

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：26402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06492

研究課題名(和文)染色体を再編成に導くコードRNA介在型染色体合着の解明

研究課題名(英文)Elucidation of coding RNA-mediated chromosome adhesion, inducible for chromosome rearrangement

研究代表者

中沢 宜彦 (NAKAZAWA, Norihiko)

高知工科大学・環境理工学群・助教 (PD)

研究者番号：70514751

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)：染色体が細胞分裂を経て子孫の細胞に受け継がれるときには、相同な染色体間の合着(合着)とその分離のサイクルが繰り返される。これまで相同な染色体間の合着は、タンパク質に翻訳されない非コードRNAにより促されることが示されていた。本研究では、分裂酵母細胞をモデル系とし、より普遍的なコードRNAを介して起こる新しい染色体合着の検出を目指した。研究成果として、上記合着を効率的に検出するための染色体再編法を2種類開発した(1.転座誘導法、2.部分異数性誘導法)。研究期間内にコードRNA介在型染色体合着の同定には至らなかったが、新規合着の検出を多角的に試みる有効な実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、染色体の部分重複(部分異数性)を系統的に誘導する手法を分裂酵母で初めて開発したことにある。染色体の部分重複は、当該領域に含まれる遺伝子コピー数を増加させる。遺伝子産物の不均衡が細胞に負荷を与え、種々の疾患と関連することも示唆されている。一方、この部分重複が世代を越えて受け継がれ、生物進化に寄与することも推測される。染色体生物学の優れたモデル生物である分裂酵母において、染色体部分異数性を系統的に誘導する手法が開発されたことは、病気や進化の基本原則を知る上での大きな技術的進展である。また本法を他生物種に応用することで、新しい育種法の開発も期待される。

研究成果の概要(英文)：For transmission of the chromosomes from mother cells to daughter cells, the pairing (cohesion) and separation are repeated between two homologous chromosomes at every cell division cycle. Previously, non-coding RNA-mediated chromosomal cohesion at homologous DNA sequences has been reported. In this study, I tried to identify the novel chromosome cohesion, so-called "coding-RNA-mediated chromosomal cohesion" using fission yeast cell as a model system. I developed two kinds of new methods which promote the chromosome rearrangement for efficient detection of the chromosome cohesions (1. Induced-translocation, 2. Induced-partial aneuploidy). Although the coding-RNA-mediated cohesion is not detected so far, I expect that the established methods are utilized to identify the novel cohesion effectively.

研究分野：分子生物学 染色体工学

キーワード：染色体再編成 部分異数性 分裂酵母 細胞分裂 RNA介在型染色体合着

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 染色体は長大なゲノム DNA を収納し、DNA に記録された遺伝情報を正確に子孫に継承する。体細胞分裂での姉妹染色分体や減数分裂での相同染色体のように、染色体が細胞分裂を経て受け継がれるときには、相同な染色体間の接着（以降、合着と呼ぶ）とその分離のサイクルが繰り返される。染色体間の合着はコヒーシンなどのタンパク質が担っているが、近年、RNA 分子が減数分裂時の相同染色体を合着させることが判明し、RNA が 2 つの染色体間をつなぎ留める仕組みが初めて呈示された（文献 1）。

代表者は、分裂期の染色体分配に必要なコンデンシン複合体が、染色体上に結合した RNA 分子を速やかに取り除き、姉妹染色分体を引き離していることを強く示す一連の結果を得た（文献 2-4）。この結果は、染色体上の RNA を残すか、除去するかで染色体間の合着と分離が決まることを示唆している。また、RNA 分子が液-液相分離と呼ばれる現象を通じて自己集合し、クロマチン領域間を引き寄せるとする報告にも合致する（文献 5,6）。しかし、RNA を介した染色体合着が、ダイナミックな染色体活動をどの程度普遍的に支えているのかは明らかではない。

(2) RNA を介した染色体合着の解明が進まない理由には、タンパク質に翻訳されない RNA 分子（非コード RNA）の中の特別な RNA だけが合着に関わると考えられてきたことが挙げられる。染色体上でコンデンシンが作用する RNA は非コード RNA だけではなく、100 以上の転写活性化遺伝子から転写される一般的なコード RNA である。コード/非コードに関係なく、あらゆる RNA 分子が染色体間相互作用を媒介している可能性がある。また、染色体合着は、減数分裂時の相同染色体や姉妹染色分体のような相同な DNA 配列間だけで起こるとは断言できない。前述の RNA 自身による自己集合を考えれば、相同性のない染色体領域間で合着が起こっていることも十分に考えられる。しかし、相同でない染色体領域間をコード RNA が合着させるかどうかは不明であり、この解明を試みた研究はこれまでに存在しない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、染色体再編成を人為的に誘導できる分裂酵母をモデルとし、染色体に結合したコード RNA が DNA 配列に関係なく染色体間を合着させることを明らかにする。本研究の成果は、進化の起点となるゲノム再編を再現するだけでなく、染色体数や遺伝子の並びを自由自在にデザインする新しい育種法の開発基盤となりうる。

(2) この染色体合着は、組換え反応を経て遺伝的な多様性を生み出す一方、ゲノムの恒常性を破綻させるため、通常の細胞状態では抑制されていると考えられる。本研究では、染色体上の RNA 結合を制御する因子を同定し、この RNA 介在型染色体合着を必要時にのみ活性化させる仕組みの解明も目指す。

## 3. 研究の方法

DNA 配列によらない RNA 介在型染色体合着は、染色体の構造変化が誘発されて染色体 DNA 上の組換えが起きるときに生じると推測される。そこで、本研究では、染色体の再編成や構造変化を人為的に誘導し、このとき新たに染色体上に滞留するコード RNA の同定を行う。また、当該 RNA 分子が DNA 配列に関係なく染色体間を合着させることを明らかにする。実験系としては分裂酵母細胞をモデルとし、既に確立された染色体の人為的再編成法を利用する。または新規の染色体再編法を開発して用いる。遺伝学的、および分子生物学的アプローチにより、染色体結合 RNA の機能、生理的意義の解明も試みる。

## 4. 研究成果

### (1) 人為的な染色体転座誘導法の開発

はじめに、細胞内で RNA 介在型染色体合着を誘発させるため、染色体再編成を人為的に起こす実験系の検討を行った。当初の研究計画通り、分裂酵母を用いたセントロメア破壊法（文献 7）によって染色体再編成を惹起し、染色体に結合する RNA 分子を生化学的に分離する条件を探った。しかし、予備的な RNA 回収実験の結果、セントロメア破壊法では染色体結合型新規 RNA 分子の検出は困難であると判断した。

上記結果より、RNA 介在型染色体合着の検出には、セントロメア破壊法だけでなく、別の染色体再編法が開発が必須と考えた。そこで、染色体腕部の任意領域を人為的に切り出し、同一もしくは他の染色体に転移させることを試みた。この手法は、部位特異的組み換え酵素 Cre と

その標的配列 *loxP* を用いて特定の染色体領域を切り出すという点でセントロメア破壊法と同様の手法を用いている。具体的には、染色体 DNA 上の任意の 2 カ所に *loxP* 配列を挿入した株を作製した。各 *loxP* 配列の隣には薬剤耐性遺伝子を二分割して配置し、耐性遺伝子のプロモーター側が上流、ORF 側が下流になるようにした。Cre の誘導により、環状化切除された *loxP* ペア間の染色体領域が、ゲノム上の他領域に挿入されることが PCR、およびパルスフィールドゲル電気泳動法等で確認された。当手法の開発により、染色体再編を誘導する新たな実験系として、人為的な染色体転座誘導法が加わった。

## (2) 部分異数性を系統的に誘導する手法を確立

(1) の染色体転座誘導法の改変バージョンとして、任意の染色体領域を分裂酵母ゲノム上で縦列に重複させる手法を開発した (図)。この手法は、染色体 DNA 上の 2 カ所に挿入する *loxP* 配列モジュールの挿入位置を変えることで、*loxP* 間領域の転座ではなく、当該領域のタンデムな重複を起こすというものである。ゲノムワイドに様々な染色体領域でのタンデム重複を誘導するため、*loxP* 配列を同一染色体腕部にペアで挿入した株を系統的に作製した。タンデム重複誘導領域のデザインとしては、各染色体腕部を 4 分割し、テロメア側、セントロメア側を起点として 4 段階の長さの領域を設定した。腕部ごとに 7 株、もしくは 8 株の *loxP* ペア挿入株を作製し、これまでに計 44 株を準備した。その結果、Cre の発現誘導により、分裂酵母染色体の任意の DNA 配列を最長 2.6 メガベースまで縦列に重複させることが可能であると判明した。

この手法は分裂酵母で部分異数性を系統的に誘導する初めての成果である。染色体領域の重複は、重複 DNA 配列に含まれる遺伝子コピー数増加による影響だけでなく、ゲノムワイドな転写量の増減をもたらすことが知られている。セントロメア破壊法、染色体転座誘導法では誘発できない新規染色体合着の発生が期待される。

## (3) 染色体制御因子変異体を用いたコード RNA 介在型合着検出の試みへ

(1), (2) の成果として、染色体再編を誘発する 2 つの新手法を開発した。このうち、系統的に重複配列を作り出せる (2) 部分異数性誘導法を用いて、多様な重複構造をもつ分裂酵母株を作製した。そして、これらの菌株を用いてコード RNA 介在型染色体合着を検出する実験のセットアップを行った。

当初計画では、染色体合着を促す可能性のある RNA 分子を網羅的に同定し、その後遺伝学的手法によって合着を検証するアプローチを考えていた。しかし、分裂酵母細胞における染色体結合 RNA 分子の回収量は当初の予想以上に微量であった。そこで、逆のアプローチとして、遺伝学的手法から新規染色体合着の発生を推測し、その条件において RNA 分子を絞り込む方法に計画変更した。

具体的な方法として、染色体合着タンパク質コヒーシンの高温感受性変異体を用いる。この変異体細胞内において、(2) で開発した部分異数性誘導法により染色体の任意配列を重複させる。その後、変異体増殖遅延回復の有無を指標に、新規染色体合着の発生条件 (合着が生じる重複株) を探索する。実際に、変異体の増殖遅延を回復させる重複株を探す予定であったが、時間的な制約から本研究期間内に一連の実験を完了させることはできなかった。RNA 除去機能が示唆される染色体凝縮因子コンデンシンの変異体を用いた実験も興味深く、今後の RNA 介在型合着検出の手掛かりになると考えている。

本研究は当初計画を一部変更し、染色体再編を誘発する新手法の開発に研究時間を割いた。そのため、コード RNA 介在型染色体合着自体の検出を十分試みたとは言えない。今後は遺伝学的手法だけでなく、液-液相分離解析やロングリードシーケンズ法などの手法も適宜導入し、多角的に上記合着の検出を試みる研究展開を期待したい。

## 参考文献

- 1) Ding DQ et al., Science. 2012, 336(6082):732-6.
- 2) Nakazawa N et al., Genes Cells. 2015, 20(6):481-99.
- 3) Nakazawa N et al., Open Biol. 2019, 9(10):190125.
- 4) Nakazawa N et al., bioRxiv. 2019, 1:371.
- 5) Larson AG et al., Nature. 2017, 547(7662):236-240.
- 6) Strom AR et al., Nature. 2017, 547(7662):241-245.
- 7) Ishii K et al., Science. 2008, 321(5892):1088-91.

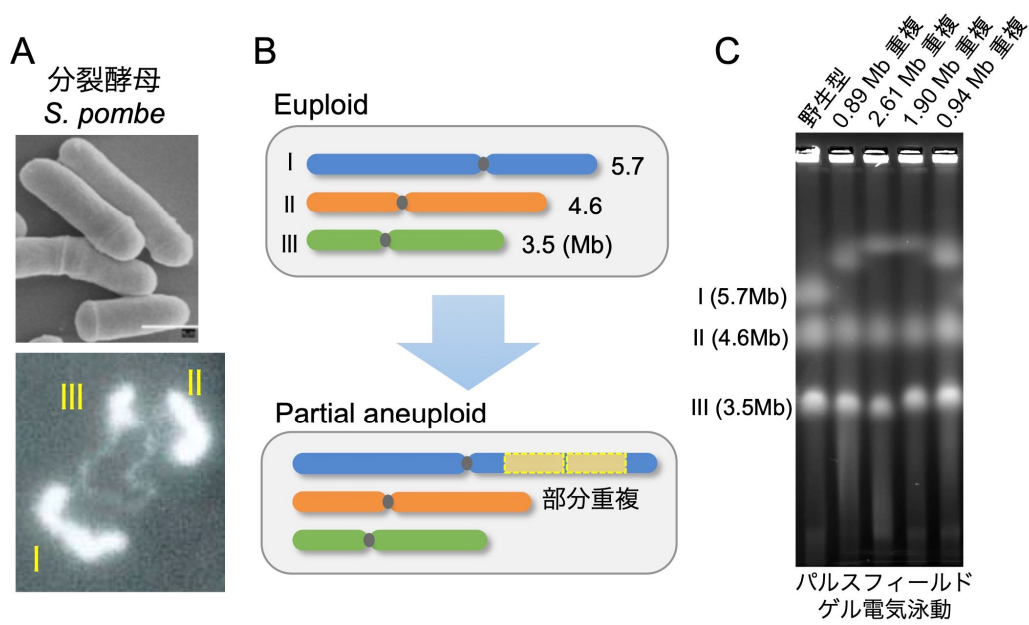


図) 新規染色体合着検出のための部分異数性誘導実験

A: 分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)の細胞 (上, David O Morgan, The Cell Cycle: Principles of Control, 2007) と3本の染色体 (下, Umesono *et al.*, Curr Genet. 1983, 7: 123-128.)

B: 部分重複により正倍数体(Euploid)から部分異数体(Partial aneuploid)を誘導

C: 第1染色体部分重複の検出

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 中沢宜彦、石井浩二郎
2. 発表標題 分裂酵母における染色体部分異数性の系統的誘導
3. 学会等名 日本分子生物学会第44回年会
4. 発表年 2021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
---------	---------