



動物細胞ゲノムの構造・核内動態とその制御に関する分子細胞生物学的研究

三重大学大学院生物資源学研究所 奥村 克純

はじめに

つなげば2メートルにもなる私たちヒトの長大なゲノムDNAは、わずかに直径数マイクロメートルの細胞核内にクロマチンの形で高度に折りたたまれて収納されており、古くから知られたバンド構造で示されるさらに凝縮した染色体として、細胞分裂のたびに精密かつ安定に受け継がれる。ゲノム上に存在する2万もの遺伝子は、どの細胞でも個々に同じ塩基配列であるにもかかわらず、細胞ごとに異なるON/OFF制御を受け、私たちが構成する数百種類もの細胞を生み出している。染色体の構造や形成過程、遺伝子の発現制御機構の異常は、ゲノムの不安定性、細胞の機能異常、さらには、がん化や細胞死を導き、個体レベルでは、生活習慣病をはじめとする様々な疾患の原因となると考えられるが、このような構造が、組織や個体の形成段階でいつどのように構築され、どのような制御を受けるのか、遺伝子のON/OFF制御とどのように結びつくのかなどの詳細は知られていなかった。

現在、個々のゲノム領域は、細胞核内で、数十万塩基対程度のみとまり(ドメイン構造)として存在し、おそらくは精妙な制御下に、細胞分裂のたびに安定に維持されると考えられており、また、ゲノム上の遺伝子は、DNAのメチル化、タンパク質ヒストンのアセチル化・メチル化などのクロマチンのエピジェネティック修飾等により、個々にON/OFF制御を受けることが知られている。

演者は、長年にわたってこれらの研究に取り組む中で、細胞核内のゲノムの動態や染色体の構築原理、それらの制御メカニズムを明らかにすること、さらにそれらが、種々の物質や環境要因等によって、どのような影響を受けるのかを明らかにすることが、農芸化学が担う「食品機能」による細胞制御・健康維持や、「ゲノム設計」・「人工細胞の構築」による未来の物質生産技術開発などの礎(いしずえ)となるとの思いで、研究を進めてきた。

1. 個々の遺伝子を可視化する FISH法の DNA複製解析への応用

1-1. FISHによるゲノムの構造解析とDNA複製ドメイン

染色体上の1コピーのDNAを顕微鏡下に可視化検出する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法は、主に染色体上の遺伝子座を明らかにする技術として、ヒトの全ゲノム配列を解明する「ヒトゲノム計画」に貢献し、演者も国内外の多数の研究者と協力して、数多くの遺伝子やゲノム領域の染色体上の存在部位を明らかにした<sup>1, 他多数</sup>。一方で、演者らはFISH法をDNA複製タイミングの解析に応用し、世界で初めて、DNA複製研究に可視化で解析する手法を導入した<sup>2)</sup>。

哺乳類の長大な染色体DNAは、細胞周期S期の特定のタイミングで複製する数十万から数百万塩基対程度のみとまり(複製タイミングドメイン)のモザイク的に構築されているという「複

製タイミングドメイン」の概念(図1)は、染色体構築の基本原則であり、染色体バンド構造とマクロなレベルで一致することもあるが、古くから提唱されてきたが、個々のゲノム領域の複製タイミングは、煩雑な分子生物学的手法を駆使しても何万という細胞の平均値としてしか調べることができなかった。演者らは、FISHを用いる単純な方法を提案し、一個一個の細胞で複製タイミングが可視化検出できること、さらに、遺伝子の発現で変動する複製タイミングドメインの存在を初めて示し、染色体構築原理の新しい概念を提示した<sup>2)</sup>。また、複製ドメインが、クロマチン構造のエピジェネティック修飾の違いで変化すること、すでに未分化のES細胞で見られることなども示した<sup>3)</sup>。

さらに、この概念を同じ研究グループの竹林が発展させ、哺乳類ゲノムの複製ドメイン構造を、次世代シーケンサーを利用してゲノムワイドに解析する方法を導入し、1細胞で解析できる画期的な方法(scRepli-seq法)開発して、「安定な複製ドメイン」の他に「ゆらぐドメイン」の存在を明らかにし<sup>4, 5)</sup>、現在、ゲノム編集技術等を駆使して、複製タイミングを制御するDNA配列の特定などを進めている。

