

【領域番号】 3305	【領域略称名】 非コードDNA
【領域代表者（所属）】 小林 武彦（国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授）	
<p>本領域が目標としているのは染色体の機能維持に働く非コードDNA領域の機能の解明である。また当班が応募時に研究領域として設定した研究の対象は以下の2つである。</p> <p>(2)異なる研究分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により、当該研究領域の発展を目指すもの。</p> <p>(3)多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により、当該研究領域の新たな展開を目指すもの。</p> <p>それぞれに該当する進展状況については（対象2）、（対象3）とし、下の文中に下線で示す。また各班の「設定目標」は領域調書に書いた内容となっており、大きな変更はない。</p> <p><b>研究計画ア rDNAの不安定性が染色体及び細胞機能に与える影響</b>  <b>研究代表者：小林 武彦（国立遺伝学研究所・教授・分子遺伝学）</b></p> <p>リボソームRNA反復遺伝子(rDNA)は大きな非コードDNA領域を含む巨大反復配列である。出芽酵母ではリピート数を2コピーまで減らして配列を操作し、その後コピーを増幅させることですべてのコピーに特定の変異を導入することが可能で、非コードDNA領域の解析には大変有利である。次の3つを目標として、それぞれ予定通りに進展している。</p> <p>1)rDNAの安定性に関わる因子の網羅的解析:酵母の遺伝子欠損ライブラリー(4800株)の全株のrDNAの安定性を調べ、それに関わる遺伝子を網羅的に同定しデータベース化した(論文作成中)。結果として約500株のrDNA不安定株を単離し現在グループ分けを行っている。</p> <p>2)rDNAの安定化機構の解析:1)の結果から4つの代表的な変異株を解析中。そのうちの1つRTT109変異株については、非コードDNAのヒストン修飾の変化が組換えの異常を引き起こしていることを解明した(Plos Genet, 2013)。共同研究としては1)の情報を元に中山班がクロマチン関連の変異株を分裂酵母で、高田班が複製フォークの維持に関わる変異株を動物細胞でそれぞれ解析中である(対象3)。また印南班と連携して比較ゲノム解析により動物細胞のrDNAの安定性に関わる配列を抽出中である(対象2)。</p> <p>3)rDNAの安定性の変化が細胞機能に及ぼす影響の解析:1)の結果等を踏まえて動物細胞でノックダウンを行っている。既に6ヶの遺伝子を解析し、うち3つ(TTF1、Tim、Tipin)については複製フォークの進行に異常を引き起こしていることを見いだした(投稿準備中)。また酵母でrDNAの安定性を自由に改変できる系を確立し、rDNAの不安定性が細胞老化を引き起こすこと、また非コードDNAからの転写活性がその不安定化を調整していることを発見し、現在論文を投稿中である。</p> <p><b>研究計画イ 非コードDNA領域によるゲノムDNA再編成制御機構</b>  <b>研究代表者：太田 邦史（東京大学大学院総合文化研究科・教授・分子細胞生物学）</b>  <b>研究分担者：加藤 由起（東京工業大学大学院生命理工学研究科・助教・生物情報学）</b></p> <p>真核細胞のゲノムDNAは変動しながら維持される。ゲノムDNA再編成を制御する非コードDNA領域の機能を、クロマチン構造、反復配列、非コードRNA転写の観点から、全ゲノムの・構成的手法を活用して解明する。次の2つを目標として計画研究はほぼ予定通り進捗し、予想外の発見も得られつつある。</p> <p>1)非コード配列のDNA解析ツールや次世代シーケンサーを用いた方法論の確立：  2)組換えに関わる非コードDNA配列、それに付随するタンパク質、ヒストン修飾パターンの同定：  <u>集団遺伝学の専門家である印南班と共同で、分裂酵母と出芽酵母の減数分裂期組換えホットスポット、姉妹染色分体接着部位のDNA配列を解析し、データベース化した(対象2)。</u>また、次世代シーケン</p>	

