

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14627

研究課題名(和文)一本鎖rDNAを介したコンデンシンの染色体結合機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of condensin binding onto chromosomal DNA through single-stranded rDNA

研究代表者

矢野 晃一 (Yano, Koichi)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特任研究員

研究者番号：30624712

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):染色体DNAの凝縮と分配には原核生物から真核生物まで広く保存されるコンデンシンが重要な役割を果たしている。研究代表者は以前、枯草菌コンデンシンは転写活性の高いrDNAに結合することを示し、報告している(Yano and Niki, Cell Rep 2017)。本研究では、枯草菌コンデンシンがrDNAへの結合にプロモーター直下の100～500塩基の領域に生じた一本鎖DNAが重要であることを示した。また、枯草菌コンデンシンが結合できないrDNAの変異体では、このプロモーター直下の100～500塩基の領域において一本鎖DNAの形成が野生型に比べ低下していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コンデンシンは原核生物から真核生物まで染色体上のような配列を認識し、またどのように結合するかについて統一的な知見が得られていない。さらにコンデンシンは二本鎖DNAの他に一本鎖DNAにも結合活性を持ち、この2つの活性がどのように染色体構築に関わっているかは不明であった。研究代表者の以前の研究でコンデンシンがrDNAに結合することを示していた。今回の研究で、一本鎖DNAへの結合活性はrDNA領域、さらに、プロモーター直下の数百塩基の領域に結合するために重要であることを示した。この成果はこれまで不明であったコンデンシンの一本鎖DNAへの結合活性の生物学的意味に迫る重要な知見である。

研究成果の概要(英文):Condensin plays a crucial role for compaction and segregation of chromosomal DNA from prokaryotes to eukaryotes. I previously reported that *Bacillus subtilis* condensin topologically binds to highly transcribed rDNA (Yano and Niki, Cell Rep 2017). In the present study, I show that a single-stranded DNA segment formed at 100 - 500 bp downstream the rDNA promoter is important for the binding of the condensin onto rDNA. Furthermore, it has been demonstrated that the single-stranded DNA formation at the 100 - 500 bp segment downstream the promoter is hindered in rDNA mutants to which condensin cannot bind.

研究分野：分子遺伝学、分子生物学

キーワード：一本鎖DNA rDNA コンデンシン Sodium bisulfite 枯草菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA は細胞の 1000 倍以上の長さがあり、細胞内に密に凝縮されている。DNA 凝縮にはヒトからバクテリアまでコンデンシンが関わっている。コンデンシンは特定の染色体領域に結合するが、それがどのようにして決まるのかは明らかとなっていない。研究開始当初は、以下の 2 点について明らかにしていた。

(1) バクテリアコンデンシンは一本鎖 DNA にトポロジカル結合する。

(2) バクテリア細胞内ではコンデンシンは rDNA 領域に結合する (Yano and Niki, Cell Rep 2017)。

しかしながら、バクテリアコンデンシンが rDNA 領域内のどのような配列や構造を認識して結合するのかについては不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、バクテリアコンデンシンの結合領域である rDNA において、一本鎖 DNA 領域を *in situ* で特定することを目的とした。rDNA 内の一本鎖 DNA 領域を特定することでバクテリアコンデンシンの結合領域を明らかにすることを目指した。また、これまでの解析で、バクテリアコンデンシンが結合することができない rDNA の変異体を多数取得している。この変異体では野生型に比べ、露出している一本鎖 DNA の領域や頻度が低下していることが予想された。この点についても本研究で解析した。

### 3. 研究の方法

一本鎖 DNA を検出する方法として、亜硫酸水素ナトリウム (Sodium bisulfite、以下 Bisulfite と呼ぶ) を用いた。Bisulfite は一本鎖 DNA 中のシトシン塩基を脱アミノ化し、ウラシルに変換する。Bisulfite 処理後の DNA を鋳型として PCR 増幅すると、チミンが取り込まれる (CT 変換)。その一方で、二本鎖 DNA 中のシトシンは Bisulfite による攻撃を受けない。これまで、Bisulfite を用いた一本鎖 DNA の検出法は、主に定性的な解析に用いられてきた。本研究では、定量的に一本鎖 DNA の露出頻度を測定するため、次世代シーケンサーを使った。可能な限り生きた細胞内での一本鎖状態を調べるため、細胞を直接 Bisulfite 処理し、DNA を抽出後 PCR 増幅した。野生型の rDNA 領域全体に渡って一本鎖 DNA の露出頻度を調べ、さらに変異型 rDNA の一本鎖 DNA の露出頻度と比較した。

