

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570006

研究課題名(和文) M期凝縮染色体の構築原理の解明：コンデンシン複合体は染色体上で何をしているか

研究課題名(英文) Understanding the molecular functions of the condensin complex in chromosome condensation

研究代表者

須谷 尚史 (Sutani, Takashi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30401524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：コンデンシン複合体は染色体DNAを凝縮された形状へと変換する役割をもつ、正確な遺伝情報継承に不可欠な機能を果たす因子である。本研究課題ではコンデンシン複合体が染色体上のどこに結合しているかを正確にマッピングすることにより、コンデンシンの凝縮過程における分子機能の解明を目指した。その結果、転写反応により生じる単鎖DNA構造を認識しこれを解消することが、コンデンシンの果たす重要な役割の一つであることが見いだされた。

研究成果の概要(英文)：The condensin plays an important role in shaping genomic DNA into compact, rod-like “condensed” chromosomes, and is required for faithful inheritance of genetic material. In this study, I aimed to reveal the molecular function of condensin in condensation through high resolution mapping of condensin binding locations in condensed chromosomes. I found that condensin targets and rewinds unwound DNA structure created by transcription during mitosis, thereby contributing to chromosome condensation.

研究分野：ゲノム情報・構造学

キーワード：染色体 染色体凝縮 染色体分配 転写 分裂酵母 ChIP-seq法 染色体高次構造

## 1. 研究開始当初の背景

染色体凝縮は、真核生物種で共通してみられる染色体の巨視的構造変換である。細胞分裂に先立って起こり、凝縮が起こらない場合には染色体分配が正常に進まなくなることが知られる。すなわち、染色体凝縮は正確な染色体分配のための不可欠な前段階である。これまでの研究により、染色体凝縮過程において重要な役割を果たす因子としてコンデンシン複合体が同定されている。コンデンシンは ATPase 活性をもつタンパク質複合体であり、DNA の高次構造を制御するいくつかの活性が試験管内で見いだされている。しかし、それらの活性が実際の染色体中でどのように染色体凝縮に寄与するのかは未だ不明のままであった。本研究課題の代表者は ChIP-seq 法という手法を用いて分裂酵母コンデンシン複合体は染色体上で転写活性の高い部位に結合していることを見いだした。これは染色体凝縮と転写の間にこれまで知られていなかった関係があることを示す予想外の知見であった。この結果を起点とした研究を進めることで、染色体凝縮のメカニズムという長年の問題の解明が大きく進むことが期待された。

## 2. 研究の目的

分裂酵母コンデンシンを対象とし、以下の点を明らかにする。

- (1) コンデンシンはどのように転写部位を認識するのか。
- (2) コンデンシンは遺伝子転写にどのような影響を与えるか。
- (3) コンデンシンの転写部位における機能は何か。

また、以上の知見が他の生物種にも当てはまるのかについても合わせて検討する。

## 3. 研究の方法

分裂酵母を実験材料とし、ゲノム学的・分子生物学的・遺伝学的手法を用いて上述の問題の解明に迫る解析を遂行する。染色体上における対象タンパク質の結合位置を解析する手法、ChIP 法を主要な解析技法として用いる。

## 4. 研究成果

- (1) コンデンシンが転写部位に結合することの検証。

ChIP-seq 解析において転写部位は偽陽性の結合シグナルがでやすい箇所であることが指摘されている。見いだしたコンデンシン結合が真の結合であることを確認する実験を

行なった。まず、特異的な DNA 結合活性をもたない核タンパク質を用いて ChIP-seq 解析を行なった。このタンパク質の結合プロファイルはコンデンシンのものと低い相関しか示さず、コンデンシンのプロファイルがクロマチン構造によるアーティファクトである可能性が否定された。また、凝縮活性に欠損をもつコンデンシン変異タンパク質を用いた ChIP 解析から、見いだされた結合がコンデンシンの機能と結びついたものであることを確認した。この研究を遂行する過程で、コンデンシンが転写部位に結合していることを報告する論文が複数の研究室から出されてきた。しかし、上述のような検証実験を行なった解析は皆無であり、本研究によって初めて、コンデンシンの転写活性部位への結合という知見が明確に確立されたと考えている。

