

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：63904
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2012～2015
課題番号：24570203
研究課題名(和文) コンデンシンによる染色体凝縮の制御機構

研究課題名(英文) Condensin-dependent chromosome organization

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
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：染色体凝縮は、細胞分裂の際に複製されたゲノムを2つの娘細胞に正確に分配するための基本的な細胞機能の1つである。近年の研究から、酵母からヒトにまで広く保存されたタンパク質複合体であるコンデンシンが染色体凝縮で中心的役割を果たすことがわかってきた。本研究では、出芽酵母をモデルとしてDNAに結合したコンデンシンが細胞分裂期にクロマチンDNAを折りたたむことを見出した。コンデンシンによるクロマチンDNAの折りたたみが、分裂期に観られる染色体凝縮の基本的な素反応の1つと考えられる。また、G1期においてもコンデンシンは染色体の折りたたみを制御していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Chromosome condensation is a basic cellular process that ensures the faithful segregation of chromosomes during cell division. Recent studies demonstrated that chromosome condensation is mainly achieved by condensin, a multi-subunit protein complex widely conserved from yeast to human. In this study, I showed that condensin play a role in chromatin interactions and this interaction lead to create chromatin folding. It is thought that condensin-dependent chromatin folding is one of the basic molecular processes for chromosome condensation during M-phase. In addition, it is demonstrated that condensin regulate chromosome folding in interphase too.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体 クロマチン 細胞分裂 ヘテロクロマチン コンデンシン 分子生物学 遺伝学

1. 研究開始当初の背景

長大なクロマチン DNA 鎖は時として様々な高次構造を形成する。細胞分裂時には、クロマチン DNA が太く短く折りたたまれ、分裂期特有に観られる染色体構造を形成する。この“染色体凝縮”は基本的な細胞機能の1つで、単に染色体の長さを短くする目的だけではなく、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つの姉妹染色分体を形成し、次世代に分配するためにも重要な役割を果たしている。一方、間期においてもクロマチン DNA が折りたたまれることで、DNA 配列上遠く離れた部位同士が近接して遺伝子発現や、あるいはまた核内でのクロマチン DNA の収納が制御されているらしいことが報告されている。しかしながらこれら染色体の“形”の制御がどのように生じているのか未だ明らかになっていない。これまでの研究から、酵母からヒトにまで広く保存されたコンデンシンと呼ばれる複数のタンパク質からなる複合体が、分裂期に観られる凝縮した染色体の形成に必須の役割を果たすことが解ってきている。しかしながらコンデンシンがどのようにして染色体凝縮に働くのか、その詳細はほとんどわかっていない。

モデル生物の出芽酵母を使った解析から、コンデンシンは核内でリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) リピート領域が局在する核小体に最も多く分布することが顕微鏡で観察されている。これまでの解析から、rDNA にある短い配列“RFB”がコンデンシンの結合部位であると特定した。コンデンシンの RFB への結合には、Fob1 を含む少なくとも4つの因子がリクルーターとして必要であることが明らかとなっている。また RFB は、rDNA リピート領域以外の任意の染色体上の ectopic 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、さらにこの結合にも Fob1 が必要であることがわかっている。一方でゲノムの網羅的解析の結果から、rDNA 領域以外でも多数の結合部位が特定されている。それらの中でも顕著な部位として、コンデンシンは各染色体のセントロメアに結合することが示されている。それ以外にも、結合シグナルレベルとしては非常に低いながらも、染色体腕部に散在している tRNA 遺伝子 (tDNA) や、一部のリボソームタンパク質をコードした遺伝子部位等を主とした結合部位が判明している。このようにコンデンシンは染色体の様々な場所に広く分布していることがわかってきた。しかしながら、その結合シグナルレベルを比べると大きな差異が認められる。rDNA リピート領域にある RFB の1コピーだけを6番染色体上に人工的に挿入して、そこへのコンデンシンの結合シグナルを比較したところ、セントロメアへの結合シグナルに比べて同等~1.5倍の強いシグナルが観られることが解った。さらに1

コピーの RFB への結合を、染色体腕部に散在する tDNA やリボソームタンパク質遺伝子への結合シグナルと比較した場合、20倍以上の差が観られることが解った。従って RFB は主要な結合配列であることがわかる。この事は、酵母の細胞分裂期で rDNA 領域が最もよく凝縮するのに対して、他の染色体領域はほとんど凝縮していないという顕微鏡観察の結果とよく一致する。