サーから得られる非コード DNA 配列データを解析するツールを開発し、パイプライン化することで、解析のスピードが大幅に向上した。次世代シーケンサーを用いた ChIP-Seq、RNA-Seq、ゲノム・リシークエンス解析のウェット/ドライ解析系を全て内製化・標準化した。これにより新規組換え調節因子「リエゾニン」同定や組換えホットスポットのヒストンコード解読に至った(Mol. Cell, 2012: NAR, 2013)。分担者の加藤らにより、次世代シーケンサーを用いた少数細胞に関する正確な解析系を開発し、インビトロ転写法で鋳型核酸を増幅してから PCR を行うことで、数千個レベルの細胞から正確なデータを入手することに成功した。

以上の実験系構築の進捗により、現在多数の解析、領域内の共同研究が進行中である（対象3）。

#### 研究計画ウ 集団遺伝学理論と比較ゲノムによる非コード DNA 領域の進化メカニズム

研究代表者：印南 秀樹（総合研究大学院大学先導科学研究科・准教授・集団遺伝学）

本研究では、非コード領域を支配する進化メカニズムを解明する。具体的には、非コード領域にどのような自然選択の力が働き、どのような過程で進化してきたかを明らかにする。アプローチは、理論的なものから、データベース由来のゲノムデータ解析、さらには独自のゲノム配列決定まで、他班と共同で幅広く行う。研究は、以下の3つの目標に対して、ほぼ予定通りに進展している。

1) 分裂酵母の集団遺伝学的解析：多数の野生由来の同種のゲノムを比較すると、ゲノムの個々の領域でまったく違う塩基多型 (SNPs) パターンを観察することが出来る。これは、それぞれの領域に異なった方向性の自然選択が、異なった強さで働いているからである。自然選択は、その領域の機能と深い関わりがあり、塩基多型パターンを解析することによって、分子生物学とは独立な視点から重要な働きをしている領域の「候補」を同定することが出来る。候補領域は、その興味の対象に基づいて、他班に転送され、それぞれの研究室で新しい実験プロジェクトの研究対象となりうる。このように、本研究はdata-drivenのスタイルで行うことになり、将来的に非常に広範囲な研究展開が開けることが期待される。現在までのところ中山班、小林班、太田班と共同で、分裂酵母の38の野生株の全ゲノム塩基配列を次世代シーケンサーで決定した。このデータをもとに集団遺伝学的解析、および比較ゲノム解析を行うことによって、特別な機能を持ちそうな配列の同定、およびそれらの領域における進化的背景の推定を行う（対象3）。

2) 基礎的な進化モデルの理論的解析：非コードを対象とした進化モデルの構築を行っている。例えば、セントロメアを介した種分化のモデル解析は、モデル構築後、舛本班と共同でヒトのセントロメア配列進化に応用している（投稿準備中）（対象2）。その他にも、コピー数変異に関する集団遺伝学的理論、次世代シーケンサーの配列データ解析アルゴリズムの開発などを行った。

3) データベース由来のゲノムデータの進化的解析：NCBIなどのデータベースにあるデータを解析することによって、非コード領域に働く進化的な力の働きを解明した。

#### 研究計画エ 染色体維持におけるヘテロクロマチンの機能

研究代表者：中山 潤一（名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科・准教授・分子生物学）

分担者：有吉眞理子（京都大学物質-細胞システム拠点・特任准教授・構造生物学）

分担者：須賀 則之（明星大学理工学部・准教授・生化学）

本計画研究では、非コード DNA 上にどのように高次クロマチン構造が形成されるのか、その分子機構を明らかにする。以下3つを目標に対して、ほぼ予定通りに進展している。

