DNA複製タイミングの発生過程における制御

Developmental Regulation of DNA Replication Timing

平谷伊智朗
Ichiro Hiratani

染色体DNA複製の分野は現在まで活発に研究が進められてきた．その結果DNA複製に関わるタンパク質群が多数同定され，それらの機能に関する理解が進んだ．しかし，細胞の核において，S期のどの時期にどのゲノムDNA領域が複製を開始し完了させて最終的にゲノムDNAが倍加するのか，その制御機構はほとんど未知である．本稿では多細胞生物におけるDNA複製の時間的制御，その発生過程における制御，さらにその意義を細胞核内におけるゲノム（染色体）の高次の折り畳み構造との関連に即して議論したい．

key words　DNA複製タイミング，染色体，発生・分化，ES細胞

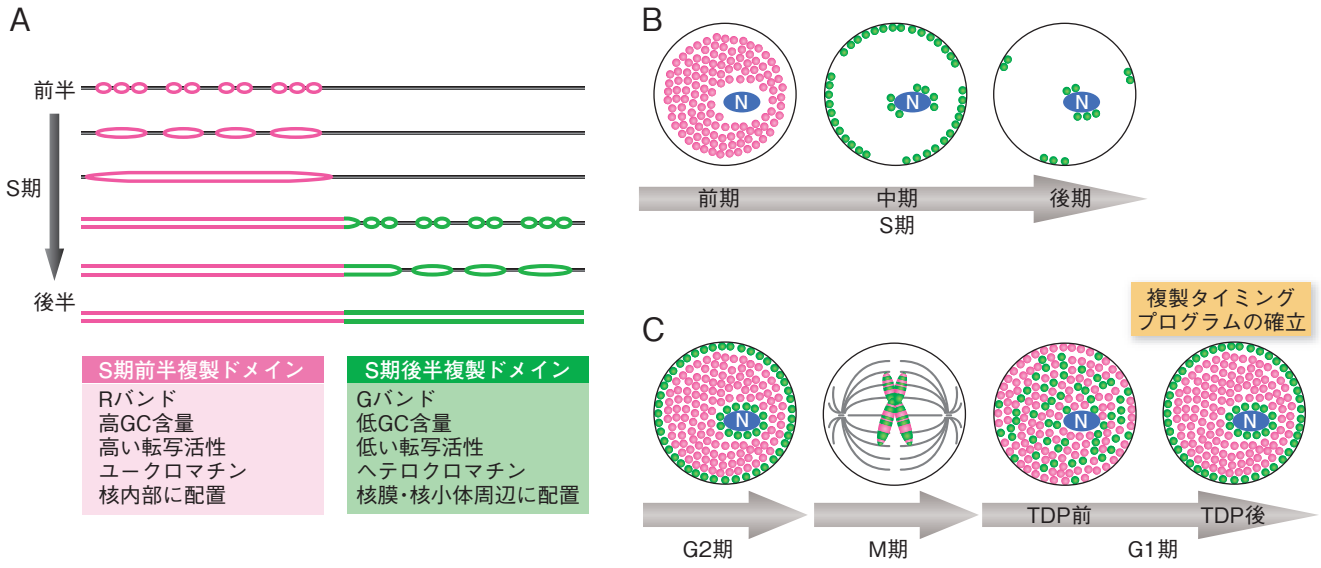
はじめに

DNAの二重らせん構造の発見以来，染色体DNA複製は研究する者を魅了してきた．真核生物の細胞は染色体DNA上の異なる多数のMb（megabase；100万塩基）単位の領域から複製を開始し，個々の領域は細胞周期を経ても，再現よくS期の決まった時期（タイミング）に複製を開始する．個々の領域は隣接した複数のレプリコン〔1つの複製開始点（オリジン）由来の複製領域〕から構成され，これら一群のレプリコンは同調して各領域の複製を完了する．複製タイミング（replication timing）はこのようにMb単位で制御されており，これらの単位は一般に複製ドメイン（replication domain）と呼ばれている（図1A）．複製タイミングは転写活性やクロマチン構造と密接に関連しており，このような時間的制御に重要な意味合いがあることが示唆される．最近，筆者らはマウスES細胞（embryonic stem cells；胚性幹細胞）が分化に伴い高頻度で複製タイミングを変化させることを見いだした．したがって，複製タイミングのプロファイルは細胞の種類に固有であり，発生・分化に伴い変化することが示唆される．複製タイミングのプロファイルとその変化の意味合いは，遺伝物質を過不足なく倍加させるという目的を超越したところにあると考えられ，ゲノムの高次の折り畳み構造（higher-order chromosomal organization）とその分化に伴う変化を反映している可能性がある．

