

博士論文審査報告書

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

2012 年 12 月

前世紀の終盤から始まったヒトゲノムプロジェクトは、ゲノム科学発展の礎となった。このプロジェクト自体は 2003 年に実質的に終了したが、その後も様々な生物を対象として様々なゲノムプロジェクトが実施されており、現在公開されているゲノムデータベースは 2,000 を超える。ゲノムプロジェクトでは、対象とする生物のゲノム DNA の全塩基配列を解明する。しかし、真核生物のゲノムの場合、全塩基配列が解明されても、そこから解読できる情報はごく僅かである。これは、真核生物ゲノムの大部分が遺伝子のエキソンをコードしていない DNA 領域（非コード DNA 領域）で構成されているからである。例えばヒトゲノムの場合、非コード DNA 領域は全体の 98%にも及ぶ。その一部は、遺伝子発現、DNA 複製や組換えの制御、あるいは染色体の凝縮や分配など、遺伝子機能を維持・制御するうえで重要な役割を担っている。しかし、大部分の非コード DNA 領域の機能は不明である。

ゲノム DNA の塩基配列の特徴や共通性を解析して機能を推定する研究は十分に行われてきたし、現在も行われている。しかし、現状を鑑みるに、この手法で解明できる情報は遺伝子やプロモーターの構造情報など、極めて限定的で、非コード DNA 領域に隠されている大半の情報は解明できないと推察される。一方、このような領域には、複雑な体制をとった生物の細胞機能や個体発生・分化、ならびに老化といった基本的な生命現象を制御するさまざまな遺伝情報が記されていると考えられている。このような背景のもと、ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) プロジェクトをはじめとして、ゲノム DNA に印された未知の遺伝情報の解明を目指した様々な研究が活発化してきている。この潮流のなかで、申請者の研究室は、DNA の物理的特性のひとつである DNA の柔軟性（DNA 分子がもつ硬さ・柔らかさの特性）に、プロモーターの働きを制御する遺伝情報が“印”されていることを発見している (Fukue *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 32, 5834-5840, 2004 ; *ibid.* 33, 3821-3827, 2005)。この研究は、“遺伝情報は核酸塩基の配列として符号化されている”という従来の概念を“改訂”する契機となった。

本論文の研究はこのような背景の下、DNA の物理的特性に印されている未知の遺伝情報を解明するために行われた。研究は大きく分けて 3 部からなる。第 1 部では、ヒトをはじめとした各種真核生物のゲノム DNA を DNA の柔軟特性の視点から俯瞰し、各生物の共通性や特殊性を解析した。第 2 部の研究は、DNA の柔軟特性とヌクレオソーム形成との関係を明らかにする目的で、ヌクレオソームから単離された 199 配列の DNA の柔軟特性を解析した。さらに第 3 部では、長大なゲノム DNA が細胞核という微細な空間に収納される際に使われる基本的な原理を、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のゲノム DNA を材料として探究した。申請者は、これらの研究により以下に述べる成果を得た。

第 1 部の研究では、ゲノム DNA の柔軟性を短時間で解析するために、まず、コンピュータプログラム (GEN07 と命名) を開発した。GEN07 は、3 塩基対または 4 塩基対 (それぞれトリヌクレオチドステップ、テトラヌクレオチドステップ

と呼ばれる) からなる全 DNA 配列の相対的柔軟性のデータセットを用いて、あらゆる DNA 配列の柔軟性を好みの解析幅 (window size と呼ばれる) とスライド幅 (sliding step と呼ばれる) で解析できるというプログラムである。なお、トリヌクレオチドステップは全部で 32 種類あり、テトラヌクレオチドステップは 136 種類ある。GEN07 は、前者に関しては Brukner ら (*EMBO J.* 14, 1812-1818, 1995)、後者に関しては Packer ら (*J. Mol. Biol.* 295, 85-103, 2000) のデータセットを使用し、バイオインフォマティクスにおける標準的な言語である Perl (文字列の処理に強い言語) と統計計算に特化した R および計算速度に優れた C 言語を用いて(これらの言語により、配列データをフレキシビリティ値へ変換する) 構築されている。GEN07 を用いることで 約 30 億塩基対もあるヒトゲノム DNA の柔軟性でさえ約 1 日で解析できるようになった。