- (2) コンデンシンが転写部位を認識する機構の解析。

転写阻害剤処理した細胞の ChIP 解析より、コンデンシンの結合は転写活性に依存していることを見いだされた。より詳細に経時的な解析を行なうことにより、コンデンシンは転写装置を認識しているのではなく、転写により生じる何らかの DNA/クロマチン構造を認識して結合している可能性が示唆された。生化学的解析では、コンデンシンが単鎖 DNA を含むような特殊な構造の DNA に対し特に親和性を示すことを見いだされている。そこでコンデンシンが結合する染色体部位に単鎖 DNA が含まれているかを、単鎖 DNA 特異的ヌクレアーゼ処理と組み合わせた ChIP 解析で検討した。その結果、コンデンシン結合部位には単鎖 DNA 領域が含まれていることを見いだされた。転写反応は DNA 二重鎖の解裂過程を伴うので、転写により生じた単鎖 DNA 構造をコンデンシンは認識していることが強く示唆された。

- (3) コンデンシンの遺伝子転写への効果の検討。

コンデンシン欠失細胞を用いてコンデンシンが遺伝子転写に与える影響を検討した。各種 mRNA 量を RT-PCR 法を用いて定量した結果、コンデンシンが遺伝子転写の制御に関わるという証拠は見いだされなかった。

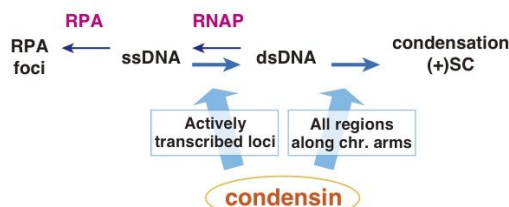
- (4) コンデンシンの転写部位における機能の探求

2 で述べたようにコンデンシンは遺伝子転写部位で単鎖 DNA を認識して結合していることがわかった。代表者は以前の生化学的解析で、コンデンシンが相補的な 2 本の単鎖 DNA の再会合を促進する活性を示すことを見いだしている。この活性が染色体上においても機能しているかを検討することにした。単鎖 DNA 結合因子 (RPA) の ChIP-seq 解析から、コンデンシン結合部位 (すなわち転写活性部

位)には確かにRPAが局在し、単鎖DNAが存在していることが染色体上で確かめられた。このRPAの結合量を指標に単鎖DNAの量を計測したところ、コンデンシン欠失により染色体上の単鎖DNA量が増えることが見いだされた。これは、コンデンシンが単鎖DNAの再会合を染色体上で担っているという仮説とよく合致するものである。

(5) 単鎖DNA除去反応の生理的意味の解明。RPA ChIP解析から転写阻害により染色体上の単鎖DNA領域が減少することが見いだされた。そこで、転写阻害がコンデンシンの機能にどのような影響を与えるかを検討した。制限温度下で培養したコンデンシン変異体を転写阻害剤で処理したところ、コンデンシン変異体の示す染色体分離異常の表現型が軽減されることがわかった。また、コンデンシン変異体の表現型を抑圧するサプレッサー変異を単離同定したところ、転写反応に関わるメディアータ複合体構成因子の欠損がコンデンシン変異を相補しうることが見いだされた。これらの結果は、遺伝子転写は染色体分配にとって阻害的な効果をもたらすものであり、コンデンシンはこの阻害効果を除去すべく染色体凝縮過程の中で機能していることを強く示唆していると解される。

