

博士論文

分裂酵母における複製起点決定因子の解明

東京大学 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻

氏名 増田 晃士

指導教官 白髭克彦教授

目次

論文の要旨	3
略語一覧	7
序論	8
結果	15
表	25
図	29
考察	39
結論	44
材料と方法	45
参考文献	60
謝辞	68

論文の要旨

序論

細胞の遺伝情報が正確に継承されるためには、細胞の持つ DNA が正確に倍加することが必須である。母細胞で複製された DNA は、それぞれの娘細胞に等しく分配されることで正しく継承される。そのため、細胞のもつ全てのゲノム DNA は細胞周期ごとに正確に一度だけ複製されなければならない。複製回数の過不足は遺伝情報の欠落・重複を引き起こしてしまう。また、倍加が部分的にしかおきていない複製途中の染色体は、構造的に非常に不安定であることが知られる。実際、DNA 複製に関わる遺伝子の変異が様々な疾患の原因遺伝子として報告されている。従って、DNA 複製機構の理解は生物学的な興味のみならず、疾患の原因解明においても非常に重要である。

DNA 複製は複製起点と呼ばれるゲノム DNA 上の特定領域から開始される。大きなゲノム DNA を有する真核生物ではゲノム DNA の大きさに応じて数百から数万ヶ所の複製起点が存在することが知られている。DNA 複製の破綻は細胞にとって致命的であるため、複製の開始から完了までは厳密に制御されたステップからなる。最初のステップは複製起点に複製起点認識タンパク質 (Origin Recognition Complex, ORC) が結合することである。次にこれらの ORC 結合領域からいくつかを選択され、MCM2-7 ヘリケースと呼ばれる六量体のリング状タンパク質をはじめとする複数のタンパク質因子が段階的に複製起点にリクルートされる。以上の過程を経て複製前複合体 (pre-replicative complex, pre-RC) が複製開始までに複製起点に形成される (図 1)。このような複製前複合体形成から複製の完了までのタンパク質側の詳細な分子機構が明らかとなってきた一方で、ゲノム DNA 上のどこが複製起点として機能するのかという問題、すなわち複製起点の規定因子については必ずしも明らかでない。

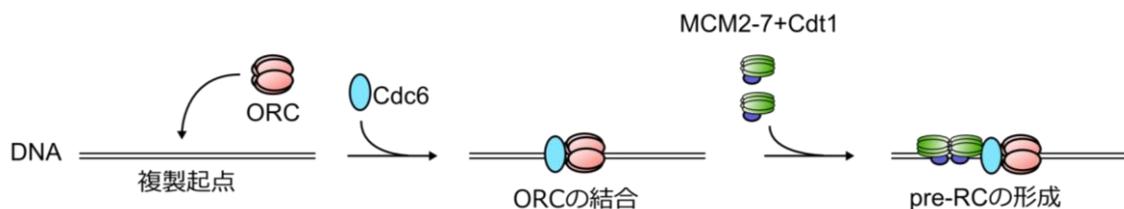


図 1. 複製の開始段階の模式図。

歴史的に最初に複製起点が同定された真核生物は出芽酵母であり、プラスミドの自己複製を誘導できる DNA 領域として同定された。この DNA 領域は特徴的な 11 bp のコンセンサス配列を有し、ORC はこのコンセンサス配列を認識して複製起点に結合することが知られる。すなわち、出芽酵母では DNA 配列によって複製起点が規定されている。面白いことに、他の真核生物種では ORC 複合体は存在するにもかかわらずこのようなコンセンサス配列が見出されない。DNA 配列とは異なる別のメカニズムによる複製起点の決定が行なわれていることがわかってきた。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において複製起点とし

て同定された DNA 領域は、A・T リッチであること、非遺伝子領域に存在することが知られている(Heichinger et al., 2006)。しかし、そのような特徴を満たす領域はゲノム DNA 上に数千か所存在しており、実際に複製が開始される複製起点の数よりも大幅に多い。そのため、複製起点の cis 決定因子の普遍的な理解が進んだとは言いがたい状況にある。本研究の目的は、分裂酵母における複製起点をゲノムワイドに解析し、複製起点を規定する因子を明らかにすることである。

近年利用可能となった大量並列型シーケンサーを活用することでゲノム上の複製起点の位置を網羅的に、かつこれまでにない高解像度で決定することが可能となってきている(ChIP-seq 法)。分裂酵母 Orc4 (ORC サブユニット) と Mcm2 (MCM ヘリケースサブユニット) の ChIP-seq 解析を行うため、染色体上のこれら遺伝子の C 末端に PK エピトープタグを付加した細胞株を作製し、G 1 期に同調した細胞を用いて抗 PK 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。

分裂酵母ゲノムにおける複製起点の同定

ChIP-seq データが妥当であるか確認するため、これまでに報告された代表的な複製起点における ChIP-seq プロファイルを調べたところ、予想通り Orc4 と Mcm2 はともに染色体に結合していることが確かめられた。次に、複製起点のゲノムワイドな分布を明らかにするため、全ゲノム上での Orc4 と Mcm2 のピーク同定を行った。Orc4 については 756 ヶ所、Mcm2 については 380 ヶ所の結合部位が同定され、Orc4 と Mcm2 の両方が存在するピークを pre-RC ピークと呼ぶことにした。本研究で同定された複製起点は既報のものといっしょに合致を示すことが確かめられた。本研究では、これまでに同定されていない pre-RC も 64 ヶ所同定された。これらの新規同定部位が確かに pre-RC ピークであることは、ChIP-定量 PCR 解析により確認されている。大量並列型シーケンサーを用いたことにより、これまでの報告よりも網羅性と解像度の両方でより優れた複製起点のマッピングができたものと考えられる。以降では、この同定された複製起点を基に、複製起点の cis 規定因子の探索を行なった。

ORC の染色体への結合はポリ(dA/dT) トラック数に相関する

複製起点の形成は ORC が染色体に結合することから始まる。本研究で同定された複製起点にコンセンサス配列が存在するかを検討するため、ORC ピークにおけるモチーフ解析を行った。この解析では、全ての Orc4 ピークをインプットとして用い、結合領域 DNA 中に保存されているモチーフ配列が存在するかを検討した。その結果、Orc4 ピークにおいて A または T 塩基が少なくとも 3 つ連続する特徴的なモチーフ配列(AAA[A/T]AAA[A/T]AAA[A/T]AAA) を同定し、ポリ(dA/dT) トラックと呼ぶことにした。Orc4 ピーク周辺のモチーフ配列数を調べたところ、1 つの Orc4 ピークに対して 2 つ以上のモチーフ配列が存在するケースが多く見られた。さらに、Orc4 の染色体結合効率とポリ

(dA/dT)トラックの数に関係を調べたところ、Orc4 の染色体への結合効率はポリ(dA/dT)トラックの数が多いほど高くなった。この結果から ORC の染色体上での存在確率がポリ(dA/dT)トラックの数に相関することを示された。

pre-RC は divergent な転写領域で優先的に形成される

多細胞生物の複製起点ではコンセンサス配列は報告されていない。これまで報告されている多細胞生物の複製起点の特徴は、複製起点と転写領域との相関である。ハエ、マウス、そしてヒトの転写開始点周辺で複製の開始が見られる傾向があることや、ゲノムワイドな解析により転写活性の高い領域と複製領域との相関が高いことが報告されている。しかしながら、いずれも相関関係を示すことにとどまっており、複製起点形成と転写の因果関係は不明である。分裂酵母において、遺伝子の転写が複製起点を規定しうるか調べるため、複製起点周辺遺伝子の転写方向を解析した。その結果、pre-RC の周辺では複製起点がない場合に比べて、両隣の遺伝子が複製起点から離れる方向に転写される divergent 転写領域の割合が大きかった。この結果は原核生物のほとんどの遺伝子がリーディング鎖にコードされており、複製装置の進行方向と遺伝子の転写方向が同一である、という構造を想起させる。もしこの構造が分裂酵母にも当てはまるのならば、複製起点周辺の転写方向の偏りは、両隣の遺伝子にとどまらず複製の終結点までみられると予想される。そこで、複製起点から 2 番目に近傍の遺伝子についても、転写方向の偏りがみられるかどうか調べた。興味深いことに複製起点から 2 番目に近い遺伝子ではそのような転写方向の偏りは全く見られなかった。すなわち、遺伝子の転写方向の偏りは複製起点の両隣の遺伝子に限られていることが示された。従って分裂酵母では、原核生物のように複製装置の進行方向と転写方向を同じとなるような偏りがあるのではなく、遺伝子上流領域が pre-RC の形成に好ましい構造であることが示唆された。

転写方向の反転は pre-RC の形成を阻害する

pre-RC の両隣の遺伝子として divergent 転写領域が好まれることから、転写している遺伝子上流領域が pre-RC の形成を促進する、という仮説が考えられた。その仮説を検証するため、複製起点両隣の内在性遺伝子の転写方向を反転させたときに、pre-RC の形成が阻害されるかを調べた。複製起点の両隣で 2 つの遺伝子が同じ方向に転写される tandem 転写領域のうちの一つの遺伝子(*urg1*)の転写方向を反転させ、両方の遺伝子の転写方向が複製起点に向かう convergent 転写領域に変換したときの pre-RC の形成を調べた。その結果、転写方向を反転させた遺伝子の隣の複製起点では、Mcm2 の結合量は約 60%程まで減少した。一方、転写方向を反転させても、ORC の結合量は変わらなかった。Convergent 転写領域では複製起点側に遺伝子上流領域が無いため、pre-RC の効率的な形成には少なくとも一つの遺伝子上流領域が必要であることが示された。これは、複製起点両隣の遺伝子の転写が pre-RC の形成を制御することを示す、初めての直接的な証拠であった。

結論

本研究では、分裂酵母における複製起点の決定因子の探索を行った。Orc4 と Mcm2 の ChIP-seq のデータ解析の結果、ORC はポリ(dA/dT)トラック依存的に染色体へ結合することが示された。また、遺伝子上流領域が pre-RC の形成にとって好ましい領域であること、pre-RC 近傍遺伝子の転写方向の反転によって pre-RC の形成が阻害されたことが見いだされた。転写開始点上流に作り出されるクロマチン環境、例えば負の DNA 超らせん構造が蓄積するような環境が、ポリ(dA/dT)トラックに加えて複製起点決定因子として機能していることが強く示唆された。

略語一覽

ACS	ARS consensus sequence
ARS	autonomously replicating sequence
CDK	cyclin-dependent kinase
Cdc45	autonomously replicating sequence
ChIP	chromatin immunoprecipitation
ChIP-qPCR	ChIP followed by quantitative PCR
ChIP-seq	ChIP followed by massively parallel DNA sequencing
DDK	Dbf4-dependent kinase
GINS	go ichi ni san
HU	hydroxyl urea
MCM	minichromosome maintenance
ORC	origin recognition complex
PCR	polymerase chain reaction
PI	propidium iodide
RPKM	Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads
<i>S. japonicus</i>	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>
<i>S. octosporus</i>	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TSS	transcription start site
TTS	transcription termination site
dsDNA	double strand DNA
pre-IC	pre-initiation complex
pre-RC	pre-replicative complex
ssDNA	single strand DNA

序論

正確な DNA 複製は遺伝情報の継承にとって必須である

細胞の遺伝情報の一部は DNA と呼ばれる核酸の配列によってコードされる。DNA はアデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、そしてシトシン (C) の 4 種類の塩基とデオキシリボースおよびリン酸から成り、これら 4 つの塩基が数珠状につながり合わせた高分子生体物質である。DNA には方向性があり、通常細胞内では二本の DNA 鎖は反平行二重らせん構造を取る。この二重らせん中の 4 種類の塩基には相補性があり、A は T と、G は C とそれぞれ水素結合を介した塩基対を形成し安定化している。重要な点は、それら塩基配列の組み合わせによって、遺伝子をはじめとする機能単位が規定されることであり、それが細胞、さらには生物を特徴づけることである。従って、細胞の遺伝情報を正確に継承するためには、DNA 配列が正確にコピーされることが必須である。母細胞でコピーされた DNA は、そのコピーの半分をそれぞれの娘細胞に等しく分配されることで継承される。逆に DNA が正確に複製されない場合には、細胞の遺伝情報は正しく継承されない。例えば、DNA の複製が不十分であれば、遺伝子の欠失が起これ、逆にある領域が二回以上複製されると、遺伝子が過剰に受け継がれることは容易に想像できる。ヒトの細胞は約 30 億塩基という長大な DNA を有しているため、エラー率が 10 億塩基対に 1 つという極めて高い精度で DNA の複製が行われることも頷ける。

DNA 複製に関わる遺伝子の変異が以下に示す疾患の原因遺伝子として報告されていることから DNA の正確な複製が細胞の正常な増殖に必須であることは明らかである。RecQ ヘリケースファミリーである BLM、WRN、RECQ4L 遺伝子はそれぞれ常染色体劣性遺伝病 Bloom's Syndrome (BLOOM, 1954)、Werner's Syndrome (Muftuoglu et al., 2008)、Rothmund-Thompson Syndrome (Vennos et al., 1992) の原因遺伝子である。RecQ ヘリケースは、ATP 依存的に DNA を開裂させる働きがあり、DNA 損傷の修復に必須のタンパク質である。また、RecQ ヘリケースは正常な DNA の複製や組み換えにも必要である。これらの疾患の共通点は身体発達遅延と高い発がん率である。Bloom's Syndrome では、低身長、頭蓋が小さいこと (小頭症)、また幼少期には頬に発赤がみられる。発がん率が高く、固形腫瘍と血液悪性疾患が主な死因となる。Werner's syndrome の特徴は、若年成人期における早期老化症である。成人では毛髪の色化、脱毛、そして皮膚の委縮に伴う顔面の早老化がみられる。Rothmund-Thompson

Syndrome では、頬の発赤と水泡の他に、親指の形成異常や橈骨の欠如、膝蓋骨の縮小などを含む骨格形成異常がみられる。また、DNA ヘリケースである MCM4 (後述) の変異が免疫不全、ゲノム DNA の不安定化、副腎機能不全を引き起こすという報告がある(Gineau et al., 2012; Hughes et al., 2012; Shima et al., 2007)。従って、DNA の複製機構の理解は生物学的な興味のみならず、疾患の原因解明においても非常に重要である。

真正細菌、古細菌、および真核生物における複製開始機構

細胞が増殖する際には、1つの母細胞が細胞分裂を成すことにより2つの娘細胞が生まれる。DNA の複製と分配は細胞の規則的なサイクルによって制御され、これを細胞周期という。DNA が複製される時期を S 期、分配される時期を M 期と呼び、M 期から S 期までの間の DNA の複製の準備時期を G1 期、S 期から M 期までの間の DNA の分配の準備時期を G2 期とそれぞれ呼ぶ。S 期における DNA の複製は複製の開始、伸長、終結の3段階で進む。上述したように DNA の複製は細胞の増殖にとって根源的事象であると同時に、医学的にも重要な主題であったため、古くから研究が行われてきた(O'Donnell et al., 2013)。モデル生物としては、真正細菌と古細菌を含む原核生物、さらに出芽酵母、分裂酵母、シロイヌナズナ、ハエ、カエル、マウス、ヒトを含む真核生物が用いられた。真正細菌、古細菌と真核生物における複製機構は異なる点も多いが、重要な共通項もある。以下主に複製の開始機構について、真正細菌、古細菌、真核生物での共通点と相違点を述べつつ概説する。

まず、DNA 複製は複製起点と呼ばれるゲノム DNA の特徴的な領域から開始される。小さい環状 DNA を有する真正細菌では基本的に1ヶ所、古細菌では1ヶ所から数か所、大きなゲノム DNA を有する真核生物ではゲノム DNA の大きさに応じて数百から数万ヶ所の複製起点が存在する(Leonard and Méchali, 2013)。複製開始の初めのステップは複製起点に複製起点認識タンパク質が結合することであり、この段階は3つの生物界で共通している。真正細菌と古細菌の複製起点は複製起点認識タンパク質が認識する特徴的な DNA モチーフ配列が存在するが、真核生物では、出芽酵母を除いてそのようなモチーフ配列は確認されていない。複製起点認識タンパク質は AAA⁺ファミリーに含まれており、ATP の結合によって活性化し、ATP 加水分解によって不活性化する(Duderstadt and Berger, 2008)。真正細菌、古細菌、真核生物の複製起点認識タンパク質はそれぞれ DnaA、Orc1/Cdc6、ORC (origin recognition complex) である(O'Donnell

et al., 2013)。真正細菌と古細菌の DnaA と Orc1/Cdc6 は共に複製起点に単量体として結合し、DNA 上でフィラメント構造を形成した後、ATP の結合によって A/T-rich な二本鎖 DNA (double strand DNA, dsDNA) を開裂させる働きを持つ (図 1、細菌、古細菌) (Mackiewicz et al., 2004)。dsDNA が開裂し、一本鎖 DNA (single strand DNA, ssDNA) となった複製起点は後述する pre-replicative complex (pre-RC) が形成される足場となる。一方、真核生物では ORC はリング状の六量体として存在し、複製起点に結合するものの、dsDNA を開裂させる働きは無い (図 1、真核生物) (Masai et al., 2010)。

複製起点認識タンパク質の複製起点への結合は、続く pre-RC 形成に必要なステップである。pre-RC の形成では、M 期後期から G1 期にかけて DNA ヘリケースと呼ばれる六量体のリング状タンパク質が複製起点にリクルートされる。これを DNA replication licensing と呼ぶ。2 分子の DNA ヘリケースは最終的に 2 つの複製フォークを形成し、ATP 加水分解によって得られたエネルギーを利用して、dsDNA を開裂させながら複製起点から両方向に移動していく (Gai et al., 2010)。真正細菌と古細菌の DNA ヘリケースはそれぞれ DnaB と MCM (Minichromosome maintenance) であり、ホモ六量体を形成する。一方、真核生物の DNA ヘリケースは MCM2-7 であり、ヘテロ六量体である (O'Donnell et al., 2013)。また、真正細菌の DnaB は DNA の 5'側から 3'側へ、ラギング鎖上を移動するのにに対し、古細菌と真核生物の MCM および MCM2-7 ヘリケースは DNA の 3'側から 5'側へ、リーディング鎖上を移動するという違いがある。その他の違いとして、真正細菌と古細菌では DNA ヘリケースは ssDNA にリクルートされるが、真核生物では DNA ヘリケースは dsDNA にリクルートされる。真核生物では、ORC はまず Cdc6 タンパク質をリクルートし、続いて Cdc6-ORC 複合体が MCM2-7 ヘリケースをリクルートする (図 1、真核生物のヘリケースリクルートメント)。MCM2-7 ヘリケースは Cdt1 タンパク質と複合体を形成しており、これが pre-RC の形成を促進している。2 分子の Cdt1-MCM2-7 ヘリケースは、MCM2-7 の N 末端側を向い合せて DNA に結合する。この段階では、dsDNA は MCM2-7 ヘリケースのリングの中央に通っておらず、Cdc6 による ATP の加水分解によって MCM2-7 ヘリケースのリングに dsDNA が通る (図 1、真核生物のヘリケースローディング)。最後に ORC による ATP の加水分解によって、Cdc6 が複製起点から遊離し、MCM2-7 ヘリケースのローディングが完了する。ただしこの後の複製の開始段階では、全ての pre-RC から一様に複製が開始されるわけではない。それぞれの複製起点が発火するには pre-RC が活性化されなければならない。活性の強い pre-RC から S 期の初期に複製が順に開始され、

活性の弱い複製起点はS期の後期に発火するか、近傍の複製起点由来の複製装置によって受動的に複製される。

DNAヘリケースがS期に活性化するためには、少なくとも1つの別の因子による制御が必要となる。真正細菌では、DNAヘリケースDnaBのC末端に結合したDnaCが複合体を形成し(Ludlam et al., 2001)、DnaA依存的に複製起点にロードされる。DnaCはAAA+ファミリータンパク質であり、ATPと結合している時はDnaBを不活性化している(Allen and Kornberg, 1991; Davey et al., 2002)。DNAヘリケースの活性化段階では、プライマーゼDnaGがDnaBのN末端に結合し、続いてATPの加水分解とともにDnaCがDnaBから遊離し、最終的にDnaBが活性化される。

