

細胞分裂後の染色体の形が DNA 複製を左右する

ー秩序だったゲノム 3 次元構造の再構築がカギー

概要

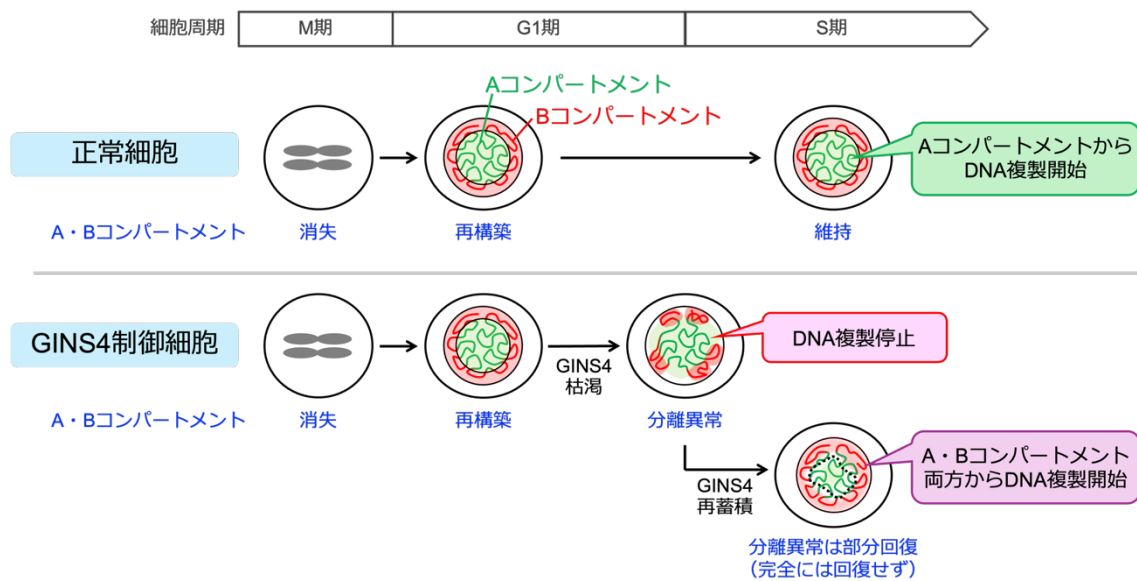
理化学研究所（理研）生命機能科学研究センター発生エピジェネティクス研究チームの大字亜沙美研究員（研究当時、現客員研究員）、平谷伊智朗チームディレクター、京都大学医生物学研究所幹細胞遺伝学分野の遊佐宏介教授らの共同研究チームは、細胞分裂後に染色体の秩序だった 3 次元構造が再構築されることが、その後の DNA 複製^[1]の開始に重要な役割を果たすことを明らかにしました。

本研究は、DNA 複製の適切な制御には、DNA 配列上の情報だけでなく、核内における染色体の 3 次元構造も重要であることを初めて実験的に示し、DNA 複製制御の基本原則に新たな概念を提示するものです。

哺乳類のゲノムは、遺伝子の働きが活発な（転写が活性化している）A コンパートメント^[2]と、不活発でより凝縮した B コンパートメント^[2]に区画化されており、これらは核内で空間的に分かれて存在しています。ゲノム上の A コンパートメントおよび B コンパートメント（A・B コンパートメント）領域は、ゲノム上の各領域がいつ複製されるかを示す「複製タイミング^[3]」の早い・遅い領域とよく対応しており、DNA 複製は A コンパートメント領域から始まり、その後 B コンパートメント領域へと進みます。しかし、この対応関係が DNA 複製制御にどのような役割を果たしているのかはよく分かっていませんでした。

今回、共同研究チームは、マウス ES 細胞^[4]を用いて、複製タイミング異常を示す変異体を効率的かつ網羅的に選別できる独自の実験系を構築し、新たな DNA 複製タイミング制御因子として GINS4^[5]タンパク質を同定しました。さらに、GINS4 を特異的に枯渇させた細胞を解析したところ、GINS4 が複製タイミングだけでなく、B コンパートメント構造の形成にも関わることを見いだしました。また、核内コンパートメント構造が正しく形成されない細胞は DNA 複製を開始できないことが分かり、核内コンパートメント構造の構築が DNA 複製の制御を支える重要なプロセスであることを実験的に明らかにしました。

