

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07249

研究課題名(和文) 分裂酵母のゲノム核内配置マップの作製による染色体-核膜相互作用の分子基盤の研究

研究課題名(英文) Placement of chromosomes in fission yeast

研究代表者

近重 裕次 (Chikashige, Yuji)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・研究マネージャー

研究者番号：60359081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：間期核内における染色体の配置は、転写・複製・修復などの染色体機能に重要な役割を担っていると考えられてきた。分裂酵母染色体において、染色体が核内においてどのように配置しているかを調べる目的で、分裂酵母染色体全域を80～100kbごとにlacO/lacI-GFPにより可視化した分裂酵母株を用いて、各染色体領域と核膜との距離を蛍光顕微鏡観察により計測し、分裂酵母全ゲノムにわたる染色体の核内配置マップを作製した。その結果、500Kbから1Mbにわたって、核膜縁辺部に局在する領域や、100～200kbごとに核膜縁辺部と核内奥部への局在を繰り返す領域など、特徴的な染色体配置が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分裂酵母は、比較的少ない遺伝子数や染色体数を持ちながら、ヘテロクロマチンや動原体構造、細胞周期制御など、真核生物が有するさまざまな特徴を備えたモデル生物として、広く用いられている。本研究課題においてはじめて作成した、分裂酵母の全ゲノムにわたる染色体領域の核内配置マップは、分裂酵母を用いて、複製や転写などの染色体機能とその核内配置の関係について解析を行う上で、重要なベースデータを与えるものである。

研究成果の概要(英文)：It is thought that the arrangement of the chromosomes in the interphase nucleus have the key role on the chromosome functions such as transcription, replication, and repair. To examine how the chromosomes arrange in nucleus of the fission yeast, we measured the distance of each chromosome region and the nuclear membrane with fluorescent microscopy using fission yeast strains, the whole chromosomes of which are made visible by lacO/lacI-GFP in each 80-100kb and made the arrangement map of all chromosomes in the fission yeast nucleus. As a result, characteristic chromosome arrangements were found such as the region more than 500kb localizes to the vicinity of nuclear membrane, and the region where localization at near the nuclear membrane and at the interior part of nucleus are repeated every 100kb-200kb.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞核 染色体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間期核内における染色体の配置は、転写、複製、修復などの染色体機能に重要な役割を担っていると考えられてきた。一般に、染色体のうち、遺伝子の少ない領域、ないしは、発現活性の低い領域が、核の縁辺部に位置するといわれている。テロメアやセントロメア、ヘテロクロマチンも一般に核縁辺部に存在する。分裂酵母は、テロメア、セントロメアの構造や局在様式、ヘテロクロマチンの様態などについて、保存された諸性質をもつことから、染色体構築のモデル生物として広く用いられている。分裂酵母のような核ラミナをもたない生物種における染色体の核膜局在に関しては、テロメア、セントロメアについて研究代表者らによるものも含めその分子機構の知見が蓄積している(Mizuguchi et al., 2015. *Febs Let.*, Ebrahimi and Cooper, 2016, *Curr. Opin. Cell Biol.*)。一方、それ以外の染色体領域については、知られていることは、少ない。

我々は、分裂酵母で bouquet 配置(減数分裂期におけるテロメアの中心体(菌類では、スピンドル極体:SPB)近傍へのクラスター形成)を発見し(Chikashige et al., 1994, 1997) bouquet 配置形成機構を解明した(Chikashige et al., 2006)。さらに、テロメアの核膜局在が bouquet 形成に不可欠であることを示すとともにその分子機構を明らかにした(Chikashige et al., 2009, 2010)。即ち、分裂酵母間期核におけるテロメアの核膜局在は、研究代表者らが同定した核内膜タンパク質 Bqt4 へ、テロメア結合タンパク質 Rap1 が結合することによるものであった。核膜とテロメアとの距離を比較すると、bqt4 破壊株において、明らかに、テロメアの核膜からの乖離が認められた。その後、我々は、非テロメア・非セントロメア領域における核膜局在の可能性を調べる目的で、予備的に選んだ 5 カ所の染色体領域へ lacO 配列を挿入し、これを lacI-GFP により可視化した細胞株を用いて、核膜との距離を測定し、染色体領域によっては、核膜近傍に局在する領域や核の内奥部に局在する領域のあることを見出していた

2. 研究の目的

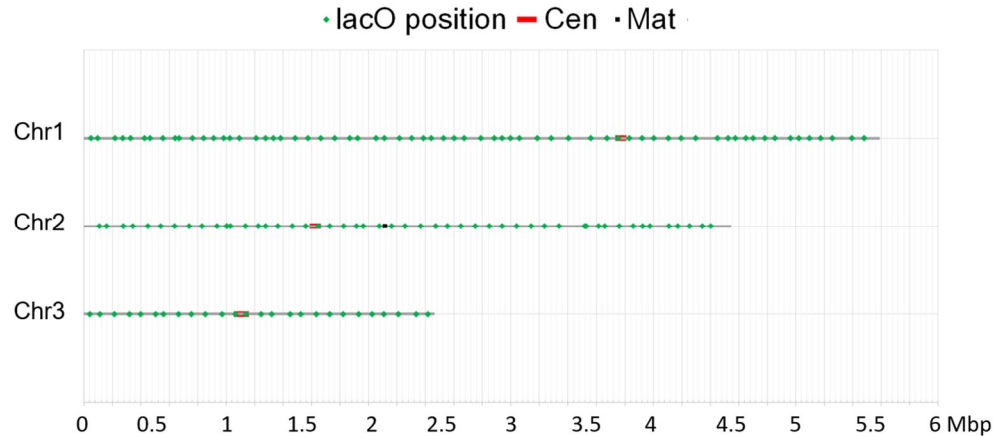
本研究では、染色体と核膜との相互作用の分子機構を理解するために、分裂酵母間期核における、染色体と核膜との距離を染色体全域にわたり計測し、染色体全域にわたる、核膜からの距離に基づく、染色体の核内配置マップの作製を目指す。染色体機能と核膜との相互作用ないしは、核内配置の制御機構の理解するために、転写などの染色体機能と染色体の核内配置の関係を解析する。これまで、分裂酵母では、テロメアやセントロメアについては、その核膜局在が明らかになっているが、それ以外の染色体領域については、不明の点が多い。本研究が目指す染色体全域にわたる、核膜からの距離のマップは、染色体機能と染色体の核内動態との関連解明において将来にわたり、重要な基本情報を提供することが期待される。

3. 研究の方法

これまでに、情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・フロンティア創造総合研究室において、分裂酵母染色体の全域から約 100kb ごとに 140 カ所余りの染色体領域に対し、lacO 配列を挿入し、lacI-GFP により可視化した分裂酵母株のライブラリーが作成されている(Fig.1)。本研究では、まず、この約 140 株に対して、核膜の可視化マーカーを赤色蛍光タンパク質により導入する。得られたそれぞれについて、各可視化領域と核膜との位置関係を蛍光顕微鏡観察により計測する。蛍光顕微鏡観察による染色体領域と核膜との距離測定には、観察データから自動的に細胞核を

検知し、距離を計測可能にするアルゴリズムを構築し、計測のハイスループット化を図った。

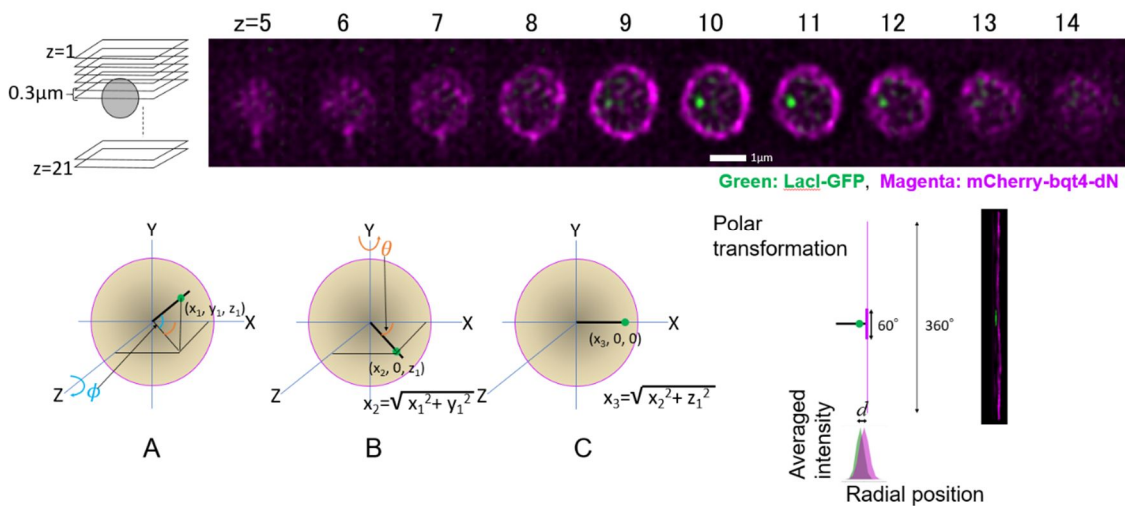
Fig. 1 分裂酵母染色体のlacO/lacI可視化ライブラリー



第1染色体(5.6Mb)について、66カ所、第2染色体(4.5Mb)について、51カ所、第3染色体(2.5Mb rRNA 遺伝子領域を除く)について26カ所、合計143カ所のlacO/lacI-GFPにより可視化した位置を示す。

核膜と染色体領域の距離の測定では、核膜と染色体領域とをそれぞれ、LacI-GFP と mCherry-bqt4-dN によって可視化された分裂酵母細胞を 0.3 ミクロンごとに、21 枚にわたり z-stack を撮影したものをを用いて、核膜画像から、核の中心座標を算出し、その座標を中心として、z 軸 (Fig.2 A) さらに、y 軸 (Fig.2 B) について回転し、GFP シグナルの座標が x 軸上の点となるように (Fig.2 C) 簡略化したうえで、Polar transformation を行い、核膜シグナルと GFP シグナルの距離を測定した (Fig.2)

Fig. 2 核膜と染色体領域との距離測定



4. 研究成果

分裂酵母全ゲノムにわたり、約 100kb 毎に lacO 配列を挿入した 143 株からなる可視化ライブラリーに対し、核膜可視化マーカー遺伝子導入を行った。また、染色体領域と核膜との距離を計測するにあたり、蛍光顕微鏡による観察条件を検討、確立するとともに、核膜と染色体領域との距離測定のための画像解析プログラムの構築を行った。これによって、第1染色体(5.6Mb)について、66カ所、第2染色体(4.5Mb)について、51カ所、第3染色体(2.5Mb rRNA 遺伝子領域を除く)について26カ所、合計143カ所の染色体領域の核膜との距離について、すべての測定を完了した。この結果、分裂酵母の3本の染色体のうち、第1第2染色体にくらべ、rRNA 遺

伝子領域を含む第3染色体が、平均的に核の内部に位置することが判明した。また、第1第2染色体には、500Kbから1Mbにわたって、核膜縁辺部に局在する領域が複数存在することや、第二染色体の左腕部において、およそ1.5Mbp（第2染色体の約30%）にわたり、核膜との距離が約300kbごとに周期的に変動している領域の存在が見出された。この領域について、さらに詳細な解析をすすめるために、この領域内のあらたな9カ所にlacO配列を挿入し、核膜との距離を測定し、先に見出した周期性の存在を確認することができた。以上の解析に加え、lacO配列挿入によるその周辺遺伝子への物理的、遺伝的な影響を調べるために、一連の測定を行ったlacO配列挿入部位、核膜可視化株のうち、7株を選び、これらにおける遺伝子発現の変化をDNAマイクロアレイを用いて測定した。その結果、lacO配列挿入部位周辺を含み、遺伝子発現には、目立った変動は、みとめられなかった。本研究課題において作成した、分裂酵母の全ゲノムにわたる染色体領域の核内配置マップは、複製や転写などの染色体機能とその核内配置の関係について解析を行う上で、重要なベースデータとなるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近重裕次、松田厚志、荒神尚子、福田紀子、佐伯恵里、岡正華澄、丁 大橋、森 知栄、原口徳子、平岡 泰
2. 発表標題 分裂酵母染色体核内配置マップの作成
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岡正 華澄 (Okamasa Kasumi)		
研究協力者	松田 厚志 (Matsuda Atsushi)		
研究協力者	荒神 尚子 (Koujin Takako)		