真核生物では、pre-RC自体はヘリケース活性は無く、別の因子によって活性化される必要がある。活性化されDNA複製を開始する直前の複合体をpre-initiation complex (pre-IC)と呼び、pre-ICではCdc45とGINSの2つの因子がMCM2-7ヘリケースと強固な複合体、Cdc45-MCM-GINS (CMG)複合体を形成する(Gambus et al., 2006; Tanaka and Araki, 2013)。真核生物では、出芽酵母のpre-RC活性化について、最も詳細な研究がなされている。出芽酵母では、pre-ICの形成はDbf4-dependent kinase (DDK)とcyclin-dependent kinase (CDK)の二つのキナーゼによって制御されている。まず、G1期においてSld3、Sld7、Cdc45がpre-RCにリクルートされる。Sld3とSld7は強固な複合体として存在しており、細胞がG1期に入ってDDKの活性が上昇し始めると、DDKはMCM2-7ヘリケースをリン酸化する。このリン酸化がSld3-Sld7-Cdc45のpre-RCへのリクルートを促進する(図2、pre-RC)(Tanaka et al., 2011)。細胞がS期に入りS期CDK(S-CDK)の活性が上昇すると、GINS複合体がCDK依存的にSld3-Sld7-Cdc45の結合したpre-RCにリクルートされ、CMG複合体を形成する(Heller et al., 2011; Masumoto et al., 2002; Tak et al., 2006; Tanaka et al., 2007; Zegerman and Diffley, 2007)。ただし、GINS複合体は単体でpre-RCに結合する訳ではなく、Sld2-Dpb11-Polεと複合体を形成し、pre-RCに結合する。詳細な機構としては、活性化したS-CDKがSld2をリン酸化することで、Sld2とDpb11の結合が促進され、さらにGINS、Polεが結合することで複合体を形成する(図2)。S-CDKはpre-RC上のSld3もリン酸化し、最終的にpre-RCにSld2-Dpb11-GINS-Polε複合体がリクルートされる。CMG複合体形成後、DNAポリメラーゼやMcm10がpre-ICにリクルートされ、複製装置が複製を開始する(Tanaka and Araki, 2013)。

このように、複製の開始には、1) DnaA(真正細菌)、ORC(真核生物)などの複製起点

認識タンパク質の複製起点への結合、2) DnaB (真正細菌)、MCM ヘリケース(古細菌、真核生物)の複製起点へのローディングによる pre-RC の形成、3) Cdc45、GINS を始めとする因子のリクルートによる pre-IC の形成、という明確に異なるステップが存在し、これらのステップが厳密に制御されることで、1回の細胞周期においてただ1度の DNA の複製が保障されている。

出芽酵母と分裂酵母における複製起点の共通点と相違点

上記のように、複製起点形成の詳細な機構が明らかとなってきた。ところで、真正細菌では基本的に1ヶ所の複製起点から複製が開始されるが、より大きなゲノムを有する真核生物では、数百から数万の複製起点から複製が開始される。では、一体何がゲノム DNA 上からそれら複製起点を規定するのだろうか。

歴史的には、出芽酵母においてプラスミドを自己複製することのできる DNA 領域が複製起点として初めて同定された(Stinchcomb et al., 1979)。この DNA 領域は autonomously replicating sequences (ARSs) と呼ばれ、ARS consensus sequences (ACS) と呼ばれる 11 bp のコンセンサス配列を含む(Van Houten and Newlon, 1990)。出芽酵母では、ORC は ACS を認識し、複製起点に結合する(Bell and Stillman, 1992)。しかしながら、複製起点におけるこのようなコンセンサス配列は出芽酵母以外の真核生物では報告されていない(O'Donnell et al., 2013)。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) では、A または T が連続した配列ポリ(dA)トラックが複製起点において確認されている(Clyne and Kelly, 1995; Dai et al., 2005; Dubey et al., 1996; Okuno et al., 1999; Segurado et al., 2003)。ORC サブユニットの一つである Orc4 の N 末端に存在する 9 つの AT-hook ドメインが A/T リッチ配列を認識することで ORC は複製起点に結合する(Chuang and Kelly, 1999)。そのため ORC の複製起点への結合は Orc4 のみによって依存しており、他のサブユニットは複製起点に結合できないことが明らかとなっている(Chuang et al., 2002; Kong and DePamphilis, 2001; Moon et al., 1999)。

分裂酵母においてはこれまでも様々な手法で複製起点が同定されてきた(Feng et al., 2006; Heichinger et al., 2006; Xu et al., 2012)。複製起点の特徴の一つは遺伝子間領域に存在することである(Heichinger et al., 2006)。出芽酵母でも、複製起点上で転写が誘導されると ORC の染色体への結合が阻害されることが当研究室から報告されている(Mori and Shirahige, 2007)。またプラスミド上の複製についても、転写領域と複製

領域の重なりは複製を阻害することが報告されており(Nieduszynski et al., 2005)、複製起点と重なる転写は複製を阻害するという点は出芽酵母と分裂酵母で共通であるようである。

出芽酵母における、複製起点のもう一つの特徴はヌクレオソームが欠失していることである。AT-rich である ACS の周辺では、ヌクレオソームの存在確率が低い(Berbenetz et al., 2010; Eaton et al., 2010)。興味深いことに、ORC が ACS に結合すると、ヌクレオソームが規則的に配置されること(Berbenetz et al., 2010; Eaton et al., 2010)、またヌクレオソームを完全に除外すると複製起点の活性が低下することから(Lipford and Bell, 2001)、ヌクレオソームの適切な配置が複製起点の規定因子であることが示唆されている。分裂酵母の複製起点においては、ヌクレオソームの欠失しているという報告と(Givens et al., 2012; Lantermann et al., 2010; Xu et al., 2012)、欠失していないという報告があり(de Castro et al., 2011)、議論が分かれている。

これまで述べてきたような分裂酵母における複製起点の特徴が報告されているが、分裂酵母においてポリ(A) トラックが存在する遺伝子間領域はゲノム上に数千か所存在し、実際に複製が開始される複製起点の数百か所(Heichinger et al., 2006; Xu et al., 2012)に比べて大幅に多い。従って複製起点の規定因子が全て明らかになっているとは言いがたい状況にある。多細胞生物では、特徴的な DNA 配列は全く報告されていない。多細胞生物における複製起点の特徴としては、転写と複製が関連していることである。この転写と複製起点の相関はシロイヌナズナ(Costas et al., 2011)、ハエ(Cayrou et al., 2011; Eaton et al., 2011; MacAlpine et al., 2004)、マウス(Cayrou et al., 2011)、そしてヒト(Cadoret et al., 2008; Huvet et al., 2007; Karnani et al., 2010; Martin et al., 2011)において報告されているが、いずれも間接的な証拠に基づくものであり、転写が複製に与える影響は未だ不明である。

本研究の目的と意義

DNA の複製は細胞増殖にとって根源的な現象であり、その破綻は細胞に致命的な影響を与えることから、生物学だけでなく医学的にも重要な主題である。複製の開始は複製起点認識タンパク質の複製起点への結合、pre-RC の形成、pre-RC の活性化という厳密に制御されたステップから成り、この制御機構は真正細菌から多細胞生物まで保存されている。しかしながら、真正細菌と出芽酵母を除いて、複製起点を規定する因子は完全には明らかとなっていない。本研究の目的は、分裂酵母における複製起点をゲノムワイドに解析し、複製起点を規定する因子を明らかにすることである。

結果

分裂酵母ゲノムにおける複製起点の同定

真核生物における DNA の複製は複製起点と呼ばれる DNA 上に多数存在する特定領域から始まる。これまでの研究により複製開始点に結合する多数のタンパク質因子が同定され、それらがどのように協調して複製開始反応を引き起こすかの詳細な機構が明らかとなってきた。一方、複製開始点を規定する DNA 側の要因については、出芽酵母において特徴的な 11 bp のコンセンサス配列が複製起点の決定因子として非常に重要であることが見いだされている。しかし、そのようなコンセンサス配列は他の真核生物種では見いだされず、複製起点の cis の決定因子の普遍的な理解が進んだとはいえない状況にある。そこで、本研究ではモデル生物の一つである分裂酵母 *S. pombe* を用いて複製起点の cis の規定因子の解明を試みた。近年利用可能となった大量並列型シーケンサーを活用することでゲノム上の複製起点の位置を網羅的に、かつこれまでになく高解像度で決定することが可能となってきた (ChIP-seq 法)。本研究ではこのようにして得られた *S. pombe* の高解像度な複製起点情報を基に、他のさまざまなゲノム学的情報との相互比較を通じて分裂酵母複製起点の cis 決定因子を明らかにすることを目指した。

序で述べたように複製開始前複合体を構成する進化的に保存された因子として ORC と MCM 複合体が知られる。ORC はゲノム DNA 上の複製起点に最初に結合するタンパク質であり、MCM 複合体は ORC を足場に染色体に結合し、複製反応において二本鎖 DNA の開裂を担うヘリケースとして機能すると考えられている因子である。DNA 複製直前 (G1 期) の細胞中でのこれら因子の染色体局在を明らかにすることで、複製開始点の位置を同定することができる。そこで、分裂酵母 Orc4 (ORC サブユニット) と Mcm2 (MCM 複合体サブユニット) の ChIP-seq 解析を行うために、染色体上のこれら遺伝子の C 末端に PK エピトープタグを付加した細胞株を作製し、G1 期に同調した細胞を用いて、抗 PK 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った (詳細は「材料と方法」)。結果を図 4 に示す。図 4a のグラフは、ORC ないし MCM 複合体と共精製されたゲノム DNA の相対頻度を示しており、ピークの位置する箇所が ORC や MCM 複合体の結合部位であると解釈される。これまでに報告された代表的な複製起点 (Hayano et al., 2011; Hayashi et al., 2007) における ChIP-seq プロファイルをみたところ、予想通り Orc4 と Mcm2 はともに高頻度で結合していることが確かめられた。(図 4a)。真核生

物ではゲノム上の全ての複製起点が細胞周期ごとに発火するのではなく、その複製“活性”に強弱があることが知られている。複製起点の活性についての情報を得るために、S 期初期に停止させた細胞を用い、そのゲノム DNA をそのまま大量並列型シーケンサーで解析して複製が完了した領域を同定することも行った。複製済みの領域は周りの領域よりも DNA の相対量が多く検出される。このような複製済み領域に含まれる複製起点は活性が高い（より正確には S 期初期までに発火する活性をもつ初期複製開始点である）ことがわかる。図 4a のパネルの下段にこのようにして得られた複製プロファイルを示す。DNA コピー数比は S 期初期複製起点として同定された *ori1-200* および *ars2004* では高く、一方 S 期後期複製起点として同定された *AT2080* では低かった（図 4a）。これらの結果は、今回行った Orc4 および Mcm2 の ChIP-seq 解析、ならびに S 期初期 DNA 複製プロファイル解析が正しく行われ、これまでの知見と矛盾しないきれいなデータが得られたことを示唆している。

次に、複製起点のゲノムワイドな分布を明らかにするため、全ゲノム上での Orc4 と Mcm2 のピーク同定を行った（詳細は「材料と方法」）。Orc4 については 756 ヶ所、Mcm2 については 380 ヶ所の結合部位が同定された。解析を簡潔にするため、反復配列からなるセントロメア、テロメア、および rDNA 領域に位置するピークは以降の解析では考慮しないこととした。図 4b に示されるように、Mcm2 ピークのほとんどは Orc4 のピークと重なっており、これは染色体上の ORC 結合部位に MCM ヘリケースがリクルートされるというこれまでの知見と一致していた。これらのピークは G1 期染色体上で形成される pre-replication complex (pre-RC) を表していると考えられ、以降では pre-RC ピークと呼ぶことにした。一方、約 60% の Orc4 ピークは Mcm2 ピークと重ならなかった。このような Mcm2 が共局在しない Orc4 ピークがゲノム上に多量に存在することは、本解析で初めて明らかになったことである。以降、このような ORC のみが存在するピークを”Orc only”ピークと呼ぶことにした。MCM 複合体の存在しない複製起点は活性を持たないと考えられるが、実際 ORC only ピーク近傍では pre-RC ピークの場合よりも DNA 複製プロファイルの値が小さく検出された（図 4a 上段 ORC only、図 4c）。

次に ChIP-seq によって同定されたピークが妥当であるかを検討した。まず、ChIP によって得られた DNA をシーケンサーでなく定量 PCR 機によって解析し（ChIP-qPCR）、いくつかの結合箇所における ChIP DNA の量をより定量的に測定した。その結果、Orc4, Mcm2 の双方が pre-RC ピークにおいて、ピーク以外のゲノム領

域よりも大きな ChIP 効率を示すことがわかった(図 4d)。検討した pre-RC ピークには本研究で初めて同定された箇所も含まれており、今回の ChIP-seq 解析は正確に複製起点を同定していることが裏付けられた。また、Orc only ピークにおいては Orc4 の結合のみしか検出されず、このようなピークにおいて Mcm 複合体が確かに不在であることが確かめられた。コントロールとして、PK エピトープを含まない細胞を用いた ChIP-qPCR 解析も行った。このような細胞ではいずれの領域においても ChIP DNA の濃縮は見られず、ChIP-qPCR の結果が抗体ビーズによる非特異的なゲノム DNA の濃縮によるアーティファクトである可能性が否定された。(図 4d)。

分裂酵母においてはこれまでもさまざまな手法で複製起点の同定が行われてきた。これら既報のデータと、本研究で同定された複製起点がどのぐらい合致するかを次に検討した。この比較では Orc only ピークを含む全ての Orc4 ピークを複製起点とし、潜在的な複製起点をも解析対象とするようにした。文献(Dubey et al., 1994; Gómez and Antequera, 1999; Okuno et al., 1997; Segurado et al., 2002, 2003)では 2 次元アガロース電気泳動を用いて計 33 箇所の複製起点が報告されている。このうち、32 ヶ所(97%)が本研究で定義された複製起点と重なった。重ならなかった 1 つの複製起点(AT2022)は活性の弱い複製起点であると報告されている(Segurado et al., 2003)。また、分裂酵母の複製起点は高い AT 含有率を示す部分を含むことが知られている。このような DNA 配列上の特性から AT リッチアイランドとして複製起点の予測を行う報告がなされている(Segurado et al., 2003)。340 箇所の AT リッチアイランドのうち 92% (312 箇所)が今回同定した複製起点と重なった (Table1)。文献(Heichinger et al., 2006; Xu et al., 2012)では DNA 複製プロファイルを用いて複製起点が同定されている。この手法は解像度が悪いため、報告の領域と前後 5kb 以内に含まれるかを指標として比較を行った。その結果、384 箇所の既報の活性型複製起点のうち、78% (301 箇所)が本研究で同定した複製起点と重なった。複製起点の同定法としては S 期初期の細胞中に存在する単鎖 DNA 領域をマッピングする手法もある。この手法で同定された 238 の複製起点については、その 60% (142 箇所)が今回見いだした複製起点と合致した。最後に ChIP-seq と同様の原理に基づくが感度と解像度で劣る、DNA マイクロアレイを用いた ChIP-chip 法で pre-RC の同定を行った報告との比較を行った。Orc1 および Mcm6 の ChIP-chip(Hayashi et al., 2007)で見いだされた複製起点のうち 87% (393 箇所)が本研究での複製起点と重なった。以上の比較検討より、本研究で同定された複製起点は既報のものとよい合致を示すことが確かめられた。本研究では、これまでの報告にない複

複製起点も 64 ヶ所同定された。これらの新規同定部位が確かに複製起点であることは、前節で述べた ChIP-qPCR 解析により確認されている (図 4d, 本研究で同定された pre-RC)。大量並列型シーケンサーを用いたことにより、これまでの報告よりも網羅性と解像度の両方でより優れた複製起点のマッピングができたものと考えられる。以降では、この同定された複製起点情報を基に、複製起点の *cic* 規定因子の探索を行なった。

染色体全体における pre-RC と ORC only の分布を図 5a に、また ORC 間距離と pre-RC 間距離の分布を図 5b に示した。ピーク間距離の平均値はそれぞれ 16.4 kbp と 38.6 kbp であり、pre-RC 間距離はこれまで報告された複製起点間距離と近い値であった (Hayashi et al., 2007; Heichinger et al., 2006)。相互に独立に分布する点間の距離は指数分布に従うことが知られている。ORC only ピークを含む全ての Orc4 結合部位のピーク間距離は指数分布によくフィッティングした ($R^2=0.95$) ことから、ORC 複合体ゲノム上局在位置はおおむねランダムに存在することが示唆された。一方 pre-RC ピーク間の距離に関しては、指数分布から予想されるよりも長い方に偏った分布となることがわかった ($R^2=0.80$)。ゲノム上の Orc 複合体の一部が選択され pre-RC へと“成熟”する過程において、ORC の選択はランダムに行なわれるのではなく、ある ORC が選択されるとその近位の ORC は選択されにくくなるような一種の干渉が存在することが示唆される (詳しくは考察の章で論じる)。

ORC の染色体への結合はポリ (dA/dT)トラック数に相関する

複製起点の形成は ORC が染色体に結合することから始まる。分裂酵母では、ORC サブユニットの一つである Orc4 のみを介して、ORC は染色体に結合する (Chuang et al., 2002; Kong and DePamphilis, 2001; Moon et al., 1999)。また Orc4 が DNA に結合する際には、Orc4 の N 末端に存在する 9 つの AT-hook ドメインが A/T リッチ配列を認識することが知られている (Chuang and Kelly, 1999)。従って、AT 含有率が高いことが分裂酵母における複製起点の特徴の一つである。本研究で同定された ORC ピークの周辺でヌクレオチド含有率を計算したところ、高い AT 含有率が見られた (図 6a)。この結果から、本研究で同定された ORC ピークがこれまでの報告と一致して A/T リッチな領域であることが示された。

序論で述べたように、真核生物では出芽酵母を除いて、複製起点のコンセンサス配列は報告されていない。しかしながら、本研究では ChIP-seq 法を用いて高感度かつ高解像度で複製起点を同定しており、新規の複製起点も見つかっているため、新たなコンセ

ンサス配列が見つかる可能性がある。本研究で同定された複製起点にコンセンサス配列が存在するかを検討するため、ORC ピークにおけるモチーフ解析を行った。モチーフ解析には MEME-ChIP 解析ツールを用いた。この解析では、全ての Orc4 ピークをインプットとして用い、結合領域 DNA 中に保存されているモチーフ配列が存在するかを検討した。その結果、Orc4 ピークにおいてアデニンまたはチミン塩基が少なくとも 3 つ続く特徴的なモチーフ配列 (AAA[A/T]AAA[A/T]AAA[A/T]AAA) を同定し、ポリ (dA/dT) トラックと呼ぶことにした (図 6b、シークエンスロゴ)。

同様のモチーフ配列の存在は分裂酵母の複製起点において確認されていた(Dai et al., 2005; Xu et al., 2012)。しかしながら、複製起点周辺でこのモチーフ配列がどのように分布しているのかは明らかではなかった。複製起点周辺のポリ (dA/dT) トラックの分布を解析するために、モチーフのゲノム DNA 上の分布を明らかにした。解析には FIMO 解析ツールを用いた(Grant et al., 2011)。FIMO は MEME-ChIP によって算出されたモチーフ配列の各位置ごとの塩基相対出現頻度 (図 6b、表) をインプットとして、そのモチーフの存在をゲノム DNA に沿ってサーチする解析ツールである。モチーフの候補領域とゲノム全域における各塩基の出現頻度と比較することで、その領域にモチーフが存在するかを判定する。その結果、5829 ヶ所がポリ (dA/dT) トラック領域として同定された。ゲノム DNA 上のポリ (dA/dT) トラックの分布が明らかとなったので、次は Orc4 ピーク近傍にこのモチーフ配列が存在するかを検討した。図 6c は Orc4 ピークの頂点と最も近傍に存在するモチーフ領域との距離をヒストグラムで示したものである。Orc4 ピークの 300 bp または 500 bp 以内にモチーフ配列が存在するかどうか調べたところ、300 bp 以内では 80.0%、500 bp 以内では 85.3% の Orc4 ピークに少なくとも 1 つのポリ (dA/dT) トラックが存在した。この結果はほとんどの Orc4 ピーク周辺には、少なくとも 1 つのポリ (dA/dT) トラックが存在することを示していた。ただし、この解析では 1 つの Orc4 ピーク周辺にいくつのモチーフ配列が存在するかはわからない。そのため、Orc4 ピーク 500 bp 周辺のモチーフ配列数を調べたところ、1 つの Orc4 ピークに対して 2 つ以上のモチーフ配列が存在するケースが多く見られた (図 6d、黒)。最大で 8 つのモチーフ配列が存在するピークも観測された。Orc4 ピーク周辺で観測されたモチーフ配列数が統計的に有意に多いかを検討するために、ゲノム DNA 上のランダムな位置周辺でのモチーフ配列数を算出した (図 6d、白)。このシミュレーションを繰り返し、実際に観測されたモチーフ配列数と比較したところ、Orc4 ピーク周辺ではモチーフ配列数が有意に大きかった ($p < 10^{-5}$)。既に述べたように、Orc4 の A-T hook

