

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14670

研究課題名(和文) 相同組換えを介した染色体編成の多様化を促すトランスポゾンRNA制御

研究課題名(英文) Regulation of retrotransposon RNA that facilitates recombination-mediated chromosome reorganization

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) 2,900,000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であり、染色体編成変化の原因の一つに挙げられる。しかしその背景にある分子メカニズムは明らかではない。今回私たちは、トランスポゾンRNAの染色体編成変化への関与を明らかにした。私たちはこれまでに、分裂酵母モデルアッセイを用いて、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トランスポゾンを介した染色体編成変化を生み出していることを明らかにしてきた。今回は、減数分裂での機能が知られる転写産物介在の相同染色体ペアリング促進機構がトランスポゾンを介した私たちの染色体編成変化でも機能することを見出した。減数分裂組換えと染色体編成変化の共通性が示された。

研究成果の概要(英文)：Retrotransposons are the repetitive element interspersed throughout the genome. They have been regarded as one of the causes for chromosome configuration changes. However, the molecular mechanisms lying behind the changes have been poorly understood. In this study, we identified the involvement of retrotransposon RNA in the chromosome configuration changes. Previously, we have demonstrated, by using a model assay in fission yeast, that a canonical stress-induced cellular program imposed the retrotransposon-mediated chromosomal configuration changes. We showed here that the known transcription-coupled facilitation mechanism of homologous chromosome pairing during meiosis also contributed to the chromosome configuration changes achieved through the retrotransposons. This uncovers a common ground between the chromosome configuration changes and meiotic recombination.

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 RNA 動原体

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾン「動く遺伝子」として古くから注目され、特に生物進化においては種分岐や生殖隔離を生む主要因の一つと考えられてきた。その理由には、トランスポゾ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ゾ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ゾンを抑制している。

私たちはこれまで、トランスポゾンが特に染色体編成変化の局面において活性化され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ゾ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てきた可能性も十分に考えられたが、私たちのこれまでの研究では、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、トランスポゾ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た(図1)。しかし本研究を開始した当初、その背景にあるトランスポゾン制御機構については全てが不明なままであった。

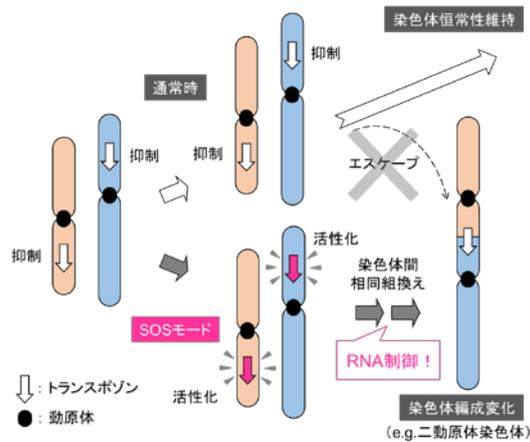


図1 染色体進化を促進するSOSモードとRNA制御のその過程への関与

2. 研究の目的

本研究では、染色体進化促進プログラムとしてトランスポゾン介在ゲノム変化の機構

を解明し、染色体編成の多様化が生まれる仕組みを解明することを目的とした。中でも本研究においては、トランスポゾンのRNA制御を介した染色体進化促進プログラムについて、その解明を目指した。そもそもトランスポゾ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敵対する存在と捉えられている。しかし近年になって、トランスポゾ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、常にトランスポゾ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のです。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。そのような協調関係が染色体再編の過程ではどのあたりで働くのか、本研究が対象とする課題は深遠であり、その成果からは大きなインパクトが得られることが期待された。

3. 研究の方法

分裂酵母実験株にはLTR型レトロトランスポゾンとしてTf2の一種類のみが存在し、その複数コピーがゲノム上に散在している(図2)。Tf2の転移活性はすでに喪失されて

