSA を行ったところ、中央領域の RRM だけでなく、N 末端の CD も RNA 結合能を持つことが明らかになった。他のタンパク質のクロモドメインが RNA 結合能を有することはこれまでも報告があるが、メチル化ヒストンへの結合とどのように共役しているのかについてはほとんど解明されていない。Chp1-CD の RNA 結合能についてさらに詳細に調べたところ、38 番目のアスパラギン（N38）と 49 番目のトリプトファン（W49）・50 番目のチロシン（Y50）が重要な残基であることが判明した。RNA 結合能を失った変異型 Chp1-CD は、野生型 Chp1-CD と同様に H3K9me に結合できることから、Chp1-CD は RNA と H3K9me の両方を別々に認識し結合することが示唆された。

2. H3K9me 結合により Chp1-CD の RNA 結合能が促進され、DNA 結合能も獲得する

実際に Chp1-CD が RNA と H3K9me に同時に結合できるのかどうか、EMSA にペプチドを添加することで検討した。その結果、H3K9me ペプチド添加によって、Chp1-CD の RNA 結合が大きく変化し結合活性が促進されることを見出した。さらに驚いたことに、H3K9me と結合した Chp1-CD は、DNA にも強いアフィニティで結合できるようになることが明らかになった。この結果は、Chp1-CD が H3K9me と結合することで何らかの構造変化を起こし、その結果 Chp1-CD の核酸結合活性が大きく変化したものと考えられた。実際に NMR 実験によって RNA 結合に関わる Chp1-CD の領域を特定したところ、C-末端に存在する α -ヘリックス中の塩基性アミノ酸残基のクラスターが RNA/DNA への結合に関与していることが明らかになった。

3. Chp1-CD の核酸結合能は Chp1 の *in vivo* におけるサイレンシング機能に必要である

次に、Chp1-CD が有する核酸結合能が *in vivo* での Chp1 の機能にどのように寄与しているのかを確かめるため、サイレンシングアッ

セイによってその影響を調べた。野生型 *chp1*⁺ 遺伝子を、変異型 *chp1* 遺伝子に置き換えた分裂酵母株を作製し、セントロメアに挿入された *ura4*⁺ マーカー遺伝子の発現状態を調べることで、各変異によるヘテロクロマチンのサイレンシング状態を確認した。その結果、H3K9me に結合できない変異 Chp1 が部分的なサイレンシング機能を保持していること、RNA や DNA との結合に関わる残基に変異を導入することで、この部分的なサイレンシング機能が大きく損なわれることが分かった。以上の結果より、Chp1 のサイレンシング機能には CD による H3K9me への結合と RNA/DNA への結合の両方の性質が重要であることが示唆された。

4. クロモドメインの核酸結合能はクロモドメインタンパク質の機能分化に寄与する

RNAi 経路を介した分裂酵母のヘテロクロマチン形成には、Chp1 に加えて他に 3 つのクロモドメインタンパク質が関与している（図 1）。これらのタンパク質のクロモドメインは、Chp1-CD と異なり、単体で RNA に結合しない。しかし、Chp1-CD で見られたように、これらのクロモドメインも H3K9me に結合することにより核酸への結合能を示す可能性が考えられた。そこで、これら 3 つのタンパク質のクロモドメインを用いた RNA-EMSA にペプチドを加える実験を行った。すると、H3K9me ペプチド添加により、Ctr4-CD が RNA と DNA 両方に結合できることが明らかになった。興味深いことに、Ctr4-CD の C-末端の α -ヘリックスには Chp1-CD と同様に塩基性アミノ酸のクラスターが存在しており、変異による解析からこれらの残基が核酸結合に関与していること、また *in vivo* における Ctr4 の機能に関与していることが確認された。一方、Swi6-CD と Chp2-CD は H3K9me 存在下でもでも核酸結合能を示さず、クロモドメインの核酸結合能の有無やその性質が、各クロモドメインタンパク質の機能分化と役割分担に寄与している可能性が示唆された（図 2）。