が AT リッチ配列を認識することで ORC は染色体へ結合する。従って、ORC の染色体上の存在確率がポリ (dA/dT) トラックの数に依存している可能性があった。そこで、Orc4 の染色体結合効率とポリ (dA/dT) トラックの数に関係を調べたところ、予想通り Orc4 の染色体への結合効率はポリ (dA/dT) トラックの数が多いほど高くなった (図 6e)。これは、ORC が 2 つのポリ (dA/dT) トラックを介して、複製起点 *ars2004* に相乗的に結合している、という過去の報告と一致していた (Takahashi et al., 2003)。この結果から、ORC の染色体上での存在確率がポリ (dA/dT) トラックの数に相関することが示された。

ORC ピーク周辺ではヌクレオソームは欠失している

序論で述べたように、出芽酵母の複製起点は必須の DNA コンセンサス配列 (ACS) のみによって決定されるわけではない。出芽酵母ではコンセンサス配列だけでなく、ヌクレオソームの欠失が複製起点の *cis* の規定因子の一つとして報告されている (Berbenetz et al., 2010; Eaton et al., 2010)。従って、分裂酵母においてもヌクレオソームの分布が複製起点の *cis* の規定因子となる可能性がある。そのため、分裂酵母の複製起点においてもヌクレオソームの分布が調べられている。しかし、複製起点においてヌクレオソームが欠失しているという報告 (Givens et al., 2012; Lantermann et al., 2010; Xu et al., 2012) と、ヌクレオソームが存在しているという報告 (de Castro et al., 2011) があり、意見の一致が見られていない。これまで分裂酵母のヌクレオソームの分布は全て非同調細胞において調べられていたため、本研究では G1 期に同調した細胞を用いることで、pre-RC 形成時期のヌクレオソームの分布を明らかにしようとした。ヌクレオソーム分布を得るために、マイクロコッカルヌクレアーゼで分裂酵母のゲノム DNA を処理した。マイクロコッカルヌクレアーゼは 1 本鎖および 2 本鎖 DNA を分解するエンドヌクレアーゼであり、ヒストンに巻き付いていない DNA を分解するために、ゲノム DNA を処理するとヌクレオソームでプロテクトされている DNA のみを得ることができる (詳細は「材料と方法」)。得られたモノヌクレオソーム DNA を精製し、大量並列型シーケンサーを用いることで、ゲノム全域におけるモノヌクレオソームの分布を得た。ヌクレオソームは転写開始点 (Transcription Start Site, TSS) の上流で欠失し、遺伝子内では規則的に配置していることが広く知られる。得られたデータがヌクレオソームの分布を反映しているかを確認するために、全タンパク質コーディング遺伝子の TSS 周辺でヌクレオソームの分布を計算したところ、確かに TSS の上流でヌクレ

オソームは欠失し、また遺伝子内においては+1、+2、+3等の規則的なヌクレオソームの配置が観測された(図7a)。従って、ゲノムDNAをマイクロコッカルヌクレアーゼで処理して得られたシーケンスデータはヌクレオソームの分布を表していると結論した。前述した通り、ORCはポリ(dA/dT)トラックを認識して染色体に結合する。ところで、このポリ(dA/dT)トラックの立体構造はヌクレオソームを形成しづらいことが知られている。そのため、ポリ(dA/dT)トラックではヌクレオソームが欠失していることが予想される。しかしながら、もしヌクレオソームの分布が複製起点のcisの規定因子の1つであるならば、ORCの結合している場合と結合していない場合でポリ(dA/dT)トラック周辺のヌクレオソームの分布が異なるはずである。ORCが結合している場合と結合していない場合のポリ(dA/dT)トラック周辺のヌクレオソームを調べると、Orc4が結合している場合には、より深く、広いヌクレオソームの欠失が見られた(図7b)。この結果から、分裂酵母でも出芽酵母と同様、モチーフ配列だけでなくヌクレオソームの欠失が複製起点のcisの規定因子であることが示唆された。

出芽酵母の複製起点では、ヌクレオソームが欠失しているだけでなく、周辺ヌクレオソームの周期的な配置がみられる(Berbenetz et al., 2010; Eaton et al., 2010)。分裂酵母の複製起点においてもヌクレオソームの周期的な配置がみられるか調べるため、ORC only と pre-RC の周辺におけるヌクレオソームの分布を比較した(図7c)。ORC only と pre-RC ピーク中心部では同程度のヌクレオソームの欠失がみられた。一方、pre-RC 近傍では周期的なヌクレオソームの配置がみられたが、ORC only ではそのようなヌクレオソームの配置はみられなかった(図7c)。この結果から、ORCの結合のみでは周辺ヌクレオソームは規則的に配置されないが、pre-RC 形成は近傍ヌクレオソームを適切に配置させることが示唆された。

pre-RC は転写領域外で形成される

ORCのモチーフ解析から、ORCはポリ(dA/dT)トラックを認識して染色体に結合することがわかった。またORCは全てのポリ(dA/dT)トラックに結合するのではなく、ヌクレオソームの欠失している領域に優先的に存在した。ところで、図5bからpre-RCは全てのORCにランダムに形成されるのではなく、特定のORCに選択的に形成されることが示唆されている。従って、モチーフ配列とヌクレオソームの分布とは別の因子がpre-RCの形成を規定していると考えられる。そこで、pre-RCの形成に関わる因子を調べるため、まずORC only および pre-RC と遺伝子との重なりを検討した。91.0%

の pre-RC ピークが遺伝子間領域に存在した一方、遺伝子間領域に存在した ORC only の割合は 56.9%であった (図 8a)。興味深いことに、ORC の結合していないポリ (dA/dT) トラックは 27.1%しか遺伝子間領域に存在しなかった。この結果は、ORC は全てのポリ (dA/dT) トラックに結合するのではなく、遺伝子と重ならない領域と優先的に結合することを示していた。さらに、pre-RC の形成される領域は遺伝子との重なりが特に避けられることを示していた。この結果から、転写領域との重なりが pre-RC の形成を阻害することが示唆された。多細胞生物と比べて、分裂酵母のゲノムでは遺伝子が密にコードされており、ゲノム全体の遺伝子間距離の中央値は 347 bp である。pre-RC の形成が転写領域によって阻害されるならば、転写領域との重なりを避けるために pre-RC は遺伝子から離れた位置に形成されることが予想される。実際に、pre-RC は複製起点の形成されない領域よりも広い遺伝子間領域に存在した (図 8b)。さらに、遺伝子と重なるわずかな (9.0%) の pre-RC についても、pre-RC と重なる遺伝子の転写量が、ORC only と重なる遺伝子、ないし複製起点と重ならない遺伝子の転写量よりも有意に低いことから、転写領域が pre-RC の形成を阻害することが再び示唆された (図 8c)。従って、ORC の染色体結合後、pre-RC はほぼ転写活性のない領域において形成されることが考えられる。pre-RC の形成は複製開始の必須段階であるので、これまで報告されている初期複製起点のほとんどが遺伝子間領域に存在することも頷ける (Hayashi et al., 2007; Heichinger et al., 2006; Segurado et al., 2003)。

pre-RC は divergent な転写領域で優先的に形成される

多細胞生物の複製起点ではコンセンサス配列は報告されていない。これまで報告されている多細胞生物における複製起点の共通の特徴は、複製起点と転写領域との相関である。複製起点と転写領域との相関はハエ (Cayrou et al., 2011; Eaton et al., 2011; MacAlpine et al., 2004)、マウス (Cayrou et al., 2011)、そしてヒト (Cadoret et al., 2008; Huvet et al., 2007; Karnani et al., 2010; Martin et al., 2011) において報告されているが、いずれも相関関係を示すことにとどまっており、複製起点形成における転写の影響は不明である。最近、複製起点が近傍遺伝子の TSS 周辺に存在することがヒトで報告され、転写が複製起点の形成を制御するモデルが提唱されている (Dellino et al., 2013)。分裂酵母において、遺伝子の転写が複製起点を規定しうるか調べるため、まず複製起点周辺遺伝子の転写方向を解析した。複製起点の両隣の遺伝子を、両遺伝子の TSS が複製起点側に位置する divergent、片方の遺伝子の TSS と片方の遺伝子の TTS

(Transcription Termination Site) が複製起点側に位置する tandem、両遺伝子の TTS が複製起点側に位置する convergent 転写領域の 3 種類に分類し、それらの数を調べた (図 9a)。ORC only と ORC の存在しないポリ(dA/dT)トラック周辺遺伝子の向きの間には差が見られなかったことから、ORC の染色体への結合は両隣遺伝子の転写方向の影響を受けないことが示唆された(図 9a、ORC only と polyA w/o ORC)。一方、pre-RC の周辺では複製起点がない場合に比べて、divergent 転写領域の割合 (0.586) が統計的に有意に大きかった(図 9a、 $p < 10^{-5}$ 、Bonferroni の補正を行った Fisher's exact test)。この結果は原核生物のほとんどの遺伝子がリーディング鎖にコードされており、複製装置の進行方向とほとんどの遺伝子の転写方向が同一である、という構造を想起させる。もしこの構造が分裂酵母にも当てはまるのならば、図 9a に示される転写方向の偏りは、複製起点の両隣の遺伝子にとどまらず複製の終結点までみられると予想される。そこで、複製起点から 2 番目に近遺伝子についても、転写方向の偏りがみられるかを調べた。興味深いことに複製起点から 2 番目に近い遺伝子ではそのような転写方向の偏りは全く見られなかった (図 9b)。すなわち、遺伝子の転写方向の偏りは複製起点の両隣の遺伝子に限られていることが示された。従って分裂酵母では、原核生物のように複製装置の進行方向と転写方向を同じにするような偏りがあるのではなく、遺伝子上流領域が pre-RC の形成に好ましい構造であることが示唆された。

遺伝子の転写が pre-RC の形成を規定することが示唆されたため、複製起点両隣の遺伝子の転写量に特徴がみられるかどうか調べた。複製起点周辺遺伝子の転写方向と転写量の関係を調べるため、複製起点の両隣の遺伝子転写量を転写方向ごとに示した (図 9c,d)。Tandem 転写領域は、TSS が複製起点側に存在する tandem-TSS と、TTS が複製起点側に存在する tandem-TTS とに、さらに分けられた。pre-RC 両隣の遺伝子では convergent 転写領域の転写量は、複製起点両隣にない遺伝子の転写量よりも統計的に有意に低かった ($p < 0.05$ 、Games-Howell test)。一方、ORC only 両隣の遺伝子間の転写量には統計的に有意な差がなかった ($p > 0.05$ 、Welch's one-way ANOVA)。これらの結果から、convergent 転写領域の転写は pre-RC 形成の妨げになる一方、ORC の染色体への結合には影響を与えないことが示唆された。

転写方向の反転は pre-RC の形成を阻害する

pre-RC の両隣の遺伝子として divergent 転写領域が好まれることから、転写している遺伝子上流領域が pre-RC の形成を促進する、という仮説が考えられた。その仮説を

検証するため、複製起点両隣の内在性遺伝子の転写方向を反転させたときに pre-RC の形成が阻害されるかを調べた。pre-RC の形成は MCM ヘリケースのサブユニットである Mcm2 の染色体への結合によって評価した。まず、divergent 転写領域のうちの一つの遺伝子 (*def1* または *tif213*) の転写方向を反転させ、tandem 転写領域とした (図 10 上段)。転写方向を反転させた遺伝子の隣の複製起点では、Mcm2 の結合量はその他の複製起点に比べてほとんど減少していなかった。次に、tandem 転写領域のうちの一つの遺伝子(*urg1*)の転写方向を反転させ、convergent 転写領域として、pre-RC の形成を調べた。その結果、転写方向を反転させた遺伝子の隣の複製起点では、Mcm2 の結合量は約 60%程まで減少した (図 10 左下段)。一方、この遺伝子の転写方向を反転させても、ORC の結合量は変わらなかった (図 10 右下段)。これらの結果から、pre-RC の効率的な形成には少なくとも一つの遺伝子上流領域が必要であることが示された。これは、複製起点両隣の遺伝子の転写が pre-RC の形成を制御することを示す、初めての直接的な証拠であった。

Table1 本研究で同定された複製起点と既報複製起点とのオーバーラップ

手法	総数	オーバーラップ数	オーバーラップ率	参考文献
AT含有率のスキャン ^a	340	312	92%	Segurado M et al. 2003
2D-ゲル ^a	33	32	97%	Segurado M et al. 2003
マイクロアレイを用いた1本鎖DNAのゲノムワイドな解析 ^a	238	142 ^b	60%	Feng W et al. 2006
マイクロアレイを用いたDNA複製プロファイルのゲノムワイドな解析 ^a	395	311 ^b	79%	Heichinger C et al. 2006
Orc1及びMcm6のChIP-chip解析 ^a	454	393	87%	Hayashi M et al. 2007
大量並列型シーケンサーを用いたDNA複製プロファイルのゲノムワイドな解析 ^a	384	301 ^b	78%	Xu J et al. 2012

^aセントロメア、テロメア、rDNA領域は考慮していない

^b5 kbp以内でのオーバーラップ

Table2 本研究で用いた細胞株

株	遺伝子型	ソース
FY20933	<i>h- cdc10-V50</i>	NBRP「酵母」
KM79	<i>h- cdc10-V50 mcm2⁺ -9PK:kanMX6</i>	本研究
KM81	<i>h- cdc10-V50 orc4⁺ -9PK:kanMX6</i>	本研究
FY8155	<i>h- cdc25-22 leu1-32</i>	NBRP「酵母」
KM98	<i>h- cdc10-V50 mcm2⁺ -9PK:kanMX6 def1-Native:hphMX6</i>	本研究
KM99	<i>h- cdc10-V50 mcm2⁺ -9PK:kanMX6 def1-Flipped:hphMX6</i>	本研究
KM106	<i>h- cdc10-V50 mcm2⁺ -9PK:kanMX6 tif213-Native:hphMX6</i>	本研究
KM107	<i>h- cdc10-V50 mcm2⁺ -9PK:kanMX6 tif213-Flipped:hphMX6</i>	本研究
KM102	<i>h- cdc10-V50 mcm2⁺ -9PK:kanMX6 urg1-Native:hphMX6</i>	本研究
KM103	<i>h- cdc10-V50 mcm2⁺ -9PK:kanMX6 urg1-Flipped:hphMX6</i>	本研究
KM104	<i>h- cdc10-V50 orc4⁺ -9PK:kanMX6 urg1-Native:hphMX6</i>	本研究
KM105	<i>h- cdc10-V50 orc4⁺ -9PK:kanMX6 urg1-Flipped:hphMX6</i>	本研究

FY20933およびFY8155は、文部科学省NBRP「酵母」から提供された。

Table3 本研究で用いたプライマー

目的	ターゲットサイト名	Forward sequence (5' -> 3')	Reverse sequence (5' -> 3')
Orc4のC末端にPKタグエピトープを付加するため	orc4	GGTGGTactagtGCTTTGCGTGAAATATCGCG	CCACCAgcgggcgcTTATAACCTCCTTAAGCCAGC
Mcm2のC末端にPKタグエピトープを付加するため	mcm2	GGTGGTactagtGCGCCTTCTATTTATGGACA	CCACCAgcgggcgcTAATAAGATATTTAGCAAATG
ChIP-qPCR	1968 kbp, chr3	ACTGTTAAAAAGCCTTGATTATTGAACCA	ATCAGTATTTGTCAAAGCTTCGAGTAGC
ChIP-qPCR	3952 kbp, chr1	TCGTAGGATCCTTGACACTTGAATTTCT	AGGTAGATGATCGTACAAACGGCTACTAC
ChIP-qPCR	2580 kbp, chr2	CAGTCGCTAAAAAAGTAAAGCCTTCAAA	CATGCTCAATTTGTCAAAATACCCTAATA
ChIP-qPCR	1734 kbp, chr1	TCTGAACCATCATCCGCTTACTA	TAGACTGCTAATTTTACTGGCCCTT
ChIP-qPCR	820 kbp, chr3	AATTTGGGTCAGTTTGAAAAGGTGT	ACCGATTATATTGAATACCTGGAAGCA
ChIP-qPCR	823 kbp, chr2	CTTTCAGGAAATGTTTGGCGTTTAT	TTCGTCAAATGAGCTATCATAAGAA
ChIP-qPCR	2937 kbp, chr1	TAGCGCATCATACGGTACTAAAAGT	TGGTTTTCATATACTACTTGCATTGT
ChIP-qPCR	253 kbp, chr3	TAGCCAGTCATTACGTTATACGCTT	ACCCAATGTACAACATAAAAGGAACA
ChIP-qPCR	3161 kbp, chr2	GCATCGTTTTAAAGGAAAAGTTATGC	TTAAGCGGGTAGGTATCAACCATAG
ChIP-qPCR	235 kbp, chr2 (negative control)	AATTTAATTATACCATGCCGAAACTACC	TCAACTCTCAAAGTCTGAATGGTGTAG
ChIP-qPCR	3919 kbp, chr1 (negative control)	CCATAGGATCTTGGTGAAGAAAGATTAGA	GCCATCTACCTACAAGATGTCTGCTTAT
ChIP-qPCR	569 kbp, chr2 (def1)	TGGACTCTTACAAGAAGAGAGTAT	TAAGTCACCATTTTGGCAATTCAA
ChIP-qPCR	2185 kbp, chr2 (tif213)	TCAAAGTTTTTAAGTAAACAAACACTAGAT	GACCCGTAGGTTTTTCCAAGTAAG
ChIP-qPCR	1834 kbp, chr1 (urg1)	CAGACATGAATCAGACATACCAGTT	ACTTGCTGCTAGAACAGATTTTTTCA
def1遺伝子の反転	def1_DOWN_1-2	CCGCCAGCTGAAGCTGTAATAAAGATTTGATGTTAAG	TGCTGCTAGCCTGCTAGTTTTTCTATTAGTAGAC
def1遺伝子の反転	def1_UP-P-GENE_3-4	AGCAGGCTAGCAGCACTCTACAATTAATAGATATATG	CAAGCTAAACAGATCCCTTCCCTTCCAAAAAC
def1遺伝子の反転	def1_UP_3-5	AGCAGGCTAGCAGCACTCTACAATTAATAGATATATG	AATTACTGCTTCAAGTAATAATC
def1遺伝子の反転	def1_P-GENE_6-7	CTTGAAGCAGTAATTCCTTCCCTCTCCAAAAACG	CAAGCTAAACAGATCAAAGTTTTCATAAATTGACCAACTG
def1遺伝子反転の確認	pFA6a-def1_DOWN	CGGCATCAGAGCAGATTGTA	AGCGCATGCTGTTTTGCTA
tif213遺伝子の反転	tif213_DOWN_1-2	CCGCCAGCTGAAGCTAACTTAACGATGCTCGTACACG	TGCTGCTAGCCTGCTGTAATAAGCATAATTGATTAG
tif213遺伝子の反転	tif213_UP-P-GENE_3-4	AGCAGGCTAGCAGCAATGGCATTGTTTTAATAATTTCC	CAAGCTAAACAGATCTAACCGTAGACATTACCATTG
tif213遺伝子の反転	tif213_UP_3-5	AGCAGGCTAGCAGCAATGGCATTGTTTTAATAATTTCC	ACAATTAAGTCTGCTGCTGTTCC
tif213遺伝子の反転	tif213_P-GENE_6-7	CAGACAGTTAATTGTTAACCGTAGACATTACCATTG	CAAGCTAAACAGATCAATTAGCGCAACCCATAGAG
tif213遺伝子反転の確認	pFA6a-tif213_DOWN	CGGCATCAGAGCAGATTGTA	TCCAAAAGTCTGGGAAGTGAA
urg1遺伝子の反転	urg1_DOWN_1-2	CCGCCAGCTGAAGCTTTTGGGATTTGTAGAAGTAGTA	TGCTAGATCTCTGCTAAGGATCAAGAGTTAATGCC
urg1遺伝子の反転	urg1_UP-P-GENE_3-4	AGCAGAGATCTAGCAGTTCTAGCAGCAAGTAAGATTTG	CAAGCTAAACAGATCGTTGACATGATTAATAAATGATT
urg1遺伝子の反転	urg1_UP_3-5	AGCAGAGATCTAGCAGTTCTAGCAGCAAGTAAGATTTG	CTCACTGGAATTGTTAACGAAAT
urg1遺伝子の反転	urg1_P-GENE_6-7	CACAATTCAGTGAGGTTGACATGATTAATAAATGATT	CAAGCTAAACAGATCCCTATATGGAAGTCAACCTTAATTC
urg1遺伝子反転の確認	pFA6a-urg1_DOWN	CGGCATCAGAGCAGATTGTA	TGCGTACATCCCTCTCAACA

