

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06503

研究課題名（和文）相同染色体対合に寄与するRNAタンパク質複合体のダイナミクス

研究課題名（英文）Dynamics of RNA-protein complex in homologous chromosome pairing

研究代表者

丁 大橋 (Ding, Daqiao)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所バイオICT研究室・嘱託

研究者番号：50359080

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：相同染色体の対合は親から受け継いだ相同染色体が互いを見つけて接着する過程で、正常な対合が相同組換えに不可欠である。対合の分子機構を解明するのが本研究課題の目的である。本研究では、長鎖非コードRNAローカスが対合に寄与し、複数のRNA転写終結因子であるSmpたんぱく質がRNAと相分離したドロップレットを形成し、異なるRNAを持つドロップレット同士が融合できず、同じRNAを持つドロップレットしか融合できないことによって相同染色体対合の特異性が持たされたことを明らかにした。さらに、試験管内でSmpタンパク質のドロップレット形成を再現し、RNAによってドロップレットの物理的性質が変わることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減数分裂の最初のステップとして相同染色体が互いを見つけて対合しなければならないが、相同染色体対合のメカニズムが未だに解明されていない部分が多い。対合が失敗すると、その後の相同組換えが大きく下がり、正常の配偶子の形成に影響を及ぼす。人間の場合は、不妊症や流産を引き起こす可能性が高まる。従って、相同染色体対合のメカニズムの解明が生物学の基本問題であり、未解決である。本研究の研究成果は分裂酵母における対合のメカニズムの解明に貢献し、それは他の生物も類似する普遍的なメカニズムではないかを示唆した。

研究成果の概要（英文）：Pairing of homologous chromosomes is a process in which homologous chromosomes inherited from parents find each other and adhere to each other. Normal pairing is essential for homologous recombination. The purpose of this research is to clarify the molecular mechanism of pairing. In this research, we found that long noncoding RNA loci contributed to pairing, and Smp proteins, which are multiple RNA-binding transcription termination factor, formed droplets with RNA through phase separation. We found that droplets with different RNAs could not fuse with each other, and only droplets with the same RNA could fuse with each other, which gave the specificity of homologous chromosome pairing. In addition, we reproduced droplet formation of Smp and RNA in vitro, and proved that physical properties of droplets were changed by the species of RNA.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：相同染色体対合 相分離 長鎖非コードRNA RNA結合タンパク質 in-vitro 解析 分裂酵母 減数分裂

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

減数分裂前期の主なイベントとして、DNA の複製、相同染色体の対合、シナプシスと組換えが行われる。そのうち、相同染色体の対合は親世代から受け継いだ相同染色体が互いを見つけて接着する過程であり、正常な対合が相同組換えおよび相同染色体の還元型分配に不可欠である。相同染色体の対合に関する研究は減数分裂の初期段階の観点から非常に重要で、特に相同染色体の相互認識機構がもっともミステリに満ちた問題で、多くの研究者を減数分裂の研究分野に引き込むきっかけでもある。しかし、相同染色体同士が如何にして相手を見つけて対合していくのかはほとんど解明されていない。以前本研究代表者は分裂酵母の *sme2* ローカスが対合のホットスポットで、*sme2* 遺伝子から転写される lncRNA である *sme2*-RNA が染色体上に滞留し、RNA ドットを形成することによって組み換え非依存的に相同染色体の認識・対合を促進することを発見した (Ding et al. Science 2012)。その後、*sme2*-RNA ドットに結合するタンパク質を分裂酵母蛍光タンパク質ライブラリデータベースから、核内蛍光ドットを示すものを検索し、*sme2* ローカスと共同在を示すタンパク質 (Smp タンパク質) を 10 個同定した。それらのタンパク質を遺伝子破壊および条件的シャットオフを行い、*sme2* サイトの対合活性に影響を与える Smp タンパク質を 5 個同定した。Smp タンパク質の染色体結合部位を ChIP-seq 法により同定し、さらにゲノムワイド LacO/lacI-GFP ライブラリを作成し、*sme2* サイト以外に、それぞれの染色体に一個の lncRNA/Smp ドットがあることを見出し、対合のホットスポットであることを明らかにした。しかし、lncRNA/Smp ドットがどのようなメカニズムで対合に寄与するのか不明である。

2. 研究の目的

本研究は分裂酵母減数分裂における非コード RNA による対合の分子機構を解明するとともに、相同組換え非依存的相同染色体の相互認識・対合機構にタンパク質と RNA の液液相分離の役割の解明を目的としている。

3. 研究の方法

(1) RNA ドットを Single molecule fluorescence in situ hybridization (smFISH) 法で観察すると、丸い形状を示すことから、そのようなドットの形成に液液相分離が関与していることを予想した。相分離の関与を確かめるために、減数分裂に誘導された生細胞を顕微鏡観察しながら相分離を破壊する 1,6-hexanediol で処理し、lncRNA/Smp ドットの変化や相同染色体対合に対する影響を直接に観察する。

(2) Smp たんぱく質がどのように長鎖非コード RNA を認識し、結合するのかを明らかにするために、機械学習の手法を導入し、ゲノムワイド ChIP-seq のデータから、二種類の Smp たんぱく質の共通する RNA 結合モチーフを探索する。

(3) RNA 配列とタンパク質の種類によって、どのようにドロップレットの性質が変わるかを解析するために、Smp タンパク質及び lncRNA を精製し、試験管内にドロップレットを再構成することを試み、ドロップレットの形成や物理的特性と lncRNA の関係性を探る。

