

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07281

研究課題名(和文) コンデンシンを介したDNA超らせん構造の制御機構とその生理作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of condensin-mediated control of DNA supercoiling and its physiological roles

研究代表者

須谷 尚史 (Sutani, Takashi)

東京大学・定量生命科学研究所・講師

研究者番号：30401524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、染色体凝縮の駆動因子コンデンシンがどのように染色体凝縮を引き起こしているのかを解明することを目的とした。技術的困難等により当初予定したように研究は進展しなかったが、コンデンシンに類似したSmc5/6複合体がDNAに正の超らせんが蓄積した染色体領域を認識することを示す結果を得ることができた。Smc5/6の分子機能を理解する上で重要な知見であるとともに、Smc5/6がDNAの超らせん状態を計測するプローブタンパク質として利用できる可能性を示す結果であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コンデンシンやSmc5/6複合体は、遺伝情報が子孫細胞に正確に伝達されてゆくために不可欠な役割を果たす因子である。これらの因子の機能異常は発がんや先天性遺伝疾患の原因となることが知られている。本研究結果はコンデンシンやSmc5/6複合体が細胞内で果たす役割を明らかにする一歩となるものである。染色体凝縮などの染色体高次構造の制御においてDNA超らせんが果たす役割は、これまでも示唆はされているが、未解明の部分が多い。これは染色体DNAの超らせん状態を計測する手法が整備されていないためである。本研究の知見を活用すると、超らせん状態計測の新技法が開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate how condensin, a key player of mitotic chromosome condensation, drives chromosome condensation at molecular level. Research did not progress as initially planned due to technical difficulties. However, we obtained the results showing that the condensin-like Smc5/6 complex recognized chromosomal regions with accumulated DNA positive supercoiling. This result is important for understanding the molecular function of Smc5/6. It also implies that Smc5/6 can be used as a probe protein to measure the supercoiling state of DNA.

研究分野：染色体の分子生物学

キーワード：染色体 染色体凝縮 コンデンシン Smc5/6 DNA超らせん

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の実体である染色体は、細胞分裂に先立って凝縮し特有の棒状の形態に変化することが知られる。この染色体凝縮は、遺伝情報を二つの子孫細胞へ分配する上で不可欠な事象である。これまでの研究によって、染色体凝縮を駆動する主要な因子はコンデンシンと呼ばれるタンパク質複合体であることが明らかとなっていた。コンデンシンの機能が阻害されると正確な染色体分配が妨げられ、染色体の断裂や染色体数の不均一化が引き起こされる。コンデンシンはまた、間期(細胞分裂時でない時期)の核中においても DNA 損傷修復や転写の制御などに一定の役割を有していると考えられている。当該研究分野における現在未解明の大きな問題に、コンデンシンはどのような分子活性によって染色体の高次構造を制御し、染色体凝縮を引き起こしているのだろうか、というものがある。申請者は、コンデンシンは染色体上で転写活性が強い領域に高い親和性を示すこと、結合している DNA には単鎖 DNA 構造(二重らせん構造が解けた状態の DNA)が含まれていること、コンデンシンはその単鎖 DNA 構造の解消(二重らせんへの巻き直し)を行っていることを見出していた<sup>1</sup>。この細胞内で観察されたコンデンシンの役割は、コンデンシンが試験管内で示す「DNA に正の超らせんを導入する活性」を反映するものだと推察された。

## 2. 研究の目的

本研究では、コンデンシンがどのように染色体凝縮を引き起こしているか、また間期核中でどのように染色体高次構造を制御しているかを分子レベルで理解することを目的とした。上述の背景を踏まえて、コンデンシンが DNA の超らせん状態を制御しているという作業仮説の検証を当初の主たる研究目的とした。

## 3. 研究の方法

既報のビオチン標識ソラレンを用いる手法<sup>2</sup>で、染色体 DNA の超らせん密度をゲノムワイドに計測することを研究開始時点での主たる研究手法としていた。しかし、この方法の利用には感度と再現性の点で問題が大きいことが研究を進める過程でわかってきた。超らせん密度計測のための新手法開発の一環として、超らせん密度によって結合親和性が変化するような DNA 結合タンパク質を見だし、これを検出プローブとして利用することを考え、研究を遂行した(研究成果 1)。コンデンシンについては、新たな分子活性を有することが他研究室により近年報告された。これはコンデンシンが DNA にループ状の構造を導入するという活性<sup>3</sup>であり、精製タンパク質を用いた生化学実験で見出された。この新しい活性に基づいて凝縮染色体の構造を理解しようという動きが世界で活発となった。この点を踏まえ、本研究においても凝縮染色体上にコンデンシンに由来するループ構造が存在するのかを Hi-C 法等の最新のゲノム学的手法を用いて検討することとした(研究成果 2)。最後に、コンデンシン変異体と遺伝学的相互作用を示す新規変異を分裂酵母において取得し、コンデンシンの機能や制御についての理解を深めることを試みた(研究成果 3)。