I　複製タイミング，クロマチン構造と転写活性：これまでの研究史

1950年代後半～1960年代，DNAの半保存的複製の発見とほぼ時を同じくして，哺乳類細胞がその染色体DNA上の様々な領域をそれぞれS期の異なる時期に複製することが見いだされた[1]．DNA複製タイミング制御の発見である．ほどなくして哺乳類の雌の不活性X染色体（雌は2本のX染色体の片方が不活性化される）が他の染色体群に比べ明らかに遅い複製タイミングを示すことがわかった[2]．雌の不活性X染色体は転写が不活性化され，バー小体と呼ばれる凝縮した構造をとることから，複製タイミングとクロマチン構造や転写活性との相関が示唆された．1970年代半ばには，分裂中期の染色体上でギムザ染色液に強く染まる低GC含量のGバンド，すなわち転写活性の低いヘテロクロマチンの複製タイミングが遅いのに対し，染まりが弱く高GC含量のRバンド，すなわち転写活性の高いユークロマチンが早い複製タイミングを示すことがわかり，ゲノムの高次の折り畳み構造との相関が示唆された[2]．1980～90年代にはこれらの細胞遺伝学的な知見が分子生物学的にあらためて確認され，数十個の遺伝子座に関する知見が蓄積された[3]．2000年代にはマイクロアレイ技術による数千から万単位の遺伝子領域の複製タイミング解析により，早期複製タイミングと転写活性の相関が多細胞生物のゲノムレベルで証明された[4, 5]．

複製タイミングとクロマチン構造の相関について，出芽酵母では，不活性型クロマチンが近傍領域の複製タイミングを制御することが遺伝学的に示されている[3]．哺乳類ではレポータープラスミドDNAを核内顕微注入した次のよ



■図1　複製タイミングと複製ドメイン，核内配置およびTDPの関係

A：S期における複製タイミングはMb単位の複製ドメインレベルで制御されている．S期前半と後半に複製されるドメインは図に挙げたように大きく異なる特徴を示す．

B：DNA複製を核内で視覚化すると，S期が進むに従って時期特異的な空間的パターンが観察される．核内部のユークロマチンがS期前半に，核膜周辺や核小体（nucleolus；N）周辺などのヘテロクロマチンがS期中期から後期にかけて複製される．便宜上，S期前半と後半に複製されるゲノム領域（replication foci）をそれぞれマゼンタと緑で模式的に示した．

C：G2期から分裂期（M期）を経てG1期に至るまでの核内配置の変化の模式図．複製完了直後のG2期にはBの結果，S期前半（マゼンタ）と後半（緑）に複製されたゲノム領域がそれぞれ特徴的な核内配置を示す．ゲノムDNAは分裂期（M期）に染色体構造をとって凝縮するが，分裂後からG1期にかけて再び脱凝縮し，核内でゲノムDNAの再配置が行われる．再配置が落ち着く以前（TDP前）のG1期核は複製タイミングプログラムが確立されていない．一方，再配置が落ち着いた後（TDP後＝G2期と同様の配置を示す）のG1期核は複製タイミングプログラムが確立されており，*in vitro*で強制的に複製を開始させるとBのような正常な空間的パターンの推移を示し，複製されるゲノム領域の順序（複製タイミングプログラム）も*in vivo*のそれと一致する．

うな報告がある．すなわち，S期前半の核に顕微注入した場合は高レベルのヒストンH4のアセチル化と高い転写活性を伴うクロマチンがレポーターDNA上に構築されたのに対し，S期後半の核はその逆であった[6]．このように，クロマチン構造が複製タイミングに影響するケースとその逆のケースの両方が存在し，その因果関係は複雑である[3]．いずれにせよ，複製タイミングはゲノム上の領域個々のエピジェネティックな状態を反映した指標と考えられ，ENCODEコンソーシアム[注1]のプロジェクトの一環に複製タイミング解析も入っている[7]．

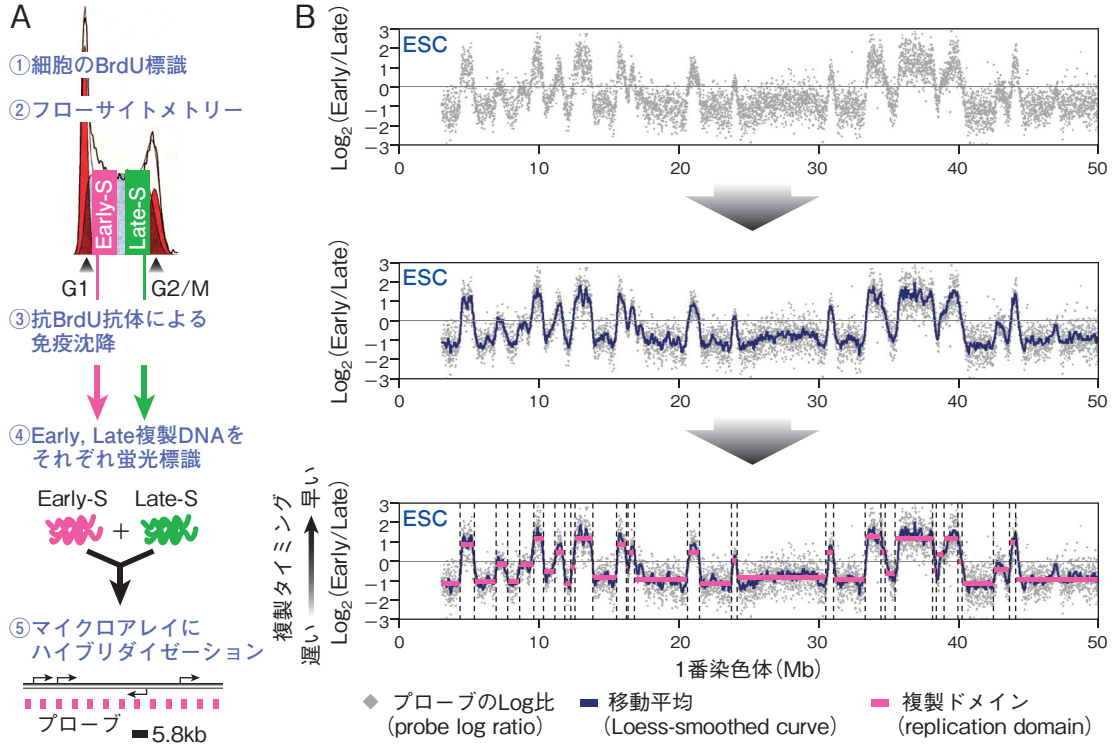
一方，出芽酵母では複製タイミング制御は存在するが，意外にも早期複製タイミングと転写活性の相関は見られなかった[4]．出芽酵母は多細胞生物とはゲノムの構成が大きく異なり，そのゲノムの大部分は転写されユークロマチンであると考えられる．相関が見られないのはそのせいかもしれない．

注1　米国国立ゲノム研究所（NHGRI）によって組織された研究コンソーシアム．ヒトゲノム中の生物学的機能に関与する全領域を明らかにすることを目指す．

Ⅱ 複製タイミングと核内配置

複製タイミングは核内配置（subnuclear position）とも密接な関係にある．哺乳類細胞にヌクレオチド・アナログを取り込ませて視覚化するとS期が進むに従って時期特異的なreplication foci（複製がまさに進行中の箇所）の空間的パターンが観察される[8]．S期初期にはreplication fociは核内部のユークロマチンに均一に分布する．一方，S期の中期から後期にかけては，核小体周辺と核膜周辺およびセントロメア領域などのヘテロクロマチンが複製される（図1B）．

哺乳類では，複製タイミングのプログラム（どのゲノム領域がいつ複製を開始するかというプログラム）は細胞が分裂するごとにG1期初期に新たに確立される[9]．これは次の実験で示された．すなわち，G1期2時間以後に単離した哺乳類細胞核をアフリカツメガエル卵抽出液に入れて強制的にDNA複製を開始させ，時間を追って観察すると*in vivo*の細胞核と同様のreplication fociの空間的パターンの推移を示し，複製されるゲノム領域の順序（複製タイミングプログラム）も*in vivo*のそれと一致したのに対し，G1期1



