

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291079

研究課題名(和文) 染色体相互認識に寄与する染色体集積RNAの作用機構解析

研究課題名(英文) The role of chromosome-retaining RNA transcripts in homologous chromosome recognition

研究代表者

丁 大橋 (DING, DAQIAO)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・主任研究員

研究者番号：50359080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：減数分裂における相同染色体の対合は相同組み換えと還元型染色体分配にとって非常に重要である。減数分裂時における相同組換えには、まず相同染色体が互いに見つけて対合することが必要である。しかし、相同染色体同士が如何にしてお互いを認識するのは全く解明されていない。本研究では、分裂酵母における相同染色体の対合にロバストな対合サイト、sme2対合サイトに寄与するタンパク質因子を複数同定した。さらにそれらの対合に寄与するタンパク質因子の染色体結合サイトを同定した上、ゲノムワイドのIac0アレール挿入ライブラリを作成することによって新規のncRNAによって制御される対合サイトを同定した。

研究成果の概要(英文)：Pairing of homologous chromosome is an essential step in meiosis that ensures effective homologous recombination and reductional segregation in meiotic division. In fission yeast, the formation of telomere bouquet and accompany telomere-led chromosome oscillation align the homologous chromosomes to the same direction and effectively promote their contact and pairing. However, the mechanisms for homologous chromosome specific recognition remain undefined. To understand the molecular mechanisms of meiRNA promoted pairing, we screened for sme2 locus-localization protein (smp). As a result, we found ten kinds of Smp and half of them are required for the robust pairing of the sme2 locus. These proteins are RNA binding proteins and/or involved in transcription termination. We propose that retaining of RNA transcripts on the chromosome play an important role in homologous chromosome recognition and pairing.

研究分野：生物学

キーワード：染色体 減数分裂 対合 非コードRNA

1. 研究開始当初の背景

減数分裂期前期の主なイベントとして、DNAの複製、相同染色体の対合、シナプシスと組換えが行われる。そのうち、相同染色体の対合は親世代から受け継いだ相同染色体が互いを見つけて接着する過程であり、正常な対合が相同組換えおよび相同染色体の還元型分配に不可欠である。相同染色体の対合に関する研究は減数分裂の初期段階の観点から非常に重要で、特に相同染色体の相互認識機構がもっともミステリに満ちた問題で、多くの研究者を減数分裂の研究分野に引き込むきっかけでもある。しかし、相同染色体同士が如何にして相手を見つけて対合していくのかはほとんど解明されていない。以前われわれは分裂酵母の *sme2* ローカスが対合のホットスポットで、*sme2* 遺伝子から転写される ncRNA である *meiRNA* が染色体上に滞留し、RNA ドットを形成することによって組み換え非依存的に相同染色体の認識・対合を促進することを発見した (Ding et al. Science 2012)。しかし、染色体滞留 RNA の相同染色体対合への促進作用が *sme2* ローカスに限った現象なのか、もっと一般性を持つ普遍的な現象で、ゲノム全体にわたって作用するのか不明である。

2. 研究の目的

本研究は分裂酵母における非コード RNA による対合の分子機構を解明するとともに、相同組換え非依存的相同染色体の相互認識・対合機構の解析を目的としている。

3. 研究の方法

既知の *sme2* 共局在因子を調べ、破壊することによって、*sme2* 対合ホットスポットに寄与する因子を同定する。また、新規の対合ホットスポットを同定するために、既知の *sme2* 対合ホットスポットの特性から共通の性質を持つ染色体ローカスを網羅的に LacO/LacI-GFP システムにより可視化し、野生株および DSB 形成欠損株で対

合の頻度を測定する。3つの Smp タンパク質の栄養増殖期および減数分裂期の染色体結合サイトを ChIP-seq 法により同定する。単分子 RNA FISH により新規に特定した対合サイトの染色体滞留 RNA ドットを可視化する。

4. 研究成果

(1) *sme2* 遺伝子座のロバストな対合の分子メカニズムを解析するために、分裂酵母 GFP ライブラリ及び YFP ライブラリのデータベースから、核内蛍光ドットを示すものを検索し、*sme2* ローカスと共局在を示すタンパク質 (*smp* タンパク質) を 10 個同定した。同定したタンパク質が全部 RNA 結合タンパク質で、お互いに共局在を示すが、相互依存関係がない。さらに、*sme2* ローカス以外にも顕著な染色体結合サイトが複数ある。遺伝子破壊および条件的シャットオフを行い、*sme2* サイトの対合活性に影響を与える Smp タンパク質を 5 つ同定した。それらのタンパク質の内、4 つが exosome に依存した減数分裂寄与 mRNA の分解に必要なタンパク質で、残りの一個が RNAi 非依存的セントロメアのヘテロクロマチンの形成に必要な因子である。

(2) 新規な対合サイトを発見するために、ゲノムワイドに 100kb 以内の距離間隔で lacO リピートを染色体に挿入し、高頻度に対合する染色体サイトを捜査するアプローチをとった。すでに分裂酵母のゲノム上約 30 箇所に lacO リピート挿入したので、新規に約 100 か所均一分布した場所に lacO リピートを挿入した。その結果、分裂酵母の全ゲノムをカバーするような LacO/lacI-GFP ライブラリを作成した。このライブラリは対合の研究のみならず核染色体ダイナミクス研究にも有用なツールとして利用できる。

(3) Smp タンパク質の染色体結合サイトを同定するために、3つの Smp タンパク質の栄養増殖期および減数分裂期の染色体結合サイトを ChIP-seq 法により同定した。働く経路が大きく違うにもかかわらず、ChIP-Seq の解析結果、共