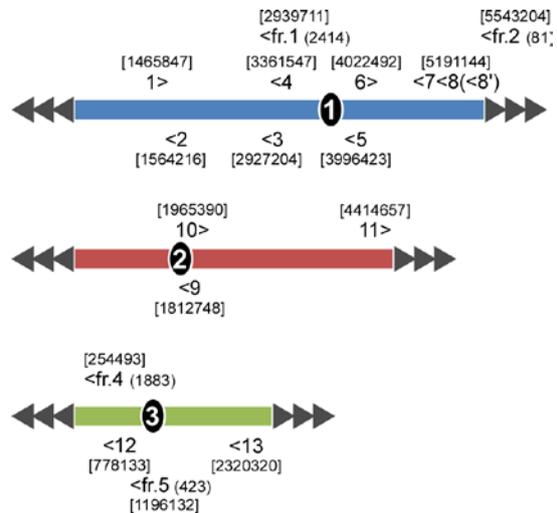


図2 分裂酵母の3本の染色体上のTf2の位置取り

おり、Tf2やソロLTRのゲノム上での位置取りは安定しているため、ゲノム変化の解析には好都合なモデルである。本研究ではこの分裂酵母を対象として、私たちがこれまでに樹立してきた動原体破壊アッセイ(図3参照)を利用して、染色体再編成とその過程を追跡する手法を採用した。これまでの結果として、

動原体破壊アッセイは、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ことが判明している (Ishii et. al. (2008) Science)。本研究ではさらにこの動原体破壊アッセイを、人為的に環状化させた染色体で行うこととした (図3)。人為的に環状化させた染色体で動原体破壊を行うと、トランスポゾ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ることが既に判明している (図3)。

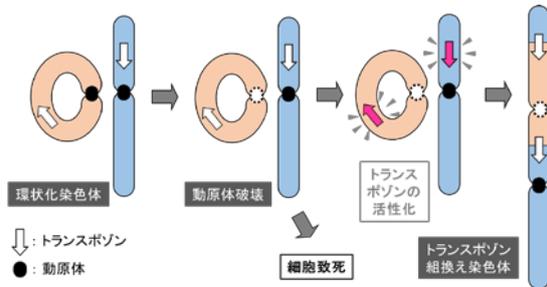


図3 環状化染色体での動原体破壊

本研究ではこの反応における RNA の寄与を明らかにし、染色体再編成との関連性を調べることによって、トランスポゾンの RNA 制御を介した染色体進化促進プログラムの解明を目指した。

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、研究開始時点において強い確証は得られていなかった。しかし、このアッセイで取得できる新たな染色体再編成生物は多様であり、かつそれらは自発的に生じた。同様の組換え分子反応が環状化していない普通の染色体で起こると、それは BFB サイクルにつながる可能性は極めて高い (図1参照)。チャレンジ性の高いモデルに立脚した研究ではあるが、細胞アッセイを用いた独創的な解析であり、有用な新規成果の創出が予感された。

4. 研究成果

(1) 染色体再編成時に生成されるトランスポゾン由来小分子 RNA の機能解析

私たちは、以前から動原体破壊に伴う染色体再編成の促進とトランスポゾン抑制制御変化の対応関係を解析してきたが、その一環として Tf2 の RNA 転写レベルを解析する過程で、試しに小分子 RNA のノザンプロットも試みたところ、驚いたことに Tf2 のプロンプ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と同調して出現することを見出していた。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由来する。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 シグナルは過酸化水素への曝露では認められなかった。今年

度はさらに、その出現に対する RNAi 変異や exosome 変異の影響を検証した。その結果、小分子 RNA の出現は exosome 経路には依存せず、RNAi 経路には依存している、という解析結果を得た。しかし、その知見をさらに発展させ、小分子 RNA の生合成メカニズムを探る目的で、小分子 RNA の次世代シーケンス解析を行ったところ、そのような Tf2 に由来する 40 ヌクレオチド強の小分子 RNA を有意に見出すことができなかった。さらには、Tf2 に由来する小分子 RNA に対する RNAi 経路変異の影響も有意には見出されなかった。この知見に関しては、今後のより注意深く詳細な解析が必要であると結論づけた。

(2) トランスポゾン RNA 制御と染色体相同組換えの関与の解明

動原体破壊による SOS モードの誘導はトランスポゾンの活性化を引き出すのが、その結果として生じているのは異なる染色体上の Tf2 座位の間での相同組換えである。相同組換えと RNA 制御の関わりについては、減数分裂期における反復配列同士の相同組換えで、それが不均衡に起こるのを抑制するのに反復配列由来の RNA が作用する例が知られている。また分裂酵母においては、減数分裂期における相同染色体の効率的なペアリングを生み出すためにノンコーディング RNA が機能するという報告がある (Ding et al. (2012) Science)。ここで作用するノンコーディング RNA (mei RNA) は sme2 という遺伝子座に由来する RNA であり、Tf2 とは一見したところ関係性は見出せない。しかし、興味深いことに、動原体破壊は減数分裂過程で行っているわけではないにもかかわらず、動原体破壊後の SOS モードと思われる細胞では sme2 遺伝子座由来の mei RNA の発現上昇が認められた。そこで、減数分裂期には Tf2 を抑制して mei RNA だけが機能する機構が働いているのに対し、動原体破壊では mei RNA も Tf2 RNA も染色体ペアリングに作用し、染色体再編成を促進しているモデル (図4) を考え、その可能性を検証してみることにした。

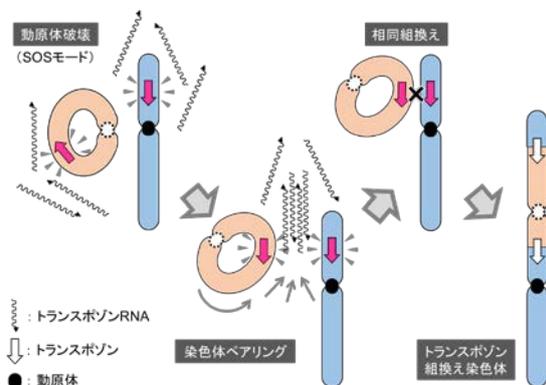


図4 トランスポゾン RNA 制御を介した染色体相同組換えの促進

まずは、inverse PCR 法を用いて、組換えに用いられた Tf2 を同定する解析をより徹底的に進めた。その結果、多くの組換え関与 Tf2 座位が明らかとなり、そこには強い偏りもないことが判明したが、興味深いことに、環状染色体と直鎖状染色体間の組換えのみならず、環状染色体上の 2 つの Tf2 座位と直鎖状染色体上の 1 つの Tf2 座位 (図 2 参照) の 3 者間で相互に相同組換えが起こり、それに従った複雑な染色体再編成が起こっているケースも見出された (図 5)。また Tf2 の部分断片 (図 2 参照) との間での相同組換えも明らかになった (図 5)。興味深いことに、組換えに用いられたのは RNA 転写反応が阻害されないタイプの部分断片 (fr.1) であり、RNA 転写が阻害されるタイプの部分断片 (fr.4) では相同組換えは見出されなかった (図 5)。トランスポゾンのクラスター化と RNA 制御を介した染色体相同組換え促進の可能性が示唆された。

Recombination		Site used	
1×10 (Φ ¹ +II)	2	1 (I)	3
1×11 (Φ ¹ +II)	1	2 (I)	4
2×10 (Φ ¹ +II)	4	3 (I)	6
3×n.i. (Φ ¹ +II)	5	4 (I)	6
3×12 (Φ ¹ +III)	1	5 (I)	6
4×10 (Φ ¹ +II)	3	6 (I)	13
4×13 (Φ ¹ +III)	3	7 (I)	0
5×10 (Φ ¹ +II)	1	8 (I)	3
5×13 (Φ ¹ +III)	2	8' (I)	1
6×10 (Φ ¹ +II)	6	fr.1 (I)	2
6×12 (Φ ¹ +III)	4	9 (II)	0
5×6×13 (Φ ¹ +III)	3	10 (II)	18
8×11 (Φ ¹ +II)	1	11 (II)	3
8'×11 (Φ ¹ +II)	1	12 (III)	6
8×12 (Φ ¹ +III)	1	13 (III)	9
8×13 (Φ ¹ +III)	1	fr.4 (III)	0
fr.1×10 (Φ ¹ +II)	2	n.i.	17

図 5 組換えに用いられた Tf2 座位の
パターンと頻度

次いで、動原体破壊では mei RNA も Tf2 RNA も染色体ペアリングに作用し、染色体再編成を同様に促進している可能性を追究するために、環状化染色体に sme2 転写ユニットを異所的に挿入し、Tf2 と同様の相同組換え促進が sme2 座位で起こるかについて解析した。すると、相同組換えを介して出現する染色体再編成サバイバーの出現頻度に上昇が見られた。従って、動原体破壊に伴う染色体再編成は RNA 分子を介在した染色体相同組換えの促進を誘起している可能性が強く示唆された。

近年の piRNA などを中心とした研究から、とりわけ生殖系列細胞でトランスポゾン抑制機構は高度に発達していることが明らかにされている。また、減数分裂は種分岐と生殖隔離に直結している。実は生殖系列細胞では SOS モードのかたちでトランスポゾンの活性を高め、染色体編成変化を促進できる活性調節機構を特別に残して保持しているのかもしれない。分裂酵母には piRNA 経路はな

く、Tf2 の RNA 制御に対する小分子 RNA の関与も現状では判然とはしていない。しかしながら、染色体再編成結果のひとつであるテロメア融合は、実は不均衡な染色体相同組換えの産物であることが判明している (Ohno et al. (2015) *Nucleic Acids Res.*)。すなわち、染色体相同組換えは体細胞分裂期の染色体再編成と減数分裂・生殖系列細胞をむすぶ特徴的な共通点となっているのである。一方で、mei RNA を介した減数分裂期染色体ペアリングは RNAi 機構とは無関係なことが示されている (Ding et al. (2012) *Science*)。動原体破壊に伴う相同組換えの RNAi 機構依存性についても、sme2 を加えた新しい実験系で再度確認を行う必要があると考えている。mei RNA 由来の小分子 RNA の同定など、今後明らかにしていく必要のある対象はまだ数多い。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 とその相同組換えを介した染色体編成多様化メカニズムの解析は、今後も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 1 件)

- ① Masatoshi Mutazono, Misato Morita, Chihiro Tsukahara, Madoka Chinen, Shiori Nishioka, Tatsuhiko Yumikake, Kohei Dohke, Misuzu Sakamoto, Takashi Ideue, Jun-ichi Nakayama, Kojiro Ishii & Tokio Tani: The intron in centromeric noncoding RNA facilitates RNAi-mediated formation of heterochromatin. *PLoS Genetics*, 査読有、13, e1006606 (2017)、doi: 10.1371/journal.pgen.1006606

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kojiro Ishii: Pericentric heterochromatin is crucial for the neocentromeres facing meiosis, The 10th 3R Symposium, 2016 年 11 月 13 日～2016 年 11 月 17 日、ホテル一畑 (島根県松江市)
- ② 石井浩二郎: 新規形成されたセントロメアの減数分裂、酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会、2016 年 9 月 9 日～2016 年 9 月 11 日、シーサイドホテル舞子ビラ (兵庫県神戸市)
- ③ Yuko Ohno, Kazufumi Hosoda, Yoshino Kubota, Kojiro Ishii: Immediate cellular response to chromosomal aneuploidy, 日本遺伝学会第 88 回大会、2016 年 9 月 7 日～2016 年 9 月 9 日、日本大学国際関係学部三島駅北口校舎 (静岡県三島市)
- ④ Kojiro Ishii: A role for pericentric

heterochromatin in the
neocentromere-mediated meiosis,
Gordon Research Conference:

Centromere Biology、2016年7月24日
～2016年7月29日、Mt. Snow (USA)

- ⑤ 大野悠子、細田一史、久保田佳乃、石井浩二郎：染色体の異数性に対する初期応答、第68回日本細胞生物学会大会、2016年6月15日～2016年6月17日、京都テルサ（京都府京都市）

〔図書〕（計 1 件）

- ① 川上慶、道家康平、石井浩二郎：化学同人、ノンコーディングRNA、2016、354 ページ（pp. 83-95）

〔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(常勤)

研究者番号：40360276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし