

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650124

研究課題名(和文)トランスポゾン制御を介した積極的な染色体進化促進プログラムの実体解明

研究課題名(英文)Elucidation of a chromosome evolution mechanism through the control of transposon

研究代表者

石井 浩二郎 (ISHII, Kojiro)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：40360276

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):トランスポゾンは、ゲノムに散在する反復配列として多様な染色体編成変化を生み出す。私たちはこれまでに分裂酵母を用いて、その作用はストレスなどに応答して発動する正規な細胞プログラムが積極的に生み出している証拠を得てきた。本研究ではそこでのトランスポゾン活性化の仕組みを解析した。分裂酵母トランスポゾンTf2のエピジェネティック制御要素であるヒストンH3-K56のアセチル化について解析を加え、染色体再編成における特異的な影響はないことを示した。一方、複数のTf2遺伝子座の核内クラスター形成が染色体再編成時には崩壊していることを見出した。細胞核の高次構造が染色体編成変化を促している可能性が挙げられる。

研究成果の概要(英文):As an interspersed repetitive element throughout the genome, transposon has been known to cause various changes in chromosome configuration. We previously found an indirect evidence that that such changes in fission yeast is given through a canonical, stress-induced cellular program. Here we analyzed the control mechanism by which transposon is specifically induced under the condition. Although acetylation of histone H3-K56 has been known to regulate the activity of the fission yeast transposon Tf2 epigenetically, our results indicated that H3-K56 acetylation has no specific contribution to the Tf2 activation in the face of chromosome configuration change. By contrast, clustering of the Tf2 loci within the nucleus was found to be collapsed upon chromosome configuration change. These data suggest the involvement of nuclear higher order structure in the chromosome evolution.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム 染色体 トランスポゾン セントロメア

1. 研究開始当初の背景

トランスポズンは、ゲノムに散在する反復配列として、染色体の転座や重複、欠失、逆位といった多様な編成変化を生み出し、生物進化を引き起こす力の一つに挙げられるが、その作用はストレスなどに応答して発動する正規な細胞プログラムが積極的に生み出すものなのか、あるいはゲノムの恒常性維持機構をかいくぐって偶然に生じた非正規産物が進化的に定着した結果を与えるものなのか、判然とはしない。

そもそもトランスポズンは「動く遺伝子」として古くから注目されてきた。その理由には、トランスポズンが遺伝子上に転移することで生まれる遺伝子攪乱効果に加え、ゲノム中に散在するトランスポズン配列同士の組換えが生み出す染色体編成変化効果が挙げられる。編成変化は、染色体の転座や部分重複、部分欠失、逆位など多様だが、中でも二動原体染色体(図1参照)は、細胞分裂時に染色体分配装置がその染色体を逆向きに引っ張ることで生じる切断(Break)が、切断部の染色体異所融合(Fusion)を通じて新たな二動原体染色体を作り出し、それが再び染色体分配装置によって逆向きに引っ張られ(Bridge)、さらに別の切断を生み出すという「BFB サイクル」を引き起こし、より多様な染色体編成変化を生み出すと考えられている。ゲノムの恒常性を維持し生物種の同一性を保つためには、このような作用は避ける必要がある。従って細胞は通常は様々な仕組みでトランスポズンを抑制している。

私たちはこれまで、トランスポズンが特に染色体編成変化の局面で活性化しているかどうかを解析してきた。細胞の恒常性維持機構はいかなる局面でもトランスポズンの活性化を許さず、その抑制からのエスケープでたまたま生じた染色体再編成細胞が結果的に進化に定着した可能性も十分に考えられたが、私たちの現在の研究では、細胞はむしろ状況に応じて恒常性の維持モードから染色体進化を促進する SOS モードに変貌し、トランスポズンが一過的に活性化された結果、染色体編成変化が促進される可能性が示唆されている(図1)。しかしその背景にある

