

平成22年5月31日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570172

研究課題名(和文) 転写が引き起こすゲノム不安定性の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of genomic instability induced by transcription

研究代表者

定塚 勝樹 (JOHZUKA KATSUKI)

基礎生物学研究所・ゲノム動態研究部門・助教

研究者番号 40291893

研究成果の概要：

細胞が分裂するとき、遺伝情報をコードした DNA 鎖は分裂期染色体へのその形状を大きく変化させコンパクトに折りたたまれます。染色体凝縮と呼ばれるこの現象で DNA に作用して重要な役割を果たすのがコンデンシンと呼ばれる複合体ですが、染色体のどこに、どのようにして結合し、どのような作用をするのか依然として不明です。本研究では酵母を用いて、コンデンシンが結合する DNA 部位とその結合に必要な因子を明らかとしました。この成果は染色体高次構造を分子レベルで理解するために大きく貢献します。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体、遺伝学、分子生物学、コンデンシン、合成致死、リボソーム遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂期に染色体がコンパクトに折りたたまれる現象(染色体凝縮と呼ぶ)は100年以上前から既に知られているが、その機構と構造については未だに理解されていません。近年コンデンシンと呼ばれるタンパク質複合体が、分裂期に凝縮した染色体の骨格構造となっている事が顕微鏡観察によって判ってきましたが、DNAにどのように作用して凝縮しているのか依然として不明のままです。そのような状況の中、これまでに酵母

(*S.cerevisiae*) を使ってゲノムの安定維持機構について調べている過程で、偶然にもコンデンシンが局在する特定の部位を見いだしました。酵母ゲノムの中で代表的な繰り返り領域であるリボソームRNA遺伝子(rDNA)領域にある複製停止部位(RFB)には、Fob1蛋白質が特異的に結合して、複製フォークの進行を阻害します。このFOB1遺伝子欠損と合成致死性を示す変異体としてコンデンシン複合体を構成する遺伝子の変異体が多数獲得してきたことから、両者の間の遺伝的相互作用が浮かび上がってきました。さらにコンデ

ンシンは Fob1 があると RFB に局在することが判りました。染色体凝縮に働くコンデンシンが局在する染色体上の場所として DNA レベルで初めて特定されたこととなります。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の 2 点について明らかにすることを目的としました。

(1) 染色体凝縮に関わるコンデンシン複合体と、rDNA 領域での複製停止に関わる *FOB1* との関連(合成致死性)を調べることで、Fob1 によるコンデンシンの RFB site への局在が果たす役割を調べる。

(2) コンデンシン複合体が Fob1 によりどのようにして RFB site に結合するのか。染色体凝縮の初期過程と言えるコンデンシンとクロマチン DNA との結合の分子メカニズムを理解する。

## 3. 研究の方法

(1) *FOB1*<sup>+</sup>及び $\Delta fob1$ 細胞での rDNA 領域におけるコンデンシンの結合分布から、rRNA の転写とコンデンシンのクロマチンへの結合に何らかの関連が推測できました。そこで、rRNA を転写する RNA ポリメラーゼ I の転写の有無が *FOB1* とコンデンシンとの合成致死性に与える影響を中心に調べる。

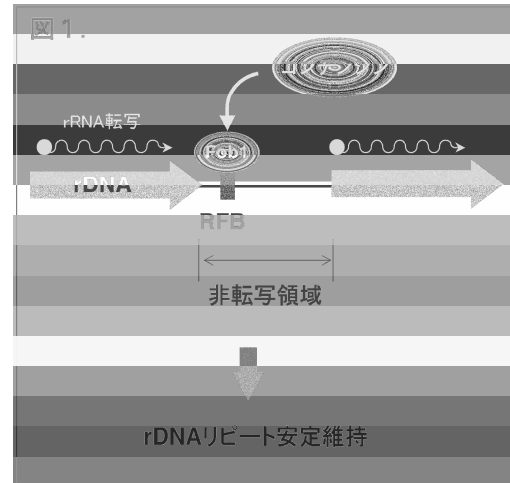
(2)-① RFB site それ自身だけでコンデンシンを結合させるために必要なシス配列として機能するのか、それとも rDNA 領域が局在する核小体構造が必要なのか不明です。RFB site だけを rDNA 繰り返し領域以外の染色体上の任意の部位に挿入して、そこへのコンデンシンの結合を検証することで判断する。