本研究は、科学雑誌『*Nature Communications*』オンライン版（8 月 10 日付：日本時間 8 月 10 日）に掲載されました。



G1 期から S 期への移行時における核内 A・B コンパートメント形成と、DNA 複製制御の関係

背景

生命の設計図であるゲノム DNA は、細胞分裂に先立って正確に複製される必要があります。哺乳類のように長大なゲノムを持つ生物では、DNA 合成期 (S 期^{[1])} に染色体のさまざまな箇所から複製が始まります。しかし、ゲノム全体が一斉に複製されるのではなく、S 期前半に複製される領域と、後半に複製される領域があらかじめ決まっており、この時間的制御は「複製タイミング制御」と呼ばれます。一方、染色体は細胞核内で空間的に区画化され、転写が盛んで遺伝子の働きが比較的活発な A コンパートメント領域と、転写が抑制されて染色体の構造もより凝縮した B コンパートメント領域に分かれています。一般に、A コンパートメント領域は核内部に、B コンパートメント領域は核膜周辺に存在し、それぞれ S 期前半、S 期後半に複製される領域とよく対応しています。

この A・B コンパートメントの構造は細胞分裂の際に一度失われますが、次の DNA 複製が始まるまでに再構築されます。しかし、A・B コンパートメントが DNA 複製の結果を反映したものにはすぎないのか、それとも DNA 複製制御に重要な役割を果たしているのかを直接検証することは困難でした。A・B コンパートメントはゲノム全体に及ぶ大規模な構造であり、これを簡単に操作する手法が存在しないからです。そこで共同研究チームは、DNA 複製タイミングに異常を示す変異細胞を網羅的にスクリーニングし、その中で A・B コンパートメントにも異常を示すものを見だし、その原因遺伝子の機能解析を通じて、両者の関係と A・B コンパートメントの生物学的意義を明らかにすることを目指しました。

研究手法と成果

共同研究チームはまず、DNA複製タイミングを1細胞レベルで検出できる独自のレポーター細胞を作製しました。これは、マウスES細胞の特定のゲノム領域に蛍光タンパク質の遺伝子を組み込むことで、その領域がS期前半と後半のどちらで複製されたかを蛍光強度の計測で推定できる仕組みです。この細胞を用いて全ゲノムスクリーニングを行い、DNA複製タイミング異常を示す変異細胞を網羅的に選別することで、DNA複製タイミング制御に関わる候補因子を効率的に探索しました（図1）。

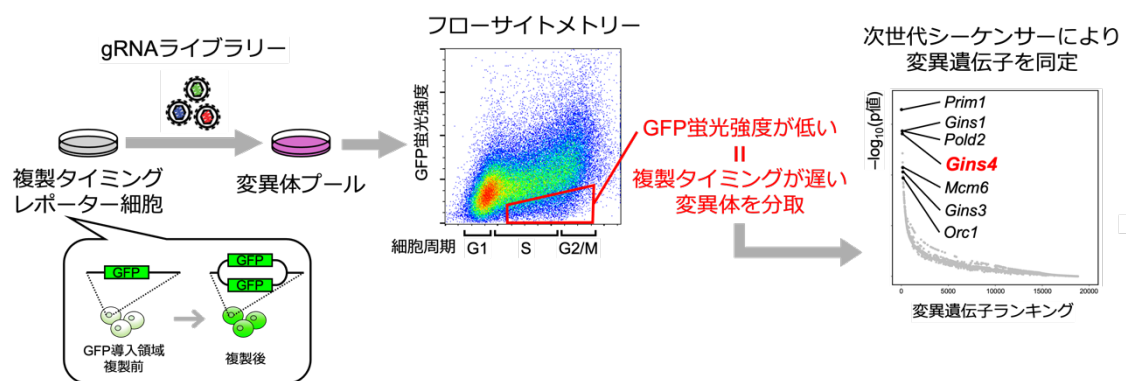


図1 DNA複製タイミング異常を引き起こす原因遺伝子を同定する全ゲノムスクリーニング

左) 複製タイミングを1細胞レベルで検出可能なレポーター細胞を用いた変異体プールの作製。S期前半に複製されるゲノム領域に蛍光タンパク質（GFP）の遺伝子を組み込むと、正常細胞ではS期が進むにつれてGFPの蛍光強度が高くなる。このレポーター細胞に、マウスのほぼ全ての遺伝子を網羅的に変異させる操作（gRNAライブラリー感染）を行い、変異体プールを作製した。

中) 細胞の蛍光を1個ずつ測定・選別する装置を用いたフローサイトメトリーという手法で、GFP蛍光強度が低い（複製タイミングが遅い異常を示すことが期待される）細胞を分取（分離・精製）した。

右) 次世代シーケンサーで変異遺伝子を同定し、個々の遺伝子が複製タイミングに影響している確からしさ（縦軸）を統計学的に解析した。複製タイミング異常の原因となった七つの候補遺伝子の中から、*Gins4*に着目した。

その結果、DNAヘリカーゼ^[5]の構成因子であるGINS4を有力な候補因子として同定しました。GINS4は、DNA複製開始に必要な因子として知られています。そこで、GINS4の機能を詳しく調べるため、細胞内に存在するGINS4の分解を特異的に誘導できるマウスES細胞を作製しました。これによりGINS4を枯渇させた細胞（GINS4枯渇細胞）をHi-C法^[6]で解析したところ、A・Bコンパートメント構造にも異常が生じることが分かりました。特に、Bコンパートメント領域同士の長距離相互作用が弱まり、AコンパートメントとBコンパートメントの分離が不十分になっていました（図2）。

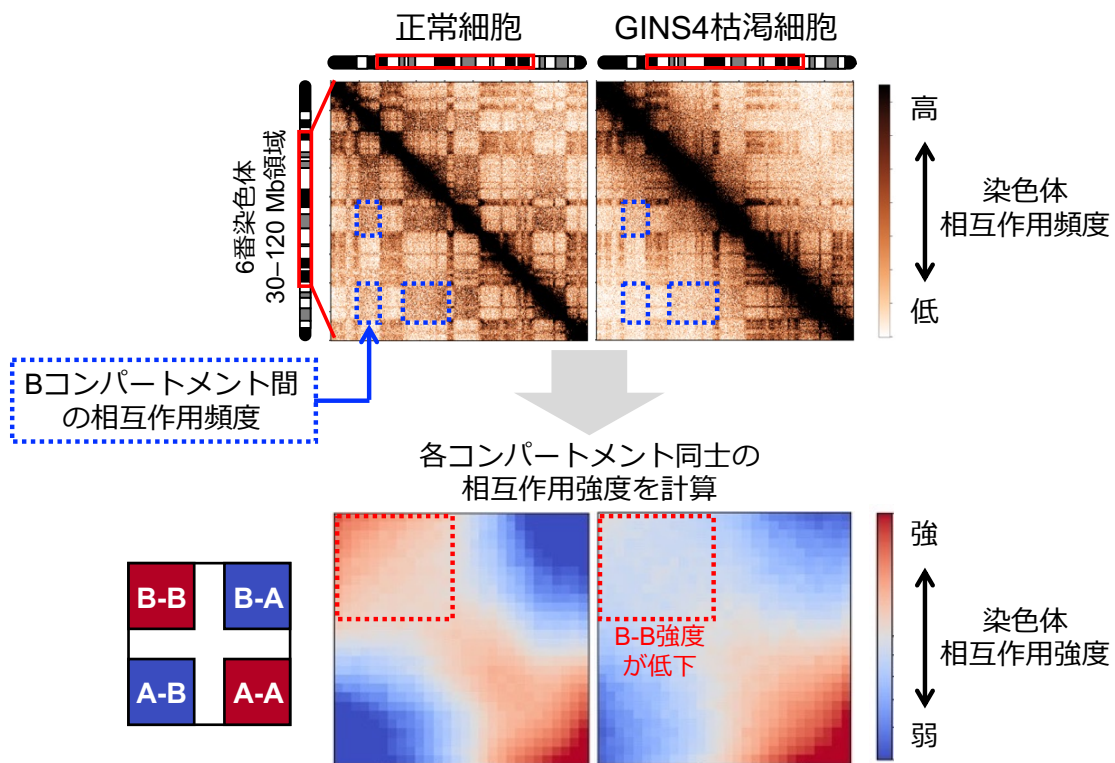


図 2 GINS4 を特異的に分解・枯渇させた細胞の Hi-C 解析

上) Hi-C 解析により、正常細胞および GINS4 を枯渇させたマウス ES 細胞における 6 番染色体の染色体相互作用頻度をヒートマップで示した。横軸と縦軸はいずれも、6 番染色体 30–120Mb (メガ・ベース: DNA の長さの単位で 1Mb は 100 万塩基対) 領域の DNA 配列を並べたときの位置 (ゲノム座標) を示し、色の濃い領域は相互作用頻度が高い (DNA が空間的に近い距離にある) ことを示す。青の破線で囲んだ領域は B コンパートメント間の相互作用頻度を示し、GINS4 枯渇細胞ではこれが低下している。