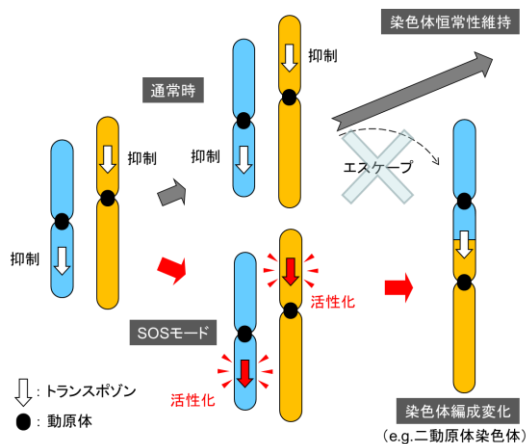


図1 染色体進化を促進する SOS モード

トランスポズン制御機構については全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではこのような正規の細胞プログラムによる積極的なトランスポズン活性化機構の実体解明を目的とした。そもそもトランスポズンは細胞外来性の因子であり、内在性の遺伝子発現を攪乱する働きがあるため、基本的に宿主の細胞ゲノムとは相対する存在と捉えられている。しかし近年になって、トランスポズンが一つの主要要素を占める遺伝子外ゲノム領域、いわゆる「ジャンクDNA」領域は、当初想定されていたよりもはるかに重要な機能を有しており、特に RNA (ノンコーディング RNA) 転写を通じて、さまざまな生物機能に関与している可能性が指摘されはじめています。すなわち、ゲノムの中核となる発現遺伝子群は、常にトランスポズンを敵対視して抑制し続けるわけではなく、むしろ適切に制御した上で可能な部分については巧妙に有効活用している可能性がある。両者は染色体という枠組みの中ですでに共存する体制を樹立しているのかもしれない、そのような友好関係が染色体再編の過程ではどのかたちで発揮されるのか、本研究が対象とする課題は深遠で、その成果は大きなインパクトを持つことが考えられた。

3. 研究の方法

私たちが分裂酵母で樹立した動原体破壊アッセイ(図2参照)は、ネオセントロメア形成とテロメア融合という、進化の過程で頻発する染色体再編成を自発的に促す(Ishii et al. (2008) Science)。本研究ではこのアッセイをトランスポズン動態の主要な解析対象に用いた。このような細胞アプローチから得られる知見が本当に生物進化での染色体編成変化に適用できるのか、当初は強い確証はなかった。しかし、進化と同様のトランスポズンの染色体再編成への関与はこの細胞アッセイにおいても見出されている。すなわち、人為的に環状化させた染色体で動原体破壊を行うと、トランスポズン配列を通じた染色体間の組換え染色体が自発的に得られた(図2)。もともとネオセントロメア形成にもテ

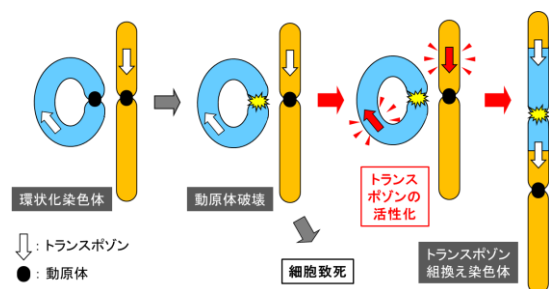


図2 分裂酵母人工環状化染色体のトランスポズンを介した組換え

ロメア融合にも染色体末端の寄与は大きく、

環状化染色体はそれらを不能にする目的で作出した産物であったが、それはトランスポゾン配列同士の組換え反応を浮き彫りにする結果になった。本研究では、この人工環状化染色体を用いてトランスポゾン脱抑制の原因について特にエピジェネティクス因子を中心に検討を行うことを計画した。

4. 研究成果

(1) ヒストン H3-K56 アセチル化修飾が Tf2 活性化に影響している可能性の検証

分裂酵母実験株には Tf2 という LTR 型レトロトランスポゾンのみがゲノム中に存在する。Tf2 は転移活性を失っており、ゲノム上での 13 箇所挿入位置やソロ LTR の存在位置は既に確定している。

本研究ではまずは当初の計画に従い、トランスポゾン Tf2 の遺伝子領域に起こるヒストン H3-K56 のアセチル化に着目した解析を進めた。さらに、Tf2 に結合する CENP-B 相同蛋白質 Abp1 (図 3 参照) の H3-K56 アセチル化への影響についても解析を行った。これまでの解析で動原体破壊による染色体再編成の誘導時には Tf2 の転写量が増加することが見出されている。H3-K56 の脱アセチル化反応を行う酵素 Hst4 の変異株において同様の染色体再編成を誘導したところ、Tf2 の活性化は同じく認められた。しかし、その活性化の度合いは Hst4 が正常に維持された野生株で検出されるレベルと同等であった。従って、Hst1 は Tf2 の通常時の抑制には寄与するが、染色体編成変化の促進のための積極的な脱抑制には関与していないと考えられる。また Abp1 の変異株でも同様の結果が得られた。これらの因子は染色体再編成時の Tf2 脱抑制に積極的には関与していないことが示唆された。