Table4 大量並列型シーケンサーによるシーケンシングとマッピングの統計

サンプル名	細胞周期	遺伝子型	プラットフォーム	方法	リード長 (bp)	リードタイプ	総リード数	マップされたリード数	マップ率 (%)	マッピングツール
Orc4-9PK, G1	G1 phase	<i>h- cdc10-V50 orc4⁺ - 9PK:kanMX</i>	Hiseq 2000	ChIP-seq	51	single-end	5437540	5025924	92.43	bowtie2 version 2.1.0
Orc4-9PK, G1, input	G1 phase	<i>h- cdc10-V50 orc4⁺ - 9PK:kanMX</i>	Hiseq 2000	ChIP-seq	51	single-end	6245472	6205292	99.36	bowtie2 version 2.1.0
Mcm2-9PK, G1	G1 phase	<i>h- cdc10-V50 mcm2⁺ - 9PK:kanMX</i>	Hiseq 2000	ChIP-seq	51	single-end	31244102	29628162	94.83	bowtie2 version 2.1.0
Mcm2-9PK, G1, input	G1 phase	<i>h- cdc10-V50 mcm2⁺ - 9PK:kanMX</i>	Hiseq 2000	ChIP-seq	51	single-end	34248334	34052910	99.43	bowtie2 version 2.1.0
Genome DNA, S phase	early S phase	<i>h- cdc25-22 leu1-32</i>	Hiseq 2000	Genome sequencing	51	single-end	6333279	6220196	98.21	bowtie2 version 2.1.0
Genome DNA, G2 phase	late G2 phase	<i>h- cdc25-22 leu1-32</i>	Hiseq 2000	Genome sequencing	51	single-end	5672715	5600122	98.72	bowtie2 version 2.1.0
Mononucleosome, G1	G1 phase	<i>h- cdc10-V50 mcm2⁺ - 9PK:kanMX</i>	Miseq	MNase-seq	51	paired-end	26727666	26548591	99.33	bowtie2 version 2.1.0
mRNA, S phase	early S phase	<i>h- 972</i>	Hiseq 2000	RNA-seq	36	single-end	35806836	33896193	94.66	tophat2 version 2.0.9

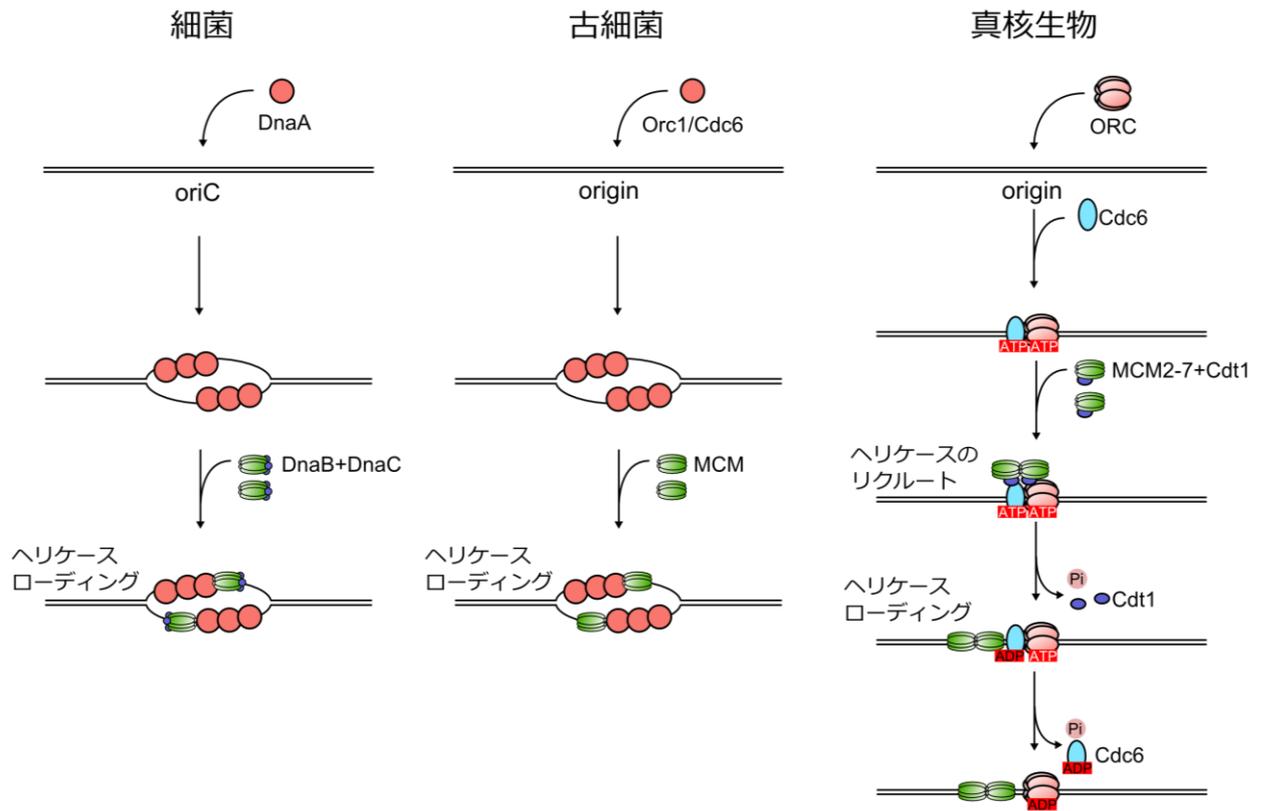


図1 真正細菌、古細菌、および真核生物における複製起点の形成。詳細は本文に記載。

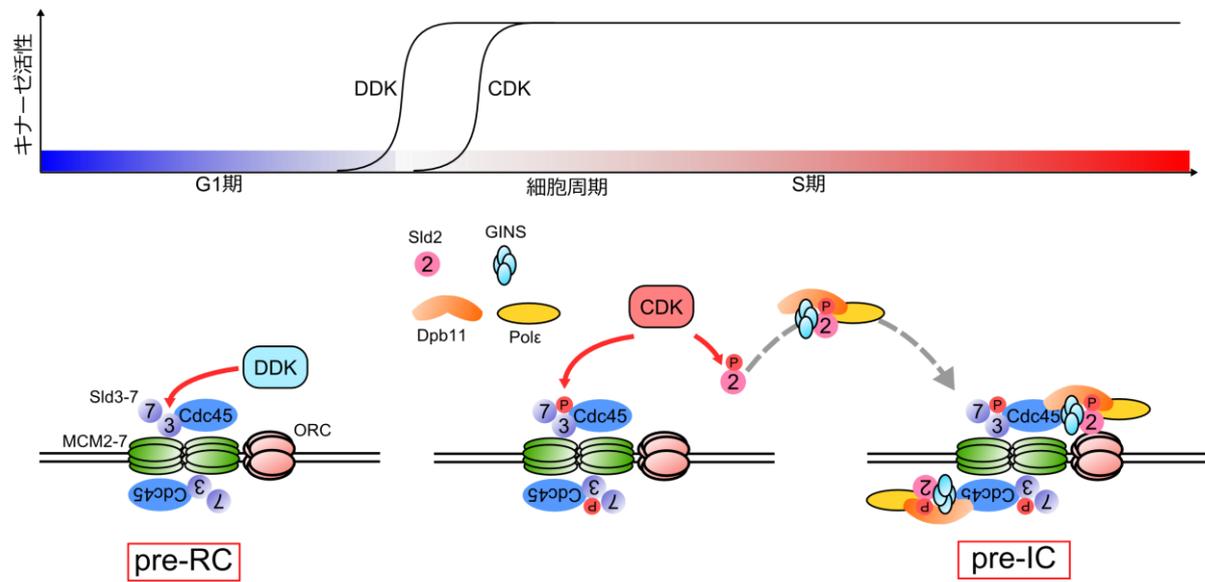


図2 pre-RCの活性化とpre-ICの形成。(上段)横軸は細胞周期を示し、縦軸はDDKとCDKの活性を示した。(下段)G1期に形成されたpre-RCの活性化とpre-ICの形成を図示した。詳細は本文に記載。(Tanaka and Araki, 2013)より改変。

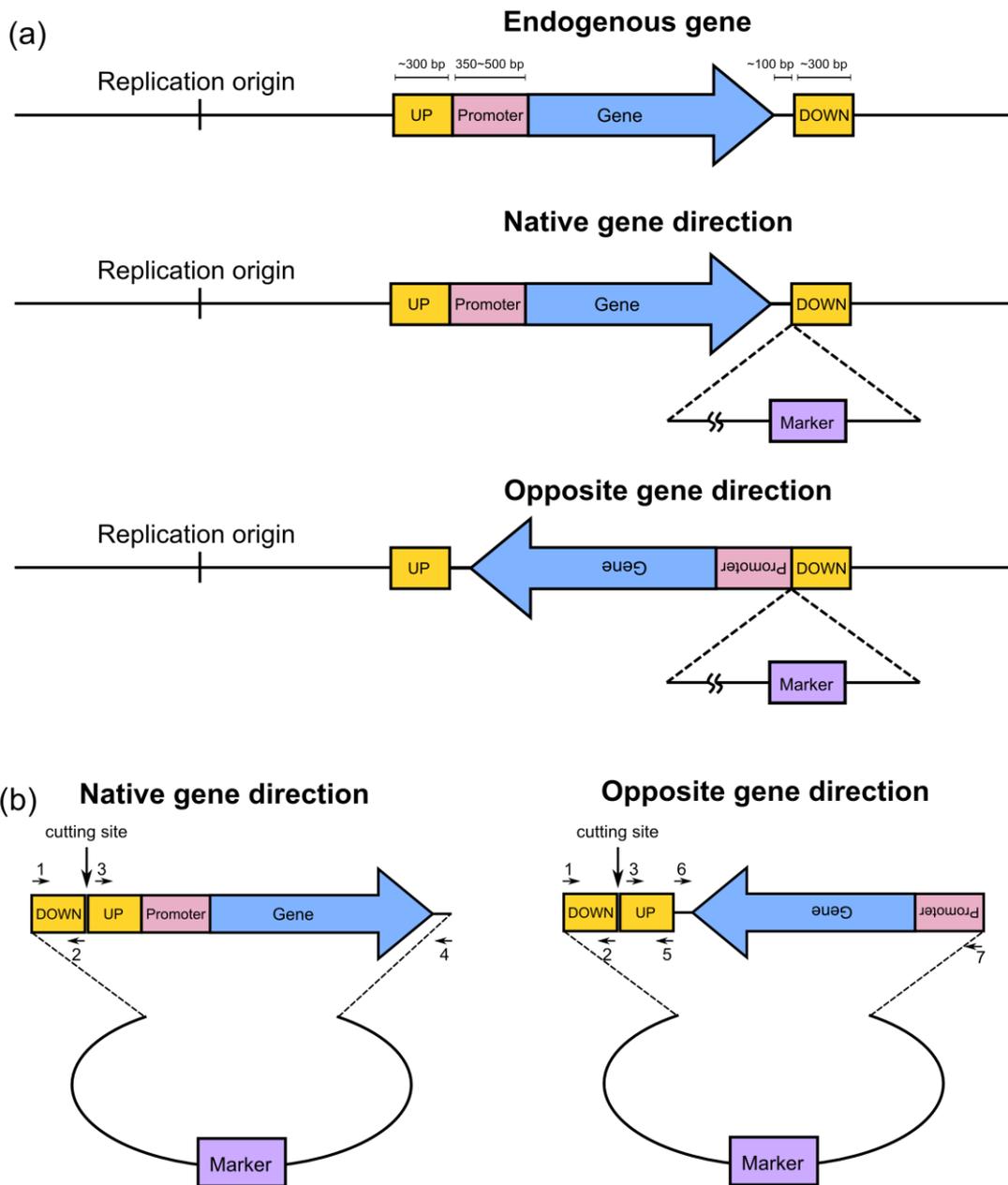
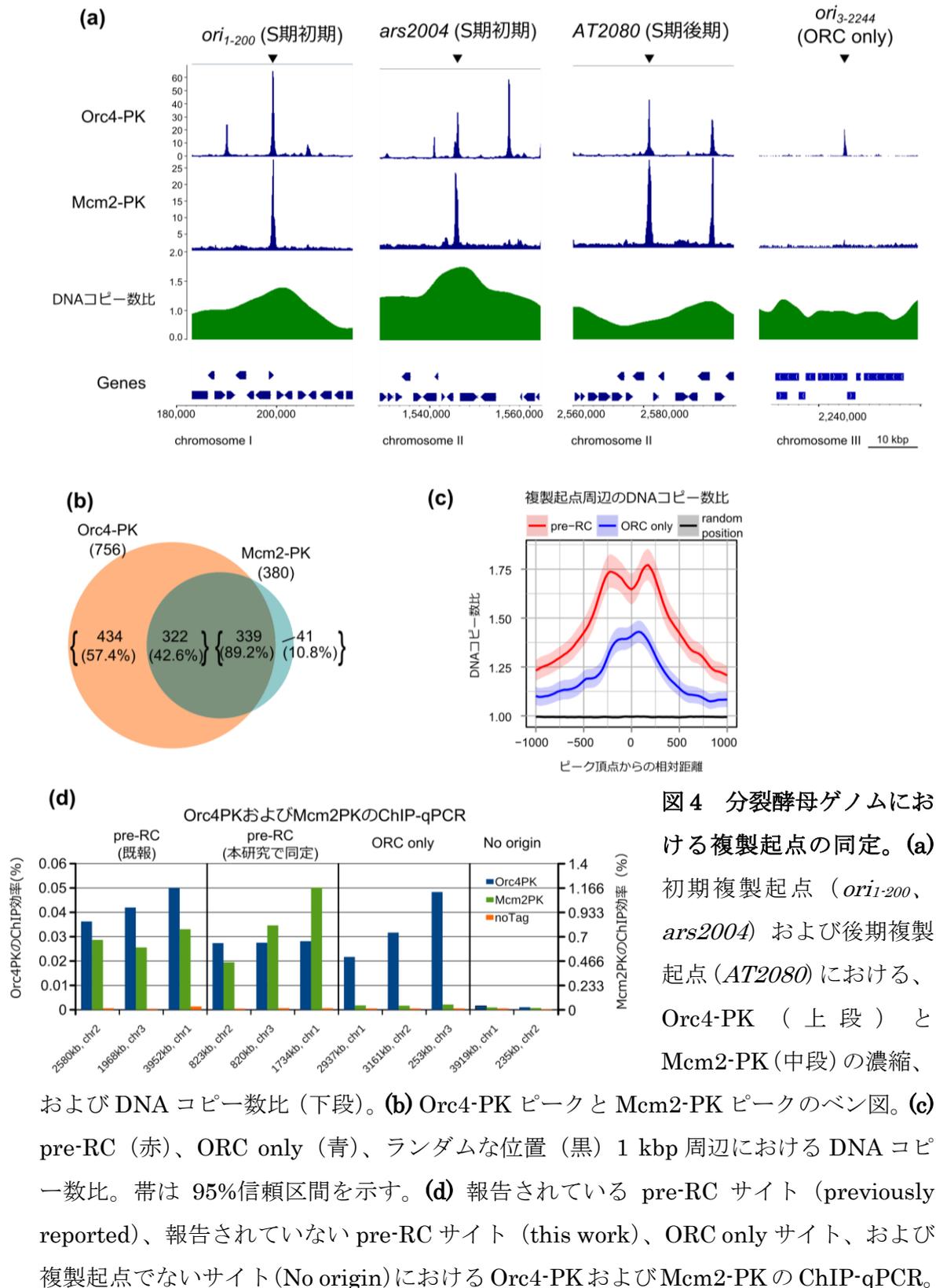


図 3 内在性遺伝子反転のストラテジー。(a) ゲノム上の内在性遺伝子（上段、endogenous gene）、マーカー配列のみを挿入したもの（中段、native gene）、およびプロモーター配列を含む遺伝子を反転させたもの（下段、opposite gene）。(b) マーカー配列のみを挿入する（native gene）または遺伝子を反転させる（opposite gene）ためのプラスミド模式図。



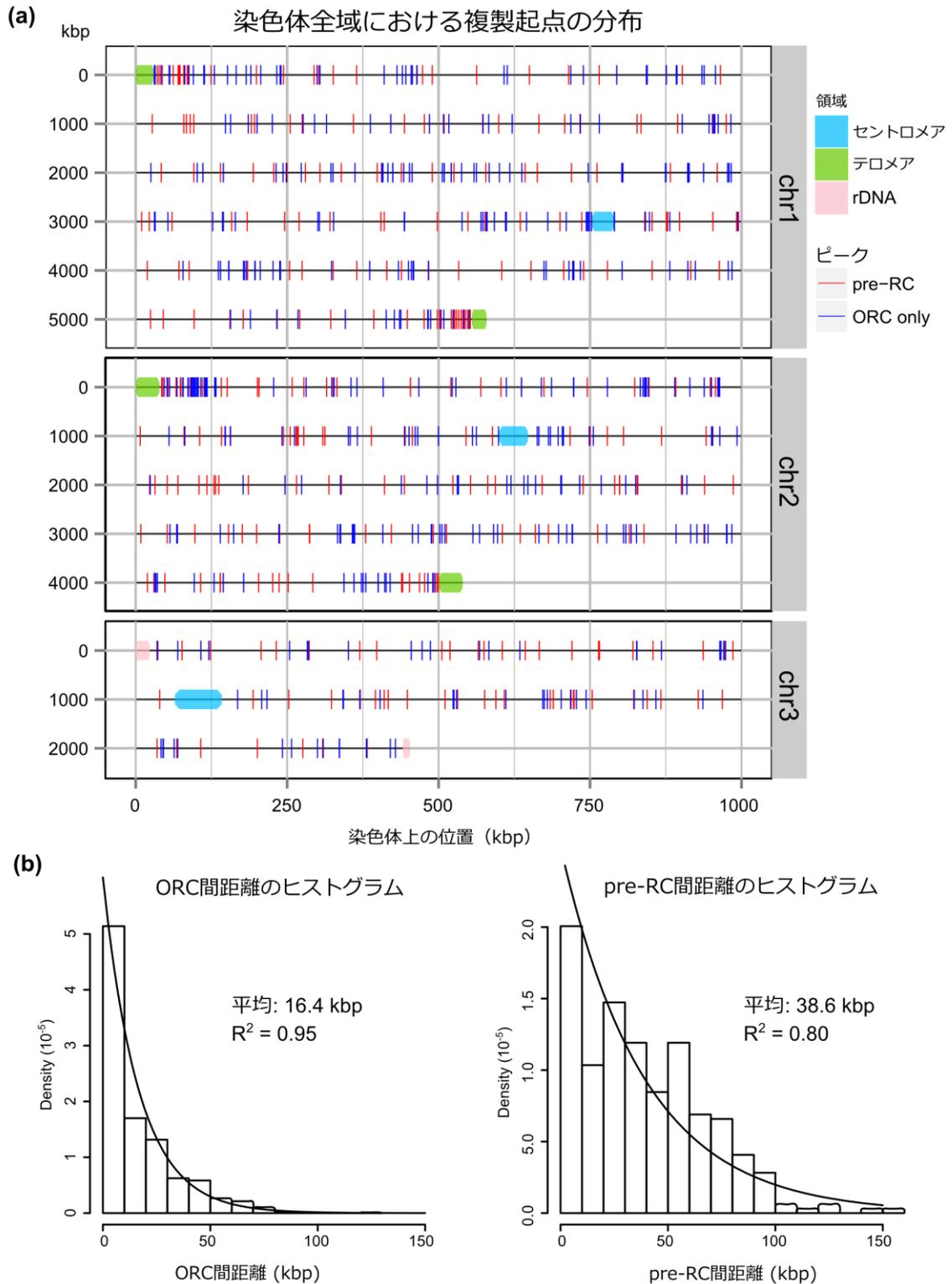


図5 染色体における複製起点の分布と複製起点間距離。**(a)** 各染色体における pre-RC (赤) と ORC only (青) の位置が示されている。**(b)** ORC および pre-RC 間距離のヒストグラム。平均値と指数分布に対する決定係数が挿入されている。