下) A・B 各コンパートメント同士の相互作用の強さをヒートマップで示した。GINS4 枯渇細胞では、特に B コンパートメント間の相互作用強度がゲノムワイドに著しく低下している。

さらに、細胞周期^[1]を同調させた細胞で、複製タイミングの早い A コンパートメント領域と遅い B コンパートメント領域にそれぞれ異なるラベルを入れて、両者を識別・可視化・追跡できる実験系を構築しました。この実験系を用いてさらに解析を進めたところ、通常は核膜周辺に位置する B コンパートメント領域の DNA が、GINS4 枯渇細胞では核内で異常に大きな凝集体を形成することが分かり、Hi-C データが捉えていた B コンパートメントの 3 次元構造異常を顕微鏡下でも確認できました (図 3A)。この異常は、GINS4 のタンパク質量を回復させることで少なくとも目視レベルでは改善したため、GINS4 の枯渇によって引き起こされる B コンパートメント構造の異常は可逆的であることが示唆されました。

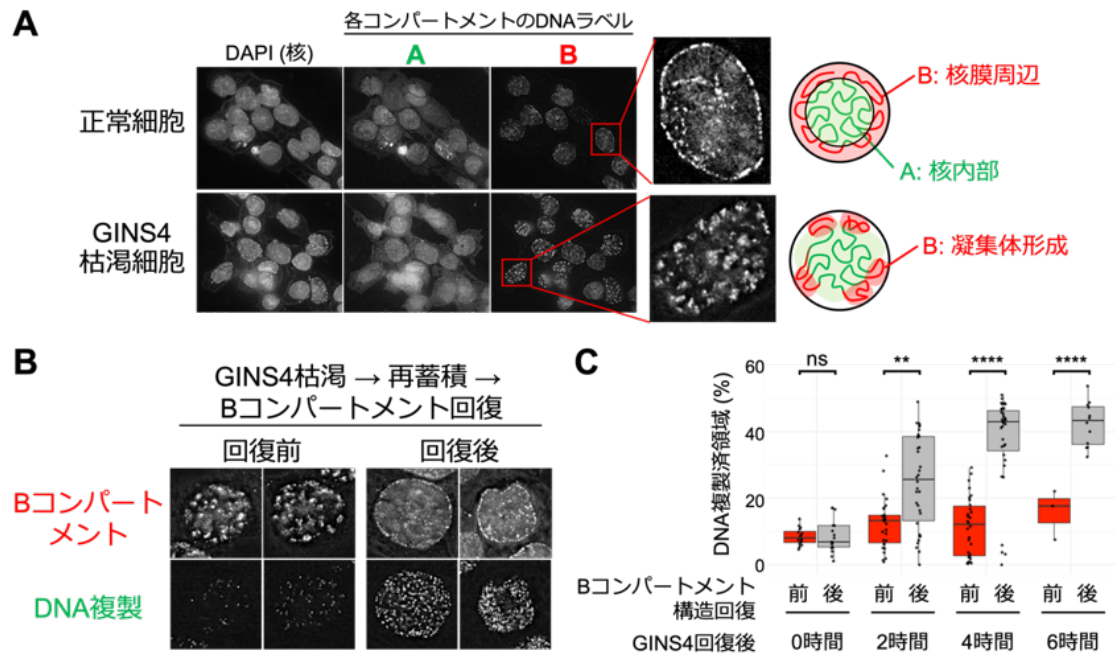


図3 A・B コンパートメント形成とゲノム DNA 複製の密接な関係

- A) GINS4 の枯渇は A・B コンパートメントの分離異常を引き起こし、正常細胞では核膜周辺に位置する B コンパートメント領域の DNA が、核内部に凝集体を形成する。
- B) S 期直前に GINS4 を再蓄積させると、B コンパートメント構造異常が回復した細胞から複製が開始される (複製 DNA を示すラベルが増大する)。
- C) GINS4 回復による B コンパートメント構造の回復度に依存して、時間とともに DNA 複製済み領域の割合が上昇する。ns: 「not significant (有意差なし)」の略号。「**」は有意水準 1%での有意差あり、「****」は有意水準 0.01%での有意差あり、を示す。