(2) Tf2 遺伝子座の細胞核内クラスター形成と染色体再編成現象の関与の解明

分裂酵母の Tf2 トランスポゾンは 13 コピーの遺伝子座にコードされているが、それらの遺伝子座は細胞内ではトランスに集合して Tf-body と呼ばれる 1 個ないしは 2 個のクラスターを形成していることが知られている (図 3)。Tf-body 形成は Tf2 の発現抑制に寄

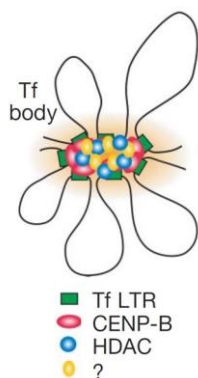


図 3 Tf-body の模式図
(Cam et. al. (2009) Nature より改変)

与している可能性はすでに指摘されており、Tf-body と動原体の共局在も報告されている (Cam et. al. (2009) Nature、Tanaka et al. (2012) Mol. Cell)。そこで、動原体破壊により染色体再編成が誘導されている細胞における Tf-body を蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) によって観察し、トランスポゾン遺伝子座の細胞核内クラスター形成と染色体編成変化の関係性を解析した。Tf-body の細胞内局在とその総数変動を詳細に解析した結果、少なくとも Tf-body 数は有意に増加することが判明した (図 4)。この観察結果

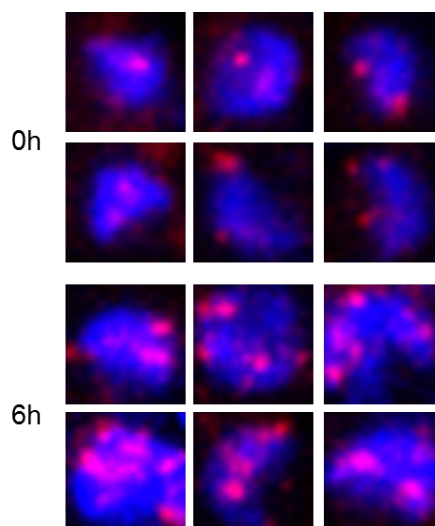


図 4 Tf2 DNA FISH (赤) と核 DNA (青) の動原体破壊前 (0h) と動原体破壊後 (6h) の染色像

は、染色体再編成時にトランスポゾン遺伝子発現抑制が緩和されることと合致する。

次いで Tf-body の崩壊と染色体再編成の関係性を解析した。前述の CENP-B 相同蛋白質 Abp1 の変異株では、Tf2 の脱抑制に加えて Tf-body 形成が不能になることが知られている (Cam et. al. (2009) Nature)。そこで、Abp1 変異株で動原体破壊アッセイを行い、染色体編成変化を誘導した。その結果、得られる染色体再編成には顕著な変化がないことが判明した。従って、Tf-body は Tf2 の転写抑制には寄与するが、DNA 相同組換えの活性制御に積極的には関与していないことが示された。

(3) 染色体再編成に応じて生成される Tf2 由来小分子 RNA の機能解析

これまでに Tf2 の RNA 転写産物をノザンプロットで解析する中で、試しに小分子 RNA のノザンプロットも行ってみたところ、驚いたことに、Tf2 のプローブに反応するバンドが動原体破壊に伴うトランスポゾン活性化のタイミングに同調して出現することを私たちは見出していた。そのシグナルは 40ヌクレオチド強のもので、Tf2 の順方向転写産物のみに由来していた。

本研究においては当初の計画に従い、まず小分子 RNA を検出する最適条件の検討を行

った。その上で、過酸化水素曝露による酸化ストレス応答条件と染色体再編成時の比較を行い、小分子 RNA の特異性を解析した。そもそも Tf2 の転写自体は細胞の過酸化水素への曝露などの環境ストレスに応じて上昇する事が知られている (Chen et al. (2003) Mol. Biol. Cell)。しかし 40 ヌクレオチドの小分子 RNA シグナルはそのような過酸化水素への曝露では認められなかった。従って、同じように Tf2 の転写が上昇しても 40 ヌクレオチドの小分子 RNA シグナルは染色体再編成に特異的であると結論づけた。

Tf2 は RNAi 機構の単純な標的ではなく、RNAi 機構と RNA 品質管理に関わる exosome 経路の連携制御の支配下にあることが近年明らかにされている (Yamanaka et al. (2013) Nature)。その分子的性質から、40 ヌクレオチド小分子 RNA は siRNA とは異なると考えられるが、RNAi 変異や exosome 変異、あるいはその二重変異で 40 ヌクレオチド小分子 RNA がどのように振る舞うか、今後明らかにしていく必要があると考える。この染色体再編成に応じて生成されるトランスポゾン由来小分子 RNA の解析は、今後更に発展させていくべき課題である。