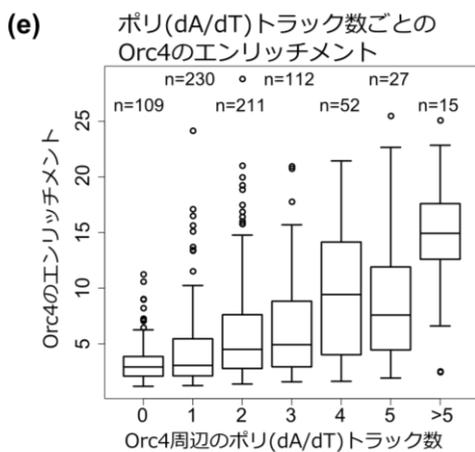
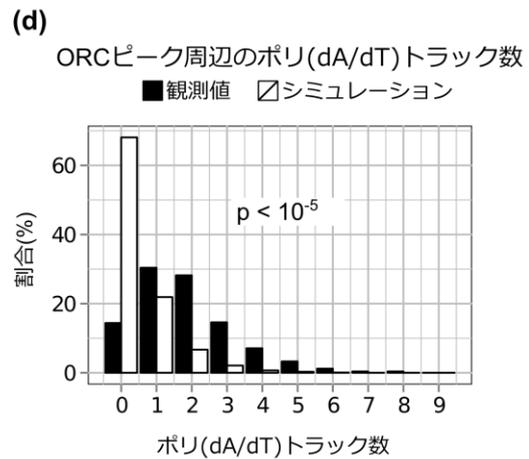
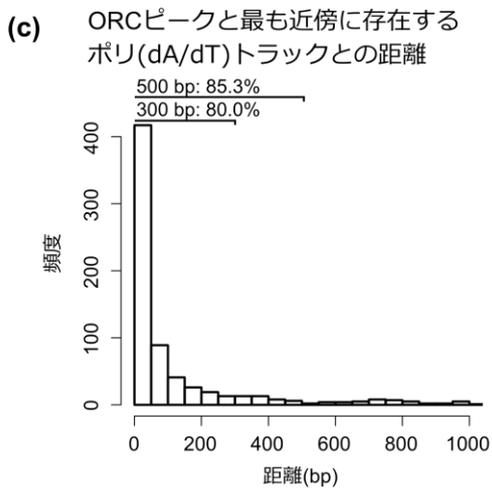
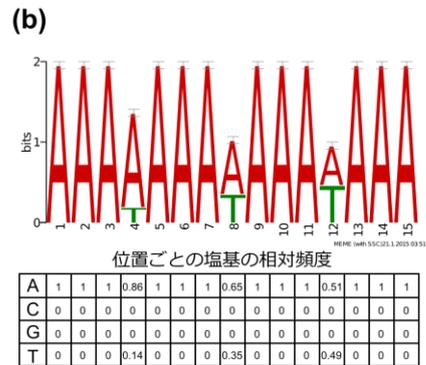
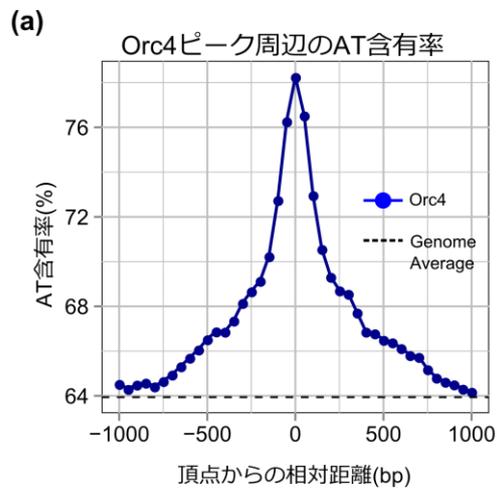


図 6 ORC の結合効率は poly(dA/dT) stretch 数に相関する。(a) ORC ピーク周辺 (青) の AT ヌクレオチド率。ゲノム平均は破線で示す。(b) poly(dA/dT) stretch ログ。(c) ORC ピークと最も近くに存在する poly(dA/dT) stretch との距離。(d) ORC ピークの 500 bp 周辺における poly(dA/dT) stretch の数 (黒) はゲノム上のランダムな位置から予測される数 (白) よりも有意に多かった ($p < 10^{-5}$)。

(e) Orc4 ピーク 500 bp 周辺の poly (dA/dT) stretch 数ごとの Orc4 の濃縮。

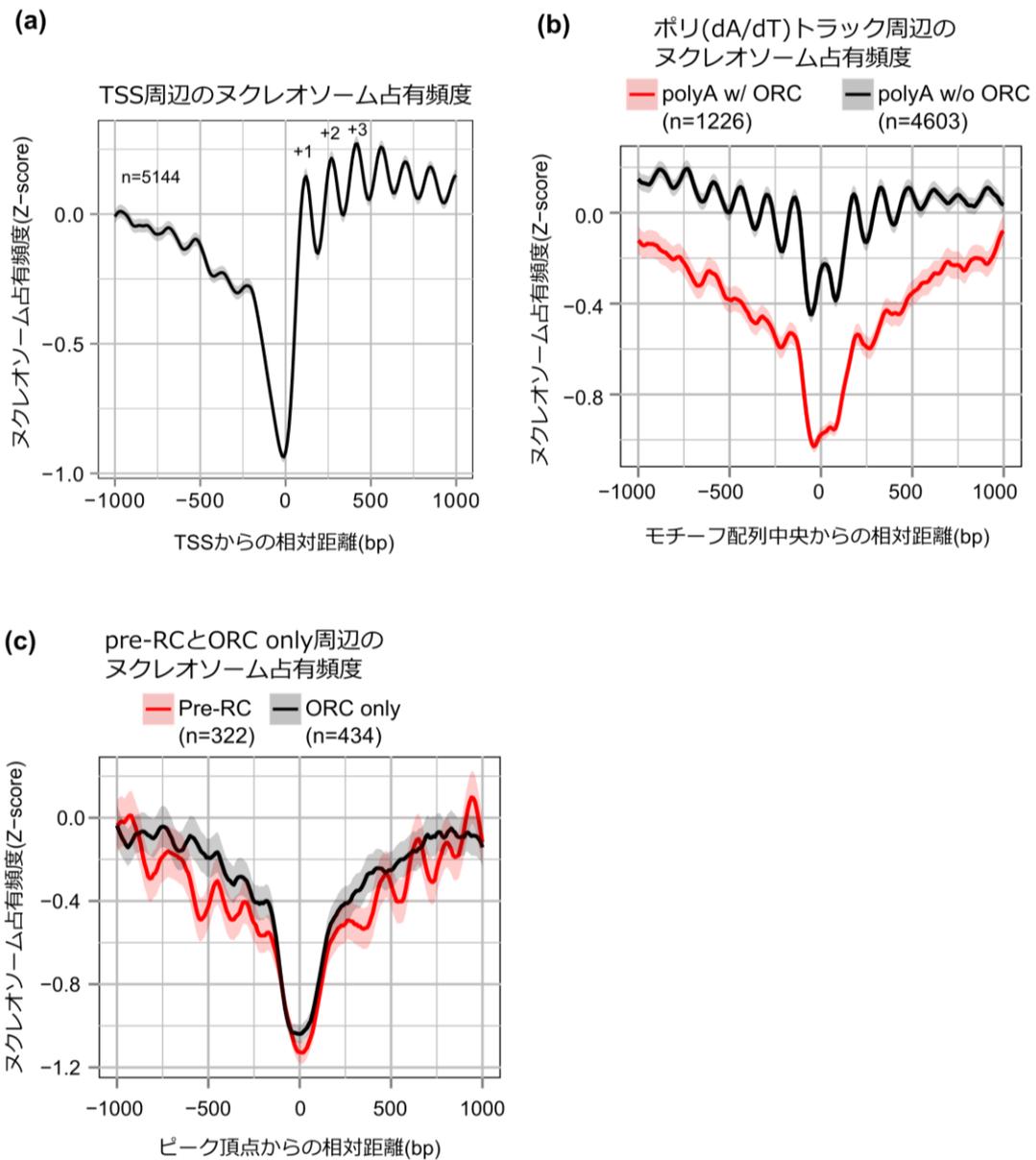


図 7 ORC の結合する poly (dA/dT) stretch ではヌクレオソームは欠失する。(a) Transcription Start Site (TSS) におけるヌクレオソームの分布。横軸の方向は転写領域が正となるよう一致させてある。(b) ORC の結合する (赤) または結合しない (黒) poly(dA/dT) stretch におけるヌクレオソームの分布。(c) pre-RC (赤) または ORC only (黒) 周辺のヌクレオソームの分布。(a-c) 実線は Z-score に変換したヌクレオソーム分布の平均値、帯は 95% 信頼区間を示す。ヌクレオソームの分布は Z-score に変換されているので、ゲノム全域での平均が 0、分散が 1 となっている。

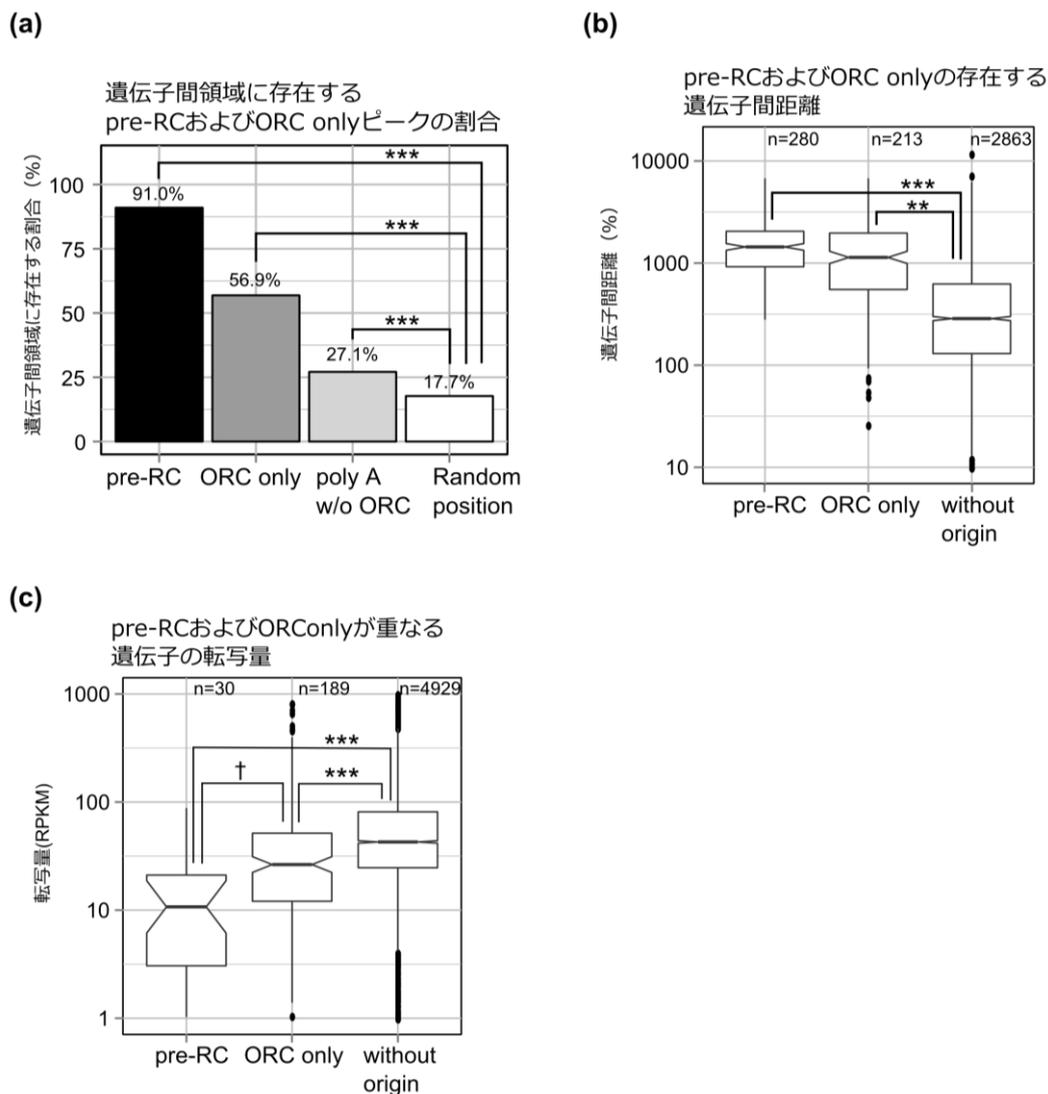


図 8 pre-RC は遺伝子間領域に形成される。(a) pre-RC (黒)、ORC only (濃い灰)、ORC の結合しない poly(dA/dT) stretch (淡い灰)、およびゲノム上のランダムな位置 (白) と遺伝子間領域との重なり。全てのグループはランダムな位置から予測されるよりも遺伝子間領域と重なる割合が大きかった (** $p < 10^{-5}$)。 (b) pre-RC および ORC only の存在遺伝子間距離。 (c) pre-RC および ORC only の存在する遺伝子の転写量。 (b) および (c) においては、Welch's one-way ANOVA によって平均値が等しくないことを確認した後 ($p < 10^{-5}$)、Games-Howell 法によってそれぞれの群間での差を検定した (** $p < 10^{-5}$, ** $p < 10^{-4}$, † $p < 10^{-3}$)。

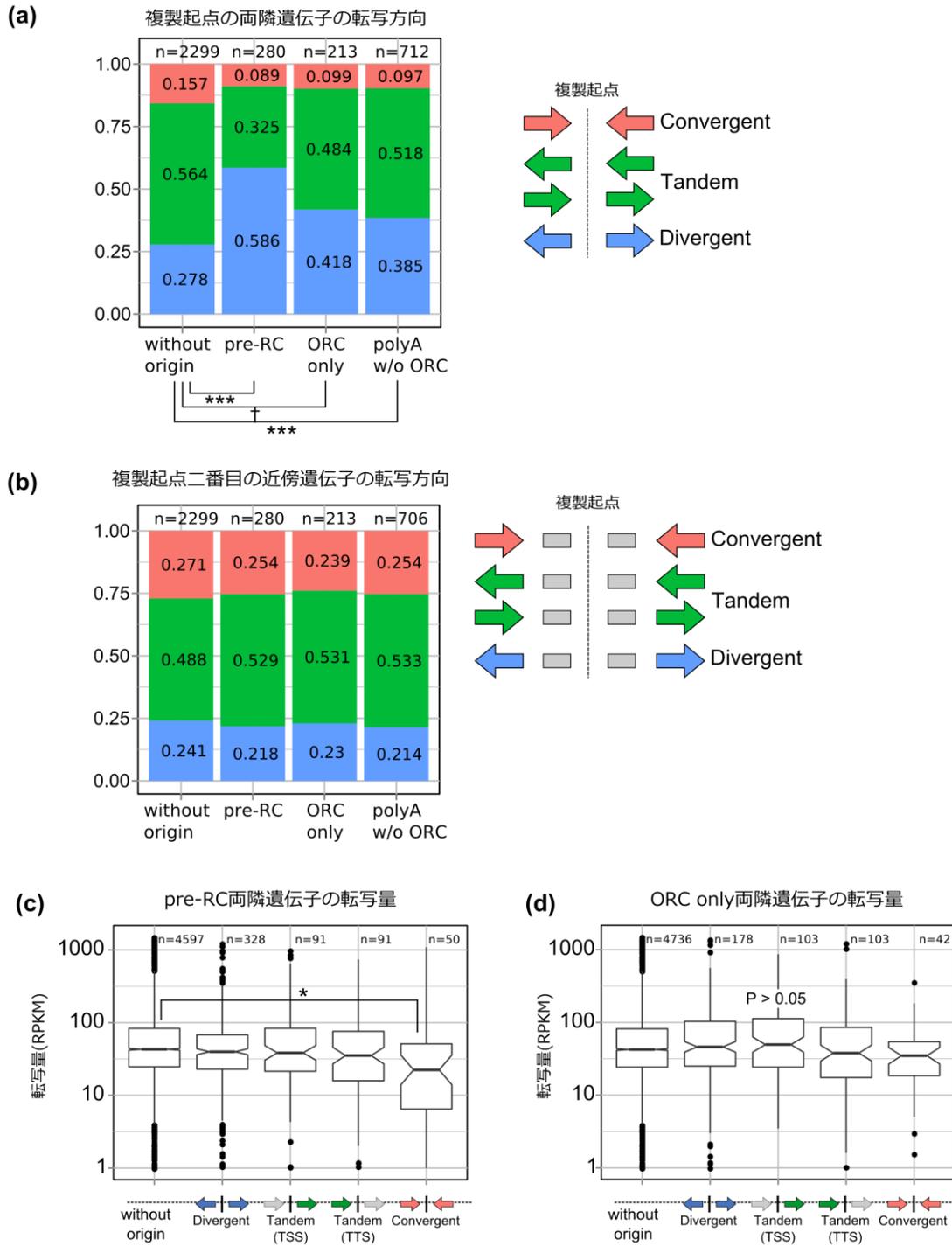


図9 pre-RCはdivergent転写領域で優先的に形成される。 pre-RC、ORC only、ORCの結合しないpoly(dA/dT) stretchの(a)両隣または(b)2番目に近い遺伝子の向きの割合。両隣の遺伝子の割合はグループ間で差があったが(カイ二乗検定、 $p < 10^{-5}$)、2番目に近い遺伝子の割合はグループ間で差はなかった(カイ二乗検定、 $P > 0.05$)。pre-RC (b)およびORC only (c)隣の遺伝子の転写量(Welch's one-way ANOVAにより検定)。