そこで、この B コンパートメント構造異常の回復と DNA 複製との関係を調べました。S 期に入る前にタンパク質の分解誘導を解除して、GINS4 の枯渇状態から GINS4 を再蓄積させると、B コンパートメントの異常な凝集体が消失し、DNA 複製を開始する細胞が出現しました。一方、異常な凝集体が消失していない細胞では、S 期になっても DNA 複製は開始されませんでした (図 3B、C)。これらの結果は、複製開始直前に秩序だった A・B コンパートメントの構造が再構築されることが、DNA 複製制御に重要な役割を果たすことを示しています。

さらに、GINS4 の枯渇状態から GINS4 を再蓄積させた細胞は、目視レベルでは B コンパートメントの凝集体は消失したものの、Hi-C 解析をすると A・B コンパートメントの分離レベルが正常細胞よりも弱いことが分かりました。そこで、この状態で DNA 複製を開始した細胞の複製タイミングを、1 細胞全ゲノム DNA 複製解析法 (scRepli-seq^[7]) で 1 細胞ずつ調べました。その結果、通常は S 期後半に複製される B コンパートメントの一部が S 期前半から複製されるなど、複製タイミングが乱れていました (図 4)。すなわち、ゲノム 3 次元構造を正常に構築していない細胞は、複製タイミング異常を示すことが分かりました。

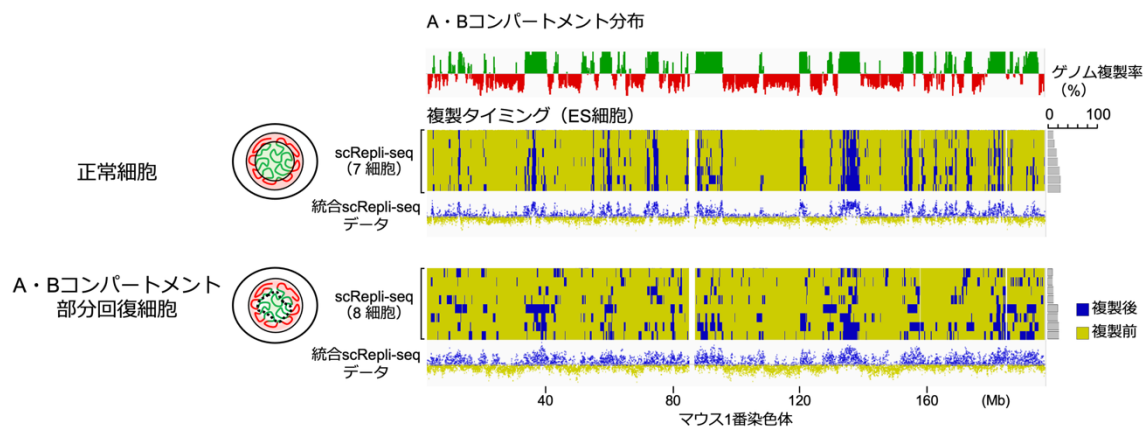


図4 正常細胞とA・Bコンパートメント部分回復細胞のS期前期のscRepli-seqデータ比較

上) Hi-C データから算出したマウス1番染色体のA・Bコンパートメントの分布。Aコンパートメント(緑)はS期前半に、Bコンパートメント(赤)はS期後半に複製される。

中) S期前期の7個の正常細胞について、1細胞全ゲノムDNA複製解析法(scRepli-seq)による解析を行い、ゲノム複製率が低いものから高いものまで上から順に並べたもの。Aコンパートメント領域(上図の緑)に複製後の領域(青)が出現していることが分かる。

下) GINS4の枯渇後に再蓄積させたA・Bコンパートメント部分回復細胞のうち、S期前期の細胞8個のscRepli-seqデータ。これらの細胞ではA・Bコンパートメントの分離が完全には回復していないものの、DNA複製は開始される。しかし、複製タイミングは乱れており、本来この時期に複製されないBコンパートメント領域(上図の赤)からもDNA複製が始まっている。