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 4 件)

- ① Sanki Tashiro, Tetsuya Handa, Atsushi Matsuda, Takuto Ban, Toru Takigawa, Kazumi Miyasato, Kojiro Ishii, Kazuto Kugou, Kunihiro Ohta, Yasushi Hiraoka, Hisao Masukata & Junko Kanoh: Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. Nature Communications、査読有、7, 10393 (2016)、doi: 10.1038/ncomms10393
- ② Kazufumi Hosoda, Soichiro Tsuda, Kohmei Kadowaki, Yutaka Nakamura, Tadashi Nakano & Kojiro Ishii: Population-reaction model and microbial experimental ecosystems for understanding hierarchical dynamics of ecosystems. Biosystems、査読有、140, 28-34 (2016)、doi: 10.1016/j.biosystems.2015.12.005.
- ③ Yuko Ohno, Yuki Ogiyama, Yoshino Kubota, Takuya Kubo & Kojiro Ishii: Acentric chromosome ends are prone to fusion with functional chromosome ends through a homology-directed rearrangement. Nucleic Acids Research、査読有、44, 232-244 (2016)、doi: 10.1093/nar/gkv997
- ④ Teppei Kitagawa, Kojiro Ishii, Kojiro

Takeda & Tomohiro Matsumoto: The 19S proteasome subunit Rpt3 regulates distribution of CENP-A by associating with centromeric chromatin. Nature Communications、査読有、5, 3597 (2014)、doi: 10.1038/nsmb.2697

[学会発表] (計 11 件)

- ① 石井浩二郎: 染色体の異数性が生み出す細胞変化、新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム、2016年2月8日~2016年2月9日、一橋講堂学術総合センター (東京都千代田区)
- ② 荻山友貴、久保田佳乃、浅川東彦、平岡泰、石井浩二郎: 新生 (ネオ) セントロメアの減数分裂、第33回染色体ワークショップ、2016年1月12日~2016年1月14日、松島一の坊 (宮城県宮城郡松島町)
- ③ 石井浩二郎: セントロメアの異所的確立と世代を越えた維持、第38回日本分子生物学会年会、2015年12月1日~2015年12月4日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ④ 荻山友貴、久保田佳乃、浅川東彦、平岡泰、石井浩二郎: 減数分裂におけるネオセントロメアの機能性とヘテロクロマチンの寄与、第23回DNA複製・組換え修復ワークショップ研究会、2015年10月19日~2015年10月21日、焼津グランドホテル (静岡県焼津市)
- ⑤ Kojiro Ishii: Immediate cellular response to chromosomal aneuploidy, Gordon Research Conference: Chromosome Dynamics、2015年6月28日~2015年7月3日、Waterville Valley (USA)
- ⑥ Yuko Ohno, Yoshino Kubota, Kojiro Ishii: Immediate cellular response to chromosomal aneuploidy, The eighth international fission yeast meeting、2015年6月21日~2015年6月26日、生田神社会館 (兵庫県神戸市)
- ⑦ 石井浩二郎: 体細胞分裂期にエピジェネティックに形成されたネオセントロメアの減数分裂期の機能性、第9回日本エピジェネティクス研究会年会、2015年5月25日~2015年5月26日、一橋講堂学術総合センター (東京都千代田区)
- ⑧ Yuki Ogiyama, Haruhiko Asakawa, Yasushi Hiraoka, Kojiro Ishii: Meiotic behaviors of neocentromeres, EMBO Workshop: Dynamic kinetochore、2015年5月18日~2015年5月21日、Copenhagen (Denmark)
- ⑨ Kojiro Ishii: Immediate cellular response to chromosomal aneuploidy, 4D Nucleome 2014、2014年12月17日~2014年12月20日、安芸グランドホテル

(広島県廿日市市)

- ⑩ 石井浩二郎: 染色体異数性に対する初期応答、第32回染色体ワークショップ、2014年12月15日～2014年12月17日、安芸グランドホテル (広島県廿日市市)
- ⑪ 石井浩二郎: 染色体異数性の初期応答、日本遺伝学会第86回大会、2014年9月17日～2014年9月19日、長浜バイオ大学 (滋賀県長浜市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/ishii/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 浩二郎 (ISHII, Kojiro)
大阪大学・生命機能研究科・特任准教授
研究者番号: 40360276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし