

博士論文概要

論文題目

DNA の物理的特性の生物学的意義
—真核生物ゲノムの核内収納原理—
Biological significance of physical properties of
DNA: the genome folding principle in eukaryotes

申請者

木村	元
Hajime	KIMURA

生命理工学専攻 分子遺伝学研究

2011 年 12 月

高等真核生物のゲノムには、ある個体が卵から完全な成体へと成熟するために必要なすべての遺伝情報が印されている。すなわち、高等真核生物において、個々の細胞が集合して組織をつくり、種々の組織が同調して器官として働き、ひいては個体が生存するために必要な様々な機能を実装する胚発生の全過程は、予めゲノムにプログラムされている。このように、“生物の設計図”といえるゲノム DNA に印されたすべての遺伝情報を解読することは、生物が普遍的にもつゲノム DNA に基づいて生物を理解しようとする事と同義であることから、生命科学における最も重要な課題のひとつであると考えられる。

2003年に、30億塩基対から成るヒトゲノム配列が完全解読された結果、タンパク質のアミノ酸配列をコードする、遺伝子のエキソン領域は、そのうちのほんの数%の領域を占めるに過ぎないことが明らかになった。それ以降、ENCODE (*Encyclopedia of DNA elements*) プロジェクトをはじめとする、ゲノム配列に印された新たな遺伝情報を解き明かそうとする研究が大きく発展したが、依然として、ゲノムの大部分の領域に印された遺伝情報は不明である。このような現状において、従来の概念にとらわれない新たな視点に基づいたアプローチの提案が急がれている。

近年、DNAの物理的特性に焦点を当てた解析により、DNAに印された新たな遺伝情報を解読することに、私が所属している大山研究室が成功した。具体的には、DNAの柔軟性（DNA分子の硬さ・柔らかさの特性、物理的特性の一つ）に、プロモーターの働きを制御する遺伝情報が印されていることを明らかにした（Fukue *et al.*, 2004, 2005）。したがって、従来の“遺伝情報は核酸塩基の配列として符号化されている”という概念を超えて、DNAの物理的特性の生物学的意義を解明することが、上述の課題に対する有力な方策のひとつであると考えられる。

本論文は、DNAの物理的特性の生物学的意義を明らかにするために行なった研究の報告である。古くから、DNAの物理的特性は真核生物ゲノムの機能的な折り畳み機構を解明するための鍵であると考えられてきたが、それを示す直接的な証拠は未だ得られていない。一方で、ゲノムDNAが折り畳まれて核内での三次元構造は、転写・複製・修復などの様々な核内現象の舞台となる重要な基盤構造である。そこで、DNAの物理的特性が真核生物ゲノムの機能的な折り畳み機構に果たす役割を解明することを目的として、大きく分けて三つの研究を行なった。本論文ではこれらの結果について、それぞれ第1部と第2部、および第3部に分けて述べる。

第1部の研究では、ゲノムDNAの柔軟性に印された新たな遺伝情報を明らかにすることを目的として、ヒトゲノム全域の柔軟性を解明した。なお、その際、30億塩基対の膨大な情報量进行处理する解析手法に課題があったが（Excelを用いた手作業でヒトゲノム全域の柔軟性を解析した場合、約200年を要すると見積られる）、独自に開発したプログラムを用いることにより、ヒトゲノム全域の柔軟性を解明すること

に成功した。次に、作成した「ヒトゲノムの柔軟性地図」において特徴の見られる領域を探索したところ、個々の染色体上に、異常に柔らかい領域（SPIKE と命名）が存在することを発見した。興味深いことに、ヒト 21 番染色体において、SPIKE は Mb 単位の間隔で周期的に存在していた。他の染色体においても、このように周期的に存在する領域が散在していた。続いて、SPIKE の生物学的意義を考察するために、以下の二つの解析を行った。第一に、SPIKE を構成する塩基配列がもつ特徴を解析した。その結果、SPIKE は、TA リピートをはじめとする柔軟性の高いマイクロサテライトを豊富にもつことが明らかになった。一方、T または A を反復単位とする硬いマイクロサテライトについては、SPIKE にはあまり含まれていないことが明らかになった。第二に、マウス、ショウジョウバエ、線虫についても、ゲノム全域の柔軟性を解明したところ、SPIKE はヒト以外の生物種においても種を超えて存在していることが明らかになった。また、SPIKE の出現頻度（単位領域あたりの SPIKE の本数）を生物種間で比較したところ、高等生物になるにつれて SPIKE の出現頻度が高くなる傾向が見られた。以上の解析から、SPIKE は間期染色体ならびに分裂期染色体における重要な構造因子となっている可能性が示唆された。