■図2　複製タイミングのゲノムワイド解析

A：複製タイミングのゲノムワイド解析の概要．本文参照．

B：染色体はMb単位の複製ドメインの集合体である．図はES細胞（ESC）のデータ．マイクロアレイのプローブごとのLog比 [Log_2（Early/Late）] をマウス1番染色体座標軸上に並べたのが上のパネル．これに移動平均（Loess-smoothed curve）をオーバーレイしたのが真ん中のパネル．さらに，同調的に複製する領域（複製ドメイン）を分節化アルゴリズム（segmentation algorithm）により同定したものが下のパネル．

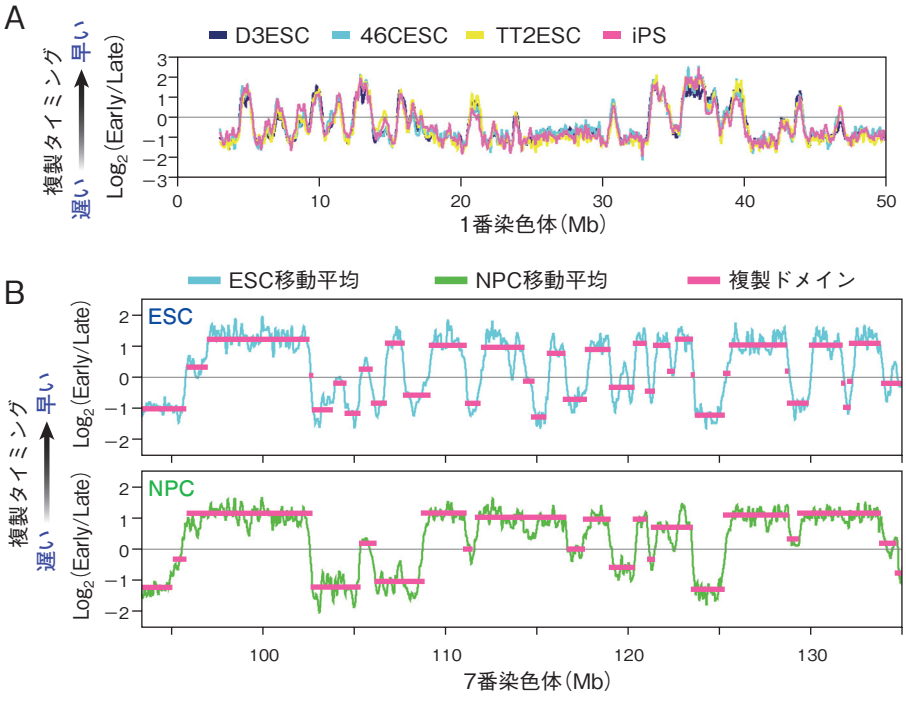
Hiratani I, et al: PLoS Biology (2008), in press より改変．

時間後までに単離した核はそのような空間的パターンの推移を示さず，複製タイミングプログラムも*in vivo*のそれを反映しなかった．すなわち，プログラムはG1期1～2時間に確立したことになる．我々はこの決定期をTDP（timing decision point）と名付けた[9]．

興味深いことに，G1期TDPは哺乳類細胞において分裂期直後にゲノムDNAの核内配置が落ち着く時期，すなわち分裂期染色体が脱凝縮し，染色体テリトリーとなって配置が落ち着く時期と一致する[3), 9)]（図1C）．別の一連の研究から，分裂期以外の時期（間期）は染色体の動きが比較的限定されているが（0.5～1 μm），例外的にG1期初期には数μm以上動くことが観察されている[10), 11)]．併せて考えると，この限られたG1期初期の時間帯にゲノムDNAが核の中でどう動き，どのような配置で最終的に落ち着くかが複製タイミングのプログラムを決定するうえで重要な鍵を握ると考えられる．逆にG1期初期は，複製タイミングプログラムの維持または変化を決定する機会を細胞に提供してくれる．

ただ，G1期TDP時点のゲノムの核内配置がその後維持されずとも，複製タイミングプログラムは正しく実行されるようである．例えば，出芽酵母ではG1期TDPに核膜と相互作用するゲノム領域をTDP以後のG1期に核膜から強制的に離しても直後のS期にその複製タイミングプログラムは正しく実行される[12)]．したがって，G1期TDPに個々の複製ドメインに対して複製タイミングのプログラムが何らかの形で刷り込まれるようである．その分子的実体は不明だが，核内に点在する異なるタンパク質群が相互作用を介して個々の複製ドメインに何らかの修飾を施すのかもしれない．

