

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570188

研究課題名（和文） 染色体凝縮と分配におけるコンデンシンの作用機序

研究課題名（英文） Biological role of condensin in chromosome condensation

研究代表者

定塚 勝樹 (JOHZUKA KATSUKI)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：40291893

研究成果の概要(和文):染色体凝縮は複製されたゲノムを娘細胞に正確に分配するために、細胞が持っている最も基本的な機能の1つである。この過程は単に染色体腕部の長さを短くする役割だけではなく、複製によって姉妹染色体間に生じた絡まりを解消し、分離可能な2つの姉妹染色分体にする上で重要な役割を果たしている。さらに細胞分裂期だけではなく、rDNA リピート等の繰り返し構造を安定に維持する上でも重要な役割を果たすことが知られている。近年の研究で、酵母からヒトにまで広く保存されたコンデンシン複合体が、染色体凝縮で中心的役割を果たしていると考えられるようになった。本研究では、モデル生物の出芽酵母を使い、コンデンシンの主要な局在部位である rDNA リピート領域で、RNA ポリメラーゼ II による転写抑制、および相同組換えの抑制に、コンデンシンがどのように働いているかを明らかとした。

研究成果の概要(英文): Chromosome condensation is a basic cellular process that ensure the faithful segregation of chromosomes during cell division. This process is required not only for shrinking the length of chromosome arms, but also for resolving entanglements between sister-chromatids that created during DNA replication. In addition, chromosome condensation plays an important role in maintenance of the stability of repetitive structure in genome such as rDNA repeat. Studies in the past decade have demonstrated that chromosome condensation is mainly achieved by condensin, a multi-subunit protein complex widely conserved from yeast to human. In this study, we showed that condensin contributes for transcriptional- and recombinational-repressions within the rDNA repeat in *Saccharomyces cerevisiae*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体構造、クロマチン、組換え、転写、サイレンシング

1. 研究開始当初の背景

染色体凝縮は基本的な細胞機能の1つであり、複製された2組の染色体を娘細胞に正確に分配する上で重要な役割を果たしている。さらに細胞分裂期だけではなく、環境応答においても重要な役割を果たすことが知られている。出芽酵母では栄養飢餓にตอบสนองして、リボソームを産出する核内小器官である核小体が凝縮する。これは核小体に局在するrDNAリピート領域の染色体が凝縮することに依って引き起こされる。正確に凝縮しない場合、核小体の分断化を招き致死となる。この様に染色体凝縮は、分裂期だけでなく、リピート構造の安定維持にも重要な役割を果たしている。近年の研究から、コンデンシンと呼ばれる酵母からヒトにまで広く保存されたタンパク質複合体が染色体凝縮で中心的役割を果たすと考えられているが、その詳細な働きは殆どわかっていない。

出芽酵母の染色体のうち、rDNAリピート領域が最も顕著に凝縮する。顕微鏡でコンデンシンの細胞内局在を観ると、コンデンシンは主にrDNAリピートが在る核小体に局在する様子が観察できる。クロマチン免疫沈降法で詳細に調べた結果、rDNA領域内のRFB配列にコンデンシンが結合していることが明らかとなった。このRFB配列は、rDNA領域以外の染色体の任意の部位に挿入した場合でも、そこにコンデンシンを特異的に結合するシス配列として機能することがわかった。コンデンシンのRFB結合には、これまでにTof2, Csm1, Lrs4,そしてFob1といった複数のリクルーター因子が必要である。Fob1はRFB配列を認識してDNAに結合する因子で、他の3種は複合体を形成して、Fob1とコンデンシンとを物理的相互作用により橋渡しすることで、RFBにコンデンシンをリクルートすることがわかっている。

rDNA領域は、ゲノムのその他の部位と比較して幾つかの特徴がある。1つは、rDNA領域ではRNA polymerase IによるrRNAの強い転写がある一方で、RNA polymerase II (PolIII)による転写は抑制されている。コンデンシンのRFB配列への結合に必要なリクルーター因子はまた、rDNAでのPolIIIによる転写の抑制にも必要であることが判明した。このことから、コンデンシンがRFB配列に結合することで、PolIIIによる転写の抑制に関与している可能性が推測出来る。

また別の特徴として、rDNA領域はリピート構造であるが故に、そのコピー数が常に変動する。これは、リピート内で相同組換えが生じることに依るが、細胞ごとに一定レベルのコピー数が維持されるように制御されて

いる。しかしながら、コンデンシン変異体、あるいはコンデンシンがRFB配列に結合するためのリクルーターの変異体では、rDNAリピートのコピー数が極端に減少すること、そしてrDNAリピート内での組換え頻度が異常に上昇することが判明した。しかしながら、その原因は未だに不明のままとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、(1) rDNAリピート領域内で観られるPolIIIによる転写の抑制に、コンデンシンがどの様に関与しているのかを調べることを目的とした。また、(2) コンデンシン変異体で観られる、rDNA領域内での組換え頻度の異常な上昇は、どの様にして生じるのか、その原因を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) rDNAリピート領域内で、PolIIIによる転写の抑制に与えるコンデンシン変異の影響を調べる。また、rDNA領域でPolIIIによる転写の抑制に働いていることが知られているSir2タンパク質の、rDNA領域での結合分布に及ぼすコンデンシンの役割をコンデンシン変異体を使って調べる。

(2) 相同組換えで中心的役割を果たす組換えタンパク質であるRad52の細胞内局在に及ぼすコンデンシン変異の影響を、顕微鏡観察で調べる。

4. 研究成果

(1) PolIIIで転写されるレポーター遺伝子を、rDNAリピート領域内にあるRFB配列の近傍に挿入して、レポーターからの転写の抑制を調べた。その結果、コンデンシン複合体を構成するサブユニットの中の2種類の変異体(*smc2-157*, *ycs4-1*)でPolIIIによる転写の抑制が弱くなっていることがわかった。さらに、rDNA内の3ヶ所に同定されている内在性のPolIIIプロモーターからの転写を、RT-PCR法で直接検出したところ、2種のコンデンシン変異体いずれの場合でも、RFB近傍に在る内在性PolIIIプロモーターからの転写が上昇していた。その一方で、RFBから離れた場所にある内在性PolIIIプロモーターからの転写に、変化は観られなかった。これらの結果から、rDNA領域でのPolIIIによる転写抑制には、RFBに結合したコンデンシン複合体が関与していることが明らかとなった。

また、転写抑制に働くヒストン脱アセチル化酵素であるSir2のrDNA領域内での結合分布を、クロマチン免疫沈降法で調べた結果、

コンデンシン変異体では RFB 近傍で Sir2 の結合量が、野生型に比較して減少していることがわかった。このことから、RFB にコンデンシンが結合することで、その近傍での Sir2 の結合を促進して、その結果 PolIII による転写の抑制に働いていると考えられる。

(2) Rad52 タンパク質は核内に局在するが、rDNA リピートが収納されている核小体内部には局在しないことが知られている。Rad52 を核小体から排除する制御は、rDNA リピート構造の安定維持に貢献していると考えられる。間期細胞では Rad52 の核小体への局在はコンデンシン変異体でも観られない。しかし、rDNA リピート領域が凝縮する分裂期の細胞では、Rad52 が核小体内部に侵入している様子が観察された (下図)。分裂期でコンデンシンに依って正常に rDNA が凝縮することで、組換えタンパク質の核小体への侵入を抑制して rDNA に作用することを抑え、リピート構造の安定維持に貢献していると考えられる。

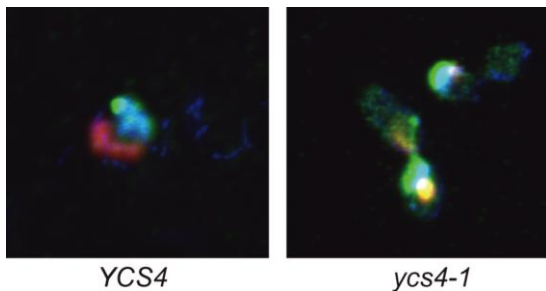


図 1. コンデンシン変異体における核小体への Rad52 局在
分裂期 (metaphase) の細胞で核小体構成成分である Nop1 を mCherry, Rad52 を GFP で観察した。コンデンシン変異体 (*y cs4-1*) では Rad52 の緑のシグナルが核小体 (赤) に侵入して黄色くなっている様子が観える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Johzuka K., Horiuchi T.
The cis element and factors required for condensin recruitment to chromosomes
Mol Cell (34)26-35 (2009) 査読有り

[学会発表] (計 10 件)

- ① 定塚勝樹 「コンデンシンによるクロマチン折りたたみ」 第 29 回染色体ワークショップ 2012 年 1 月 27 日 (仙台市 秋保温泉)
- ② Johzuka K. 「Condensin-dependent chromatin folding」 第 34 回 日本分子

生物学会 2011 年 12 月 15 日 (横浜市 パシフィコ横浜)

- ③ 定塚勝樹 「コンデンシンによる染色体凝縮の分子機構」 DNA 複製組換えワークショップ 2011 年 10 月 27 日 (福岡市 サンピア福岡)
- ④ 定塚勝樹 「コンデンシンによる転写と組換え抑制」 BMB2010 シンポジウム 2010 年 12 月 10 日 (神戸市 神戸国際展示場)
- ⑤ Itazu M., Johzuka K.
「Condensin-dependent transcriptional silencing」 International 3R Symposium 2010 年 10 月 26 日 (富山市 富山国際会議場)
- ⑥ Johzuka K. 「Association of condensin with chromosome: mechanism and its effect on transcriptional silencing」 57th NIBB Conference 2010 年 10 月 14-16 日 (岡崎市 岡崎カンファレンスセンター)
- ⑦ Itazu M., Johzuka K. 「Condensin contributes to the transcriptional silencing in the rDNA cluster」 日本分子生物学会 2009 年 12 月 9-12 日 (横浜市 パシフィコ横浜)
- ⑧ 板津昌子, 定塚勝樹 「コンデンシンによる rDNA リピートでの転写抑制機構」 第 20 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2009 年 11 月 1-3 日 (彦根市 琵琶湖カンファレンスセンター)
- ⑨ 定塚勝樹 コンデンシンによる転写抑制 日本遺伝学会 2009 年 9 月 16-18 日 (松本市 信州大学)
- ⑩ 定塚勝樹, 板津昌子, 石根直美 出芽酵母セントロメア近傍での転写抑制 酵母遺伝学フォーラム 2009 年 7 月 28-30 日 (筑波市 ノバホール)

[その他]

- (1) ホームページ等
http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary_biology_and_biodiversity/diversity/AssisProf/johzuka.html
- (2) 報道関連情報
- ① 「たんぱく質と結合」
日経産業新聞 2009 年 4 月 10 日 11 面
- ② 「結合メカニズム解明」

日刊工業新聞 2009年4月16日 23面

- ③ 「染色体凝縮の謎にメス」
科学新聞 2009年4月24日 4面

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定塚 勝樹 (JOHZUKA KATSUKI)
基礎生物学研究所・多様性生物学研究
室・助教

研究者番号：40291893