今後の期待

本研究は、DNA複製開始直前、すなわちS期に入る直前に秩序だった染色体3次元構造を構築することが、その後のDNA複製を正しく進めるための重要な基盤となることを示しました。これまで、A・Bコンパートメントと複製タイミングの対応関係は知られていましたが、その因果関係を実験的に検証することは困難でした。GINS4を足がかりとしてコンパートメント構造を操作できるようになったことで、ゲノム3次元構造とDNA複製の因果関係に迫ることが可能になりました。本研究は、DNA複製制御がDNA配列情報だけでなくゲノム3次元構造にも支えられているという新たな概念を提示するものです。

GINS4がどのような分子機構によって、S期直前にBコンパートメントの形成や成熟を制御しているのかは、今後解明すべき重要な課題です。そのためには、GINS4が細胞核内やゲノム上のどこに局在し、どのような因子と協調して働くのかを明らかにする必要があると考えています。

DNA複製異常や複製タイミング異常は、ゲノム不安定性^[8]や細胞のがん化と深く関わることで知られています。今回の成果は、細胞周期進行に伴うゲノム3次元構造制御とDNA複製制御を結び付ける新たな基礎的知見であり、将来的にゲノム不安定性やがんなどの疾患発症機構の理解にもつながると期待されます。

論文情報

< タイトル >

Nuclear compartmentalization at the G1/S transition plays a key role in DNA replication control

< 著者名 >

Asami Oji, Kosuke Yusa, Izumi Noda, Takako Ichinose, Yoshiko Kondo, and Ichiro Hiratani

< 雑誌 >

Nature Communications

< DOI >

10.1038/s41467-026-75264-6

補足説明

[1] DNA 複製、S 期、細胞周期

増殖中の真核細胞が繰り返す時間的なサイクル（期間）のことを細胞周期と呼ぶ。細胞周期の中で、分裂期（M 期）は細胞分裂を行う期間、間期は分裂期以外の期間を指す。間期は、さらに G1 期、S 期、G2 期に分けられる。DNA 複製は、細胞分裂に先立って、細胞が持つゲノム DNA を過不足なく倍加する過程であり、S 期に行われる。

[2] A コンパートメント、B コンパートメント

ともに、Hi-C 法 ([6]参照) により検出される核内の大規模な染色体区画のこと。A コンパートメントは比較的遺伝子転写活性の高いユークロマチン、B コンパートメントは活性の低いヘテロクロマチンに対応する。

[3] 複製タイミング

ゲノム DNA 上の各領域が S 期のどの時期に複製されるかという時間的制御。一般に、遺伝子が活発に転写されるユークロマチン領域は S 期前半に、凝縮したヘテロクロマチン領域は S 期後半に複製される。

[4] ES 細胞

哺乳類の発生初期の胚盤胞期と呼ばれる時期の胚の一部、内部細胞塊と呼ばれる細胞群からつくられる幹細胞株のこと。胚性幹細胞とも呼ばれる。ES は embryonic stem の略。

[5] GINS4、DNA ヘリカーゼ

GINS4 は、GINS1、GINS2、GINS3 とともに GINS 複合体を構成するタンパク質の一つ。GINS 複合体は、DNA ヘリカーゼ (DNA 二重らせんをほどく酵素) である CMG 複合体 (CDC45、MCM、GINS からなる) の構成要素であり、CMG 複合体は DNA 複製開始に必須の因子として知られている。

[6] Hi-C 法

核内でゲノム DNA のどの領域同士が近接しているかを、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム規模で網羅的に測定する方法。A・B コンパートメントをはじめとする、さまざまなスケールのゲノム 3 次元構造を同定・解析できる。

[7] scRepli-seq

1 細胞レベルで DNA 複製の進行状態を全ゲノム解析する方法。1 細胞から得たゲノム DNA を増幅し、複製済み領域と未複製領域を DNA コピー数の違いから推定する。

