

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14454

研究課題名(和文)クロマチン相互作用の検出による核内染色体形態の解析

研究課題名(英文)Analysis of chromosome conformation based on the chromatin interaction

研究代表者

定塚 勝樹 (Jozuka, Katsuki)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：40291893

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)：出芽酵母をモデルに、分裂期の染色体凝縮に働くコンデンシンが、間期でも染色体の形の制御に働くことがわかった。細胞の接合型(aと α 型)に応じて、接合型遺伝子を持つ3番染色体の形に差異が有ることを発見した。この形の制御にコンデンシンが働いている。さらに、同染色体上でa型細胞特異的にコンデンシンが結合するシス配列を同定した。このシス配列は、a型特異的な3番染色体の形の形成に必要で、同染色体上の任意の場所に移動してもその役割を果たすことが解った。さらに細胞の接合型変換の制御に、このシス配列とコンデンシンが働くことが解った。染色体の形をコントロールすることで、接合型変換の調節をしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I showed that the condensin complex, a key player for the mitotic chromosome condensation, controls the chromosome folding even in interphase cells. First, I found the difference in the chromosome 3 folding state between two mating types, a- and α -type cells. Condensin controls a-type cell specific chromosome folding. I found the a-type cell specific condensin binding element on chromosome 3. This cis-element is required for the a-type cell specific folding of chromosome 3 and works even at ectopic positions on chromosome 3. Furthermore, it was found that both condensin and the cis-element control a frequency of mating-type switching into opposite type. These results suggest that condensin regulate a mating-type conversion by controlling chromosome 3 folding state.

研究分野：生物学・分子生物学

キーワード：染色体 クロマチン 細胞分裂 分子生物学 遺伝学 染色体構造

1. 研究開始当初の背景

細胞周期を通じて染色体の形は大きく変化する。細胞分裂期にクロマチン DNA 鎖が太く短く折りたたまれて、分裂期特有に観られる高度に凝縮した染色体構造を形成する過程は最も典型的な例の1つだろう。染色体凝縮として知られるこの過程は基本的な細胞機能の1つであり、単に染色体腕部の長さを短くする目的だけでなく、複製によって姉妹染色体間に生じた絡まりを解消し、正確に娘細胞に分配するための重要な目的も果たしている。この分裂期の染色体凝縮は、コンデンシンと呼ばれる、酵母からヒトに至るまで広く保存された蛋白質複合体が、中心的役割を担っている。

申請者は出芽酵母をモデルとして、リボソーム RNA 遺伝子の繰り返し領域 (rDNA リピート) を含んだ核小体の分配にコンデンシンが必須であることを見出した。出芽酵母では、核小体がコンデンシンの主要な局在部位として観察される。これまでの解析から、rDNA 領域にある短い配列である“RFB”にコンデンシンが結合することを見出している。さらに RFB 配列を任意の染色体上の場所に挿入すると、そこにコンデンシンが結合するシス配列であることもわかった。そこで、コンデンシンによる染色体凝縮のメカニズムを探る目的で、人工的に RFB を離れた2カ所に挿入すると、それらにコンデンシンが結合して、RFB 同士が相互作用することがわかってきた。これにより、RFB の間のクロマチン DNA が折りたたまれることになる。これが染色体凝縮の素反応であると考えられた。さらにコンデンシンによるクロマチン DNA 同士の相互作用は分裂期で促進されるものの、間期で既に生じていることがわかってきた。これは **ectopic** 部位に RFB を挿入して並べた人工的な系での結果ではあるものの、間期でもコンデンシンによるクロマチン DNA の相互作用が実際に生じて、それにより何らかの細胞機能が制御されている可能性が示唆される。

2. 研究の目的

既述の様な人工的な系ではなく、間期で細胞が本来有するクロマチン DNA 同士の相互作用と、そこでのコンデンシンの役割は何だろうか？そこで、出芽酵母の3番染色体の左右両末端付近にある **HML** と **HMR** 遺伝子座に注目した。この2カ所にはコンデンシンが結合することがわかっている。さらにこの2つの部位は、DNA 配列にして約 300kb 離れているにも関わらず、間期の細胞核の中で一定の頻度で相互作用することが報告された。**HML** と **HMR** には、酵母細胞の性に相当する接合型を決める遺伝子である **alpha** 型と **a** 型遺伝子をそれぞれコードしている。両遺伝子

座は **Sirtuin** ファミリーの働きによりヘテロクロマチン状態となり、転写が強く抑えられている。細胞の接合型は、3番染色体の中程にある **MAT** 遺伝子座に、何れか一方の遺伝子がコピーされ、そこで発現することによって決まる。染色体の両末端付近にあるこの2カ所の部位の相互作用とコンデンシンの関与を調べることを目的とした。