既述のように、コンデンシンとクロマチン DNA との結合に関して多くの情報が蓄積されてきているが、その一方で DNA に結合したコンデンシンがどのようにして染色体凝縮に働くのかと云う疑問は未だ謎に包まれている。精製したコンデンシン複合体の生化学的解析から、ATP に依存して DNA に“ねじれ”(スーパーコイル)を導入する活性が見出されているが、それがどのように染色体凝縮に働くのか、未だ不明の点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、コンデンシンと DNA との結合のシス配列として機能する RFB の性質に注目した。染色体上のデザインした部位にコンデンシンを結合させるための“ツール”として RFB を使うことで、コンデンシン結合部位を染色体上に人工的に構築できる。この系を用いて、クロマチン DNA に結合したコンデンシンが如何にして染色体の“形”を作り出すために働いているのかを、分子レベルで探ることを目的とした。さらには、自然状態でコンデンシンが結合していることが判明している場所に注目し、コンデンシンが染色体の形態に及ぼす影響を調べることも同時に目的とした。

3. 研究の方法

(1) コンデンシンの主要な結合配列である RFB は、rDNA リピート領域に150~200コピー存在する。これらに大量のコンデンシンが奪われることなく、デザインした任意の染色体部位に十分量のコンデンシンが結合出来る状態を作り出す目的で、rDNA リピートを完全に欠失した細胞を作成した。この細胞では、rRNA の産出に必要な最低限の rDNA 領域 (RFB 配列を含まない) だけをコードした multi-copy plasmid を同時に持つことで、生育に必要な rRNA が供給される。作成した細胞は、通常の野生型と同等に生育することが判明した。従って、RFB 配列それ自体は、細胞の生育に全く必要でないことが解る。そこでこの細胞を用いて、同一染色体腕部に一定の距離を隔てて2つの RFB を挿入した細胞を作成した。これを用いて、人工的に挿入した RFB にコンデンシンが結合することで、DNA 配列上離れた位置にある2つの RFB が、細胞内で物理的に近接する可能性を、chromosome conformation capture (3C) 法により検討した。さらに、細胞周期の様々なステージの細胞を用いて 3C を行うことで、

2 つの RFB を挿入した領域でのクロマチン相互作用がどの様に変わっていくかを調べた。

(2) 染色体上の様々な領域でのコンデンシンによるクロマチン間の相互作用を調べるために、2 つの RFB を同一染色体ではなく、それぞれ異なる染色体上に挿入した場合、あるいはまた同一染色体上でも左右両腕部に挿入した場合の RFB 間の相互作用についても、同様に 3C により調べた。

(3) 3 番染色体の両端付近には、酵母の性に相当する接合型を決定する遺伝子の非発現コピーをコードした遺伝子座、*HML* および *HMR* がある。これらは間期 (G1) において互いに近接していることが知られている。興味深いことに、この両部位にはいずれもコンデンシンが結合することがわかっている。そこで、間期での *HML* と *HMR* との相互作用にコンデンシンが関与する可能性を、3C 法により検討した。

4. 研究成果

(1) 人工的に 2 つの RFB を 6 番染色体右腕上に 16kb の距離を隔てて挿入した細胞を、細胞周期の G1 期、分裂中期 (metaphase)、分裂後期 (anaphase) で停止させ、3C 解析を行った。その結果、G1 期で 2 つの RFB 間の相互作用が観られることがわかった。分裂中期にはその相互作用シグナルが増大した。さらに分裂後期では、2 つの RFB の間の相互作用を示すシグナルが分裂中期よりもさらに増大するだけでなく、RFB と 2 つの RFB で挟まれた部位間での相互作用を示すシグナルも増大することが解った。これらの結果から、G1 期で既に一定程度のクロマチン相互作用があり、分裂期が進むにつれてそれが増大することが判明した。一方、コンデンシンの構成因子の 1 つである *Ycs4* の温度感受性変異 (*ycs4-1*) では、RFB 間の相互作用シグナルがバックグラウンドレベルに減少すること、またコンデンシンの RFB 結合でリクルーターとして働く *FOB1* 遺伝子が欠失した細胞でも、クロマチン相互作用シグナルがバックグラウンドレベルまで減少することが解った。これらの結果から、コンデンシンが RFB に結合することで、DNA 配列上で離れた位置にある RFB 同士が物理的に相互作用することが明らかとなった。これによって RFB で挟まれたクロマチン DNA 領域が折りたたまれることになる。G1 期から分裂中期、後期になるにしたがってクロマチン相互作用シグナルの増大が観られたことから、このクロマチンの折りたたみが染色体凝縮の素反応の 1 つと考えられる。さらに分裂後期になると RFB で挟まれた領域でより複雑な相互作用が増大することで、より一層染色体凝縮が進むと考えることができる。RFB は rDNA リピート領域に約 9kb の間隔で存在している。酵母では分裂期に、この rDNA リピート領域が太く短く凝縮することが観

察されている。今回、明らかとなった RFB 間の相互作用によるクロマチン折りたたみと、分裂後期に観られたより複雑な相互作用は rDNA リピート領域でも生じていると考えられ、コンデンシンによるクロマチン折りたたみの働きにより rDNA 領域が凝縮していると考えられる。

本研究で 6 番染色体上に人工的に挿入した 2 つの RFB に挟まれた領域には *tDNA* がコードされており、自然状態でコンデンシンが結合することがわかっている。実際、この *tDNA* に対するコンデンシンの結合シグナルは既述のように RFB への結合シグナルと比較して 20 倍以上の低い値を示す。3C による解析からは、RFB と *tDNA* との相互作用を示すシグナルは僅かではあるが検出された。しかしながら RFB 同士の相互作用シグナルと比較すると著しく低いレベルであった。このことから、クロマチン相互作用を示すシグナル値とコンデンシン結合シグナルの値に正の相関関係がみられることがわかった。すなわち、コンデンシン結合シグナルレベルが高いほど、クロマチン相互作用が高頻度で生じていると云える。このことから、自然状態で rDNA 領域以外の染色体領域の凝縮が非常に僅かである理由は、RFB に比べて腕部に散在する結合部位へのコンデンシンの結合レベルが非常に低いことが原因であると説明できる。

(2) 2 つの RFB を 6 番と 3 番染色体、それぞれ異なる染色体に挿入した場合、RFB 間の相互作用を示すシグナルは、コンデンシンの結合が生じない *FOB1* 欠失細胞でのそれと同等で、バックグラウンドレベルあることがわかった。このことから、コンデンシンによる異なる染色体間でのクロマチン相互作用が生じる可能性は確認できず、生じるとしても非常に低い頻度であると考えられる。

次に、2 つの RFB を同一染色体上の左右両腕部にセントロメアを挟んで挿入した場合、RFB 間の距離が 100kb 程度離れていると相互作用シグナルが *FOB1* 欠失細胞と同等のバックグラウンドレベルであった。ところが RFB 間の距離を 18kb にまで近づけた場合には、*FOB1* 欠失細胞と比較して有意に相互作用シグナルが観られることがわかった。このことから、染色体の左右両腕の比較的近い場所に主要なコンデンシン結合配列である RFB を挿入すると、両腕の間での折りたたみが生じ得ることが判明した。また RFB によるクロマチン相互作用は、RFB 間の距離の影響があることもわかった。

(3) 3 番染色体両端付近に位置する *HML*、*HMR* の相互作用を 3C で調べたところ、野生型細胞では相互作用が観られたのに対して、コンデンシンを構成する因子の温度感受性変異細胞、*ycs4-1* ではその相互作用が著しく減少することが解った。このことから、3 番染色体の両端付近の *HML* と *HMR* の相互

作用にもコンデンシンが働いていることがわかった。この働きにより3番染色体の形態が制御されている。またこの相互作用はG1期において観られることから、分裂期だけでなく、間期においてもコンデンシンが染色体の“形”を制御する上で働いていることが示された。RFBを人工的に挿入した系のみならず、自然状態でコンデンシンが結合しているHML、HMRの場合でも同様にコンデンシンによるクロマチン相互作用が生じていることから、コンデンシンによるクロマチン相互作用は普遍的に生じている現象であると考えられる。

一方、HMLとHMRにコードされた遺伝子の転写は強く抑制されていることが知られている。HML-HMRの相互作用が、これら遺伝子座の転写抑制に与える影響を調べたところ、*ycs4-1* 温度感受性変異の場合でも、HMR遺伝子座からの転写は野生型同等に抑制されていることがRT-PCR法により判明した。このことは、これら遺伝子座での転写抑制とHML-HMRの相互作用は独立した2つの事象であることを示している。

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)

[学会発表](計 6件)

定塚勝樹「コンデンシンが制御するクロマチン相互作用」BMB2015 2015年12月2日(神戸国際会議場)兵庫県神戸市

定塚勝樹「コンデンシンによるクロマチン相互作用」第37回日本分子生物学会 2014年11月25日(パシフィコ横浜)神奈川県横浜市

定塚勝樹「コンデンシンによるクロマチン相互作用」第36回日本分子生物学会 2013年12月4日(神戸国際会議場)兵庫県神戸市

定塚勝樹「染色体凝縮におけるコンデンシンの役割」第35回日本分子生物学会 2012年12月13日(福岡国際会議場)福岡県福岡市

Johzuka K.「Condensin-dependent chromatin interaction」The 8th 3R symposium 2012年11月25日(淡路夢舞台国際会議場)兵庫県淡路市

定塚勝樹「コンデンシンによるクロマチン折りたたみ」第84回日本遺伝学会 2012年9月26日(九州大学)福岡県福岡市

[その他]

ホームページ等

http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary_biology_and_biodiversity/diversity/AssisProf/johzuka.html

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