一方，染色体DNA上の複製オリジンの位置も細胞が分裂するごとにG1期に新たに確立される[13)]．これはTDPより遅れてG1期3～4時間に確立され，我々はこの決定期をODP（origin decision point）と名付けた[13)]．すなわち，複製オリジンの確立とその複製タイミングの確立は独立に制御されている．*β-globin*遺伝子座は複製タイミングの異なる細胞で同じ複製オリジンを使っており，この考えを支持する[3)]．



■図3　ES細胞，iPS細胞，神経前駆細胞の複製タイミングプロファイル

A：ES細胞（ESC）とiPS細胞の比較．3つのES細胞株（D3，46C，TT2）およびiPS細胞はほぼ同じ複製タイミングプロファイルを示した．グラフは移動平均（Loess-smoothed curve）．

B：ESCと神経前駆細胞（NPC）の比較．複製タイミングプロファイルはESCからNPCへの分化に伴って大きく変化した．図は移動平均（Loess-smoothed curve）グラフの上に同定された複製ドメイン（図2B参照）をオーバーレイしたもの．

Hiratani I, et al: PLoS Biology (2008), in press より改変．

Ⅲ 複製タイミングの発生過程における制御

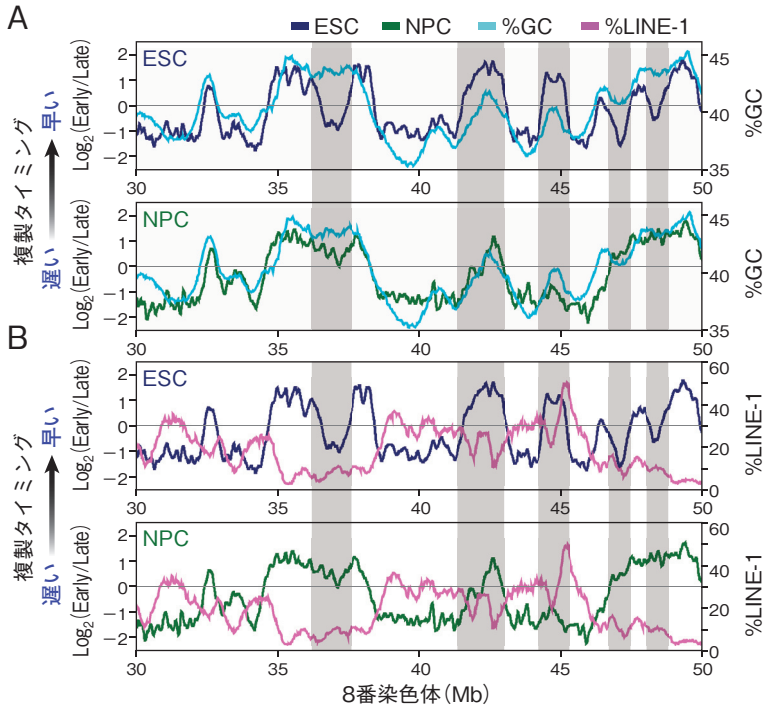
哺乳類の雌の不活性X染色体は発生に伴い複製タイミングが変化する好例である．雌の不活性X染色体はマウス6日胚の時期に不活性化され，その複製タイミングも顕著に遅くなる[14]．*β-globin*遺伝子座も発生過程において制御を受ける良い例である．赤血球以外の細胞では*β-globin*遺伝子座は複製タイミングが遅く不活性型のクロマチン構造をとるが，*β-globin*を発現する赤血球細胞または発現誘導可能な赤血球前駆細胞では*β-globin*を含む1Mb以上の領域で複製タイミングが早くなる[3]．この他にも転写活性依存的に複製タイミングの違いを示す遺伝子座がいくつか知られており，早期複製タイミングは転写に必要である（が十分でない），と一般的に考えられている[3]．