申請者は、ヒト、マウス (*Mus musculus*)、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の各ゲノム DNA を対象として、ゲノムの全域に亘る DNA の柔軟性地図を作成した。その結果、各生物がそれぞれ固有の柔軟性プロファイルを有することなど、様々な特徴が明らかになった。申請者は、それらのなかで、各ゲノムに異常に柔軟な領域 (SPIKE と命名) と異常に硬い領域 (rSPIKE と命名) が存在することに着目し、さらに解析を進めた。その結果、以下の点が明らかになった。① SPIKE も rSPIKE も、解析したすべてのゲノムに存在するが、高等な生物ほど、SPIKE の出現頻度が高い。例えばヒトの場合、SPIKE は数百カ所に存在するが、rSPIKE は、わずか 3 箇所だけにしか存在しないことが判明した。一方、線虫の場合、rSPIKE が数百カ所存在するのに対し、SPIKE は、3 箇所だけにしか存在しない。② SPIKE も rSPIKE も、それぞれの特性を有するマイクロサテライト DNA を有意に多くもつが、主要な構成成分は、それぞれ、柔軟な、または硬い特性を有する非反復配列である。③ SPIKE も rSPIKE も、遺伝子のエキソン領域には存在しない。これらの解析結果をもとに、申請者は、SPIKE と rSPIKE は、真核生物ゲノムの折り畳みにおける重要な構造因子である可能性を指摘した。

第 2 部の研究では、出芽酵母のヌクレオソーム DNA を対象として、199 配列の DNA がもつ平均の柔軟性を解析した。その結果、極めて硬い領域および極めて柔らかい領域が、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 の位相のずれがあることを明らかにした。また、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を解明した。一方で、周期的に存在する柔らかい領域には、GC が高頻度で存在することを明らかにした。以上の解析結果をもとに、ヌクレオソーム DNA がもつ上記の物理的特性は、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特性であると結論した。

第 3 部では、まず、出芽酵母のゲノム全域にわたるヌクレオソームの配置データに基づき、約 50,000 ヶ所すべてのリンカー領域を同定した。一方で、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、このデータと DNA およびヌクレオソームに関する構造データをもとに間期染色体構造をシミュレーションした。16 本ある各染色体を 35,000 回以上シミュレーションした後、直径 $2\mu\text{m}$ の球 (出芽酵母半数体細胞の核の大きさに相当) に納まる構造標品だけをスクリーニングした。次に得られた構造の正確さを検証するために、間期染色体内 2 点間距離に関する実験データとの比較解析を行なった。既存の全 16 データに加え、新たに 13 のデータを FISH 法により取得し、合計 29 の 2 点間距離情報を用いて、シミュレーションにより得られた平均的 (時間平均) 間期染色体構造における対応距離との比較解析を行った。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示された。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を理論的に解明した。ヌクレオソームの配置は、第 2 部の解析から、DNA の物理的特性で決まることが解明された。従って、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 の物理的特性と細胞核の大きさであると結論された。

上記のシミュレーションは、対象とする染色体以外の 15 本の染色体の存在を考慮に入れずに行われた。それにも拘らず得られた構造標品はすべて実験データをうまく説明できたことから、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、直径 $2\mu\text{m}$ の球体内でシミュレーションした。その結果、実際の核内構造と同様に、すべての染色体が所与の空間を互いにうまく分け合っていることが確認された。

以上の研究から、DNA の物理的特性がゲノム DNA の折り畳みや細胞核内収納機構に重要な役割を果たしていることが明確になった。特に、各種真核生物ゲノムには異常な柔軟性をもつ領域が散在していること、DNA の規則的な柔軟特性変化がヌクレオソームの形成基盤になっていること、さらには、出芽酵母の間期染色体構造はゲノム DNA の物理的特性と細胞核の大きさだけで決定されていることを解明した点は高く評価できる。これらの研究成果は、エピジェネティクス時代を迎えた今日、分子生物学が対象とすべき研究のひとつの方向を明確に示しており、学問的意義は極めて大きい。よって本論文は、博士 (理学) の学位論文として相応しいものであると認める。

2012 年 12 月

(主査) 早稲田大学教授	理学博士	(名古屋大学)	大山 隆
早稲田大学教授	理学博士	(早稲田大学)	並木 秀男
早稲田大学教授	理学博士	(東京大学)	園池 公毅
早稲田大学名誉教授	理学博士	(東京大学)	東中川 徹