1) ヘテロクロマチンが反復配列を制御する仕組みの解明：現在までに分裂酵母の巨大反復配列 (rDNA) の動態をモニターできる系を構築し、その安定性を制御する因子の同定を進めている。また、分裂酵母のヘテロクロマチン化を制御する、RNAi 経路の詳細な分子メカニズムを明らかにし報告した (Mol Cell, 2012: PNAS, 2012: Genes Dev, 2012)。さらに、集団遺伝学を専門とする印南班員との共同研究として、次世代シーケンサーを活用した分裂酵母の比較ゲノム解析による非コード DNA の解明を進めている（対象2）。

2) ヘテロクロマチン化の構造基盤の解明：構造生物学を専門とする有吉班員、ヌクレオソーム生化学を専門とする須賀班員との密接な連携の下、HP1 の構造学的な解析を進め、現在までに HP1 のリン酸化がメチル化ヒストンの結合を制御していること、HP1 がメチル化ヒストン非依存的なクロマチン

結合を示すことなどを明らかにしている（対象2、3）。

**3) ヘテロクロマチンの動態制御の解明：**HP1 のリン酸化修飾の制御に着目し、HP1 のリン酸化酵素を同定するとともに、リン酸化によってHP1 のヌクレオソーム結合能が変化することを明らかにしており、それぞれ順調に成果が得られている。

#### 研究計画オ レトロトランスポゾンがもたらす非コード DNA 領域のクロマチン構造変化

研究代表者：梶川 正樹（東京工業大学大学院生命理工学研究科・講師・分子生物学）

高等真核生物の非コード DNA 領域のかなりの部分はレトロトランスポゾンで構成されている。本研究計画の設定目的は、このレトロトランスポゾン配列のエピゲノム情報（クロマチン構造や DNA メチル化）が時空間的にどのように制御されているのか明らかにし、レトロトランスポゾンが非コード DNA 領域の機能やその成り立ちにどのような影響を及ぼしているのか解明することである。次の2つを目標として計画研究はほぼ予定通り進展している。

##### 1) レトロトランスポゾンの新規増幅とクロマチン構造変化

レトロトランスポゾン（LINE および SINE）をゼブラフィッシュ生体内で人工的に転移させる実験系の構築に成功した(投稿準備中)。本実験系を用いて新規転移させた LINE が、転移後すぐに抑制性のヒストン修飾を受けることを明らかにした。一方、新規転移 LINE の DNA メチル化の程度は、転移後すぐでは高くないことを明らかにした。また、ゲノム DNA 上に既に存在する LINE についても解析を行い、ヒストン修飾や DNA メチル化のパターンが LINE の種類に依存して異なることを発見した。これは、レトロトランスポゾンの非コード DNA 領域に及ぼす影響が、レトロトランスポゾンの種類により異なることを示唆する。また、クロマチン構造解析の専門である須賀班員との共同研究で、SINE 配列のクロマチン構造解析が進行中である。加えて、タンパク質構造解析の専門である有吉班員との共同研究で、LINE タンパク質の構造解析が進行中である（対象2、3）。

##### 2) レトロトランスポゾンクロマチン構造の時空間的制御：

新規転移 LINE を持つゼブラフィッシュを飼育し、様々な発生時期・組織のサンプリングが進行中である。また、新規転移 LINE を受け継いだ第二世代のゼブラフィッシュの作出も進行中である。

#### 計画研究カ 非コード DNA 領域が果たす DNA 損傷ストレス耐性機能

研究代表者：菱田 卓（学習院大学大学院自然科学研究科生命科学専攻・教授・分子遺伝学）

環境レベルの紫外線照射下で染色体上に散在する非コード DNA 領域に生じた変異が染色体や細胞機能に及ぼす影響について解析する。さらに、それらの情報を統合して染色体維持機構に関わる DNA 配列及びクロマチン構造を明らかにする。また、変異の頻度と非コード DNA 領域の特徴を調べ、非コード DNA 領域の持つ DNA 損傷ストレス耐性の実体を明らかにする。以下の2つの研究目標を設定し、予定通り進捗している。