## 4. 研究成果

(1) コンデンシンと類似した複合体に Smc5/6 複合体がある。この複合体の出芽酵母染色体上における結合箇所は、隣接する遺伝子が収束的な配置を取っている遺伝子間領域(いわゆる convergent site)であることがほとんどなのだが、全ての convergent site に結合するわけではないことが知られていた<sup>4</sup>。どのような特徴を持つ遺伝子間領域に結合するのかを理解するために、機械学習を用いた結合部位予測モデルの作成を行なった。DNA 配列の様々な特徴を入力とした予測モデルを作成し、比較検討することで、Smc5/6 の結合位置を説明する主要な特徴量を見出すことが目的である。この解析により、Smc5/6 の結合箇所では隣接する直近の遺伝子だけでなく、±5 kb 程度の近隣領域に存在する全ての遺伝子が収束的な配置をとっている傾向が強いことが見出された。また、該当の近接遺伝子の発現量も結合位置の予測に一定の効力を示した。遺伝子の転写は下流領域に正の超らせんを誘起する。複数の近接遺伝子が収束的配置を取るゲノム上の箇所(super-convergent site)では超らせん密度が高い正の値をとることが予測され、Smc5/6 はこのような DNA 構造を認識している可能性が想起された。この仮説を実験的に検証することも行った。スウェーデン・カロリンスカ研究所 Camilla Björkegren 博士と共同研究を行い、酵母染色体上に高い発現活性を示す遺伝子が収束的に配置された箇所を人為的に作製した。すると Smc5/6 複合体はこの部位に結合するようになること、結合は遺伝子発現に依存す

ることが確かめられた。以上の結果は、Smc5/6 複合体は DNA の正の超らせん密度を認識して結合することを示唆する。今後さらに検証を重ね、Smc5/6 が認識する DNA 構造の詳細を理解してゆくことが重要であると考えている。もし正の超らせん状態を認識していることが事実となれば、Smc5/6 を利用して染色体上の超らせん密度を計測することが可能となるかもしれない。染色体上の超らせん密度を高い感度と解像度で計測する手法は現在のところないので、このような技術の開発がもたらす知見は大きなものとなることが期待される。Smc5/6 は、染色体の大規模再編を防ぐことでゲノム情報維持に寄与するタンパク質である。しかし、どのような分子活性によってこの機能を果たしているのかは未だ不明である。今回の研究で得られた知見は Smc5/6 複合体の果たす役割を理解する上でも重要な意味を持つものだと考えられる。本項目の研究成果については、投稿論文を現在準備しているところである。

(2) コンデンシンのヒト染色体上での結合位置を ChIP-seq 法で決定し既に報告<sup>1</sup>していたが、より検出感度を向上させる工夫について論文化し報告した<sup>5</sup>。ここで得た知見は、他の核タンパク質の ChIP-seq 解析を行う際にも有用なものであった。次に、次世代 DNA シークエンサーを活用して染色体の高次構造を可視化する技術、Hi-C 法を用いてヒト培養細胞中の染色体高次構造の解析を行った。その結果、間期染色体に見られる TAD と呼ばれる構造が染色体凝縮に伴って消失すること、凝縮染色体上には染色体の全域にわたって 10 Mb 程度の大きさの単位からなる構造が存在することを見出した。Hi-C 法による染色体研究は現在非常に競争が激しくなっており、同様の発見が詳細なモデリング結果と合わせて他研究室によって先に発表されてしまっている<sup>6</sup>。そこで、Hi-C 法を改良した新しい解析手法による凝縮染色体構造の可視化に現在挑戦している。Hi-C 法の最大の問題は、得られる構造情報が多数の細胞の平均像である点である。すなわち、細胞間のばらつきが大きい構造について Hi-C 法からわかることは少ない。この点を克服し一分子レベルでの高次構造情報を取得する方法として、ChIA-drop 法が考案されている<sup>7</sup>。非常に複雑な実験手法であるが、ヒト培養細胞に適用して結果を得ることができるようになってきたところである。この方法で凝縮染色体を解析したところ、染色体の一部領域に数 kb のオーダーの大きさの揃ったループが連続して形成されている様子が観察された。非常に興味深い構造と考えており、その詳細を理解するための実験を現在続けているところである。Hi-C、ChIA-drop などの手法が次々と開発され、これまで 100 年以上の間謎であり続けた染色体の高次構造に肉薄することが可能となってきているのが現在の染色体研究の状況である。これら最新技術を十分に活用すること、また様々な工夫で解像度の限界を押し広げることを通じて、染色体の相貌がさらにつぶさに理解できるようになってゆくと期待される。