じつは，雌の不活性X染色体以外に分化に伴う複製タイミングの変化を直接観察した例はなかった（*β-globin*などは複数の細胞株の比較である）．しかし，2004年に筆者らを含め2つのグループがES細胞の神経分化に伴う複製タイミングの変化を直接観察することに成功した[15), 16)]．変化は高AT含量でLINE-1（long interspersed nuclear element-1）密度の高いゲノム領域で見られ，遺伝子発現の変化を伴う．また，神経分化に伴い複製タイミングが早くなる*Mash1*遺伝子座は核膜周辺から核内部へとその核内配置を変化させた[17)]．これはreplication fociの空間的パターンのS期における推移（図1B）と矛盾しない．

一方，ヒト22番染色体のマイクロアレイ解析によるとリンパ芽球様細胞と線維芽細胞は約1%の複製タイミングの違いを示すのみである[18)]．しかし，ヒト22番染色体は最も複製タイミングが早くかつ非常に高GC含量の染色体であり[19)]，これが例外的な可能性もある．したがって，分化に伴う複製タイミングの変化がどのゲノム領域でどの程度起こるのか，ゲノムレベルの全体像は得られていない．

本稿では便宜上，複製ドメインという用語を繰り返し用いてきた．しかし，じつはこれすらもDNAファイバーを用いた個別のゲノム領域の実験データから生まれた概念であり[8)]，ゲノムレベルでこの概念がどこまで正しいのかは未解決の問題である．また，複製ドメインが約1Mbの染色体の基本単位（sub-chromosomal foci）として存在し，核内でも1つ1つのreplication fociとして細胞分裂を経ても安定に存在する，とする考え方がある[20), 21)]．魅力的な説ではあるが，その裏付けは細胞生物学的な観察が主であり，分子生物学的な裏付けが欠けている．このように，複製タイミングに関してはその基本的な概念に確固たる実験的証拠が欠けている面も否めない．

このような背景を念頭に，筆者らは高密度のマイクロアレイを使ってマウスのES細胞の複製タイミングと複製ドメイン構造をゲノムレベルで明らかにし，またその神経分化に伴う変化を追うという試みを続けてきた．以下に筆者らの最新のデータを紹介する[22)]．



■図4　複製タイミングとGC含量およびLINE-1密度の比較

A：複製タイミングとGC含量（%GC）の比較．ES細胞（ESC；上のパネル）は複製タイミングとGC含量のカーブに正の相関が見られない箇所が多いが（　の部分），神経前駆細胞（NPC；下のパネル）で両者は良い相関を示す．

B：複製タイミングとLINE-1密度（%LINE-1）の比較．Aと同様，複製タイミングとLINE-1密度のカーブに負の相関が見られない箇所がESCに多い（　の部分）．NPCでは2つのカーブはほぼ鏡像の関係にある．

Hiratani I, et al: PLoS Biology (2008), in pressより改変．

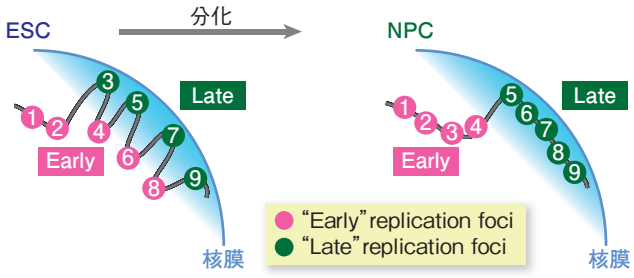
Ⅳ ES細胞分化に伴う複製タイミングとその変化のゲノムワイド解析

解析は次の手順で行った（図2A）．まず細胞にブロモデオキシウリジン（BrdU）を1～2時間取り込ませて固定し，フローサイトメトリーを用いて細胞当たりのDNA量をもとにS期前半およびS期後半の細胞をそれぞれ分画する．抗BrdU抗体を用いた免疫沈降によりS期前半分画からは複製時期の早いゲノム領域のDNA（“Early”）を，S期後半分画からは複製時期の遅い領域のDNA（“Late”）を得る．これらを別々の蛍光色素でラベルし，マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせ，プローブごとのLog比[Log_2（Early/Late）]を染色体座標軸上に並べて各ゲノム領域の複製タイミングを調べる．複製タイミングの早い領域と遅い領域はそれぞれ高い比，低い比を示す．これを3つのES細胞株（D3，46C，TT2）で調べ，またES細胞を神経前駆細胞へ分化させるプロトコル2種類を用いて分化前後のプロファイルの比較を行った[22]．用いたマイクロアレイのプローブ密度は染色体上5.8kbごとに1つである（Nimblegen Systems）．