第 2 部の研究では、どのような物理的特性をもつ DNA 領域がヌクレオソームを形成しやすいのかを解明することを目的として、「ヌクレオソーム DNA に共通した物理的特性」について解析した。まず、出芽酵母のヌクレオソーム DNA を対象として、199 個の DNA 断片がもつ平均の柔軟性を明らかにした。その結果、極めて硬い領域および柔らかい領域が、それぞれ約 10 bp の間隔で周期的に存在し、両者の間には約 5 bp のずれがあることが明らかになった。次に、どのような塩基配列がこのような物性をもつ領域を構成しているのかを解析した。その結果、周期的に存在する硬い領域は、AA/TT によって構成されていることが判明した。このようなヌクレオソーム DNA がもつ物理的特性は、ヌクレオソームの形成過程において、DNA とヒストン八量体タンパク質との相互作用を安定化するための重要な物理的特性であると考えられる。

第 3 部の研究では「間期染色体の三次元構造の構築原理」を解明することを目的とした。まず、出芽酵母の間期染色体の全長を、ヌクレオソームの配置が識別できる分解能でモデル化した。はじめに、出芽酵母のゲノム全域にわたるヌクレオソームの配置のデータに基づき、約 53,000 ヶ所すべてのリンカー領域を同定した。なお、個々のリンカー DNA がとる“かたち”を決定し、ひいては間期染色体の三次元構造を描くためには、リンカー DNA の持続長（高分子鎖の拡がり具合を表わす物理量、物理的特性の一つ）を解明する必要がある。しかし現実的に、すべてのリンカー DNA の持続長を測定することは不可能である。そこで、異なる柔軟性をもつ 5 種の DNA 断片の持続長を原子間力顕微鏡により測定し、DNA の柔軟性 (x) と DNA の持続長 (y) との間に線形関係 ($y = -5.54x + 69.2$) があることを見いだした。この関係式を用いて、すべてのリンカー DNA の持続長を明らかにした。また、DNA の柔軟性は、第 1 部の研

究で独自に開発したプログラムを用いて解明した。以上の結果と細胞核の大きさに関するデータをもとに、ヌクレオソームの配置が識別できる分解能における、間期染色体全長のモデル化に成功した。

つづいて、モデルの正確さを検証するために、予測された間期染色体構造と核内における実際の構造との比較を行なった。具体的には、染色体上の二点間の空間距離についての比較を行なった。これまでに、比較的近い二点間（30～200 kb）の空間距離については報告があったが、比較的離れた二点間（200～1,400 kb）については未解明であった。そこで、出芽酵母において最も長い4番染色体（1,530 kb）、中程度の長さをもつ7番染色体（830 kb）、比較的短い5番染色体（577 kb）を対象として、合計13組の空間距離をFISH法により測定した。従って、既に報告のあった比較的近い二点間に関する全てのデータ16組と合わせて、合計29組の二点間について、空間距離における比較を行なった。結果として、出芽酵母の染色体上のあらゆる範囲（30～1,400 kb）において、モデルから得られる予測値と実験値とがよい一致を示すことが明らかになった。以上より、出芽酵母の間期染色体の三次元構造を決定する主要な因子は、DNAの物理的特性、ヌクレオソームの配置、細胞核の大きさであることが理論的に解明された。

出芽酵母の一倍体の細胞は全部で16本の染色体をもつが、上で構築した間期染色体のモデルは、対象とする1本の染色体を除く残りの15本の染色体の存在を考慮に入れないモデルであった。それにも拘らずモデルから得られる予測値と実験値とがよい一致を示すことから、個々の染色体同士は互いに干渉し合わないことが推察された。そこで、この点を検証するために、全16本の染色体を、核と大きさの等しい直径2 μm の球の空間内でモデル化した。具体的には、はじめに、rDNAをもつ12番染色体に次いで最も大きい4番染色体のセントロメアを、既に報告のある位置情報(Duan, *et al.*, 2010)に基づいて配置し、これを基点として4番染色体の三次元構造を計算した。続いて、他の染色体についても同様の方法を用いて、大きい染色体から順にセントロメアを配置し、染色体の三次元構造のモデリングを行なった。その結果、実際の核内構造と同様に、全ての染色体が所与の空間を互いにうまく分け合っていて収まっていることが確認された。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 木村 元 印