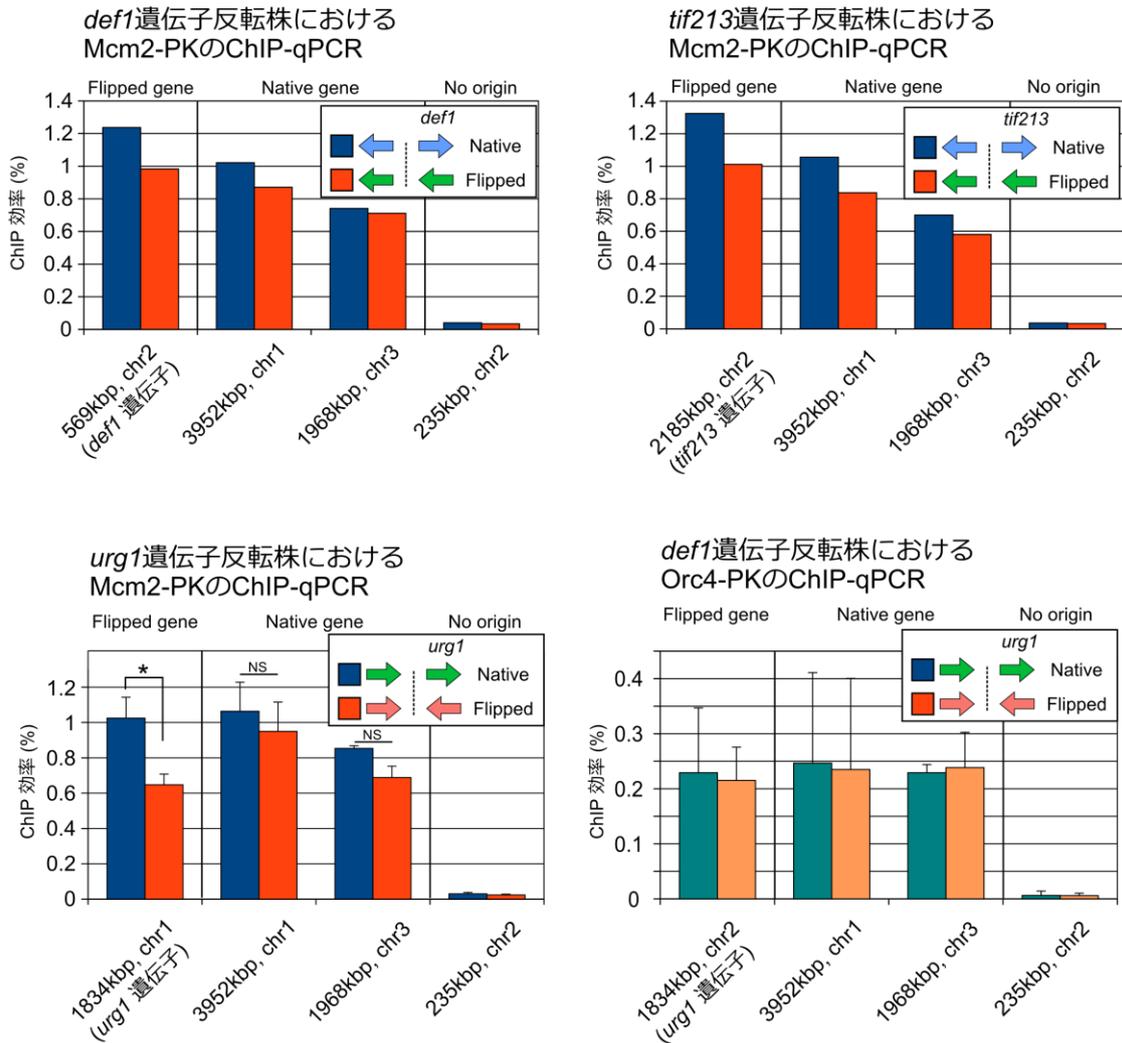


図 10 Tandem から convergent 転写方向への変換は pre-RC 形成を阻害する。(上段) Divergent から tandem 転写方向へ変換 (赤) した時の Mcm2 の結合量。転写方向を変換していない (青) 場合をネガティブコントロールとした。(左下段) Tandem から convergent 転写方向へ変換 (赤) した時の Mcm2 の結合量。転写方向を変換していない (青) 場合をネガティブコントロールとした。(右下段) Tandem から convergent 転写方向へ変換 (オレンジ) した時の Orc4 の結合量。転写方向を変換していない (緑) 場合をネガティブコントロールとした。

考察

本研究では、分裂酵母 *S. pombe* の複製起点の cis 決定因子を明らかにするために、大量並列型シーケンサーを用いて Orc4(ORC サブユニット)と Mcm2(MCM2-7 ヘリケースサブユニット)の結合領域をこれまでにない高感度かつ高解像度で同定した。ピーク同定を行ったところ、Orc4 については 756 ヶ所、Mcm2 については 380 ヶ所の結合部位が同定された。Orc4 と Mcm2 の両方が存在するピークを pre-RC ピーク、Orc4 のみが存在するピークを ORC only ピークと呼ぶことにした。全ての複製起点が等しく発火するわけではない。形成された pre-RC のうち、特定のものが発火し、DNA が複製される。S 期に同調した細胞の DNA をそのまま大量並列型シーケンサーで解析し、この DNA 複製プロファイルをも捉えた。得られた ChIP-seq プロファイルとピーク同定が妥当であるかは以下の方法で確認した。1)既知の複製起点での Orc4 と Mcm2 のプロファイルを見ると、確かにこれらのタンパク質は高頻度で染色体に結合していた (図 4a)。また、ORC only は pre-RC を形成していないため、S 期後期に複製を開始する後期複製開始点または近傍で発火した複製起点から来た複製装置に受動的に複製される不活性な複製起点と考えられる。実際に、ORC only の周辺では S 期初期に複製されている割合は低かった (図 4a、ORC only 及び図 4c)。2)本研究で得られた複製起点を既に報告されている複製起点と比較した。Table1 に示したように、異なる手法で同定された複製起点とも良い重なりが確認された。3)ChIP-seq 法で同定された複製起点を ChIP-qPCR を用いて確認した (図 4d)。ピーク領域では、それ以外の領域よりも高い ChIP 効率がみられた。また、PK エピトープを付加しない細胞株を用いて ChIP-qPCR を行っても ChIP DNA の濃縮はみられず、ChIP-qPCR の結果が抗体ビーズに非特異的に結合した DNA によるものである可能性を否定できた。さらに、本研究ではこれまでに報告された pre-RC 結合領域に含まれない新規の pre-RC 結合領域をも 64 ヶ所同定した。この新規 pre-RC 結合領域は ChIP-qPCR によって確かめられた。以上から分裂酵母の複製起点をこれまでにない高感度かつ高解像度で同定できたと結論した。

真核生物では、出芽酵母を除いて複製起点におけるコンセンサス配列は報告されていない。本研究では ChIP-seq 法を活用することで、高感度かつ高解像度で複製起点を同定したことに加え、同定された複製起点のなかにはこれまでに報告されていない新規のものも含まれていたため、複製起点のコンセンサス配列が見出される可能性があった。

ORC 結合領域におけるモチーフ配列解析を行ったところ、少なくとも 3 つの A または T が連続して現れるモチーフ配列 (AAA[A/T]AAA[A/T]AAA[A/T]AAA) を同定した (図 6b)。これまでも分裂酵母の複製起点のコンセンサス配列を探索を試みた研究があるが、いずれも A または T が連続して現れることを示しているのみであった (Dai et al., 2005; Xu et al., 2012)。それに対して、本研究で同定したモチーフ配列では A または T が連続している点は過去の報告と一致していたが、A または T が少なくとも 3 つ連続しなければならない点がこれまでの報告と異なる。興味深いことに、複製起点 *ars2004* の活性には、A または T が少なくとも 3 つ続く DNA 配列 (AAA[A/T]) が必要であることが報告されている (Okuno et al., 1999)。従って、今回同定されたモチーフ配列は Orc4 が複製起点に結合するために必要な必須配列を表していると考えられる。

これまで高解像度で複製起点は同定されていなかったため、複製起点周辺でいくつのポリ (dA/dT)トラックがどのように分布しているかは全く不明であった。本研究で同定された ORC ピーク周辺のポリ (dA/dT)トラックの分布を解析したところ、ほとんどの ORC ピークには少なくとも一つのポリ (dA/dT)トラックが存在し、複数のポリ (dA/dT)トラックが存在するケースも多く見られた。さらに、ORC の染色体への結合効率はポリ (dA/dT)トラックの数に相関することが示された。この結果は、ORC が複製起点 *ars2004* に 2 つのポリ (dA/dT)トラックを介して相乗的に結合するという結果と一致していた (Takahashi et al., 2003)。ORC の染色体への結合は Orc4 の N 末端に存在する AT-hook ドメインに依存していることから (Chuang and Kelly, 1999)、Orc4 がポリ (dA/dT)トラックを認識して染色体へ結合することが考えられる。ただし、原子間顕微鏡を用いた解析から Orc4 に複製起点を含む DNA が巻き付いていることが示されていることから (Gaczynska et al., 2004; Marilley et al., 2007)、Orc4 の N 末端に存在する 9 つの AT-hook が 2 か所以上のポリ (dA/dT)トラックを認識することで、ORC が複製起点により強固に結合している可能性が示唆された。

コンセンサス配列の以外の出芽酵母の複製起点の特徴は、ヌクレオソームの欠失である。一方で、分裂酵母の複製起点におけるヌクレオソームに関しては、ヌクレオソームが欠失しているという報告と (Givens et al., 2012; Lantermann et al., 2010; Xu et al., 2012)、ヌクレオソームは欠失していないという報告があり (de Castro et al., 2011)、議論が分かれている。本研究では、pre-RC 形成時期のヌクレオソーム分布を明らかにするために、G1 期に同調させた細胞のゲノム DNA をマイクロコッカルヌクレアーゼで処理し、モノヌクレオソームのマッピングを行った。ORC の結合しているポリ (dA/dT)

トラックでは、ORC の結合していない場合よりもヌクレオソームが欠失していたため、分裂酵母の複製起点においても出芽酵母同様に、ヌクレオソームの欠失が複製起点の規定因子の一つであることが示唆された。これまでに、*Schizosaccharomyces* 属のうち、*S. pombe*、*S. octosporus* および *S. japonicus* の 3 種において、複製起点の解析が行われている(Xu et al., 2012)。*S. pombe* と *S. octosporus* の複製起点ではポリ(dA/dT)トラックが観測されている一方、*S. japonicus* では、ポリ(dG)トラックが複製起点においてみられる。これらモチーフ配列の塩基配列は全く異なるが、poly(G)トラックは poly(A)トラック同様、ヌクレオソームの DNA への組み込みを阻害する。従って、真核生物の複製起点においては DNA 配列だけでなく、ヌクレオソームの欠失が共通の特徴と考えられている。実際、ハエの複製起点でもヌクレオソームの欠失が見られる(MacAlpine et al., 2010)。

また出芽酵母では、ORC のクロマチン結合により、周辺のヌクレオソームが規則的に配置されることが報告されている(Berbenetz et al., 2010; Eaton et al., 2010)。また、複製起点周辺のヌクレオソームを取り除いてしまうと、複製活性が弱くなることから複製起点周辺のヌクレオソームの規則的な分布が重要であることが示されている(Lipford and Bell, 2001)。本研究で pre-RC ピークと ORC only ピーク周辺のヌクレオソームを解析したところ、ORC のクロマチン結合ではヌクレオソームは規則的に配置されないが、その後の pre-RC 形成においてはヌクレオソームの規則的な配置が見られた。このことから、分裂酵母では出芽酵母とは異なり、pre-RC の形成によってヌクレオソームが規則的に配置されることが示された。

上記の解析から、ORC はポリ(dA/dT)トラックとヌクレオソームの分布依存的に染色体に結合することが示された。しかしながら、続く pre-RC の形成は pre-RC 間距離の分布が指数分布で完全に説明できないことから、特定の ORC に pre-RC が選択的に形成されると考えられる。そこで pre-RC の規定因子を探索するために、まず複製起点と遺伝子との重なりを解析した。ORC only ピークのうち 4 割以上は遺伝子と重なることが許容された一方、pre-RC では 9 割以上が非転写領域に存在していた。この結果から、pre-RC の形成段階において転写領域と重なることが好ましくないことが示された。出芽酵母では、複製起点において転写が誘導されると ORC の染色体への結合が阻害され、その結果複製が阻害されることが報告されている(Mori and Shirahige, 2007)。

複製起点の両隣の遺伝子の転写方向を調べたところ、pre-RC は divergent 転写領域に優先的に形成されることが示された。この結果から、転写の上流領域が pre-RC の形成

を促進することが示唆された。この結果は、2D ゲルを用いた 14 ヶ所の複製起点の解析で、活性のある複製起点の多くは遺伝子上流にあるという結果と一致していた (Gómez and Antequera, 1999)。さらに、tandem 転写領域の遺伝子を反転させ convergent 転写領域とすると Mcm2 の染色体への結合が阻害されたことから、pre-RC が効率よく染色体に形成されるためには、少なくとも 1 つの遺伝子上流領域が必要であることが示された。このことから、転写によって引き起こされる遺伝子上流領域のクロマチン構造の変化、例えば負の DNA 超らせん構造が pre-RC の形成に影響を与えていると考えられる。興味深いことに、生化学的な実験により分裂酵母の ORC は負の DNA 超らせん構造により強い親和性を持つ (Houchens et al., 2008)。また Cdt18 と Cdt1 の存在下では、ORC は DNA に負の DNA 超らせん構造を導入し、高塩濃度の洗浄でも外れない強い親和性を持って DNA に結合する (Houchens et al., 2008)。上述したように、原子間顕微鏡観察から ORC は複製起点を含む DNA に巻き付いていることが示唆されており、*in vivo* においても遺伝子上流領域のような負の DNA 超らせん構造を含む領域では、それ以外の領域とは異なる結合様式で ORC は染色体に結合している可能性がある。このような遺伝子上流領域における特殊な ORC の染色体への結合が pre-RC の形成を促進しているのかも知れない。また、ショウジョウバエにおいても、ORC が負の DNA 超らせん構造に高い親和性を持って結合することが報告されている (Remus et al., 2004)。面白いことに、出芽酵母において *in vitro* で観測されるよりも、*in vivo* で ORC が強く染色体に結合する複製起点が報告されている (Hoggard et al., 2013)。この *in vitro* と *in vivo* の結合の差はクロマチン構造が原因であると考えられており、*in vivo* で高い親和性を示す複製起点は活性型の初期複製となる傾向がある。

Tandem 転写領域から convergent 転写領域への転写方向の反転によって pre-RC の形成は阻害されたが、バックグラウンド同等までは阻害されておらず影響は部分的であった。従って、pre-RC の形成には転写の方向とは別の因子が影響を与えていると考えられる。その可能性のひとつとして、複製起点と転写領域との距離がある。図 8b より、pre-RC は広い遺伝子間領域に形成される。実際に pre-RC の形成されている convergent 転写領域の遺伝子間領域距離も複製起点の無い場合よりも長いことが示されている。今回転写方向を反転させた領域でも遺伝子間領域は長かった。従って、遺伝子間距離が短い領域の遺伝子を反転させれば、pre-RC の形成はより顕著に阻害されると考えている。

今回の pre-RC 形成の阻害実験では、遺伝子上流領域が pre-RC の効率的な形成に必

要であることが示された。しかしながら、転写遺伝子上流領域が pre-RC の形成にとって十分であるかは不明である。今後は、ORC only ピークの convergent 転写領域から tandem 転写領域への変換によって、少なくとも 1 つの遺伝子上流領域が pre-RC の形成にとって十分であるかを検討したい。さらに、tandem 転写領域を divergent 転写領域に変換することで、2 つの遺伝子上流領域が pre-RC の形成を促進するか検討したい。また、TATA-box を欠失させるなどの実験によって転写そのものが pre-RC の形成を促進していることを確認したい。

結論

本研究では、分裂酵母における複製起点の決定因子の探索を行った。Orc4 と Mcm2 の ChIP-seq のデータ解析の結果、ORC はポリ(dA/dT)トラック依存的に染色体へ結合することが示された。また、遺伝子上流領域が pre-RC の形成にとって好ましい領域であること、pre-RC 近傍遺伝子の転写方向の反転によって pre-RC の形成が阻害されたことが見いだされた。転写開始点上流に作り出されるクロマチン環境、例えば負の DNA 超らせん構造が蓄積するような環境が、ポリ(dA/dT)トラックに加えて複製起点決定因子として機能していることが強く示唆された。

材料と方法

菌株

本研究で用いた全ての菌株は Table2 に示されている。

培地

YPD

Yeast Extract (BD)	10 g/L
Peptone (BD)	20 g/L
D-Glucose (Wako)	20 g/L

YPD プレート

Yeast Extract (BD)	10 g/L
Peptone (BD)	20 g/L
D-Glucose (Wako)	20 g/L
Agarose (Wako)	20 g/L

選択培地として使用する場合、*kanMX6* マーカーに対しては geneticin (G418, CALBIOCHEM)、*hphMX6* マーカーに対しては hygromycin B (Wako)、*natMX6* マーカーに対しては nourseothricin (HKI Jena)を終濃度 100 µg/mL でそれぞれ加えた。

PMG-S

Potassium hydrogen phthalate (Wako)	3 g/L
Na ₂ HPO ₄ (Wako)	2.2 g/L
L-glutamic acid, monosodium salt (Wako)	3.75 g/L
Glucose (Wako)	20 g/L
Salts	20 mL/L
Vitamins	1 mL/L
Minerals	0.1 mL/L
adenine, histidine, leucine, uracil and lysine (Wako)	225 mg/L

50x salts stock

MgCl ₂ ·6H ₂ O (Wako)	52.5 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Wako)	0.735 g/L
KCl (Wako)	50 g/L
Na ₂ SO ₄ (Wako)	2 g/L

1000x Vitamins stock

Pantothenic acid (Wako)	1 g/L
Nicotinic acid (Wako)	10 g/L
Inositol (Wako)	10 g/L
Biotin (Wako)	10 mg/L

10000x Mineral stock

Boric acid (Wako)	5 g/L
MnSO ₄ (Wako)	4 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Wako)	4 g/L
FeCl ₂ ·6H ₂ O (Wako)	2 g/L
Molybdic acid (Wako)	0.4 g/L
KI (Wako)	1 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O (Wako)	0.4 g/L
Citric acid (Wako)	10 g/L

プラスミド

pBluescript II KS(+)

ターゲットタンパク質へのエピトープタグの付加

9 コピーの PK エピトープを *Orc4* および *Mcm2* の C 末端に付加するため、endogenous の *orc4⁺* と *mcm2⁺* 遺伝子の 3' 領域に PK エピトープ配列を挿入した。そのためにまず、目的遺伝子の C 末端断片 (約 1 kbp) を PCR (polymerase chain reaction) 反応によりゲノム DNA から増幅した。テンプレートとなるゲノム DNA は 972 *h* 細胞から回収した (Gen とるくん(酵母用) High Recovery, TaKaRa)。PCR 反応は Phusion (Phusion

High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific Inc.)を用い、反応液の調製は添付プロトコールに従った。C末端断片の増幅に使用したプライマーは Table3 に示されている。プライマー設計の際、3'領域に PK エピトープを挿入するため、終止コドンを除く点に注意した。

PCR 反応

98°C	2 分
98°C	10 秒
54°C	20 秒
72°C	60 秒
72°C	5 分
サイクル数	30

目的 DNA が増幅したことを 1% アガロース電気泳動により確認した後、DNA をカラム精製した。次に、目的遺伝子の C 末端断片を、9xPK エピトープと *kanMX6* マーカーを含む pBluescript II KS(+) ベクターにクローニングした。ベクターおよび目的遺伝子 C 末端断片を SpeI および NotI により切断後、Ligation Kit v2 (TaKaRa)により、16°C、1 時間反応させて目的断片をベクターにライゲーションさせた。その後、反応溶液をコンピテントセル (DH5 α , TaKaRa) に形質転換し、選択培地 (100 μ g/mL Ampicillin LB plate) 上に形成したコロニーからベクターを精製した (GenElute Plasmid Miniprep Kit, SIGMA-ALDRICH)。目的インサートを含むベクターを SpeI および NotI 切断によって確認した。

目的遺伝子内の DNA 配列を XcmI (*orc4*⁺)または BglIII (*mcm2*⁺)で切断し、ベクターを直線化した後、ベクターを対応する遺伝子座に挿入した (Sutani et al., 1999)。分裂酵母の形質転換は次節で説明する。PK タグの付加はウェスタンブロットにより確認した。これにより、Orc4 および Mcm2 の C 末端に 9 コピーの PK エピトープタグを付加した。

分裂酵母の形質転換

Li-acetate buffer

Lithium acetate (Wako)	100 mM
Tris-HCl (pH7.5, Wako)	10 mM

EDTA (pH 8.0)	1 mM
---------------	------

細胞溶液 15 mL を PMG-S 中で OD₆₀₀~0.5 となるよう、26°C で培養した。3500 rpm, 3 分, RT で遠心し、上清を捨てて 1 mL の DDW に細胞を再懸濁して、1.5 mL チューブに移した。同様に遠心し、上清を捨てて 100 µL の Li-acetate buffer に懸濁した。直線化したベクター (<10 µL) と carrier DNA 2 µL を加え、10 分間静置した。Li-acetate buffer/40% PEG(#4000, SIGMA-ALDRICH) を 260 µL 加えた後、室温で 1 時間回転攪拌した。その後、42°C に温めた DMSO 43 µL を加え、42°C で 5 分間インキュベートした。2 分間室温で静置し、同様に遠心し、500 µL の DDW で wash 後、150 µL の DDW で懸濁した細胞液を YPD プレートへ塗布した。26°C で 24 時間以上培養後、YPD プレート上の細胞のレプリカを選択培地プレートへ作成した。26°C で 3, 4 日培養後、爪楊枝を用いてシングルコロニーを新しい選択培地プレートへストリークした。