おわりに

クロモドメインは進化的に良く保存されたドメインであり、HP1 を代表とする種々のクロマチン制御因子に見出される。その重要な役割としてメチル化ヒストンの認識と結合が明らかにされているが、一方で核酸への結合も示唆されており、それぞれの結合活性がどのように共役しているのかについてはほとんど解明されていなかった。本研究によって、Chp1-CD の持つユニークな核酸結合能の分子的・構造的詳細と、その活性が分裂酵母の RNAi 経路を介したヘテロクロマチン形成に重要な役割を果たす事を明らかにすることができた。また、クロモドメインの有する核酸結合能が、各クロモドメインタンパク質の機能分担に寄与していることも強く示唆された。一部の近縁種を除き、Chp1 の相同因子は他の真核生物には存在しない。しかし、今回明らかになったクロモドメインの核酸結合能は、他のクロモドメインタンパク質にも共通する性質である可能性が高い^{5, 6) 7)}。今後、核酸結合能を持つクロモドメインタンパク質の RNA サイレncing 機構における機能の解明が進むことにより、高次クロマチン構造の形成やセントロメアの進化、トランスポソンの抑制など、生物が持つ RNA サイレncing 機構を利用した細胞機能制御の更なる理解につながると期待される。

文献

- 1) Nakayama, J., et al. *Science*, 292, 110-113 (2001)
- 2) Volpe, T. A., et al. *Science*, 297, 1833-1837 (2002)
- 3) Verdel, A., et al. *Science*, 303, 672-676 (2004)
- 4) Partridge, J. F., et al. *Mol Cell*, 26, 593-602 (2007)
- 5) Bernstein E., et al. *Mol Cell Biol*, 26, 2560-2569 (2006)
- 6) Shimojo, H., et al. *J Mol Biol*, 378, 987-1001 (2008)
- 7) Keller, C., et al. *Mol Cell*, 47, 215-227 (2012)

（本原稿は 2012 年 7 月 10 日に新着論文レビューで紹介された記事下
に改編、転載したものです）

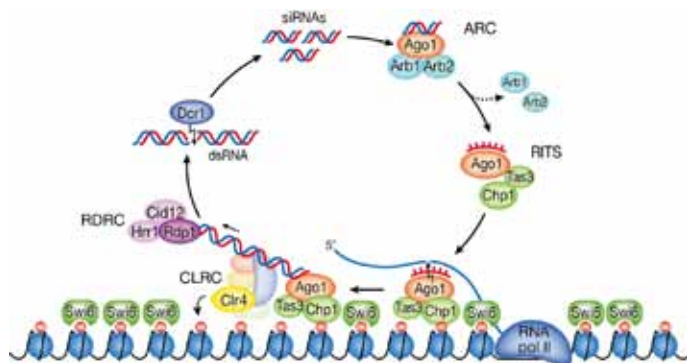


図 1 分裂酵母における RNAi 機構を介したヘテロクロマチン構造形成のモデル

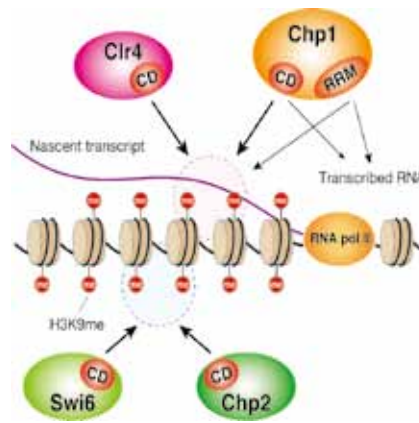


図 2 ヘテロクロマチン形成に寄与する 4 つのクロモドメインタンパク質（Chp1, Chp1, Ctr4, Swi6）の核酸結合能との機能分担



この論文で無事に学位を取得できました

学会見聞録 1 真夏の次世代シーケンサー講習会

加納 豊 財団法人東京医学総合研究所 ゲノム医科学研究分野

夏のまっただ中、東京大学の太田研究室で開催された次世代シーケンサーの講習会に参加させていただきました。これまで、多くの生物でゲノム配列が決定され、その情報を用いて研究が進められてきていますが、昨今、研究者がこれらの膨大なデータを有効活用できるツールとして次世代シーケンサーが台頭してきています。数年前まではマイクロアレイなどが全ゲノムを解析できるツールとして主流でしたが、目的のそれぞれの生物毎にマイクロアレイを準備し研究を行うことが必要でした。しかし、次世代シーケンサーはゲノムデータベースが存在すれば様々な生物で、すぐさま利用可能であり、そのアプリケーションも様々であり、また、アイデアによってはもっと色々できる強力な研究ツールです。