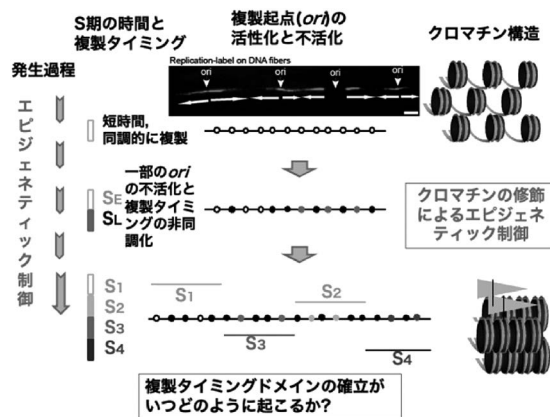


図1. DNA複製タイミングドメインの概念図とDNAファイバー上での複製フォークの可視化

1-2. DNAファイバー、分子コーミングを用いる複製フォークの可視化とレプリコン、DNA損傷修復機構の解析

DNA複製中の細胞にハロゲン化スクレオシド等を取り込ませ、細胞をスライドガラス上で溶解してDNAをファイバー状にガラスに貼り付け、ゲノム上のDNA複製フォークをDNAファイバー上で顕微鏡下に蛍光検出し、可視化解析する手法、さらに、細胞からDNAを取出し、DNAファイバーとして均一な長さでガラス上に貼り付ける分子コーミング法を導入し、DNA複製ドメイン内の複製起点(ori)間の距離や複製フォークの進行方向、進行速度の解析に応用した。すなわち、修飾スクレオチドを取り込ませDNA複製の方向を特定できる新手法

を開発し、*ori*のクラスターをゲノムファイバー上で可視化(図1)して、*ori*間の距離や*ori*の位置の細胞分裂ごとの変化なども捉えた<sup>6)</sup>。また、DNA損傷修復とDNA複製制御の連携機構としてDNA損傷応答因子PARP-1がDNA損傷時の複製フォークの進行停止に必要であることを示し(図2)<sup>7)</sup>、*ori*の活性化を細胞周期制御因子が制御することや<sup>8)</sup>、DNA損傷時に、がん細胞特有のチェックポイント制御機構が存在することなどを見出した<sup>9)</sup>。

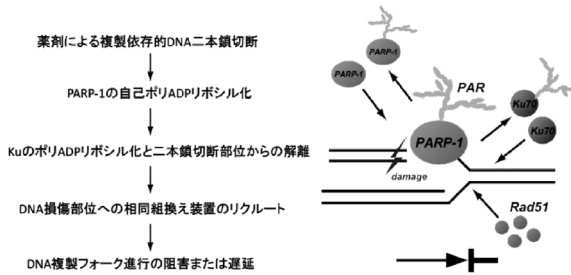


図2. DNA損傷部位でのPARP-1による複製フォークの遅延機構<sup>7)</sup>

## 2. 動物ゲノムの核内動態・遺伝子発現とクロマチンのエピジェネティック制御

FISHを用いた哺乳類ゲノムの核内配置の可視化解析として、特定の染色体についてバンド構造と核内配置の関係や、核内染色体領域(Chromosome territory)とその内部の特定遺伝子の細胞周期の進行に伴う配置の関係<sup>10)</sup>、Zebrafish胚を用いた発生過程の複製ドメインの変化などをマルチカラー画像解析により明らかにする一方、DNAのメチル化、タンパク質ヒストンのアセチル化・メチル化などのクロマチンの修飾とその制御機構を研究するエピジェネティクス分野で、2000年前後から、いち早く成果を挙げた。すなわち、転写直後のRNAを核内で検出することにより、父母由来の染色体の一方のみから発現するインプリント遺伝子を可視化し、これらがDNAのメチル化やヒストンの修飾により制御を受けることを明らかにした<sup>11)</sup>。加えて、嗅覚受容体遺伝子が染色体の一方のみから発現することも、脳内の遺伝子発現の可視化により示した<sup>12)</sup>。DNAメチル化によるヘテロクロマチン構造の形成・維持にヒストンH3.3が重要であること<sup>13)</sup>、疾病関連遺伝子領域のDNAのメチル化が疾病の進行度と共に変化することなど、核内イベントにおけるエピジェネティック制御の役割についても多数明らかにしてきた<sup>14, 15)</sup>。核内ゲノム動態のエピジェネティック制御については、上述の複製タイミングドメインとも関連付けて研究を進めている<sup>3-5)</sup>。