### 4. 研究成果

Bisulfite と次世代シーケンサーを使った *in situ* での一本鎖 DNA 領域の検出はそれまでに報告がなかったため、まずは実験系の構築を行った。そして構築できた実験系を用いて、枯草菌細胞内で rDNA 領域における一本鎖 DNA の露出頻度を調べた。その結果、シトシン塩基によって様々な露出頻度で一本鎖 DNA を形成していることがわかった。このことは、数塩基レベルで局所的に開裂しやすい領域とそうでない領域があることを示唆していた。さらに、開裂しやすい DNA 配列は一般的には低 GC 含量の領域であるが、そのような部分よりもむしろシトシンが数塩基連続するような高 GC 含量の配列で一本鎖 DNA になりやすい傾向にあるということも予期せず明らかとなった。

次に転写による一本鎖領域形成への影響を調べるために、転写プロモーターを欠損した変異 rDNA を用い同様に解析した。その結果、rDNA 全体に渡って一本鎖形成が低下していた。さらに、rDNA 後半においては、非鋳型鎖では野生型 rDNA の方が一本鎖が多かったが、鋳型鎖では野生型 rDNA と一本鎖形成頻度は同程度であった。このことは、rDNA 後半では鋳型鎖と新生 rRNA 鎖との間で DNA:RNA ハイブリッドを形成していることを示唆していた。

最後に、コンデンシンが結合することができない 5S rRNA 遺伝子の一部 (51 塩基) を欠失した rDNA/ 5S で一本鎖 DNA 形成頻度を調べた。その結果、rDNA/ 5S では、野生型に比べ、プロモーターの下流 100~500 塩基の領域で一本鎖形成頻度が顕著に低下していた。このことから、コンデンシンが rDNA/ 5S に結合することができない原因が、このプロモーターの下流 100~500 塩基の領域で一本鎖 DNA の形成頻度が低下していることによると考えられた。さらに、コンデンシンが結合できない他の rDNA の欠失変異体でも同様にこのプロモーター下流 100~500 塩基の領域で、野生型に比べて一本鎖 DNA の形成頻度が低下していた。以上の結果から、枯草菌コンデンシンが rDNA に結合する際、このプロモーター下流 100~500 塩基の領域が重要であることが明らかとなった。

現在、以上の成果をまとめ国際誌に投稿中である。また、補助事業期間中、実験手法の論文を一報執筆した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Koichi Yano, Koichiro Akiyama, and Hironori Niki	4. 巻 2004
2. 論文標題 In Vivo and In Vitro Assay for Monitoring the Topological Loading of Bacterial Condensins on DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 181-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-9520-2_14	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢野晃一、野口英樹、仁木宏典
2. 発表標題 コンデンシンがロードするrDNA領域に生じる一本鎖DNAの1塩基レベルでの検出
3. 学会等名 第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野晃一、野口英樹、仁木宏典
2. 発表標題 バクテリアコンデンシンがロードするrDNAに生じる一本鎖DNA領域の1塩基レベルでの同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野晃一、野口英樹、仁木宏典
2. 発表標題 rDNAで形成される一本鎖DNA領域の1塩基レベルでの同定
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鼻崎美紀、武藤秀樹、矢野晃一、仁木宏典、増本博司
2. 発表標題 レトロトランスポゾンTy1中のDNAのcruciform構造を中心とした遺伝子サイレンシング機構
3. 学会等名 第53回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Masumoto, Miki Hanasaki, Hideki Muto, Koichi Yano, Hironori Niki
2. 発表標題 The cruciform-centered region inside budding yeast Ty1 retrotransposon manages two distinct transcriptional modes: the gene silencing and the activation of Ty1 transcription
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meetings
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------