

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840013

研究課題名(和文) 分裂期の遺伝子発現制御と染色体分配におけるコンデンシンの役割

研究課題名(英文) Role of condensin on mitotic gene expression and chromosome segregation

## 研究代表者

中沢 宜彦 (NAKAZAWA, Norihiko)

沖縄科学技術大学院大学・その他の研究科・研究員

研究者番号：70514751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：分裂期における染色体分配は細胞の分裂・増殖に必須の生命現象であり、凝縮した染色体が構築されるとともに遺伝子発現などの活動が抑えられると考えられてきた。しかし、実際には分裂期における活発なRNA合成が、染色体の凝縮や分配の中心的役割を担うコンデンシン複合体を染色体上へと蓄積させることが本研究で明らかとなった。本研究の成果により、コンデンシンが熱ストレスへの対処など染色体上の活動を維持しながら遺伝情報を正確に子孫へ継承しているという新たな仕組みの一端がみえてきた。

研究成果の概要(英文)：Mitotic chromosome segregation is an essential life event for cell division and growth. During mitosis, it is generally understood that global silencing of gene expression occurs on condensed chromosomes. In yeast, however, a substantial number of genes are expressed even in mitosis. In this work, we demonstrated that abundant RNA production accumulates condensin complex, which is the central player for chromosome condensation and segregation, at mitotic chromosomes. Our findings shed light on the new mechanism that condensin precisely transmits the genetic information to progeny while dealing with an environmental stress, such as heat shock responses.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：分子生物学 タンパク質 染色体凝縮 染色体分配 細胞周期 遺伝子発現 コンデンシン 分裂酵母 熱ショック

### 1. 研究開始当初の背景

(1)染色体分配は細胞が遺伝情報を正確に娘細胞に引き継ぐための重要な生命現象であり、分裂期では染色体が10分の1以下の体積に凝縮したコンパクトな状態となる。分裂期では間期に起こるDNA複製や遺伝子発現(転写)は抑制されるため、染色体凝縮・分配と遺伝子発現とは相容れないものであるという考えが一般的である。しかし、酵母をはじめとする一部のモデル生物では分裂期でも遺伝子の転写が活発に起こっていることが報告されていた。

(2)大腸菌からヒトまで進化的に高度に保存されたタンパク質複合体「コンデンシン」は、染色体凝縮・分配に中心的な役割を果たすことが知られている(図1)。コンデンシンの機能欠損は、直ちに染色体の分配異常をもたらし、細胞の生存を脅かす。また、時期尚早な凝縮も小頭症などの先天性疾患と密接に関わる。代表者は、ゲノムワイドなクロマチン免疫沈降実験の結果、分裂酵母のコンデンシンが分裂期で転写が活発に起こっている遺伝子領域に結合していることを見出していた。これは、コンデンシンが転写されている遺伝子領域で働くことが、遺伝子発現制御と染色体凝縮・分配を両立させているのではないかという仮説を導く結果であった。

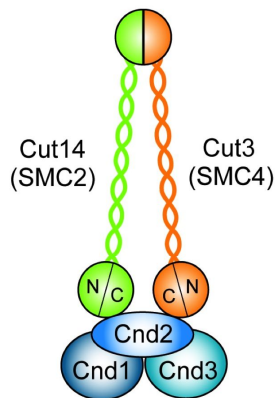


図1. 染色体分配に必要なコンデンシン複合体  
2つのSMC、3つのnon-SMCタンパク質から成り立つ。分裂酵母におけるタンパク質名で表記。

### 2. 研究の目的

本研究は、染色体ダイナミクスの中心的役割を担うコンデンシン複合体が、分裂期で転写が活発な染色体領域に結合しているという結果を出発点とした。そして、「コンデンシンが遺伝子発現制御をはじめとする分裂期染色体上での活動を維持しながら染色体を分配しているのではないか」という新たな仕組みの検証を目的として行った。

### 3. 研究の方法

(1)ゲノムワイドなクロマチン免疫沈降法(ChIP-seq法)によるコンデンシン結合部位の解析

分裂酵母コンデンシンが転写領域に結合することの再現性を確認するため、ゲノムワイドなクロマチン免疫沈降法(ChIP-seq法)により、コンデンシンの結合部位を染色体上にマッピングした。分裂期および非同調培養(70-80%の細胞が間期)の細胞より、クロスリンクされたクロマチンDNA画分を抽出し、抗体による免疫沈降法を用いてFLAGタグ融合コンデンシンサブユニットSMC2/Cut14に結合するDNAを回収した。このDNA配列をイルミナ社製次世代シーケンサー(Genome Analyzer GAIIx)により解析し、分裂酵母の3本の全染色体DNA上にマッピングした。分裂期の細胞はチューブリン低温感受性変異*nda3-KM311*により同調した。なお、コントロールとして全クロマチン画分のDNAも同様に解析した。また、他の染色体結合タンパク質としてコヒーシン複合体タンパク質Rad21、DNAトポイソメラーゼII(Top2)も同時に解析した。熱ショック後のコンデンシン結合については、20から36に温度シフト後9分後の細胞をChIP-seqに用いた。