(2)-② 変異型コンデンシンの場合、RFB に正確に結合できなければ致死性を示す (*smc2-157* と  $\Delta fob1$  との合成致死性)。この性質を利用し、変異型コンデンシンと合成致死性を示す遺伝子を探索することで、コンデンシンが RFB site に結合するために必要な、*FOB1* 以外の因子を同定することで、その結合の分子機構を解析する。

## 4. 研究成果

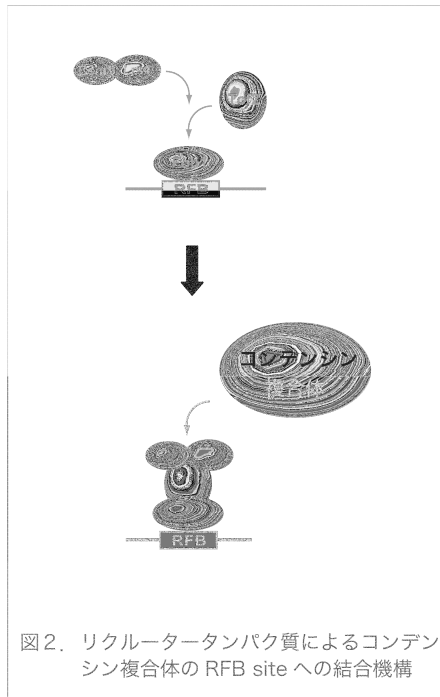
(1) コンデンシンと *FOB1* との合成致死性が RNA ポリメラーゼ I を構成する因子 (*RPA135*) の欠失により抑制される事が明らかとなりました。また  $\Delta fob1$  細胞では、わずかな量のコンデンシンがランダムにクロマチンに結合するが、RNA ポリメラーゼ I の転写によりその結合が阻害されることが解りました。これらの結果から、Fob1 タンパク質によりコンデンシンを rRNA 転写領域の

外側にある RFB site に積極的に局在させることは、RNA ポリメラーゼ I による強い転写の影響に左右されずにコンデンシンを rDNA 領域にリクルートすることを保証するシステムであると考えられます (図 1)。



(2)-① RFB site を含む短い DNA 配列を rDNA 繰り返し領域以外の染色体上の任意の部位 (Ectopic site) に挿入しても、そこに Fob1 タンパク質に依存的にコンデンシンが結合することが明らかとなりました。この結合は、ゲノム中に rDNA 繰り返し領域を持たない細胞でも観られます。この結果から、RFB 配列それ自体がコンデンシン複合体のクロマチン結合のシス配列として機能することが明らかとなりました。

(2)-② 変位型コンデンシン (*smc2-157*) と合成致死性を示す変異遺伝子として *CSM1*, *LRS4*, および *TOF2* の 3 遺伝子を同定しました。さらにそれらの欠損株での解析から、コンデンシン複合体が RFB site に結合するためには、Fob1 以外に少なくとも *Csm1*, *Lrs4*, および *Tof2* の 3 つのタンパク質が必要であることが明らかとなりました。さらにこれら 3 つのタンパク質は互いに物理的相互作用するだけでなく、Fob1 タンパク質と、さらにはコンデンシン複合体を構成する複数のタンパク質の間でも物理的相互作用を示すことが解りました。これらの結果から、RFB site に特異的に結合する Fob1 タンパク質とコンデンシン複合体との間を、3 つのタンパク質が物理的相互作用によって仲介することでコンデンシン複合体を RFB site にリクルートすると考えられます (図 2)。