**1) 慢性的な低レベル紫外線ストレスによるゲノム不安定性の誘発及び防御メカニズムの解明：**これまでに、レポーター遺伝子を用いた変異スペクトラム解析が終了しており、新規の変異誘発メカニズムの発見及び、慢性低レベル紫外線特異的な突然変異誘発のメカニズムの解明を行った（NAR, 2012）。太田班との共同研究により、本実験系を用いた全ゲノム変異解析の計画が進行中である（対象3）。さらに、分子遺伝学的手法を用いたスクリーニングによって、DNA 損傷ストレスに対して抵抗性を獲得するユニークなヒストン H3 及び H4 変異体を同定した。これらのヒストン変異の解析から、損傷ストレス耐性の獲得に重要なクロマチン構造に関する知見が得られることが期待できる。

**2) 非コード領域の安定性が DNA 損傷耐性機構に及ぼす影響の解析：**染色体の倍数性によって DNA 損傷に対する感受性が変動する変異株を複数同定することに成功している。これらの変異株は、いずれも反復配列の不安定性を引き起こすことから、非コード配列の不安定性と染色体倍数性との関連を明らかにする1つの重要な知見である。微生物を使った顕微鏡イメージングに実績のある仁木班との共同研究により、大腸菌を用いた DNA 二重鎖切断のイメージング解析が進行中であり、現在までに、生細胞イメージングによる DNA 二重鎖切断に伴う核様体断片化の可視化に成功している（対象2）。（論文投稿中）

## 研究計画キ セントロメア構成因子によるクロマチンネットワークの解析

研究代表者：舛本 寛（かずさ DNA 研究所・室長・染色体工学）

哺乳類セントロメアの形成機構と、その機能不活性化に関わるヘテロクロマチンの形成機構、染色体の他の領域との機能連係による染色体維持機構への関わりについて人工染色体 tetO/tetR システムを用いて解析する。以下の3つの目標を設定し現在順調に進行している。

1) セントロメア機能構成因子の集合メカニズムの解明: 人工染色体上の tetO 部位へ100種以上の tetR-融合タンパク質を結合させ、セントロメアクロマチン (CENP-A) の増加/減少を定量化した。CENP-A 集合を能動的に促進する (多くのキネトコア関連因子群)、受動的に促進する (クロマチン集合関連因子群)、抑制する (ヘテロクロマチン関連因子群) の各因子群を同定した。今後は他の機能装置に共通する因子の関与を含めセントロメア集合機構とその抑制反応についての詳細な筋道を解明する。

2) 構成的手法によるクロマチンネットワーク解析: tetO 配列を含む合成反復 DNA の宿主染色体異所的挿入部位 (セントロメアとしては不活性化されている) へ、順次 tetR 融合セントロメア構成因子を結合させ、セントロメア構造を部分的に細胞内再構成した。顕微鏡下でこの部位へ集合する相互作用因子をスクリーニングした結果、ヒストン交換やヘテロクロマチンに関連する因子や、転写、組換え、DNA 損傷修復などの他の染色体機能に係る因子が次々に同定されてきた (Ohzeki et al. 2012 に一部発表)。セントロメアとヘテロクロマチンを連係させる因子の解明については中山班と共同研究を進めている (対象3)。セントロメアと組換え、DNA 損傷修復関連因子との関わりについては高田班との共同研究が進展中である (対象3)。

3) 染色体インテグリティへの影響: 細胞老化や分化などの高次生命現象に伴うセントロメアとヘテロクロマチンの構造変化を解析する。反復 DNA 中に出現する CENP-B box へ CENP-B 各種融合タンパクを結合させる系を開発した。今後はセントロメア側からこれら構造形成を攪乱し、染色体制御とクロマチン変換メカニズムが染色体構造全体や高次生命現象に及ぼす影響を観察する。印南班とはセントロメアの進化について共同研究を進めている (対象2)。

## 研究計画ク テロメア構成因子による染色体の統合的制御機構

研究代表者：加納 純子（大阪大学蛋白質研究所・准教授・分子生物学）

本計画研究ではテロメアヘテロクロマチンの機能解析をベースとして、“ゲノムワイドな”ヘテロクロマチンネットワークの一員としてのテロメアの機能の解明を目指し以下の2つの研究目標を設定し、予定通り進展している。

1) テロメア蛋白質複合体の新規機能の解明: テロメアは、テロメア結合蛋白質 Rap1 を核とした様々な蛋白質複合体によって多様な染色体維持機能を果たしている。まず、テロメア機能の基盤を明らかにするため、Rap1 のドメイン解析や新規結合因子の探索を行った。さらに、Rap1 のリン酸化修飾が細胞周期の M 期の進行に重要な役割を果たしていることを明らかにした。一方、テロメアと他の染色体領域との機能相関を探るため、テロメア中枢蛋白質 Taz1 および Rap1 のゲノムワイドな局在を解析した。また集団遺伝学が専門である印南班員との共同研究により、Taz1、Rap1 が結合するゲノムワイドな DNA 配列の解析が進行中である (対象2)。

2) サブテロメアを基盤とした染色体機能ネットワークの解析

これまでほとんど明らかにされていないサブテロメア (テロメアに隣接する染色体ドメイン) の生理学的機能を探るため、分裂酵母のサブテロメアをすべて欠失した株を作製した。現在、その株の性質について解析中である。一方、セントロメア蛋白質 Sgo2 が間期にサブテロメアを含む広い領域に局在することがわかった。升方班 (公募) などとの共同研究により、Sgo2 はサブテロメア近傍の late origin の発火タイミング制御に関わること、サブテロメア隣接領域の高度に凝縮したクロマチン構造の構築に必須であることなどが明らかになった (対象3)。

## 研究計画ケ 複製フォークの安定化機構とその破綻による病態の解析

研究代表者：高田 穰（京都大学放射線生物研究センター・教授・分子生物学、病態医科学）

高等真核細胞における染色体の様々な非コード DNA 領域には脆弱部位が存在し、それらは DNA 複製が困難な“染色体ストレス”部位となっている。本班では脆弱部位での複製フォーク不安定化のメカニズムと、その維持機構を解析する。以下の3つの目標を設定し順調に進行している。

1) **染色体ストレス高感受性部位の網羅的同定**：ニワトリDT40細胞においては染色体観察による脆弱性(断裂)が観察できず、またChIP可能なグレードの抗体作成を目指したが十分な質のものが得られないなどの問題が発生した。そこで、最近実験室レベルで使用が可能となったゲノム編集酵素TALENを用いて、ヒト細胞のFANCD2終止コドンに3 x FLAGタグをノックインすることを試み、細胞を得ることができた。この細胞を用いて現在ChIP条件を検討中である。検討すみ次第、太田班と共同で染色体ストレス下にChIP-seqを行う。また印南班との共同研究によりFANCI欠損細胞におけるゲノムdeletionとG4配列の関連性について明らかにした(対象2)。

2) **複合体プロテオミクスによる複製フォーク安定化と崩壊機構の解析**：FANCD2、FANCI、FANCL、ATRIPの各蛋白質の複合体精製とマスマスペクトロメトリによる成分の同定を行い、様々な既知、未知の会合分子の同定を行った。このうち、特にFANCD2にChIP分子が会合することに着目して解析を進めている。FANCD2により複製フォーク停止部位にChIPがリクルートされることが明らかとなり、ChIP分子のFANCD2会合部位も明らかなるなど、順調に進んでいる。また舩本班との共同研究により、セントロメア関連因子とFAコア複合体がともにDNA損傷応答とセントロメア形成に寄与するという仮説のもと、解析が進行中である(対象3)。

3) **染色体ストレス下のチェックポイントキナーゼATRIP-ATR初期活性化機構の解析**：FAコア複合体に依存したATRのクロマチン結合機構の存在を明らかにし、ATR活性化のサブ経路であることを示唆する結果を得るなど、順調に進んでいる。