(2)ChIP-qPCR法によるコンデンシン結合の解析

ChIP-seq法で得られた各コンデンシン結合領域について詳細に調べるため、定量的リアルタイムPCR(qPCR)を用いてDNA量を測定した(ChIP-qPCR法)。分裂期に転写量が上昇する遺伝子群、熱ショックにより転写が活性化される熱ショックタンパク質(Hsp)遺伝子群の各々に対してPCRプライマーセットを設計した。前者は分裂期に働く転写因子*sep1<sup>+</sup>*遺伝子の有無、後者は36-9分間の熱ショック前後の条件でChIP-qPCRを行い、コンデンシンの結合量を比較した。また、窒素源枯渇培地から通常の培地に細胞を移すことにより、DNA複製の前後の細胞を回収し、熱ショック遺伝子領域のコンデンシンの結合を定量した。

(3)逆転写PCRによる熱ショック遺伝子のmRNA定量

野生株およびコンデンシン変異株における熱ショック遺伝子の転写量を調べるため、各細胞から全RNAを回収し、オリゴdTプライマーを用いてmRNAの逆転写反応を行った。生成されたcDNAを鋳型とし、熱ショック遺伝子上に設計したプライマーでPCRを行い、転写量を測定した。

### 4. 研究成果

(1)コンデンシンはRNAポリメラーゼII(pol II)によって転写される遺伝子上に蓄積する

分裂酵母の染色体 DNA 上にコンデンシンの結合部位をマッピングするため、分裂期および非同調培養（間期細胞）の各条件で SMC2/Cut14 サブユニットの ChIP-seq 解析を行った。その結果、Cut14 は既知のセントロメア DNA や tRNA 遺伝子領域に加えて、RNA ポリメラーゼ II (polII) によって転写される遺伝子上に結合していることが分かった（図 2）。とくに、*ecm33<sup>+</sup>* や *gas1<sup>+</sup>* などの分裂期に転写が活性化される遺伝子上への結合が顕著に検出された。一方、他の染色体結合タンパク質であるコヒーシンやトポイソメラーゼ II の結合はこの領域では少なかった。このことから、コンデンシンは、polII によって分裂期に転写が活性化される遺伝子上に蓄積することが明らかとなった。

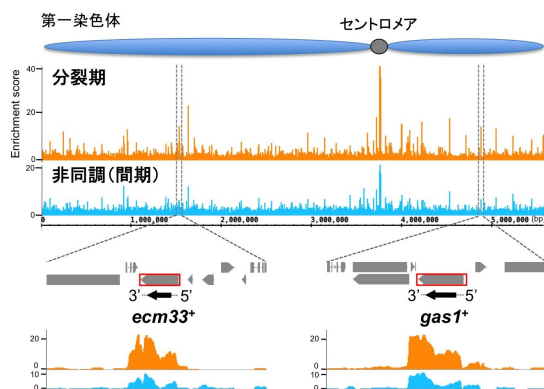


図 2. コンデンシンCut14タンパク質のChIP-seq解析  
分裂期と非同調（間期）の細胞において、コンデンシンCut14の結合する染色体領域を決定した。*ecm33<sup>+</sup>*および*gas1<sup>+</sup>*は分裂期で転写が活発な遺伝子。

(2) コンデンシンの蓄積には分裂期の転写が必要である

コンデンシンの分裂期活性化遺伝子への蓄積が、その遺伝子の転写に依存するかどうかを確認するため、分裂期の転写を司る Sep1 タンパク質の欠失下でコンデンシン結合を調べた。その結果、コンデンシンの結合が Sep1 欠失下で顕著に低下していることが判明した。一方で、セントロメア DNA への結合は変化しなかった。したがって、コンデンシンの結合には polII によるその遺伝子領域の転写が必要であることが示された。セントロメア DNA へのコンデンシン結合は Sep1 に依存しない別機構があると考えられる。