4. 研究成果

(1) 対合に非コード RNA 及び転写終結因子が寄与するメカニズムを解明するために、液液相分離の関与を検証した。その結果、Smp タンパク質と長鎖非コード RNA が液液相分離したドロップレットを形成することを発見した。ドロップレットが 1,6-hexanediol 処理で破壊され、対合している相同染色体が離れてしまう。その後、1,6-hexanediol を培地から抜くと、再びドロップレットが形成され、対合も回復することから、Smp タンパク質と長鎖非コード RNA が一緒になって形成するドロップレットが相同染色体を繋ぐ役割を果たすことが分かった。

(2) Smp たんぱく質がどのように長鎖非コード RNA を認識し、結合するのかを明らかにするために、機械学習の手法を導入し、ゲノムワイド ChIP-seq のデータから、Seb1 および Rhn1 という二種類の Smp たんぱく質の RNA 結合モチーフを探索した。その結果、それらのたんぱく質における共通の RNA 結合モチーフを発見した。そのモチーフの有効性を確かめるために、長鎖非コード RNA である *Sme2* 及び *Omt3* にあるモチーフの変異株を作成した。それらのモチーフの変異株では、対合及び Smp ドットの形成が有意に低下した結果が得られた。

(3) RNA 配列とタンパク質の種類によって、どのようにドロップレットの性質が変わるかを解析するために、試験管内に精製タンパク質ドロップレットを再構成することを試みた。その結果、Smp タンパク質のうち、Seb1 タンパク質単独でも相分離し、試験管内にドロップレットを形成できることが分かった。一方、Rhn1 タンパク質は単独で相分離しないが、Seb1 のドロップレット形成を促進し、しかもそのドロップレットに濃縮される。さらに、lncRNA が存在すると、Seb1

ドロップレットの形成がさらに促進された。

(4) Seb1-RNA ドロップレットを光褪色後蛍光回復法(FARP)で解析すると、異なる RNA 種類を含むドロップレットが異なる FRAP プロファイルを示すことから、RNA の種類によってドロップレットの物理化学性質を決定されることが分かった。さらに、同じ RNA を含むドロップレット同士がお互い融合しやすい傾向を示すことから、相同染色体相互認識のメカニズムが転写される RNA と Seb1 など Smp タンパク質から作られる染色体上のドロップレットが大きいな役割を果たすことがほぼ確実になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ding Da-Qiao, Okamasa Kasumi, Yoshimura Yuriko, Matsuda Atsushi, Yamamoto Takaharu G., Hiraoka Yasushi, Nakayama Jun-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 The mechanism of homologous chromosome recognition and pairing facilitated by chromosome-tethered protein-RNA condensates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.12.24.573283	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakuno Takeshi, Tashiro Sanki, Tanizawa Hideki, Iwasaki Osamu, Ding Da-Qiao, Haraguchi Tokuko, Noma Ken-ichi, Hiraoka Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Rec8 Cohesin-mediated Axis-loop chromatin architecture is required for meiotic recombination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkac183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakuno Takeshi, Tashiro Sanki, Tanizawa Hideki, Iwasaki Osamu, Ding Da-Qiao, Haraguchi Tokuko, Noma Ken-ichi, Hiraoka Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Rec8 cohesin-mediated axis-loop chromatin architecture is required for meiotic recombination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.12.09.472021	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ding Da-Qiao, Matsuda Atsushi, Okamasa Kasumi, Hiraoka Yasushi	4. 巻 130
2. 論文標題 Linear elements are stable structures along the chromosome axis in fission yeast meiosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chromosoma	6. 最初と最後の頁 149 ~ 162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00412-021-00757-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ding DQ, Matsuda A, Okamasa K, Hiraoka Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 The Linear Element is a Stable Structure Along the Chromosome Axis in Fission Yeast.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.07.03.185785	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 T, Yamada S, Ding DQ, Fujita Y, Takaya E, Hiraoka Y, Murakami H, Ohta K.	4. 巻 743
2. 論文標題 Maintenance of meiotic crossover against reduced double-strand break formation in fission yeast lacking histone H2A.Z.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 144615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2020.144615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ding DQ, Okamasa K, Katou Y, Oya E, Nakayama J, Chikashige Y, Shirahige K, Haraguchi T, Hiraoka Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Chromosome-associated RNA ;protein complexes promote pairing of homologous chromosomes during meiosis in Schizosaccharomyces pombe.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13609-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto TG, Ding DQ, Nagahama Y, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Histone H2A insufficiency causes chromosomal segregation defects due to anaphase chromosome bridge formation at rDNA repeats in fission yeast.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43633-5 Abstract	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丁大橋
2. 発表標題 減数分裂期相同染色体対合に寄与する lncRNA構造体
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丁大橋
2. 発表標題 lncRNA droplets mediate homologous chromosome pairing in meiosis
3. 学会等名 日本分子生物学会2020年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丁大橋
2. 発表標題 Phase separation of RNA processing proteins is involved in homologous chromosome pairing during meiotic prophase
3. 学会等名 10th International Meeting on Fission Yeast（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丁大橋
2. 発表標題 相同染色体ペアリングにおける液相分離の役割
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丁大橋
2. 発表標題 分裂酵母における相同染色体認識のメカニズム
3. 学会等名 酵母研究会第87回講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 丁 大橋	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 400
3. 書名 相分離生物学の全貌	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生物情報プロジェクト https://www2.nict.go.jp/bio/seibutsu/CellMagic/about.html 情報通信研究機構研究報告 Vol.66 No.1 2020 http://www.nict.go.jp/publication/shuppan/kihou-journal/houkoku66-1/book/html5.html#page=31 生命の遺伝情報継承に重要な相同染色体対合を促進する仕組みを発見 https://www.nict.go.jp/press/2019/12/10-1.html</p>
--

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
---------	---------