内在性遺伝子の反転

複製起点周辺の遺伝子の転写方向が pre-RC の形成に影響を及ぼすかを検討するために、pre-RC 隣の遺伝子の転写方向を反転させ、divergent 転写領域を tandem 転写領域に、または tandem 転写領域を convergent 転写領域に変換した株を作製した。遺伝子改変方法は、図 5a のような内在性遺伝子（上段）の下流領域にマーカー配列を挿入したのみのも（Native gene direction, 中段）、または promoter、遺伝子、下流領域を反転させ、マーカー配列を挿入したもの（Opposite gene direction, 下段）の 2 通りとした。Native gene direction は遺伝子改変のネガティブコントロールとした。これらの株を得るために、図 5b に示すプラスミドを作製した。まず、目的の DNA 断片を分裂酵母のゲノム DNA から増幅した（第二章、PCR 反応節参照）。この際に用いたプライマー配列は Table3 に示しており、図 5b の番号(1~7)と対応している。得られた DNA 断片と BglIII/HindIII で処理したベクター pFA6a (*hphMX6*) を In-Fusion system (In-Fusion HD Cloning Kit, TaKaRa) によりライゲーションし、コンピテントセル (DH5α, TaKaRa) に形質転換した（第二章、材料と方法節参照）。目的インサートは PCR 反応により確認した。最後に、“DOWN”配列と“UP”配列の間の制限酵素サイトを適切な制限酵素によって切断し（図 5b, cutting site）、分裂酵母に形質転換した（第二章、分裂酵母の形質転換節参照）。ベクター特異的なプライマーと、目的遺伝子座の下流領域特異的プライマーを用いて、目的 DNA 配列が遺伝子座に適切に挿入されたこと

を確認した。

細胞の同調

細胞を G1 期に同調するため、*cdc10-V50* 変異株を YPD 中 26°C で OD₆₀₀~0.3 まで培養し、その後制限温度である 36°C で 3.5 時間培養した。

また、複製領域を解析するために、S 期の G2 期に対する DNA コピー数増加を調べた。

まず、*cdc25-22* 変異株を YPD 中 26°C で OD₆₀₀~0.3 まで培養し、その後制限温度である 36°C で 3.5 時間培養することで、G2 期後期に同調した。続いて細胞を 11 mM hydroxyurea (HU) を含む YPD 中 26°C にリリースした後、2.5 時間培養し、S 期初期に同調した。細胞の同調は DNA 含有量を FACS 解析することによって確認した。

FACS 解析

Na-Citrate (pH7.4, Wako)	50 mM
RNase A (Roche)	50 mg/mL
PI (Propidium Iodide, Wako) in 50mM Na-Citrate (pH7.4)	4 µg/mL

OD₆₀₀~0.3 の培養液 1 mL (~6x10⁶ 細胞、OD₆₀₀=1 は約 2x10⁷ 細胞/mL に相当する) を 5000rpm で 2 分間遠心し、上清を取り除いた後、1 mL の氷冷した 70% エタノールを加え、混和して細胞を固定した。固定が完了するまで少なくとも 2 時間は室温で静置し、FACS 解析を行うまで 4°C で保存した。

固定した細胞溶液 300 µL を 1 mL の 50 mM Na-Citrate と混和し、5000 rpm で 2 分間遠心した。上清を取り除き、500 µL の 50 mM Na-citrate を加えた。1 µL の 50 mg/mL RNase A を加えて(終濃度 0.1 mg/mL)、37°C で 2 時間インキュベートした。その後、500 µL の 4 µg/mL PI 溶液を加え、終濃度 2 µg/mL として、暗所で 30 分間静置した。反応溶液を FACS チューブに移した後、ソニケーターで細胞をほぐした (level1: Amplitude:39%, 2 秒パルス、0.5 秒レスト、4 回、Digital Sonifier Model 250D, BRANSON)。以下の条件で FACS 解析を行った。

機器: BECTON DICKINSON FACSCalibur flow cytometer 3 lasers typeA

Detector: FL-2A

Voltage: 860

Gain: 1

Y-max: 500

Storage: 25000

DNA 含有量の FACS 解析では、細胞とごみなどの不純物、および 1 細胞と 2 細胞を区別しなければならない。まず、不純物と細胞を分けるため、x 軸に FSC、y 軸に SSC を取った 2D plot を展開し、左下の不純物以外の領域を細胞としてゲートした (ゲート 1)。ゲート 1 をインプットとした FSC のヒストグラムによって、不純物が適切に除去されたかを確認した。次に、1 細胞と 2 細胞を区別した。単純な PI のシグナルだけでは 1 細胞の DNA が 2 倍量となったのか、1 倍量の DNA を持つ細胞が接着して 2 細胞となっているのかは区別できず、ノイズの原因となる。これらを区別するために、x 軸に FL-2H、y 軸に FL-2A を取った 2D plot を展開した (インプットは gate1 とした)。FL-2H と FL-2A は、それぞれ細胞がレーザーを通過するときに得られたシグナルの高さおよび領域を表す。1 細胞がレーザーを通過するときは、FL-2H と FL-2A は比例関係にあり、2D plot で一直線上に分布するのに対し、2 細胞 (または多細胞) がレーザーを通過するときはこの直線から外れた位置にプロットされるので、この直線の近傍領域を 1 細胞としてゲートした (ゲート 2)。ゲート 2 の細胞をインプットとして、FL-2A のヒストグラムを描画し、FACS 解析を行った。

抗体

Anti-PK monoclonal antibody (SV5-Pk1 clone, AbD Serotec) を用いた。

クロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation: ChIP 法)

TBS

Tris-HCl (pH=7.5, Wako)	20 mM
NaCl (Wako)	150 mM

Lysis buffer

HEPES KOH (pH=7.5, Wako)	50 mM
NaCl (Wako)	140 mM
EDTA	1 mM

TritonX-100 (SIGMA-ALDRICH)	1 %
Na-deoxycholate (Wako)	0.1 %

Wash buffer

Tris-HCl (pH=8.0, Wako)	10 mM
LiCl (Wako)	250 mM
NP-40 (IGEPAL CA-630, SIGMA-ALDRICH)	0.5 %
Na-deoxycholate (Wako)	0.5 %
EDTA	1 mM

Elution buffer

Tris-HCl (pH=8.0, Wako)	50mM
EDTA	10mM
SDS (Wako)	1%

TE

Tris-HCl (pH=8.0, Wako)	10mM
EDTA	1mM

PBS/BSA buffer (50 mL)

PBS (Phosphate Buffered Salts Tablets, TaKaRa)	2 tablets
BSA	250 mg

TBS, Lysis buffer, Wash buffer、TE はオートクレープ、PBS/BSA buffer はミリポアでフィルターすることで滅菌処理した。

まず、ビーズ (Dynabeads Protein A for Immunoprecipitation, Thermo Fisher Scientific Inc.) に抗体を結合させる前処理を行った。抗体およびビーズ量は 25 mL の細胞液に対するものとする。チューブ (coster 1.7 mL Tube) に Dynabeads を 20 μ L 入れ、5000 rpm, 1 分, 4°C で遠心した。上清を捨て、氷冷した PBS/BSA buffer で 2 回 wash した。ビーズを 15 μ L の PBS/BSA buffer で再懸濁し、5 μ L anti-PK 抗体を加え

た。チューブを4℃でローテーションしながら3時間以上インキュベートした。使用直前に氷冷した1 mL PBS/BSA buffer で2回 wash した。

細胞培養液 (OD600~0.3) に終濃度 1%となるようにホルムアルデヒドを加え、25℃で25分間細胞を固定した。細胞が36℃で培養されていた場合は、ホルムアルデヒド添加後、フラスコは25℃の水槽へ速やかに移され、25分間固定された。終濃度 250mM となるよう 2.5M グリシン溶液を 1/10 量加え、5分間室温でインキュベートすることで固定反応を停止した。

以下の試薬は全て 25 mL 培養液に対するものとする。3000 rpm, 3分, 4℃で遠心後、氷冷した 20 mL TBS で3回 wash した。400 μL の氷冷した Lysis buffer で細胞を 1.5 mL チューブに移し、さらに 3500 rpm, 3分, 4℃で遠心した。終濃度 1xProtease Inhibitor(Complete, EDTA-free, Roche)/1mM PMSF(SIGMA-ALDRICH)となるようにそれぞれを加えた 400 μL Lysis buffer で懸濁後、懸濁液の半分程度量のジルコニアビーズを加えた。MULTI-BEADS SHOCKER(安井器械)を用いて細胞を破碎した (1分間反応、1分間静置、10 cycle, 0℃)。

細胞液の入ったチューブの底に 2.6G シリンジで小孔を作り、これを 15 mL チューブに移した後、3000 rpm, 1分, 4℃で遠心し、細胞液を回収した。これをもう一度繰り返した。細胞をソニケーション (Digital Sonifier, BRANSON, TIME=12sec, AMPLITUDE=17%)し、ゲノム DNA を抽出・断片化して、12000 rpm, 1分, 4℃で遠心した。これを5回繰り返した。反応液を 15000 rpm, 5分, 4℃で遠心し、上清を同条件でさらにもう一度遠心した。上清のうち 5 μL を ChIP 法の input として回収した。また上清の 5 μL を ChIP 法確認のためのウェスタンブロットサンプルとして回収した (input)。残った上清を抗体結合処理したビーズと混和し、4℃で5時間以上ローテーションしながらインキュベートした。

マグネティックスタンドにチューブを4℃で2分間静置し、上清を確認のためのウェスタンブロットサンプルとして回収した(sup)。上清を捨て、氷冷した 1mL Lysis buffer で2回 wash した。さらに、360mM NaCl を含む氷冷した 1mL Lysis buffer、氷冷した 1mL Wash buffer でそれぞれ2回ずつ wash した。その後、氷冷した 1 mL TE でビーズを再懸濁し、3500 rpm, 3分, 4℃で遠心した。TE を綺麗に除去後、40 μL の Elution buffer を加え、65℃で15分間インキュベートし、ビーズから抗体を遊離させた。この間、5分ごとに vortex した。15000 rpm, 5秒, RT でスピンドウンした後、5 μL の上清を確認用ウェスタンブロットサンプルとして回収した(ChIP)。残りの上清と TE/1%

SDS buffer を混和し 150 μL とした。また、input として回収していたサンプル 5 μL に 95 μL の TE/1% SDS を加えた。ChIP と input サンプルを 65°C で一晩静置し、クロスリンクを解除した。

翌日、終濃度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう、RNase A (Roche) を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。次に、input サンプルに 93 μL TE, 2 μL Glycogen (10 mg/mL, nacalaitesque), 2 μL Proteinase K (50 mg/mL, Merck Millipore)、ChIP サンプルに 140 μL TE, 3 μL Glycogen (同上), 3 μL Proteinase K (同上) をそれぞれ加え、37°C で 2 時間インキュベートした後、DNA を精製した (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN)。50 mL の細胞液から DNA を回収した場合は 50 μL TE で、100 mL の細胞液では 100 μL TE で Elute した。回収した input および ChIP DNA を ChIP-qPCR および ChIP-seq に用いた。

Mononucleosomal DNA の調製

Mononucleosomal DNA の調製は (Lantermann et al., 2009) に準拠した。

Preincubation solution

Citric acid (Wako)	20 mM
Na_2HPO_4 (Wako)	20 mM
EDTA (pH 8.0)	40 mM
β -mercaptoethanol (2-ME, 使用直前に加える, Wako)	30 mM

Sorbitol/Tris buffer

Sorbitol (Wako)	1 M
Tris-HCl (pH 7.4, Wako)	50 mM

NP-buffer

Sorbitol (Wako)	1 M
NaCl (Wako)	50 mM
Tris-HCl (pH 7.4, Wako)	10 mM
MgCl_2 (Wako)	5 mM
CaCl_2 (Wako)	1 mM

NP-40 (IGEPAL CA-630, 使用直前に加える, SIGMA-ALDRICH)	0.75 %
β -mercaptoethanol (2-ME, 使用直前に加える, Wako)	1 mM
1.6 M Spermidine (使用直前に加える)	0.5 mM

Stop buffer

SDS (Wako)	5 %
EDTA (pH 8.0)	100 mM

TE

Tris-HCl (pH=7.5, Wako)	10 mM
EDTA (pH=8.0)	1 mM

細胞を OD₆₀₀~0.3 となるよう 400 mL の YPD 中 26°C で培養した。37%ホルムアルデヒドを 5.5 mL 加え (0.5 % final)、室温で 20 分間インキュベートした。この間に、16 mL の preincubation solution に 37.92 μ L の 2-ME を加え (30 mM final)、30°C でプレインキュベートした。また、8 mg の Zymolyase 100T (SEIKAGAKU COOPERATION) を 160 μ L の DDW に溶解した。

細胞溶液に 21.6 mL の 2.5 M glycine (125 mM final) を加え、室温で 10 分間インキュベートすることで、固定反応を停止した。3500 rpm、3 分間、RT で遠心した後、20 mL の DDW で 2 回 wash した。Spheroplast 形成確認のネガティブコントロール用に数 μ L の細胞溶液を回収した。

30°C でプレインキュベートした preincubation solution/2-ME 16 mL で細胞を再懸濁し、30°C で 10 分間シェーカーインキュベートした。この間に、8 mL の Sorbitol/Tris buffer, 5.6 μ L 2-ME, 160 μ L zymolyase 溶液を混和し、30°C でプレインキュベートした。その後、細胞溶液を 3000 rpm、3 分間、4°C で遠心し、上清を捨てた。

プレインキュベートした Sorbitol/Tris buffer/2-ME/Zymolyase 溶液 8 mL で細胞を再懸濁し、30°C で 30 分間シェーカーインキュベートした。次のステップに進む前に、数 μ L の spheroplast および zymolyase 処理前に回収したネガティブコントロール用サンプル数 μ L に 10 μ L の 5% SDS 溶液を加え、spheroplast が位相差顕微鏡下で黒く見える一方、zymolyase 未処理サンプルの細胞質は明るく見えるかを確認した。また、6 mL の NP buffer に 45 μ L の NP-40、0.48 μ L の 2-ME、1.875 μ L の 1.6 M spermidine

を加え、37°Cでプレインキュベートした。

3000 rpm、3 分間、4°Cで遠心し、spheroplast を 10 mL の Sorbitol/Tris buffer (2-ME および zymolyase なし)で一度 wash した。同様に遠心後、プレインキュベートした NP buffer 6 mL で細胞を再懸濁した。以下は 50 mL culture ごとの反応とする (カルチャー開始が 400 mL の場合、8 サンプル分となる)。

MNase の反応性は細胞周期などによって大きく左右されるため、いくつかの濃度の MNase でゲノム DNA を処理し、mononucleosomal DNA を生成する最適濃度を検討する必要がある。6 mL の反応溶液のうち、750 μ L 反応溶液と 20 U/ μ L MNase (TaKaRa)をいくつかの濃度で混和させ (0, 75, 100, 125, 150, 300 U/mL final)、1.5 mL チューブ中、37°Cで 20 分間、シェーカーインキュベートした。

1 チューブ当たり 100 μ L の stop buffer を加えることで、反応を停止させ、16.25 μ L の 50 mg/mL ProK を加えて、65°Cで一晩インキュベートした。182.5 μ L の 3 M 酢酸カリウム (pH 5.5) を加え、氷上で 5 分間静置した。3200 g, 20 分間, RT で遠心後、上清と等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1, Wako) を混和し、12,000 rpm, 5 分間, RT で遠心した。上清を回収し、glycogen (7 μ g/mL final)、1/25 量の 5 M NaCl、0.7 量のイソプロパノールと混和後、-20°Cで 1 時間インキュベートした。

反応溶液を 12,000 rpm, 10 分間, 4°Cで遠心し、氷冷した 1 mL の 70%エタノールで wash 後、上清を綺麗に取り除いて風乾した。DNA を 30 μ L の 20 μ g/mL RNase/TE で溶解し、37°Cで 1 時間インキュベートした。2%アガロースを用いた電気泳動によって DNA を展開し、mono:di nucleosome が 8:2 となるサンプルから mononucleosomal DNA を切り出し後、Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (BioRad) を用いて DNA を精製した。

シーケンシングとデータ処理

次世代シーケンシングは製品説明書に則り、HiSeq2500 および Miseq システム (Illumina) を用いた。次世代シーケンシング、サンプルおよびマップ率に関する情報と統計は Table4 に記載した。

ChIP-seq 法に関しては、input および ChIP フラクシオン由来 DNA は超音波破碎 (Covaris) によって平均約 150 bp まで断片化され、エンドリペア、シーケンシングアダプターをライゲーションされ、増幅した後、シーケンスして single-end の 51-bp

のリードが生成された。得られたリードを Bowtie 2 (ver. 2.1.0)(Langmead and Salzberg, 2012)によって、分裂酵母のレファレンスシーケンス (ASM294v2.19) (Flicek et al., 2014)にマップした(デフォルトパラメータ)。マップされたリードのプロセッシングとピークコールは parse2wig と DROMPA2 (ver 2.5.1)(Nakato et al., 2013)を用いて行なった。マップされたリードはそれぞれの染色体において、10-bp の bin ごとに合計され、duplicate のフィルタリングと全リード数による正規化が行われた。ChIP フラクションと input フラクションのリード数分布を比較することにより、DROMPA 2 の Enrichment ratio モードによってピークコールを行った。オプションは"-sm 150 -binsize 10 -ethre 4 -ipm 8"を用いた。Input フラクションに対する ChIP フラクションの relative Enrichment Ratios (rERs)をそれぞれの bin ごとに計算し、150-bp のウィンドウで DROMPA2 によりスムージングした。得られた rERs は Integrative Genome Viewer(Thorvaldsdóttir et al., 2013)を用いて可視化した。また Venn 図は VennDiagram package(Chen and Boutros, 2011)を用いて作成された。

ヌクレオソームマッピングに関して、mononucleosomal DNA ライブラリは ChIP-seq 法と同様に調整された。ただし、超音波破碎を行わずに、51-bp リードが生成された。解析は"-p 1"オプションを使用した DANPOS (ver 2.1.4)(Chen et al., 2013)を用いて行われた。Duplicate リードをフィルタリングした後、それぞれのリードを 3' 方向に推定フラグメントサイズの半分シフトし、80-bp 伸長後、quantile normalization を適用した。

オーバーラップ解析

Orc4 と Mcm2 ピークのオーバーラップは自作スクリプト overlap_C.py ファイル内の Overlap クラス overlap_peak_vs_peak function によって計算した。これは、ピーク領域のうち少なくとも 1bp が重なったものをオーバーラップするもの、それ以外をオーバーラップしないものとしてピークリストを返すスクリプトである。Orc4 および Mcm2 ピークと遺伝子領域とのオーバーラップは overlap_C.py ファイル内の Overlap クラス overlap_summit_vs_peak function によって計算された。これは、ピークサミットと遺伝子領域が少なくとも 1 bp 重なった場合にオーバーラップするもの、それ以外をオーバーラップしないものとしてピークリストを返すスクリプトである。また、ゲノム上のランダムな位置を選択し、遺伝子とのオーバーラップと p-value の計算は自作

スクリプト `overlap_peak_vs_genomicFeature_oneClass.py` ファイルの `main function` によって計算された。

ヌクレオソーム分布解析

ピークまたはモチーフの中心点におけるヌクレオソーム分布の平均値および 95%信頼区間は自作スクリプト `signal_around_summit.py` ファイルの `summit_average_v2 function` によって計算された。これは、各ピーク周辺における正規化したリード数を各ウィンドウごとに積算し、ピーク数で除することで平均値を算出するスクリプトである。

また、95%信頼区間は、 $\text{平均値} \pm t_{0.025,df} \frac{S.D.}{\sqrt{N}}$ として算出する。ここで、S.D.は各ウィン

ドウにおけるリード数の標準偏差、Nはピーク数、 $t_{0.025,df}$ はt分布の自由度 $df=N-1$ における両側 5 パーセント点である。ヌクレオソームの分布は、ピークサミットの 1 kbp 周辺で、25 bp のウィンドウサイズ、10 bp のステップサイズを用いて計算した。またオプションで、ピークをゲノム全域からランダムに指定し、リードの分布を計算するシミュレーションを 1000 回繰り返すことで、ランダムな位置におけるリードの分布を計算する (`randNb=1000`)。