通する染色体結合サイトは sme2 ローカス以外にも、数百箇所があった。同定した染色体結合サイトをヒントにゲノムワイド LacO/lacI-GFP ライブラリと組み合わせ、Smp タンパク質の sme2 ローカス以外のドット状染色体結合サイトを1番と3番染色体上にそれぞれ一個を同定した。これらの場所で Smp ドットの形成に寄与する原因遺伝子を同定した結果、それぞれが減数分裂期に発現誘導される非コード RNA であることが判明した。

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 4 件)

Ding DQ, Haraguchi T, Hiraoka Y (2016) A cohesin-based structural platform supporting homologous chromosome pairing in meiosis. *Curr Genet*, Feb. 8, doi:10.1007/s00294-016-0570-x (査読有り)

Ding DQ, Matsuda A, Okamasa K, Nagahama Y, Haraguchi T, Hiraoka Y (2016) Meiotic cohesin-based chromosome structure is essential for homologous chromosome pairing in *Schizosaccharomyces pombe* *Chromosoma*, 125 (2): 205-214 (査読有り)

Matsuda A, Chikashige Y, Ding DQ, Ohtsuki C, Mori C, Asakawa H, Kimura H, Haraguchi T, Hiraoka Y (2015). Highly condensed chromatins are formed adjacent to subtelomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast. *Nat Commun*, Jul 24; 6:7753 (査読有り)

Ding DQ, Haraguchi T, Hiraoka Y (2013) The role of chromosomal retention of

noncoding RNA in meiosis. *Chromosome Res.* (6-7):665-72. (査読有り)

(学会発表) (計 14 件)

丁大橋「減数分裂期前期相同染色体対合に寄与する ncRNA 及び制御因子の解析」第39回日本分子生物学会年会 神奈川県横浜市みなとみらい2016.11.30 (ポスター、国内)

丁大橋「減数分裂期前期相同染色体対合に寄与する因子の特定と解析」酵母遺伝学フォーラム第49回研究報告会 シーサイドホテル舞子ピラ、神戸市垂水区 2016.09.11 (一般口頭、国内)

Ding “3D-SIM Analysis of Linear Element Structure in Fission Yeast” EMBO Meiosis Conference 2015 St Catherine’s College, Oxford, UK 2015.09.01 (ポスター、国際)

丁大橋「相同染色体認識における非コード DNA の役割」新学術領域研究「非コード DNA」の第9回領域会議 兵庫県淡路市夢舞台 2015.08.05 (一般口頭、国内)

Ding “3D-SIM Analysis of Meiotic Chromosome Structure in Live Cells of *S. pombe*” 第8回分裂酵母国際会議 兵庫県神戸市中央区生田神社社会館 2015.06.22 (ポスター、国際)

平岡泰、丁大橋「A role for chromosomal RNA bodies in fission yeast meiosis」第37回日本分子生物学会年会 神奈川県横浜市みなとみらい 2014.11.27 (招待、国内)

丁大橋「分裂酵母減数分裂期前期染色体構造の解析」第37回日本分子生物学会年会 神奈川県横浜市みなとみらい 2014.11.26 (ポスター、国内)

丁大橋「相同染色体対合における非コード DNA の役割」新学術領域研究「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」2014年第7回領域会議 神奈川県湯河原湯河

原温泉ホテルあかね 2014.7.14 (一般口頭、国内)

Ding “Fine structures of meiosis-specific chromosome and homologous chromosome pairing in *S. pombe*” Gordon Research Conferences Meiosis, Colby-Saweyer College, New London, NH, USA 2014.6.2 (ポスター、国際)

丁大橋「分裂酵母減数分裂期前期染色体構造の3D-SIM 解析」「ゲノムを支える非コードDNA領域の機能」公開シンポジウムインターメアによる染色体制御機構東京大学山上会館、東京都文京区、2014.1.9 (一般口頭、国内)

Ding “Live and 3D structured illumination microscopy revealed dynamic and highly organized meiotic specific chromosome architectures in fission yeast” The 4th Xiamen Winter Symposium Xiamen, University Xiamen, China, 2013.12.9 (招待、国際)

丁大橋「分裂酵母減数分裂期前期染色体構造の3D-SIM 解析」第31回染色体ワークショップ・第12回核ダイナミクス研究会、ホテルおかだ、神奈川県足柄下郡 2013.12.26 (一般口頭、国内)

丁大橋「相同染色体認識における非コードDNAの役割」ゲノムを支える非コードDNA領域の機能第5回領域会議 神奈川県横須賀市湘南国際村 2013.8.17 (一般口頭、国内)

Ding “Fine structures of meiosis-specific chromosome and homologous chromosome pairing in *S. pombe*” 7th International Fission Yeast meeting University London, UK. 2013.6.24 (ポスター、国際)

[図書](計2件)

Ding DQ, Hiraoka Y (2016) Visualization of a Specific Genome Locus by the

lacO/LacI-GFP System. In Fission Yeast: A Laboratory Manual 236-241 (Edited by Iain Hagan, Antony Carr, Agnes Grallert and Paul Nurse, Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Asakawa H, Ding DQ, Haraguchi T, Hiraoka Y (2016) Microscopic Observation of Living Cells Stained with Fluorescent Probes. In Fission Yeast: A Laboratory Manual 230-235 (Edited by Iain Hagan, Antony Carr, Agnes Grallert and Paul Nurse, Cold Spring Harbor Laboratory Press)

{その他}

ホームページ等

http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丁大橋(DING DAQIAO)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・主任研究員

研究者番号: 50359080