今回の講習で実演していただいたのは、イルミナ社製の MiSeq という次世代シーケンサーであり、一度に 10 億塩基対 (1Gbp) を読めるもので、酵母ぐらいの解析には十分な量が読めるものでした。近々にされるパフォーマンスの向上により一度に読める量が約 7 Gb になり、哺乳類の解析にも十分利用できるパフォーマンスを持つことになるとの話です。今回の実演で使用されるサンプルは出芽酵母の ChIP (クロマチン免疫沈降) の解析でしたが、データを得るまでの過程は、「拍子抜けするほど簡単すぎる」が率直な感想でした。そのサンプル調整は ChIP された DNA を目的のサイズに剪断するソニケーター（これだけで 700-800 万もする機械であるのがお驚きである）により DNA サイズを整え、さらに AMPure XP beads というマグネットビーズを用いて目的サイズの DNA を回収する。こころの操作は、マグネットビーズを ChIP や免疫沈降などに使用されている方々にとってはお手の物ではないでしょうか。次に、DNA 末端にキット化されたインデックス配列を付加します。この操作により、いくつ

ものサンプルを同時にシークセンサーで読んだとしても、解析の段階で付加されたインデックスの配列情報をもとに異なるサンプル由来であることが判別することが出来ます。PCR で増幅後、再度 AMPure XP beads を用いておよそ 275bp の DNA を回収し、最後に濃度を整えて MiSeq のカートリッジに注入して準備は完了でした。あとは機械の指示に従って、ほぼ NEXT, NEXT,... の連続でシーケンスは開始される。今回のサンプルはリード長もそんなに長くなかったので大体 6 時間で完了するとのことでした。これらのデータは、イルミナのクラウド上にも保存され、共同研究者とのデータのやり取りもできることは、便利であると感じられました。

一方で、読み出されたデータを解析する方は、これまで私も含めて実験ばかりの研究者にはハードルが高いかもしれないと思いました。今回は UNIX ベースで解析をする過程をプレゼンテーションしていただきましたが、いくつかの公開されているプログラムを用いて、プログラムを走らせて行くわけですが、普段、我々が使用しているアプリケーションのようなユーザーインターフェースではなく、ほとんどすべてコマンドラインでコマンドを入力していくものでした。この時点で、拒絶反応を示してしまう方も出てくるのではないのでしょうか。しかし、実際は少しコマンドを覚えれば、やることは同じなので意外とスムーズに進むのではないかと思います。しかし、決まったプ



ログラムを走らせているだけでは、論文の投稿後のレビューアからの無理難題に対応することは、データ処理の素人にとっては、かなり困難になる可能性も高いかもしれません。現状では、生物情報学者と連携しこれらの無理難題に取り組んで行く方が無難ではないかと思えます。また、これらの問題に対して有志の研究者によって提供された解析を補助してくれるツールがイルミナ社のクラウド上に用意されており、使用料を払うことにより使うことができます（無料のものもある）。また、本気で解析を目指すのであれば、有料ではあるが、今回の講習会で紹介いただいたバイオインフォマティクス研究支援を行っているアメリエフ株式会社の講習会等に参加して学ぶのもよいのかもしれないでしょう。

以上のように、私的には解析の方にやや壁を感じましたが、実験自体は簡便でかなりハードルが低い手法になってきた感がありました。また、普及するに従って価格も抑えられてきており、皆さんもアイデアがあれば色々活用できるのではないかと思います。

最後に、講習会のみならず懇親会において、班員である先生や学生の方々と研究のここのみならず色々とお話をできたことも、良い経験でした。また、忙しい中、本講習会の準備および実演進行をしていただいた太田研の久郷さんと村さんに、この場を借りてお礼を申し上げます。ありがとうございました。