(2012年 12月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 ○	<p>1. <u>Kimura H.</u>, Kageyama D., Furuya M., Sugiyama S., Murata N., Ohyama T. Regions with Unusually High Flexibility Occur Frequently in Human Genomic DNA. <i>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry</i>, in press.</p> <p>○ 2. <u>Kimura H.</u>, Ohyama T. A common mechanical property shared by yeast nucleosomal DNAs (2008) <i>J. Adv. Sci.</i>, 20, 37-40.</p> <p>3. Udagawa K., <u>Kimura H.</u>, Tanabe H., Ohyama T, Nuclear localization of reporter genes activated by curved DNA (2011) <i>J. Biosci. Bioeng.</i>, 113, 431-437.</p>
総説	<p>1. 大山 隆、<u>木村 元</u>、下岡 保俊. ゲノムDNAはいかにして折り畳まれるかー DNA物性とゲノム収納. (2009) 実験医学増刊 細胞核 27, 2715-2722.</p>
講演	<p>1. Ohyama T., <u>Kimura H.</u>, Nishikawa J., Shimooka Y., Miura O., Sugiyama S., Yamada S. THE GENOME FOLDING PRINCIPLE AS REVEALED BY MODELING OF YEAST INTERPHASE CHROMOSOMES. The 22nd Wilhelm Bernhard Workshop 2011 Aug. Riga, Latvia</p> <p>2. <u>Kimura H.</u>, Shimooka Y., Nishikawa J., Miura O., Sugiyama S., Yamada S., Ohyama T. THE GENOME FOLDING PRINCIPLE IN YEAST. The 22nd Wilhelm Bernhard Workshop 2011 Aug. Riga, Latvia</p> <p>3. <u>Kimura H.</u>, Shimooka Y., Nishikawa J., Miura O., Yamada S., Ohyama T. The prime determinants of interphase chromosome structures. International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities 2011 Jan. Awaji Island, Japan</p> <p>4. <u>Kimura H.</u>, Miura O., Arakawa J., Seki M., Yamada S., Ohyama T. DNA Flexibility Maps of Eukaryotic Genomes. 50th ASCB ANNUAL MEETING 2010 Dec. Philadelphia, USA</p> <p>5. <u>Kimura H.</u>, Shimooka Y., Nishikawa J., Miura O., Yamada S., Ohyama T. Three-dimensional architecture of chromatin fibers in the interphase nucleus. 50th ASCB ANNUAL MEETING 2010 Dec. Philadelphia, USA</p> <p>6. <u>Kimura H.</u>, Shimooka Y., Sugiyama S., Ohyama T. 3D STRUCTURE OF 10 NM CHROMATIN FIBER DEDUCED FROM DNA FLEXIBILITY. 2nd HOPE Meeting 2009 Sep. Hakone, Japan</p> <p>7. <u>Kimura H.</u>, Shimooka Y., Sugiyama S., Ohyama T. 3D STRUCTURE OF 10 NM CHROMATIN FIBER DEDUCED FROM DNA FLEXIBILITY. The Wilhelm Bernhard Work shop 21st International Workshop on the cell Nucleus 2009 Sep. Ustron, Poland</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>8. Ohyama T., <u>Kimura H.</u>, Shimooka Y., Kageyama D., Furuya M., Udagawa K., Tanase J. How genomic DNA is functionally folded in a nucleus. The Wilhelm Bernhard Work shop 21st International Workshop on the cell Nucleus 2009 Sep. Ustron, Poland</p> <p>9. Ohyama T., <u>Kimura H.</u>, Kageyama D., Furuya M. The DNA flexibility maps of eukaryotic genomes. 8th EMBL Transcription meeting 2009 Aug. Heidelberg, Germany</p> <p>10. Ohyama T., <u>Kimura H.</u>, Kageyama D., Furuya M. HOW GENOMIC DNA IS FUNCTIONALLY FOLDED IN A NUCLEUS. International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise 2008 May Ise, Japan</p> <p>11. Ohyama T., Tanase J., <u>Kimura H.</u> GENETIC INFORMATION CARRIED IN DNA CONFORMATION AND PROPERTIES. Embo Conference Series on Nuclear Structure and Dynamics 2007 Sep. Montpellier, France</p> <p>12. Ohyama T., Sumida N., Inoue S., Tanase J., <u>Kimura H.</u>, Miura M. HOW GENOMIC DNA IS FUNCTIONALLY FOLDED IN A NUCLEUS. Functional Organization of the Nucleus 2007 Jan. Awaji Island, Japan</p> <p>13. 木村 元、西川 純一、下岡 保俊、三浦 理、杉山 滋、山田 修司、大山 隆. The principle in structuring 3D architecture of interphase chromosomes. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 横浜</p> <p>14. 木村 元、下岡 保俊、西川 純一、三浦 理、山田 修司、大山 隆. 出芽酵母間期染色体の三次元構造とゲノム折り畳み原理. 第 28 回染色体ワークショップ 2011 年 1 月 山代温泉</p> <p>15. 木村 元、下岡 保俊、西川 純一、三浦 理、大山 隆. 間期クロマチン三次元構造の構築原理. 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 神戸</p> <p>16. 大山 隆、木村 元、下岡 保俊、西川 純一、三浦 理、荒川 潤、横尾 岳大、関 瑞穂. 間期クロマチンの三次元構造とゲノム収納の原理. 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 神戸</p> <p>17. 木村 元、下岡 保俊、西川 純一、三浦 理、大山 隆. 間期クロマチン三次元構造の構築原理. 「細胞を創る」研究会 3.0 2010 年 11 月 東京大学 生産技術研究所</p> <p>18. 木村 元、下岡 保俊、西川 純一、三浦 理、杉山 滋、大山 隆. 間期クロマチン構造の <i>in silico</i> モデリング. 第 27 回染色体ワークショップ 2010 年 1 月 御殿場</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>19. 大山 隆、古屋 美香、荒川 潤、木村 元、下岡 保俊、西川 純一、浅野 士郎、杉山 滋. ゲノム収納の原理とクロマチン繊維の基本構造. 第 27 回染色体ワークショップ 2010 年 1 月 御殿場</p> <p>20. 木村 元、下岡 保俊、三浦 理、杉山 滋、大山 隆. 間期クロマチン構造の <i>in silico</i> モデリング. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 横浜</p> <p>21. 大山 隆、木村 元、古屋 美香、荒川 潤、下岡 保俊、杉山 滋. ゲノム収納の原理とクロマチン繊維の基本構造. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 横浜</p> <p>22. 木村 元、下岡 保俊、杉山 滋、大山 隆. 間期細胞核におけるクロマチン繊維の構造. 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 神戸</p> <p>23. 木村 元、下岡 保俊、古屋 美香、景山 大、杉山 滋、大山 隆. クロマチン繊維の自己組織化. 第 26 回染色体ワークショップ 2009 年 1 月 姫路</p> <p>24. 木村 元、景山 大、古屋 美香、村田 昇、下岡 保俊、大山 隆. 真核生物ゲノムの DNA 物性とクロマチン基盤構造. 第 31 回日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 神戸ポートアイランド</p> <p>25. 大山 隆、木村 元、景山 大、古屋 美香、深川 竜郎、浅野 士郎. ゲノムの階層的折り畳みの基盤となる DNA 物性. 第 31 回日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 神戸ポートアイランド</p> <p>26. 木村 元、古屋 美香、景山 大、深川 竜郎、大山 隆. エピジェネティクスの DNA 基盤—ヒトゲノムの物理的特性に印された遺伝情報—. 第 2 回エピジェネティクス研究会 2008 年 5 月 東レ総合研修センター (静岡県三島市)</p> <p>27. 木村 元、景山 大、古屋 美香、大山 隆. ヒトゲノムの機械的特性と染色体構造. 第 25 回染色体ワークショップ 2008 年 1 月 湯河原</p> <p>28. 木村 元、古屋 美香、景山 大、村田 昇、大山 隆. ヒトゲノムの機械的特性地図. 第 30 回日本分子生物学会年会 2007 年 12 月 横浜</p>