[8] ゲノム不安定性

DNA 配列の変化や、染色体の構造変化、染色体数の異常などが生じやすい状態。

共同研究チーム

理化学研究所 生命機能科学研究センター 発生エピジェネティクス研究チーム

チームディレクター 平谷伊智朗（ヒラタニ・イチロウ）

研究員（研究当時） 大字亜沙美（オオジ・アサミ）

（現 客員研究員）

テクニカルスタッフⅠ 野田 和 （ノダ・イツミ）

テクニカルスタッフⅠ 一ノ瀬孝子（イチノセ・タカコ）

研究パートタイマーⅡ 近藤淑子（コンドウ・ヨシコ）

京都大学 医生物学研究所 幹細胞遺伝学分野

教授 遊佐宏介（ユサ・コウスケ）

研究支援

本研究は、理化学研究所運営費交付金、理研新領域開拓課題「TAD からゲノム構築原理を読み解く」、科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 CREST「潜在的不安定性から読み解くゲノム設計原理（研究代表者：平谷伊智朗、JPMJCR20S5）」、文部科学省科学研究費助成事業新学術領域研究（研究領域提案型）「細胞分化にともなうクロマチンポテンシャルの変化とその分子基盤（研究分担者：平谷伊智朗、JP18H05530）」、日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業挑戦的研究（開拓）「1 細胞全ゲノム解析の第二世代化と多次元化への挑戦（研究代表者：平谷伊智朗、JP20K20582）」、同基盤研究（A）「マウス初期胚発生における体細胞型複製タイミング制御確立過程の解析（研究代表者：平谷伊智朗、JP25H00982）」、同若手研究「DNA 複製可視化システムを利用した 3D ゲノム制御因子の網羅的探索とその機能解析（研究代表者：大字亜沙美、JP18K14680）」、同基盤研究（C）「核内コンパートメントの構築原理と、ゲノム機能における役割の解明（研究代表者：大字亜沙美、JP25K09599）」、理研基礎科学特別研究員制度、理研 CDB/BDR-大塚製薬連携センター研究助成、武田科学振興財団、京都大学医生物学研究所共同利用・共同研究拠点事業の支援を受けて行われました。

<発表者のコメント>

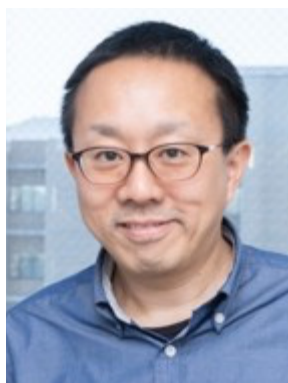
本プロジェクトの発案から9年が経ち、多くの方々に支えられながら、ようやく本論文をまとめることができました。**GINS4** を枯渇させた細胞を解析し、これまで見たことのない顕著な **B** コンパートメント構造の異常を見つけた時の驚きと感動は今も鮮明に覚えています。本研究を通して、新たに知りたい謎も数多く生まれたので、今後も常識にとらわれない視点を大切にしながら、サイエンスを続けていきたいです。(大字亜沙美)

ゲノム3次元構造や **A・B** コンパートメントの構築プロセスやその役割は、いまだに謎だらけです。ただ、**A・B** コンパートメントは複製タイミングと強く相関するので、複製タイミングの制御因子を同定できれば、**A・B** コンパートメントの構築原理や意義に迫れるのではないかと。そんな素朴な発想からスタートした野心的なプロジェクトでした。満を持して投稿した論文でしたが、査読には実に3年近くを要し、納得することが難しい局面もあり、私のキャリアの中で最も苦しい査読対応でした。しかし、最後まで諦めずに取り組んだことで、オリジナルで質実剛健な研究成果を世に出せたと思います。筆頭著者の大字亜沙美さんのセンスと超人的な努力がなければ、到底成し遂げることのできなかった成果で、「サイエンスは人である」と改めて強く実感した次第です。(平谷伊智朗)

これまで様々なタイプの **CRISPR** スクリーニングに関わってきましたが、今思い返してみても、最も複雑なスクリーニングだったと思います。**GFP** 蛍光強度の変化が2倍以内というレポーター系を使い遺伝子破壊に伴う変化を検出すること、対象が複製という一過的な生命現象であることから、**CRISPR** スクリーニングがそもそも適用できるのか自信はありませんでした。しかし、筆頭著者の大字さんの丁寧な実験により、ヒット遺伝子が見出せたことは言うまでもありません。**GINS4** に着目してからの解析結果も毎回驚きの連続で、非常に緻密に計画し実行されていました。このようなプロジェクトに関わることができ、大変光栄に思います。(遊佐宏介)



大字亜沙美



平谷伊智朗



遊佐宏介