モチーフ解析

Orc4 ピーク内でのモチーフ解析を MEME-ChIP web service (ver 4.9.1) (Machanic and Bailey, 2011)を用いて行なった。Orc4 の結合領域を BEDTools (ver 2.17.0)(Quinlan and Hall, 2010)を用いて FASTA フォーマットに変換し、”-mod anr -minw 6 -maxw 15 -revcomp”オプションを使用して MEME-ChIP web service にアップロードした。MEME アルゴリズムによって同定されたモチーフ配列はシークエンスロゴとして表される (図 6b)。シークエンスロゴはモチーフの保存性を示すものであり、位置 i における各文字の長さの総和 (情報量、 R_i) は確実性を、それぞれの文字の長さはその文字 k の位置 i における相対頻度 $f(k,i)$ と R_i との積 ($f(k,i) \times R_i$) を表す。 R_i は以下の式で算出される。

$$R_i = 2 - (H_i + e_n)$$

ここで、シャノンエントロピー H_i は、

$$Hi = -\sum_k f(k,i) \times \log_2(f(k,i))$$

であり、モチーフ長 n の補正項 e_n は

$$e_n = \frac{1}{\ln 2} \times \frac{3}{2n}$$

で表される。

MEME によって同定されたポリ(dA/dT)トラックのゲノム上での分布は FIMO アルゴリズム(Grant et al., 2011)によってスキャンされた。FIMO は MEME によって計算されたモチーフ中の各位置ごとの塩基存在確率分布表(図 6b、表)をインプットとして、そのモチーフの存在をゲノム DNA に沿ってサーチし、各塩基のゲノム全域における出現頻度と比較することで、その DNA 配列のモチーフ配列に対する log-likelihood ratio と p 値を計算する。同定されたモチーフ配列の p 値は FDR 値に変換され、FDR 閾値 5%でフィルターされた。

最近傍領域の解析

Orc4 のサミットと最も近くに存在するポリ(dA/dT)トラックは、自作スクリプト `close_dist.py` ファイル内の `closest_summit_dist` function によって計算された。これは、各ピークのサミットに対して、上流および下流に存在する領域とその距離を計算し、最近傍領域を返すスクリプトである。サミットと領域が重なっている場合は、距離を 0 とした。

ヌクレオチド分布の計算

Orc4 結合領域周辺におけるヌクレオチドの分布は、自作スクリプト `Nucleotide_C.py` ファイル内の `main` クラスにおける `CalAverageNucleotide` function によって計算された。これはピークサミット周辺における各ヌクレオチドの割合をそれぞれのウィンドウごとに計算するスクリプトである。Orc4 結合領域では、1 kbp 周辺で 100 bp のウィンドウサイズ、50 bp のステップサイズを用いて各ヌクレオチドの割合を計算した。

RPKM (Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads) 値の計算

RNA-seq データを用いて転写量を RPKM 値として算出した。RPKM 値はサンプルごと、遺伝子ごとの転写量を比較できるようにするために、マップされた総リード数と exon 長でリード数を正規化した値である。まず、BEDTools (ver 2.17.0)(Quinlan and Hall, 2010)の `genomecov` function を用いて、マップされたリード数(1 million)でリー

ドを正規化し `bedgraph` フォーマットで出力した。次に、自作スクリプト `RPKM_cal_cy.pyx` ファイルの `RPKM_cal function` を用いて各遺伝子ごとの RPKM 値を計算した。これは、各遺伝子の `exon` 領域に存在するリード数を、`exon` 領域 (1 kbp) の長さで正規化して返すスクリプトである。

Origin-flanking gene の同定

複製起点両隣の遺伝子とそれらの転写方向、および転写量は自作スクリプト `close_dist.py` ファイルの `dist_summit_neighboring_genes function` によって同定された。これはピーク領域 (複製起点) とアノテーションファイル (RPKM 値を含む) を `input` として、ピーク領域の両隣にある遺伝子とそれらの転写方向を返すスクリプトである。ピークが遺伝子と重なる場合は、警告として標準出力として表示し、アウトプットファイルには含まれない。また、オプションでピーク領域から 2 番目に近い遺伝子とその転写方向を返す (`NFG=True`)。

参考文献

- Allen, G.C., and Kornberg, A. (1991). Fine balance in the regulation of DnaB helicase by DnaC protein in replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *266*, 22096–22101.
- Bell, S.P., and Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* *357*, 128–134.
- Berbenetz, N.M., Nislow, C., and Brown, G.W. (2010). Diversity of Eukaryotic DNA replication origins revealed by Genome-wide analysis of chromatin structure. *PLoS Genet.* *6*.
- BLOOM, D. (1954). Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs; probably a syndrome entity. *AMA. Am. J. Dis. Child.* *88*, 754–758.
- Cadoret, J.-C., Meisch, F., Hassan-Zadeh, V., Luyten, I., Guillet, C., Duret, L., Quesneville, H., and Prioleau, M.-N. (2008). Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15837–15842.
- De Castro, E., Soriano, I., Marín, L., Serrano, R., Quintales, L., and Antequera, F. (2011). Nucleosomal organization of replication origins and meiotic recombination hotspots in fission yeast. *EMBO J.* *31*, 124–137.
- Cayrou, C., Coulombe, P., Vigneron, A., Stanojcic, S., Ganier, O., Peiffer, I., Rivals, E., Puy, A., Laurent-Chabalier, S., Desprat, R., et al. (2011). Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res.* *21*, 1438–1449.
- Chen, H., and Boutros, P.C. (2011). VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* *12*, 35.
- Chen, K., Xi, Y., Pan, X., Li, Z., Kaestner, K., Tyler, J., Dent, S., He, X., and Li, W. (2013). DANPOS: Dynamic analysis of nucleosome position and occupancy by sequencing. *Genome Res.* *23*, 341–351.

- Chuang, R.Y., and Kelly, T.J. (1999). The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 2656–2661.
- Chuang, R.Y., Chrétien, L., Dai, J., and Kelly, T.J. (2002). Purification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex. Interaction with origin DNA and Cdc18 protein. *J. Biol. Chem.* *277*, 16920–16927.
- Clyne, R.K., and Kelly, T.J. (1995). Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* *14*, 6348–6357.
- Costas, C., de la Paz Sanchez, M., Stroud, H., Yu, Y., Oliveros, J.C., Feng, S., Benguria, A., López-Vidriero, I., Zhang, X., Solano, R., et al. (2011). Genome-wide mapping of *Arabidopsis thaliana* origins of DNA replication and their associated epigenetic marks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 395–400.
- Dai, J., Chuang, R.-Y., and Kelly, T.J. (2005). DNA replication origins in the *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 337–342.
- Davey, M.J., Fang, L., McInerney, P., Geórgescu, R.E., and O’Donnell, M. (2002). The DnaC helicase loader is a dual ATP/ADP switch protein. *EMBO J.* *21*, 3148–3159.
- Dellino, G.I., Cittaro, D., Piccioni, R., Luzi, L., Banfi, S., Segalla, S., Cesaroni, M., Mendoza-Maldonado, R., Giacca, M., and Pelicci, P.G. (2013). Genome-wide mapping of human DNA-replication origins: Levels of transcription at ORC1 sites regulate origin selection and replication timing. *Genome Res.* *23*, 1–11.
- Dubey, D.D., Zhu, J., Carlson, D.L., Sharma, K., and Huberman, J.A. (1994). Three ARS elements contribute to the *ura4* replication origin region in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* *13*, 3638–3647.
- Dubey, D.D., Kim, S.M., Todorov, I.T., and Huberman, J. a. (1996). Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin. *Curr. Biol.* *6*, 467–473.
- Duderstadt, K.E., and Berger, J.M. (2008). AAA+ ATPases in the initiation of DNA replication. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *43*, 163–187.
- Eaton, M.L., Galani, K., Kang, S., Bell, S.P., and MacAlpine, D.M. (2010). Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev.* *24*, 748–753.

- Eaton, M.L., Prinz, J.A., MacAlpine, H.K., Tretyakov, G., Kharchenko, P. V, and MacAlpine, D.M. (2011). Chromatin signatures of the Drosophila replication program. *Genome Res.* *21*, 164–174.
- Feng, W., Collingwood, D., Boeck, M.E., Fox, L. a, Alvino, G.M., Fangman, W.L., Raghuraman, M.K., and Brewer, B.J. (2006). Genomic mapping of single-stranded DNA in hydroxyurea-challenged yeasts identifies origins of replication. *Nat. Cell Biol.* *8*, 148–155.
- Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., et al. (2014). Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* *42*, D749–D755.
- Gaczynska, M., Osmulski, P. a, Jiang, Y., Lee, J.-K., Bermudez, V., and Hurwitz, J. (2004). Atomic force microscopic analysis of the binding of the Schizosaccharomyces pombe origin recognition complex and the spOrc4 protein with origin DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17952–17957.
- Gai, D., Chang, Y.P., and Chen, X.S. (2010). Origin DNA melting and unwinding in DNA replication. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *20*, 756–762.
- Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D., and Labib, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat. Cell Biol.* *8*, 358–366.
- Gineau, L., Cognet, C., Kara, N., Lach, F.P., Dunne, J., Veturi, U., Picard, C., Trouillet, C., Eidenschenk, C., Aoufouchi, S., et al. (2012). Partial MCM4 deficiency in patients with growth retardation, adrenal insufficiency, and natural killer cell deficiency. *J. Clin. Invest.* *122*, 821–832.
- Givens, R.M., Lai, W.K.M., Rizzo, J.M., Bard, J.E., Mieczkowski, P.A., Leatherwood, J., Huberman, J.A., and Buck, M.J. (2012). Chromatin architectures at fission yeast transcriptional promoters and replication origins. *Nucleic Acids Res.* *40*, 7176–7189.
- Gómez, M., and Antequera, F. (1999). Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome. *EMBO J.* *18*, 5683–5690.
- Grant, C.E., Bailey, T.L., and Noble, W.S. (2011). FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* *27*, 1017–1018.

- Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S., and Masai, H. (2011). Mrc1 marks early-firing origins and coordinates timing and efficiency of initiation in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 2380–2391.
- Hayashi, M., Katou, Y., Itoh, T., Tazumi, A., Yamada, Y., Takahashi, T., Nakagawa, T., Shirahige, K., and Masukata, H. (2007). Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast. *EMBO J.* *26*, 1327–1339.
- Heichinger, C., Penkett, C.J., Bähler, J., and Nurse, P. (2006). Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *EMBO J.* *25*, 5171–5179.
- Heller, R.C., Kang, S., Lam, W.M., Chen, S., Chan, C.S., and Bell, S.P. (2011). Eukaryotic origin-dependent DNA replication in vitro reveals sequential action of DDK and S-CDK kinases. *Cell* *146*, 80–91.
- Hoggard, T., Shor, E., Müller, C. a, Nieduszynski, C. a, and Fox, C. a (2013). A Link between ORC-Origin Binding Mechanisms and Origin Activation Time Revealed in Budding Yeast. *PLoS Genet.* *9*, e1003798.
- Houchens, C.R., Lu, W., Chuang, R.Y., Frattini, M.G., Fuller, A., Simancek, P., and Kelly, T.J. (2008). Multiple mechanisms contribute to *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex-DNA interactions. *J. Biol. Chem.* *283*, 30216–30224.
- Van Houten, J. V, and Newlon, C.S. (1990). Mutational analysis of the consensus sequence of a replication origin from yeast chromosome III. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 3917–3925.
- Hughes, C.R., Guasti, L., Meimaridou, E., Chuang, C.H., Schimenti, J.C., King, P.J., Costigan, C., Clark, A.J.L., and Metherell, L. a (2012). MCM4 mutation causes adrenal failure, short stature, and natural killer cell deficiency in humans. *J. Clin. Invest.* *122*, 814–820.
- Huvet, M., Nicolay, S., Touchon, M., Audit, B., D'Aubenton-Carafa, Y., Arneodo, A., and Thermes, C. (2007). Human gene organization driven by the coordination of replication and transcription. *Genome Res.* *17*, 1278–1285.
- Karnani, N., Taylor, C.M., Malhotra, A., and Dutta, A. (2010). Genomic study of replication initiation in human chromosomes reveals the influence of transcription regulation and chromatin structure on origin selection. *Mol. Biol. Cell* *21*, 393–404.

- Kong, D., and DePamphilis, M.L. (2001). Site-specific DNA binding of the Schizosaccharomyces pombe origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 8095–8103.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* *9*, 357–359.
- Lantermann, A., Strålfors, A., Fagerström-Billai, F., Korber, P., and Ekwall, K. (2009). Genome-wide mapping of nucleosome positions in Schizosaccharomyces pombe. *Methods* *48*, 218–225.
- Lantermann, A.B., Straub, T., Strålfors, A., Yuan, G.-C., Ekwall, K., and Korber, P. (2010). Schizosaccharomyces pombe genome-wide nucleosome mapping reveals positioning mechanisms distinct from those of Saccharomyces cerevisiae. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 251–257.
- Leonard, A.C., and Méchali, M. (2013). DNA replication origins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a010116.
- Lipford, J.R., and Bell, S.P. (2001). Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol. Cell* *7*, 21–30.
- Ludlam, A. V., McNatt, M.W., Carr, K.M., and Kaguni, J.M. (2001). Essential Amino Acids of Escherichia coli DnaC Protein in an N-terminal Domain Interact with DnaB Helicase. *J. Biol. Chem.* *276*, 27345–27353.
- MacAlpine, D.M., Rodríguez, H.K., and Bell, S.P. (2004). Coordination of replication and transcription along a Drosophila chromosome. *Genes Dev.* *18*, 3094–3105.
- MacAlpine, H.K., Gordân, R., Powell, S.K., Hartemink, A.J., and MacAlpine, D.M. (2010). Drosophila ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Res.* *20*, 201–211.
- Machanick, P., and Bailey, T.L. (2011). MEME-ChIP: Motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* *27*, 1696–1697.

- Mackiewicz, P., Zakrzewska-Czerwińska, J., Zawilak, A., Dudek, M.R., and Cebrat, S. (2004). Where does bacterial replication start? Rules for predicting the oriC region. *Nucleic Acids Res.* *32*, 3781–3791.
- Marilley, M., Milani, P., Thimonier, J., Rocca-Serra, J., and Baldacci, G. (2007). Atomic force microscopy of DNA in solution and DNA modelling show that structural properties specify the eukaryotic replication initiation site. *Nucleic Acids Res.* *35*, 6832–6845.
- Martin, M.M., Ryan, M., Kim, R., Zakas, A.L., Fu, H., Lin, C.M., Reinhold, W.C., Davis, S.R., Bilke, S., Liu, H., et al. (2011). Genome-wide depletion of replication initiation events in highly transcribed regions. *Genome Res.* *21*, 1822–1832.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., and Oda, M. (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 89–130.
- Masumoto, H., Muramatsu, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2002). S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Nature* *415*, 651–655.
- Moon, K.Y., Kong, D., Lee, J.K., Raychaudhuri, S., and Hurwitz, J. (1999). Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 12367–12372.
- Mori, S., and Shirahige, K. (2007). Perturbation of the activity of replication origin by meiosis-specific transcription. *J. Biol. Chem.* *282*, 4447–4452.
- Muftuoglu, M., Oshima, J., Kobbe, C., Cheng, W.H., Leistritz, D.F., and Bohr, V.A. (2008). The clinical characteristics of Werner syndrome: Molecular and biochemical diagnosis. *Hum. Genet.* *124*, 369–377.
- Nakato, R., Itoh, T., and Shirahige, K. (2013). DROMPA: Easy-to-handle peak calling and visualization software for the computational analysis and validation of ChIP-seq data. *Genes to Cells* *18*, 589–601.
- Nieduszynski, C. a, Blow, J.J., and Donaldson, A.D. (2005). The requirement of yeast replication origins for pre-replication complex proteins is modulated by transcription. *Nucleic Acids Res.* *33*, 2410–2420.

- O'Donnell, M., Langston, L., and Stillman, B. (2013). Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, 1–14.
- Okuno, Y., Okazaki, T., and Masukata, H. (1997). Identification of a predominant replication origin in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* *25*, 530–536.
- Okuno, Y., Satoh, H., Sekiguchi, M., and Masukata, H. (1999). Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6699–6709.
- Quinlan, A.R., and Hall, I.M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* *26*, 841–842.
- Remus, D., Beall, E.L., and Botchan, M.R. (2004). DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding. *EMBO J.* *23*, 897–907.
- Segurado, M., Gómez, M., and Antequera, F. (2002). Increased recombination intermediates and homologous integration hot spots at DNA replication origins. *Mol. Cell* *10*, 907–916.
- Segurado, M., de Luis, A., and Antequera, F. (2003). Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Rep.* *4*, 1048–1053.
- Shima, N., Alcaraz, A., Liachko, I., Buske, T.R., Andrews, C. a, Munroe, R.J., Hartford, S. a, Tye, B.K., and Schimenti, J.C. (2007). A viable allele of *Mcm4* causes chromosome instability and mammary adenocarcinomas in mice. *Nat. Genet.* *39*, 93–98.
- Stinchcomb, D.T., Struhl, K., and Davis, R.W. (1979). Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* *282*, 39–43.
- Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K., and Yanagida, M. (1999). Fission yeast condensin complex: Essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev.* *13*, 2271–2283.
- Tak, Y.-S., Tanaka, Y., Endo, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2006). A CDK-catalysed regulatory phosphorylation for formation of the DNA replication complex Sld2-Dpb11. *EMBO J.* *25*, 1987–1996.

- Takahashi, T., Ohara, E., Nishitani, H., and Masukata, H. (2003). Multiple ORC-binding sites are required for efficient MCM loading and origin firing in fission yeast. *EMBO J.* *22*, 964–974.
- Tanaka, S., and Araki, H. (2013). Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a010371.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* *445*, 328–332.
- Tanaka, S., Nakato, R., Katou, Y., Shirahige, K., and Araki, H. (2011). Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Curr. Biol.* *21*, 2055–2063.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* *14*, 178–192.
- Vennos, E.M., Collins, M., and James, W.D. (1992). Rothmund-Thomson syndrome: review of the world literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* *27*, 750–762.
- Xu, J., Yanagisawa, Y., Tsankov, A.M., Hart, C., Aoki, K., Kommajosyula, N., Steinmann, K.E., Bochicchio, J., Russ, C., Regev, A., et al. (2012). Genome-wide identification and characterization of replication origins by deep sequencing. *Genome Biol.* *13*, R27.
- Zegerman, P., and Diffley, J.F.X. (2007). Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* *445*, 281–285.

謝辞

本論文を作成するにあたり、終始丁寧かつ熱心なご指導を賜りました、東京大学分子細胞生物学研究所 白髭克彦教授に心より感謝申し上げます。

本論文の文書作成に関して、厳しくも丁寧なご指導を賜りました、東京大学分子細胞生物学研究所 須谷尚史助教授に心より感謝致します。

本研究を進めるに際して、全面的に実験のご指導を頂きました、須谷尚史助教授に感謝致します。また、ChIP-seq 法を始めとした実験のご指導を頂きました、東京大学分子細胞生物学研究所 加藤由起助教授に感謝致します。

本研究のバイオインフォマティクスを用いた統計解析をご指導頂きました、東京大学先端科学技術研究センター 油谷研究室、Claire Renard-Guillet 博士研究員に感謝致します。また、統計解析に関する助言を頂きました、須谷尚史助教授に感謝致します。

本研究を始めるきっかけとなった ChIP-chip データをご提供下さいました、東京都医学総合研究所ゲノム動態プロジェクト 正井久雄プロジェクトリーダー、同研究所加納豊研究員に感謝申し上げます。

本研究の実験のみならず、日常の議論を通じて多くの示唆を頂き、また支えて頂きました、白髭研究室の皆様、心より感謝致します。また、多くの助言と励ましを頂いた、東京大学分子細胞生物学研究所寺井研究室 長澤あゆみ特任研究員に感謝致します。

最後に、大学入学から博士課程修了まで温かくかつ根気強く私を支えてくれた家族に、心からの感謝の意を表して、謝辞と致します。

平成 27 年 5 月 14 日

東京大学 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻

博士 5 年 増田 晃士