## 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2件)

- ① Johzuka K., Horiuchi T.  
The cis element and factors required for condensin recruitment to chromosomes  
Mol. Cell (34) 26-35 (2009) 査読有
- ② Johzuka K., Horiuchi T.  
RNA polymerase I transcription obstructs condensin association with 35S rRNA coding region and can cause contraction of long repeat in *Saccharomyces cerevisiae*  
Genes Cells (12) 759-771 (2007) 査読有

[学会発表] (計14件)

- ① 板津昌子、定塚勝樹 「減数分裂期染色体上で起きるコンデンシンの大規模な局在変化」第28回染色体ワークショップ. 2009年1月27日(ウエルサンピア姫路)
- ② 板津昌子、定塚勝樹 「対数増殖期と減数分裂期におけるrDNAとセントロメア領域を中心としたコンデンシンの局在変化」BMB2008. 2008年12月11日(神戸ポートピアホテル)
- ③ 定塚勝樹 「コンデンシン結合のシス配列とその結合の分子機構」BMB2008. 2008年12月11日(神戸ポートピアホテル)
- ④ Johzuka K. 「The cis element and factors required for condensin recruitment to chromosomes」International 3R Symposium 2008. 2008年10月28日(ヤマハリゾートつま恋)
- ⑤ 定塚勝樹、堀内嵩 「コンデンシン結合のシス配列とその結合の分子機構」第41回酵母遺伝学フォーラム. 2008年9月10日(北海道大学)
- ⑥ 定塚勝樹、堀内嵩 「コンデンシンが結合するシス配列とその結合の分子機構」第80回日本遺伝学会. 2008年9月4日名古屋大学
- ⑦ 定塚勝樹 「Condensin が特異的に結合するDNA領域とその結合機構」大阪大学蛋白質研究所セミナー. 2008年3月14日大阪大学
- ⑧ 定塚勝樹、堀内嵩 「酵母 Condensin と rDNA 領域にある複製フォーク停止部位(RFB)との特異的結合機構」組換え・複製ワークショップ. 2008年3月5日ラフォーレ修善
- ⑨ 定塚勝樹、堀内嵩 「出芽酵母コンデンシンと複製フォーク停止部位(RFB)との結合機構」第25回染色体ワークショップ 2008年2月1日湯河原厚生年金会館
- ⑩ 定塚勝樹 「染色体の凝縮と分配における Condensin の作用機序」染色体サイクル公開班会議 2008年1月7日東京大学
- ⑪ 定塚勝樹、堀内嵩 「酵母コンデンシンと rDNA リピートにある複製フォーク停止部位(RFB)との結合機構」日本分子生物学会 2007年12月12日パシフィック横浜
- ⑫ 定塚勝樹、堀内嵩 「出芽酵母コンデンシンのリボソーム RNA 遺伝子領域への結合機構」日本遺伝学会 2007年9月19日岡山大学
- ⑬ Johzuka K., Horiuchi T. 「RNA polymerase I transcription obstructs condensin association with 35S rRNA coding regions and can cause contraction of long repeat in *Saccharomyces cerevisiae*」16<sup>th</sup> International Chromosome Conference 2007年8月24-31日アムステルダム(オランダ)
- ⑭ Johzuka K., Horiuchi T. 「RNA polymerase I transcription obstructs condensin association with 35S rRNA coding regions and can cause contraction of long repeat in *Saccharomyces cerevisiae*」Gordon Research Conference 2007年8月11-19日 Univ.

New England ME (アメリカ合衆国)

[その他]

報道関連情報

日経産業新聞 2009年4月10日 11面掲載

日刊工業新聞 2009年4月16日 23面掲載

科学新聞 2009年4月24日 4面掲載

6. 研究組織

(1)研究代表者

定塚 勝樹 (JOHZUKA KATSUKI)

基礎生物学研究所・ゲノム動態研究部門・助教

研究者番号：40291893