## 3. 食品等由来機能性成分・栄養成分による細胞機能制御機構

演者の研究の開始は、食品化学研究室において翻訳後修飾を担う酵素等の機能改良や食品機能への応用を目指すものであり、上述の研究を進めつつも、常に念頭にこの点を意識して、食品成分の機能性などについても研究を進めてきた<sup>16)</sup>。最近、前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化過程にエピジェネティクスが関与している報告もでていますが、演者は独自の視点と上述の技術を生かしたアプローチにより、DNA複製ドメインの制御が分化の方向付けに関与している可能性や、栄養成分の欠乏がエピジェネティック制御に影響し、DNA損傷を導くことなどを見出しており、「栄養因子によるエピジェネティック制御機構と核内ゲノム動態制御機構の接点」といった応用基盤の研究に

展開しつつある。

おわりに

動物細胞ゲノムの核内動態や染色体の構築原理、およびそれらの制御機構に関する知見は、かなり蓄積されてきており、これらの制御にエピジェネティクスが深く関わっていると考えられる。エピジェネティクスは、自閉症などにも関与しているという報告もあり、細胞や個体の健全性の維持におけるエピジェネティクスの重要性を指摘しておきたい。演者らは、DNAの低メチル化がDNA損傷を誘発すること、またその分子機構を解明している(未発表データ)。DNAのメチル化基質の供給に葉酸などの栄養成分が関与することを考えると、「食品機能とエピジェネティクス」に関する研究はますます重要になる。また、近年のゲノム編集技術の格段の進歩は、蓄積されてきたゲノムの核内配置や遺伝子の転写制御などの細胞核ダイナミクスに関する知見と相まって、未来の物質生産系と夢見られていた「ゲノムを設計して構築する人工細胞」が、高効率物質生産系として現実味を帯びてくる。社会貢献には程遠いと見られがちなこれら基礎研究が必要とされるのも、そう遠い話ではないことを期待したい。

(引用文献)

- 1) Selig S *et al.* *EMBO J.* 11, 1217-1225 (1992). (cover illustration)
- 2) Okumura K *et al.* *Genomics*, 25, 274-278 (1995).
- 3) Kagotani K *et al.* *Biosci Biotechnol Biochem*, 66, 1046-1051 (2002).
- 4) Takahashi S *et al.* *Nat Genet*, 51, 529-540 (2019).
- 5) Miura H *et al.* *Nat Protocols*, 15, 4058-4100 (2020).
- 6) Takebayashi S, *et al.* *Exp Cell Res*, 271, 263-268 (2001).
- 7) Sugimura K *et al.* *J Cell Biol*, 183, 1203-1212 (2008). (cover illustration)
- 8) Katsuno Y *et al.* *Proc Natl Acad Sci, USA*, 106, 3184-3189 (2009).
- 9) Wakida T *et al.* *eLife*, 6, pii: e29953. doi: 10.7554/eLife.29953 (2017).
- 10) Nogami M *et al.* *J Cell Sci*, 113, 2157-2165 (2000).
- 11) Kagotani K *et al.* *Exp Cell Res*, 274, 189-196 (2002).
- 12) Ishii T *et al.* *Genes Cells*, 6, 71-78 (2001).
- 13) Sugimura K *et al.* *Exp Cell Res*, 316, 2731-2746 (2010).
- 14) Fujita N *et al.* *Mol Cell Biol*, 19, 6415-6426 (1999). (cover illustration)
- 15) Ikuno A *et al.* *PLoS One*, 14, e0222188. doi: 10.1371/journal.pone.0222188 (2019).
- 16) Kaneoka H *et al.* *Jpn J Food Chem Safety*, 24, 16-24 (2017).

謝辞 本研究は、筆者がYale大学David C. Ward研究室でFISHの薫陶を受けたことに端を発し、三重大学大学院生物資源学研究科分子細胞生物学(生物化学)研究室で行われたもので、Ward研究室諸氏、自由にやらせていただいた三重大学名誉教授(故)嶋林幸英先生、田口寛先生、現在共に取組む竹林准教授およびこれまでの学生諸君、ヒトゲノム解析研究やDNA複製、細胞核ダイナミクス特定領域研究等の先端研究グループに導き指導頂いた、松原謙一先生、吉川寛先生、花岡文雄先生ら先導研究者、共同研究を進めていただいた国内外の何十もの研究室の多くの研究者諸氏、数え切れないほどの協力者に感謝いたします。最後に、学生・大学院時代に、演者に自ら姿勢を示して、鍛え、育てていただいた京都大学食品化学研究室(故千葉英雄先生)の先生方、先輩・同輩・後輩諸氏、本賞にご推薦いただいた京都大学名誉教授・佐々木隆造先生ならびに植田和光先生、選考委員各位に感謝申し上げます。