(3) コンデンシンは熱ショックによって誘導される遺伝子群に結合する

コンデンシンの転写領域への結合が、人為的に転写誘導したときにも起こりうるのかを検証するため、非同調細胞を 20 から 36 へ 9 分間移し、そのときの Cut14 結合量を調べた。ChIP-seq 解析の結果、高温下で転写が活性化される熱ショックタンパク質遺伝子 (Hsp) 領域への Cut14 結合が顕著に増量し

た。この結果は、コンデンシンが転写誘導された遺伝子上へも結合できること、また間期細胞でもこの結合は起こることを示唆した。

(4) コンデンシンは DNA 複製後の染色体を好んで結合する

細胞を窒素源枯渇培地から通常の培地に移すことにより、細胞周期を DNA 複製前後で同調し、Cut14 の Hsp 遺伝子領域 (*ssa1<sup>+</sup>*, *hsp90<sup>+</sup>*) における結合を比較した。ChIP-qPCR 法による定量的結果、Cut14 は DNA 複製前よりも複製後の Hsp 遺伝子上に多く結合することが明らかとなった。コンデンシンは染色体の複製状態を識別して結合している可能性が示された。

(5) 変異型コンデンシンは転写活性化遺伝子上に蓄積できないが、転写量自体は変化しない

コンデンシンの転写領域への蓄積にその機能が必要であるかどうかを知るため、高温感受性変異型コンデンシン Cut14-208<sup>ts</sup> の Hsp 遺伝子上への蓄積を野生型 Cut14-WT と比較した。チューブリン低温感受性変異 *nda3* により細胞を分裂期前中期に停止させて同調後、高温に移して分裂期の進行を再開させた。この高温シフトにより、Hsp 遺伝子の転写が活性化されると同時に、変異型 Cut14-208<sup>ts</sup> の機能を欠損させることができる。なお、Cut14-208<sup>ts</sup> タンパク質は高温下でコンデンシンの分子活性を失うことが分かっている。ChIP-qPCR で野生型および変異型 Cut14 の結合をモニターしたところ、野生型は 36 9 分後に Hsp 遺伝子 (*ssa1<sup>+</sup>*, *hsp90<sup>+</sup>*) の 3' 非翻訳領域に顕著に蓄積したものの、変異型はその 1/3 程度の結合に留まった（図 3）。また、このとき野生型 Cut14 を発現する細胞では正確な染色体分配が起こったが、変異型 Cut14 を発現する *cut14-208 ts* 変異体では引き伸ばされた異常な染色体が頻

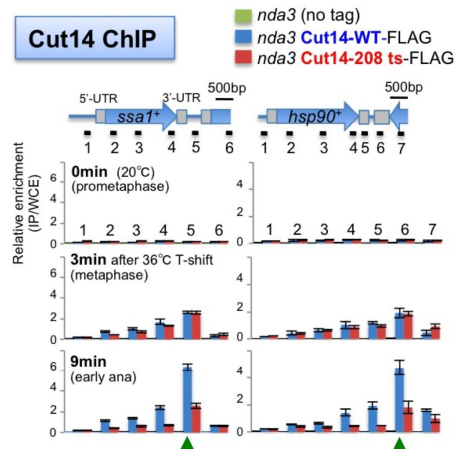


図 3. 熱ショック遺伝子上へのコンデンシンCut14の蓄積  
36°C 9 分後、野生型Cut14-WTは速やかに熱ショック遺伝子 *ssa1<sup>+</sup>* および *hsp90<sup>+</sup>* の 3' 領域（緑の矢印）に蓄積したが、変異型Cut14-208 tsは蓄積できなかった。

度で観察された(図4)。一方、2つの Hsp 遺伝子の mRNA 転写量そのものは変異体細胞内でも変化していなかった。以上の結果、コンデンシンは蓄積する Hsp 遺伝子の転写活性化自体には影響しないが、コンデンシンの機能がその蓄積に必要であり、正常な染色体分配を保障していることが示唆された。また、分裂期の最中に転写が活性化された場合でも、コンデンシンはその染色体領域に速やかに結合できることが明確となった。

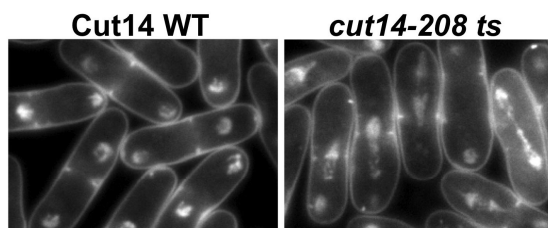


図4. コンデンシン*cut14-208 ts*変異体の染色体分配異常  
野生型Cut14-WTを発現する細胞では、染色体が正確に分配されるが、変異型Cut14-208発現細胞は引き伸ばされた異常な染色体を高頻度で生じる。棒線は10マイクロメートル。