また、**HML** と **HMR** の相互作用をモデルケースとして、染色体上の2カ所の異なる部位の間での相互作用を検出する新しい方法の開発を試みることを第二の目的とした。図1に示すように、それぞれ異なる部位の DNA 配列を認識する2種の probe と、それらを利用して **In situ** でクロマチン同士の相互作用を反映したシグナルを増幅することを組み合わせた **In situ Amplification of Chromosome Connection (IACC)** 法の開発を試みた。

3. 研究の方法

(A) **G1** 期で増殖を止めた細胞、あるいはランダムカルチャーを用いて **HML** と **HMR** の間の相互作用を **Chromosome conformation capture (3C)** 法により検出し、野生型とコンデンシンの変異体で比較した。また、染色体 DNA とコンデンシンとの結合をクロマチン IP (ChIP) により検出した。

(B) **IACC** 法は、染色体の任意の2つの部位が近接することにより、1本鎖環状 DNA の形成を誘導し、それを鋳型に **rolling circle** 型の増幅産物を生成させ、それを **FISH** で検出しようとするアイデアである。

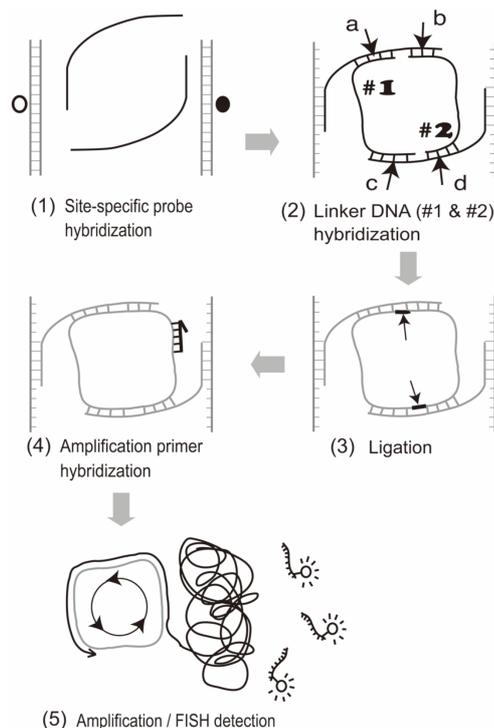


図 1

(1). 染色体上の2カ所 (○と●) に対する特異的な DNA 配列を一部だけ持つ probe DNA を、スライドガラス上に固定した細胞に hybridization する。(2). 2種の probe の別の一部と相補的配列を持つ2種の Linker DNA(#1 & #2)を hybridization する。その結果 a, b, c, d の4カ所で相補的配列同士との対合により擬似環状構造が形成される。(3). a と b、および c と d の間の2つのギャップを ligation して完全な環状 DNA を形成させる。(4). Linker DNA #2 の一部と相補的配列を持つ Amplification primer を hybridization する。(5). ポリメラーゼにより rolling circle 型増幅を行った後に、増幅産物を FISH により検出する。HML と HMR との相互作用をモデルケースとしてこの手法の開発を試みた。

4. 研究成果

(A) HML-HMR 相互作用とコンデンシン:

(1). 3C 法により HML と HMR の相互作用を、2種のコンデンシン複合体遺伝子の変異体 (*smc2-157*, *yca4-1*) で調べた。その結果、どちらの変異でも HML と HMR の相互作用を示すシグナルが野生型のそれに比べて減少することが観察された。従ってこの相互作用にコンデンシンが働いていることがわかった。また HML と HMR の相互作用は *SIR2* 遺伝子欠失で低下することが報告されている。そこで *sir2* 欠失変異体での HML と HMR 部位へのコンデンシンの結合を調べた結果、バックグラウンドレベルに低下することがわかった。これらの結果から、コンデンシンは *SIR2*⁺ に依存して HML と HMR に結合し、両者の相互作用を促進していることが見えてきた。

さらに詳細に調べると、HML と HMR の相互作用は、2種の接合型 (a と alpha 型) でその相互作用シグナルに差異があることが判明した。a 型細胞では alpha 型細胞に比較して強い相互作用シグナルを示すことから、より高頻度で相互作用が生じていることがわかった。

(2). ChIP-chip の結果から、HML と HMR のある3番染色体上のセントロメア以外の腕部に、比較的高いコンデンシン結合シグナルを示す部位を見出した。この部位は a 型細胞から alpha 型への接合型変換を制御する上で重要な役割を果たすことが知られている配列 (RE) の近傍であった。この部位へのコンデンシンの結合を詳細に調べた結果、(a)ここへのコンデンシンの結合も *SIR2*⁺ に依存することがわかった。さらに、(b)ここへのコンデンシン結合は2種の接合型のうち、a 型細胞でのみ観られ、alpha 型や2倍体細胞では観られないことが判明した。即ちこの部位は、a 型細胞特異的で *SIR2*⁺ に依存してコンデン

シンが結合する場所であることがわかった。

(3). 上記(2)で注目した部位を *URA3* で置換することで欠失させると、a 型細胞で HML と HMR の相互作用を示すシグナルが、alpha 型細胞のそれと同等レベルに低下することが観察された。この結果から、この部位は a 型細胞特異的にコンデンシンが結合し、HML と HMR の相互作用を a 型細胞レベルに促進する働きを有した配列であることが判明した。そこでこの部位を Chromosome Folding Regulator (CFR) と呼び、その性質を調べた。CFR を3番染色体の ectopic 部位に移動した場合でも HML と HMR の相互作用を促進する働きが認められた。従って CFR は HML と HMR の相互作用を制御するシス配列として機能している。

(4). ホモタリックライフサイクルで増える出芽酵母の安定な栄養増殖サイクルは2倍体である。そのため1倍体細胞では、分裂の度に娘細胞で9割以上の確立で異なる接合型への変換が生じる。a 型細胞から生じた娘細胞 (出芽酵母では母細胞から出芽して娘細胞が生まれる) は alpha 型に、逆に alpha 型からは a 型に変わる。この接合型変換の制御に異常を来すと、2倍体細胞の形成頻度が低下することになる。a 型細胞から alpha 型への変換率を野生型とコンデンシン変異体 (*smc2-157*) で比較したところ、コンデンシンに変異が生じることで、a 型から alpha 型への変換の確率が9割から6割に低下することが観察された。さらに、CFR を欠失することにより a 型細胞から alpha 型への変換率の

染色体形状による a 型から alpha 型への接合型変換制御モデル

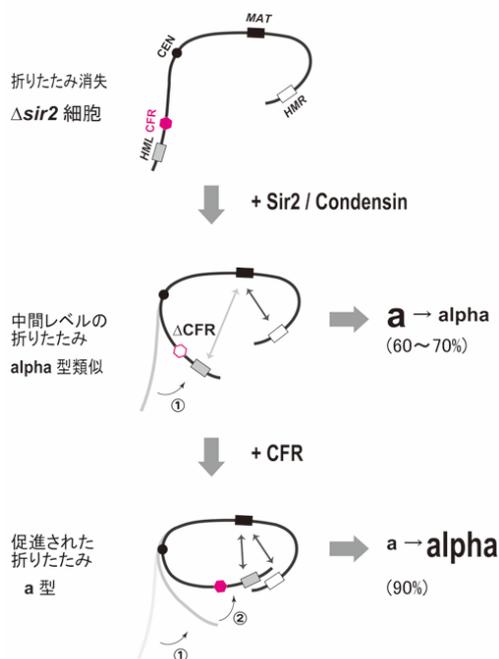


図 2

低下が観られた。これらの結果から、間期の細胞で、コンデンシンの働きにより *HML* と *HMR* の相互作用が促進され3番染色体が環状に折りたたまれる。その折りたたみ状態が *a* 型細胞では *alpha* 型細胞に比べて促進されることで、3番染色体の形状に差異が生じていると考えられる。そしてその染色体の形の違いによって接合型変換が調節されているモデルが考えられた (図2)。

(B) IACC 法による相互作用シグナルの検出の試み：

a 型細胞を使い、*HML* と *HMR* の相互作用をモデルケースとして、IACC 法の開発を試みた。1倍体細胞では *HML* と *HMR* はそれぞれ1コピーを有しており、相互作用を反映するシグナルは1つの spot として検出されなければならない。しかしながら現時点までに細胞あたり1つの spot だけが観察出来る状態になっていない。今後、各ステップの条件検討をしなければならない。

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)

[学会発表] (計 3件)

- ① 定塚勝樹「出芽酵母の接合型に依存した染色体形態の変化」第40回日本分子生物学会 2017年12月6日~9日(神戸国際会議場) 兵庫県神戸市
- ② 定塚勝樹「出芽酵母の接合型に依存した染色体構造の変化」第39回日本分子生物学会 2016年11月30日~12月2日(パシフィコ横浜) 神奈川県横浜市
- ③ 定塚勝樹「コンデンシンが制御するクロマチン相互作用」BMB2015 第38回日本分子生物学会 2015年12月1日~4日(神戸国際会議場) 兵庫県神戸市

[その他]

ホームページ等

http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary_biology_and_biodiversity/diversity/AssisProf/johzuka.html

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・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：40291893