(3) 申請者はこれまでに、分裂酵母コンデンシン変異体の復帰変異体としてメディエータ複合体のサブユニット Med6 の変異を取得し、報告している<sup>1</sup>。コンデンシンと機能相関を示す他の因子を同定するために、復帰変異のさらなる単離・解析を行った。その結果、Pli1 という SUMO E3 リガーゼが *cut3* コンデンシン変異体の復帰変異体として繰り返し単離されることを見出した。コンデンシンが SUMO 化によって制御される可能性が示唆された。しかし、この知見は他研究室によってより詳細な解析とともに論文発表がなされたところである<sup>8</sup>。

#### <引用文献>

- ① Sutani *et al.*, Condensin Targets and Reduces Unwound DNA Structures Associated With Transcription in Mitotic Chromosome Condensation. *Nat. Commun.* (2015) 6:7815
- ② Naughton *et al.*, Transcription Forms and Remodels Supercoiling Domains Unfolding Large-Scale Chromatin Structures. *Nat Struct Mol Biol* (2013) 20:387-395
- ③ Ganji *et al.*, Real-time Imaging of DNA Loop Extrusion by Condensin. *Science* (2018) 360:102-105
- ④ Jeppsson *et al.*, The Chromosomal Association of the Smc5/6 Complex Depends on Cohesion and Predicts the Level of Sister Chromatid Entanglement. *PLoS Genet* (2014) 10:e1004680
- ⑤ Sakata *et al.*, ChIP-seq analysis of condensin complex in cultured mammalian cells. *Methods Mol Biol* (2017) 1515:257-271
- ⑥ Gibcus *et al.*, A Pathway for Mitotic Chromosome Formation. *Science* (2018) 359:eaao6135
- ⑦ Zhen *et al.*, Multiplex Chromatin Interactions With Single-Molecule Precision.

Nature (2019) 566:558–562

⑧ Xu and Yanagida, Suppressor Screening Reveals Common Kleisin-Hinge Interaction in Condensin and Cohesin, but Different Modes of Regulation. Proc Natl Acad Sci USA (2019) 116:10889–10898

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakata Toyonori, Shirahige Katsuhiko, Sutani Takashi	4. 巻 1515
2. 論文標題 ChIP-seq Analysis of Condensin Complex in Cultured Mammalian Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 257-271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-6545-8_16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takashi Sutani, Mai Ishibashi, Masashige Bando, Atsunori Yoshimura, Katsuhiko Shirahige
2. 発表標題 Behavior of cohesive cohesin complex on human chromosomes
3. 学会等名 EMBO workshop “Organization of bacterial and eukaryotic genomes by SMC complexes”（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Sutani, Kristian Jeppsson, Katsuhiko Shirahige, Camilla Bjorkengren
2. 発表標題 Characteristics of Smc5/6 binding sites revealed by machine learning-based modeling
3. 学会等名 The 11th 3R & 3C symposium（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sujiraporn Pakchuen, Mai Ishibashi, Katsuhiko Shirahige, Takashi Sutani
2. 発表標題 Physical association of <i>S. cerevisiae</i> polo-like kinase Cdc5 with chromosomal cohesin facilitates DNA damage response
3. 学会等名 2nd meeting on SMC proteins（国際学会）
4. 発表年 2017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	ビョーケグレン カミィラ (Bjorkegren Camilla)		
連携研究者	坂田 豊典 (Sakata Toyonori)  (40795530)	東京大学・定量生命科学研究所・助教  (12601)	
連携研究者	藤木 克則 (Fujiki Katsunori)  (10646730)	東京大学・定量生命科学研究所・助教  (12601)	