#### (6) 得られた結果の意義と今後の課題

本研究の結果、polII により合成される多量の転写物が、分裂酵母の染色体上にコンデンシンの蓄積部位を形成することが明確に示された。また、転写誘導の可能な遺伝子群の解析を通じ、コンデンシンの蓄積はそれらの遺伝子の転写活性化には必要ないこと、その蓄積はDNA複製後の染色体で起こることも確認された。コンデンシンは正確な染色体分配に必須であることから、我々はpolIIによる多量の転写物が生じた染色体領域をコンデンシンがスムーズに娘細胞に分配しているのではないかと考察した。転写をはじめとする遺伝子発現は、分裂期の染色体上では凝縮・分配の妨げになることが推測される。熱ショックなどの様々な環境ストレス下で遺伝子発現が必要になったとき、たとえそれが分裂期であっても、正確に遺伝情報を子孫に継承するためにコンデンシンが働いているのかもしれない。

本研究では、どのようにコンデンシンがpolIIによる転写領域を認識しているのか、また実際のその場所での分子機能は何か、という問いに答えることはできなかった。このような課題に取り組むためには、酵母細胞を用いた解析のみならず、試験管内反応などの実験と併せて多方面から研究を進めることが必要であると考えている。

#### 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3件)

Nakazawa N, Sajiki K, Xu X, Villar-Briones A, Arakawa O, Yanagida M.,

RNA pol II transcript abundance controls condensin accumulation at mitotically up-regulated and heat-shock-inducible genes in fission yeast.

Genes to Cells, 査読有, 20(6)巻, 2015, 481-499, DOI: 10.1111/gtc.12239.

Xu X, Nakazawa N, Yanagida M. Condensin HEAT subunits required for DNA repair, kinetochore/centromere function and ploidy maintenance in fission yeast. PLoS One, 査読有, 10(3)巻, 2015, e0119347, DOI:10.1371/journal.pone.0119347.

Akai Y, Kanai R, Nakazawa N, Ebe M, Toyoshima C, Yanagida M. ATPase-dependent auto-phosphorylation of the open condensin hinge diminishes DNA binding. Open Biology, 査読有, 2014, 4(12), pii:140193, DOI:10.1098/rsob.140193.

[学会発表](計6件)

中沢宜彦, RNA pol II transcript abundance accumulates condensin at post-replicative chromosomal DNA, Pombe 2015: 8<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting, 2015年6月21日, 生田神社ホール(兵庫県神戸市)

中沢宜彦, RNA pol II transcript abundance accumulates condensin at post-replicative chromosomal DNA in fission yeast, EMBO workshop: SMC proteins, 2015年5月12日, ウィーン(オーストリア)

中沢宜彦, 分裂酵母コンデンシンは転写による染色体分配妨害効果を解消する, 第47回酵母遺伝学フォーラム, 2014年9月1日, 東京大学農学部(東京都)

中沢宜彦, 'Transcriptsbuster' in mitosis?: Condensin resolves the obstructive effect of mitotic transcripts on chromosome segregation, Cold spring harbor laboratory meeting 'Cell Biology of Yeast', 2013年11月5日, ニューヨーク(アメリカ)

中沢宜彦, 分裂酵母コンデンシンは転写による染色体分配妨害効果を解消することで転写活性化領域近傍の姉妹染色体分離を促進する, 第46回酵母遺伝学フォーラム, 2013年9月8日, 東北学院大学(宮城県仙台市)

中沢宜彦, Condensin *de novo* Accumulation at the Transcriptional

Active Genes from Metaphase to Anaphase,  
EMBO Conference on Fission Yeast: Pombe  
2013, 2013年6月24日, ロンドン(イギリス)

〔その他〕

沖縄科学技術大学院大学、G0細胞ユニット  
ホームページ(染色体関連分野)  
<https://groups.oist.jp/ja/g0/understanding-chromosomal-regulatory-mechanisms-proliferating-and-quiescent-cells-jp>

沖縄科学技術大学院大学、研究ニュース  
ページ  
<http://www.oist.jp/ja/news-center/news/2015/5/26/19844>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中沢 宜彦 (NAKAZAWA Norihiko)  
沖縄科学技術大学院大学・G0細胞ユニット・研究員  
研究者番号: 70514751

### (2) 研究協力者

新川 織江 (ARAKAWA Oriie)