学会見聞録 2 次世代シーケンサー講習会に参加して

坂 琢人 大阪大学蛋白質研究所 生命維持情報ネットワーク研究グループ

ロンドンオリンピックが終わり、暑さがより増した 2012 年 8 月の 22 日から 24 日にかけて、東京大学大学院総合文化研究科の太田邦史先生が世話人として、東京大学駒場キャンパスにて開催された次世代シーケンサーの講習会に参加させていただきました。この講習会が開催されることを知らされた際、自分の研究内容に関わると考えたことや最先端の技術に対する興味から、学生という身分ではありますが参加を希望しました。その講習会のご報告をさせていただきたいと思えます。1 日目の 8 月 22 日は、シーケンサーの置かれている実験室にてプロトコルを見ながら ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)-seq の実際の操作を見学させていただきました。今回見せていただいたのは、ChIP を行ったサンプルの調製とフローセルにサンプルを流してシーケンサーにかけるところでした。私は次世代シーケンサーに関する知識に乏しかったため、事前にその原理や操作などに関した文献を読みましたが、どの様な実験に用いることができるのかわからず、具体的な操作のイメージができませんでした。そのため、実際の操作を見学させていただいて、その操作手順の意味をひとつずつ確かめることができました。実験操作自体は普段行っている実験と比



べても特別難しい操作はなかったように感じたので講習会以前に持っていたイメージとは違っていたのが印象的でした。サンプル調製の際の待ち時間にはキャンパス見学もさせていただきました。一つのキャンパスに駒場寮の跡地や講堂のパイプオルガンなどを残す、歴史を感じる趣深い校舎とガラス張りの最新の建物が混在したそのキャンパスから東京大学の歴史を感じることができました。2 日目の午前は、次世代シーケンサー MiSeq の illumina 社の方によるセミナーで次世代シーケンサーの基本原則や使用機材やキット、それらに関わる論文の紹介がなされました。事前に読んだ文献よりもわかりやすい説明で、従来のシーケンサーを使用する際に別々に行っていた PCR による DNA 増幅、シーケンス、データ解析をひとつにまとめて行うことで、より早い解析が行うことができるということがわかりました。

午後からは、ChIP-seq に関するセミナーと 1 日目にシーケンサーにかけたサンプルのデータを使った実際のデータ解析を見せていただきました。セミナーでは ChIP-seq を選択する意義が話され、これまでのタイリングアレイを用いた ChIP-chip 法で



は、repetitive な部分の解析ができなかったのに対し、ChIP-seq は配列情報さえあればそれが可能であることがわかりました。私たちの研究室ではテロミア領域の研究を行っているため、ChIP-seq のこうした利点は大変有用なことであり、今後の研究に対する視野をさらに広げてくれるものでした。しかし、解析の精度がサンプルの質に左右される課題点もあるため、実際に使用する際にはその対策を講じなければならないと思いました。

最終日の 3 日目には、次世代シーケンサーなどのデータの受託解析を行うアメリエフ社の方による、次世代シーケンサーのデータ解析に関するセミナーを聴講させていただきました。実際の解析操作を見学させていただいたあとだったので説明が分かりやすく、また前日の解析操作で分かりにくかった部分を補完できました。これまで、シーケンサーの解析は高性能なコンピュータを使って行わなければならないイメージを持っていましたが、それがノートパソコンでできることに驚き、こうした技術の発展と進化が感じられました。

全 3 日間の講習会を通して次世代シーケンサーに対する見識を深めることができ、講習会に参加された先生方から懇親会などで非常に興味深いお話を聞かせていただいたことができたことは、普段では決して得ることのできない貴重な体験だったと思います。自分の行っている研究において、実際に次世代シーケンサーを使うことができるかはわかりませんが、あるタンパク質やそれと相互作用するであろうと考えられるタンパク質の局在やそれに関わる染色体の修飾などを調べるのにこの講習会で得たことを使っていききたいと思います。

最後に、この講習会の準備や進行などをしていただいた太田邦史先生と太田先生の研究室の方々にこの場を借りて深く感謝したいと思います。拙い文章ではありましたが、最後までご覧いただきありがとうございました。



新学術領域「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」 第三回領域会議に参加して

筒井 康博 東京工業大学大学院生命理工学研究科

第三回非コード DNA 領域会議は、盛夏真っ只中の 2012 年 7 月 25 日～27 日の 3 日間の日程で、御殿場高原「ホテル時之栖」にて開催された。今回は公募班員が初めて参加する領域会議であった。会議冒頭に、領域代表である小林武彦先生から開会の挨拶と領域の概要について説明があり、続いて、計画・公募班員の発表が行われた。一人あたり発表・質疑で計 25 分の持ち時間であったが、どの発表者も発表時間の 15 分を最大限活用して興味深いデータを数多く示されており、そのレベルの高さに初日から最終日まで圧倒された。個別の内容には触れないが、バクテリアからヒトまで様々なモデル生物を用いて、クロマチン構造制御、DNA 複製・修復・組換えや染色体分配などを解析されており、染色体維持に重要な諸現象がほぼ全てカバーされていた。また、非コード DNA 配列のバイオインフォマティクスもあり、生化学・遺伝学・細胞生物学といった従来から染色体機能で解析に用いられていた分野に加えて、構造生物学、集団遺伝学、情報学といった分野からアプローチされている研究が多い点が特に興味深かった。これを機会に私自身も今まで馴染みのなかった解析手法や考え方を積極的に取り入れ

ていきたいと感じた。一方、発表後の質疑に関しても、時間を超過するほどの活発な議論が交わされていた。ある評価委員の先生が「（自分が）聞きたいと思ったことを誰かが質問してくれる」という趣旨のコメントを懇親会で話されていたことからその質疑の充実ぶりが窺えよう。多岐にわたる専門分野の班員と、こうした濃密な情報交換ができるという点も本領域会議のメリットであり、改めて班員に加えていただいた有難味を噛みしめている。会議は 3 日間あったが、初日と二日目の夜にはフリーディスカッションの時間が設けられ、自己紹介や（恒例になりそうな？）カラオケなどを通して、班員同士のさらなる交流が図られた。自己紹介では、他の班員との関係がキーワードとなり、普段聞けないような貴重な話を伺えた。会議の最後に、小林代表から再度挨拶があり、その中で公募班員を含めた研究組織が示された。研究組織は研究内容から 4 つの階層：非コード配列の解析、非コード構造の解析、それらのネットワーク解析、そして、病態解析から構成されているが、今回の領域会議で班員の発表を直接聞いてみて、非常に合目的な配置となっていることを実感した。同時に、階

層内・階層間での連携が既に広がりつつあることも垣間見ることができたが、その原動力の 1 つは技術的基盤として整備されているテクノロジーハブである。今年度は人工染色体 (HAC) 講習会と次世代シーケンサー講習会が開催されており、今後こうしたハブを介した様々なネットワークが構築されていくであろう。また、ウェット系の実験に軸足を置いた研究者にとって敷居の高い、大規模・網羅的なデータの情報学的解析に関してもサポート体制が用意されている。このような様々な専門性をもった班員を積極的に活用した支援体制によって組織連携がより一層深まることで、本領域のゴールである非コード DNA 領域による染色体制御機構の全容解明が加速的に近づくものと思われる。私自身もこの 2 年間で少しでも貢献できるよう邁進していきたい。最後になりましたが、会議の準備・運営にご尽力頂いた太田邦史先生・山田貴富先生を始め太田研究室の皆様がこの場をお借りしてお礼を申し上げます。また、このような機会を与えて下さった中山潤一先生にも感謝致します。



山の畑通信 1 「名古屋考」

中山 潤一 名古屋市立大学システム自然科学研究科

本来班員の他の先生にコラムをお願いすべきところですが、先に自分で何も書かずにお願いするのは恐縮なので今回は自分で書くことにしました。毒にも薬にもならない駄文でそれもまた恐縮ですが、次号から皆さんにコラム寄稿をお願いしますので、ご協力よろしくをお願いします。

10 年間世話になった研究所での任期終了に伴い、この春から名古屋市立大学に異動し早いものでもう半年が経過しました。関東で育ち、横浜のはずれで大学院時代を過ごし、ニューヨーク、京都、神戸と根無し草のように渡り歩き、名古屋まで来たことになります。今回名古屋に初めて住む住人の視点から名古屋について文章を書かせてもらいたいと思います。あらかじめお断りさせていただきますが、これはあくまでも私見です。もっと名古屋を良く知る先生からのご意見、ご批判につきましては喜んで拝受させていただきたいと思っています。

1. 車社会

名古屋に来て最初に感じた印象はこれです。もちろん名古屋は広いので市内と郊外では違いがあるかも知れませんが、概して道路は広く車での移動や運転がとてもしやすい。県庁、市役所のある中心地域は片側が 4 車線や 5 車線もあったりします。個人が車で移動するのがあたりまえの社会として、何となくアメリカ的な印象を受けます。高速道路も良く整備され、東名、名神、中央道、北陸道などそれぞれの方面にほとんど渋滞なくスムーズに出られるので、この点とても便利に感じます。車社会としての良い面もありますが、反面マイナスに感じる点もあります。例えば路線バスの本数が少ない印象があります（京都や神戸と比較して）。

例えば私の職場から自宅まで行くバスは、市内でありながら夜の 8 時台には 1 本しかありません。もちろんバスの本数が少ないのは利用者が少ないというのが主な要因でしょう。また、名古屋市は地下鉄が整備されているというのも理由の一つかと思います。いずれにしても個人が車を利用して移動しても、周辺で大きな渋滞にならない適度な利用者密度のバランスが名古屋にはあるように思われます。もう一つ感じるマイナス面は車のマナーについてです。運転について関西では運転が荒いという声をよく聞きますが、例えば信号機が黄色から赤に変わっても交差点に入ってくる車は名古屋でもずいぶん頻繁に目にします。また自動車の盗難件数で愛知県は日本のワースト 1 位だそうです。名古屋は日本の車産業を支えるトヨタのお膝元ですから、車中心の社会というのは経済面から見てもとても良いことだと思いますが、その車社会に伴うマイナス面は改善できれば良いと思います。

2. お値打ち

この「お値打ち」という言葉、名古屋では頻繁に耳にします。実際に関東や関西ではあまり耳にすることはなかったように思います。同じ意味に相当する言葉として、「お買い得」というのが使われているかもしれません。これが名古屋に限定的な表現なのか詳しく調べたわけではありませんが、名古屋在住の人はこれが独特な表現だとはあまり自覚していないように見えます。「名古屋人は見栄っ張りだから安いものを買っているという直接的な印象を和らげているのでは」、と分析してくれた友人もいましたが、実際はどうか、誰か詳しく知っている人がいたら教えて下さい。

3. 八丁味噌

味噌カツ、味噌煮込みうどん、味噌ではないですが塩やコショウの効いた手羽先と、名古屋は濃い味の食べ物が多いです。ひつまぶしはまだ名古屋に来てから食べていません。うなぎの値段の高騰が理由です。もちろんそれぞれ人の好みがありますので、ここで味噌味の良し悪しを議論するつもりはありません。ただ個人的な感想を言わせていただければ、味噌煮込みうどん、もっと煮込んで欲しいです。

4. モーニング

午前中 11 時前までに喫茶店に入ってコーヒーを頼むと、パンやゆで卵が「サービス」でついてきます。どの喫茶店でも大体似たような感じですが、コーヒーの味ではなくサービスの部分を競っているような風潮があります。またパンにつけるものとして「小倉あん」を追加で注文できたりしますが、これはまだ試みたことはありません。多分「あんパン」と同じ味だと思われる。

5. 字（あざ）

地名に字（あざ）がつくものを良く目にします。例えば大学の住所は「字山の畑 1」となっていたりします。字がつくのはかなり田舎の地名という印象があったので、市街地なのに字がつくのは意外に感じました。昔からの地名を残すという意味合いがあるのかもしれませんが、そもそも「字」を取ってしまって地名として不具合があるのかどうか良く分かりません。郵便番号検索ではこの「字」が省略されていたり、逆に入力したくてもできなかったりします。なぜ「字」がここに残っているのか、これも誰か事情に詳しい方がいたら教えてもらいたいと思います。

次ページへつづく

6. 丸八（まるはち）

このマーク、名古屋市の至る所で見ることができます。例えば、市バス、地下鉄、マンホール、ゴミ袋、近くのお寿司屋さんの看板まで。しばらく名古屋市でなぜ「八」なのかさっぱり分かりませんでした。調べて見たらこれは名古屋市の市章で、そもそものは尾張藩の合印（戦場で敵と味方の区別をするために兜や馬具の一部につけた印）だったそうです。このあたり、徳川家に由来する歴史を感じます。歴史と言えばご存じの方も多いと思いますが、名古屋には「おもてなし武将隊」なるPR 部隊が存在します。残念ながら実物は見たことはないですが、戦国武将ブーム？の先駆けとしてとても活躍しているようです。



7. めえき

名古屋の方は名古屋駅のことをこう呼びます。最初耳にしたときなんて不思議な略し方だろうと「むずかゆい」感じがしました。が、半年経った今自分でも普通に口にし、もはや違和感はありません。慣れとは恐ろしいものです。

8. 大学

日本に帰国してからほとんど研究所にいたので、大学では日々新しい発見があります。大学と言っても国立大学ではなく公立大学なので、その点でもずいぶん違いがあるようです。そもそものが「市民のための大学」ということ、恥ずかしながら赴任するまで深く自覚していませんでした。例えば名古屋市在住の人は大学入学金の優遇制度があります（10万円くらい安い）。また大学の新学部設置や新校舎の建設計画には、市の意向が反映されたりするそうです。大学の運営に市が大きな力を持っているという点、なかなか興味深いところです。つまるところ市が潤えば大学も潤い、私たちのいる研究科もそのおこ

ぼれにあずかって新しい校舎に移れる日が来るかもしれません。市が潤うにはどうすれば良いか？今の市長で増税は無理ですが、名古屋市を拠点とする産業がどんどん業績を伸ばし、法人税をたくさん納めてくれればきっと市も潤うはずです。残念ながらトヨタの拠点は豊田市であって名古屋市ではないそうですが、関連企業が沢山ありますからやっぱり車産業です。トヨタの好業績のニュースを聞くと何となく嬉しくなり、交差点のプリウスを見る目も優しくなります。まあ、車がどんどん売れて個人がもっと車を利用するようになると、私が普段乗っているバスの本数、今後減ることはあっても増えることはなさそうです。



名古屋市立大学山の畑キャンパス内の「八高古墳」の一部
(名前の由来はまた次回紹介します)

新学術領域研究「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」今後の予定

2013 年	2 月	第 4 回領域会議（担当：梶川）
	8 月	国際シンポジウム「インターメアと進化」 （担当：印南・梶川・小林）
	8 月 11 月	第 5 回領域会議（担当：印南） 国内ワークショップ「インターメアによる染色体制御機構」 （担当：太田・菱田）
2014 年	1 月	第 6 回領域会議（担当：菱田）
	2 月	市民公開講座「ゲノムの調べ」（担当：小林・須賀・有吉）
	4 月	第 2 期公募班員の決定
	7 月	第 7 回領域会議（担当：舩本）
2015 年	2 月	第 8 回領域会議（担当：加納）
	7 月	国際シンポジウム「インターメアによる染色体制御機構」 （担当：中山・高田・加納）
	7 月	第 9 回領域会議（担当：中山）
2016 年	3 月	終了国内シンポジウム「インターメアによる染色体制御機構」 （担当：小林）
	3 月	第 10 回領域会議（担当：小林）

（実施月は目安）

編集後記

これまでのニュースレターでは班員の研究紹介で紙面を埋めることができましたが、この第3号からは真面目に原稿集めをしなくてはなりません。幸い本新学術領域の研究として順調に業績が出てきつつあり、しかも班員の皆さんが研究成果の紹介記事を喜んで引き受けて下さいましたので、スムーズにこのニュースレターの原稿を集めることができました。協力していただいた皆さんにはこの場を借りて感謝したいと思います。以前特定領域でコラムを担当していた関係で、私の方でも何か挿絵など協力できないかと思い、最初に頂いた加納先生原稿に添えるべく「トンネルから見た出口」をイメージしたイラストを描いてみました。それなりに良くできたと思いましたが、後で送っていただいた加納ラボのお祝いの明るい様子が圧倒されボツにしました。ただ折角描いたのに勿体ないかと、全く関係ない編集後記に添えさせていただきました。なかなか悪くない出来だと思うのですが・・・（JN）