結果は美しいものであった．染色体は確かにMb単位の複製ドメインの集合体であった（図2B）．ドメイン構造および境界の位置は3つのES細胞株でよく保存されており，また驚くべきことにiPS細胞（induced pluripotent stem cells；リプログラミングされ多能性を獲得した体細胞）もES細胞とほぼ同じプロファイルを示した（図3A）．

では神経分化後はどうか．分化後，ゲノム上の複製ドメインの構図は予想外に大きく変化した（図3B）．ドメインの数が明らかに減り，そのサイズが増大したのである．すなわち，ES細胞において隣接していた複数の小さな複製ドメインが，分化後には高頻度で“吸収合併”されて1つの大きな複製ドメインを形成していたのである．変化はゲノム上の約20%に及んだ．

また，神経前駆細胞で複製タイミングはDNA配列特性（GC含量とLINE-1密度）と強い相関を示したが，ES細胞では比較的弱い相関しか示さなかった（図4）．例えば，一般的に低GC含量の領域は複製タイミングが遅いが，低GC含量かつ複製タイミングの早い領域はES細胞にはるかに多い．つまりES細胞は，DNA配列特性に見合わない複製タイミングを示す小さなドメインを多数持つという特殊性を示す．この特殊性はiPS



■図5　ゲノムの高次折り畳み様式の分化に伴う変化のモデル

ゲノム上で隣接する数Mbの高GC含量領域（図中replication foci❶～❹に対応）と低GC含量領域（replication foci❺～❾に対応）を想定して説明する．ES細胞（ESC）において，GC含量に見合わない複製タイミングを示すreplication foci❸，❻，❽は，神経前駆細胞（NPC）への分化に伴い配列特性に合致するように複製タイミングを変化させ，結果的に周囲の複製タイミングに吸収合併される．複製タイミングの早い領域と遅い領域をそれぞれマゼンタと緑で示した．複製タイミングの変化に伴って核内配置も周囲に吸収合併される可能性がある．なお，このような変化がreplication foci単位で起きるかどうかは定かではないが，図では便宜的にそうした．

Hiratani I, et al: PLos Biology (2008), in pressより改変．

細胞にも認められることから，多能性を持つ細胞に共通する新規の性質である可能性がある．これらの例外的なドメインは，分化に伴い，配列特性に合致するように複製タイミングを変化させ結果的に周囲に吸収合併される．

複製タイミングの変化はドメイン内の転写制御の変化と核内配置の変化も伴っていた．前者は早期複製タイミングと転写活性の相関と矛盾せず，後者はreplication fociの空間的パターンのS期における推移と矛盾しなかった．このことは，核内におけるゲノムの折り畳み様式が初期発生に伴いこれまで知られていなかったレベルで変化していることを示唆している（図5）．

一方，replication fociの推定サイズ（約1Mb）をはるかに超える大きな複製ドメインの存在も明らかになった．このようなドメインは複数の隣接したreplication fociに相当すると思われる．また，ドメイン間の境界は複製オリジンが存在しない領域（1つの単一方向性の複製フォークが複製を担う領域）と考えて理論上矛盾しなかった．ゲノム上には単一方向性の複製フォークによって複製される配列が予想以上に多いのかもしれない[8]．

V 今後の展望

複製タイミングの変化や複製ドメインの“吸収合併”は何によって引き起こされるのだろうか？ ES細胞と分化細胞の細胞周期制御の違い，特にG1期がこれを解く1つの鍵になるかもしれない．ES細胞はG1期が非常に短いことから，分裂期直後にゲノムDNAの核内配置が落ち着くまでの時間が非常に短い．また，分化細胞ではゲノムDNAの再配置にDNA配列特性（GC含量とLINE-1密度）が大きく関与するが，ES細胞ではその関与の度合いが小さい[22]．したがって，何らかの形でES細胞特異的な核内再配置が起こると思われる．ES細胞におけるG1期制御はまだ不明な点が多い[23]．また，分裂期からG1期にかけての染色体の運命，すなわち染色体の脱凝縮から染色体テリトリー形態をとるまでの推移も未解明の部分が多い[24]．例えばTDPはチャイニーズハムスター卵巣細胞（Chinese hamster ovary cells）ではG1期1～2時間に相当するが[9]，マウス線維芽細胞C127ではG1期2～3時間に相当することから[25]，染色体DNAの核内再配置が決まる様式は細胞の種類ごとに微妙に異なることが想像される．このあたりの理解が突破口になる可能性がある．複製ドメインという切り口から，これまでブラックボックスに近かったMbレベルの染色体の基本単位とその発生・分化に伴う変化に迫ることもできるかもしれない．