以上の結果より、転写により生じる染色体DNAの乱れ(単鎖DNA領域の生成)は凝縮染色体の形成を阻害するものであり、コンデンシンはこの単鎖DNAを認識して再会合させることにより凝縮反応に寄与していると考えられた。これはコンデンシンの試験管内活性と細胞内の局在位置の両方のデータに立脚したモデルであり、これまでに提唱された染色体凝縮機構とは一線を画するものである。単鎖DNAが染色体凝縮に阻害的であるという知見は、染色体凝縮過程においてDNAの超らせん密度の制御が重要な役割を果たすという従前のモデルによく取り込むことができる。DNA超らせん密度が染色体凝縮の過程でどのように変化・制御されているかは、本研究結果が提起する今後解かれるべき大きな問題である。



注 ; ssDNA、単鎖DNA  
dsDNA、二本鎖DNA  
(+)SC、正の超らせん  
RNAP、RNAポリメラーゼ(転写装置)

(6) ヒトコンデンシン複合体のChIP解析。最後に、以上の知見の普遍性を検討するべくヒトHeLa細胞を用いたコンデンシンのChIP解析を行なった。ヒトのもつコンデンシンアイソフォームの一つ、コンデンシンIについて検討したところ、コンデンシンIも転写活性の高い領域に局在することが見いだされた。結合DNAには単鎖DNAが含まれ(特異的ヌクレアーゼ処理による結果)、また結合箇所はCpGアイランド(CGI)という配列要素と呼応して存在することが見いだされた。CGIはR-ループという単鎖DNAを含む構造をとることが近年報告されており、これらの結果からヒト細胞においてもコンデンシン複合体は転写活性に付随して生じる単鎖DNA領域を標的として結合していることがわかった。

この項の研究は、大学院生の坂田豊典氏との共同研究である(研究協力者)。

本研究ではコンデンシンが単鎖DNAを含む特殊な形状のDNA領域を認識し、この構造の解消に関わるという発見を成し遂げることができた。近年の複数の研究室での研究より、コンデンシンは細胞分裂期における役割を超えて、転写調節やDNA損傷修復、細胞分化の制御などさまざまな局面においても役割を果たすことがわかってきている。本研究で見いだされたDNA構造の制御作用は、これらの新たなコンデンシン機能を分子レベルで理解する上でも重要な基盤となることが期待される。

以上の結果は、下記の国際学会を含むさまざまな会で既に報告済みである。この内容をまとめた論文は現在海外の科学専門誌に投稿中であり、実際上述の結果の一部は論文審査過程でレフリーから要求された解析により得られた知見である。

本研究を遂行する過程で、代表者は酵母ゲノム中に生じた点変異を大量並列型シーケンサーを用いて迅速かつ正確に同定する技法を確立した。この結果を適応して、共同研究により、分裂酵母細胞の多剤薬剤耐性に関する成果を上げることに成功している。下記の発表論文はその成果に基づくものである。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)  
Aoi Y, Sato M, Sutani T, Shirahige K, Kapoor TM, Kawashima SA.  
Dissecting the first and the second meiotic divisions using a marker-less drug-hypersensitive fission yeast.

Cell Cycle (2014) vol. 13, pp. 1327-1334  
査読あり

〔学会発表〕(計 9件)

須谷尚史

染色体凝縮因子による染色体リセット  
国立遺伝学研究所研究会「表現型と遺伝子型  
のミッシングリンクをつなぐ」

2014年6月27-28日

国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)

Takashi Sutani, Katsuhiko Shirahige

Condensin complex negates an inhibitory  
effect of gene transcription on mitotic  
chromosome segregation.

7<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting

2013年6月24-29日

London (UK)

須谷尚史、中戸隆一郎、鈴木穰、白髭克彦  
コンデンシンは遺伝子転写がもつM期染色体  
分配に対する阻害的效果を中和する

第35回日本分子生物学会年会

2012年12月11-14日

福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

他、6件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須谷 尚史 (SUTANI, Takashi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号: 30401524

### (4) 研究協力者

坂田 豊典 (SAKATA, Toyonori)