前述の通り，複製タイミング制御は遺伝物質を正しく倍加させるために必要なわけではなく，ゲノムの高次の折り畳み構造を反映したものと考えられる．今回の筆者らのデータはその高次の折り畳みの様式が初期発生過程でかなり大規模に変わることを示唆する．その意味で，複製タイミングのプロファイル変化に伴って分化細胞のリプログラミング（reprogramming；多能性の再獲得）効率がどう変化するかは，複製タイミングの意義を占う上でも興味深い．また，G1期のTDPまでの期間はリプログラミング効率の最も高い時期に相当するのかもしれない．

おわりに

核内で実際にどのように染色体DNA複製が進行し完了するのか，その全貌はいまだに謎めいている．解明が一筋縄ではいかないことは，すでにDNA二重らせん構造の発見から半世紀以上経ったことからも明らかである．ただ，DNA複製，特にその複製タイミングの研究は核・染色体の構造や発生・分化の分野といった一見畑違いの様々な分野と切り離せない関係にある．こういった様々な視点から総合的に取り組むことが解明への近道と思える．逆に複製タイミングの研究が自然とそのように視野を拡げてくれることも個人的経験に基づく事実である．

PROFILE 平谷伊智朗
■ David Gilbert Laboratory, Department of Biological Science, Florida State University
■ E-mail：ihiratani@bio.fsu.edu
■ 趣味：テニス，登山，スポーツ観戦
1998年東京大学理学部生物学科卒業．2003年同理学系研究科生物科学専攻博士課程修了（平良眞規研究室），理学博士．2003年7月よりDavid Gilbert研究室にてPostdoctoral Associate．SUNY Upstate Medical University（2003～2006）に所属後，研究室移転に伴い2006年9月より現所属．この間，日本学術振興会特別研究員，同海外特別研究員，IRSF（International Rett Syndrome Foundation）Research Fellowを兼ねる．学位を発生生物学にて取得後，発生・分化とDNA複製や細胞周期との関連，さらにゲノムレベルの解析に興味を持ちDavid Gilbertの下で研究を開始，現在に至る．

文 献

1) Taylor JH: J Biophys Biochem Cytol (1960) 7: 455-464
2) Taylor JH: Bioessays (1989) 10: 121-124
3) Gilbert DM: Curr Opin Cell Biol (2002) 14: 377-383
4) Gilbert DM: Nat Genet (2002) 32: 336-337
5) MacAlpine DM, et al: Chromosome Res (2005) 13: 309-326
6) Zhang J, et al: Nature (2002) 420: 198-202
7) Birney E, et al: Nature (2007) 447: 799-816
8) Berezney R, et al: Chromosoma (2000) 108: 471-484
9) Dimitrova DS, et al: Mol Cell (1999) 4: 983-993
10) Walter J, et al: J Cell Biol (2003) 160: 685-697
11) Thomson I, et al: Curr Biol (2004) 14: 166-172
12) Heun P, et al: J Cell Biol (2001) 152: 385-400
13) Wu JR, et al: Science (1996) 271: 1270-1272
14) Takagi N, et al: Chromosoma (1982) 85: 275-286
15) Hiratani I, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2004) 101: 16861-16866
16) Perry P, et al: Cell Cycle (2004) 3: 1645-1650
17) Williams RR, et al: J Cell Sci (2006) 119: 132-140
18) White EJ, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2004) 101: 17771-17776
19) Woodfine K, et al: Hum Mol Genet (2004) 13: 191-202
20) Sadoni N, et al: J Cell Sci (2004) 117: 5353-5365
21) Cremer T, et al: Curr Opin Cell Biol (2006) 18: 307-316
22) Hiratani I, et al: PLoS Biology (2008), in press
23) White J, et al: Stem Cell Rev (2005) 1: 131-138
24) Pederson T: Curr Opin Genet Dev (2004) 14: 203-209
25) Wu R, et al: J Cell Biol (2006) 174: 185-194