

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 25 年度博士課程進学  
氏 名 坂田 豊典  
指導教員名 白髭 克彦

### 論文題目

## ヒトコンデンシンによる染色体構造の構築と制御メカニズムの解明

### 1. 序論

細菌からは乳類に至るまで、あらゆる生物は細胞から構成されており、生物の生存にとって細胞分裂は必須のプロセスである。細胞分裂においては次世代の細胞に遺伝情報を正確に伝えることが最も重要であり、そのためには DNA 複製から細胞分裂にかけて染色体の構造が正しく制御されている必要がある。複製された姉妹染色分体は分裂期にそれぞれ個別化されて高度に折り畳まれるが、この過程は染色体凝縮と呼ばれており、相同な姉妹染色分体を最終的に娘細胞へ正確に分配するために重要である。最近では染色体分配の異常が細胞のがん化を促進することが明らかとなってきており、染色体凝縮メカニズムの解明は生命現象の理解だけでなく、がんのようなヒトの病気の原因究明にもつながると期待される。

分裂期染色体凝縮において中心的に機能する因子としては、コンデンシンと呼ばれるタンパク質複合体がよく知られている。ヒトを始めとするほとんどの真核生物において 2 種類の複合体、コンデンシン I と II が存在し、これらは共通のコアサブユニットの SMC2-SMC4 ヘテロダイマーとそれぞれに特異的な 3 つのサブユニットから構成されている。これまでに、どちらの複合体も正常な分裂期染色体構造の構築に必須であることが知られている。しかしながら、コンデンシン I と II が実際に分裂期染色体上でどのように機能することで、正確な染色体凝縮がなされるのかという点については多くの疑問が残されている。顕微鏡観察によりコンデンシン I、II の染色体全域での大まかな局在は知られているものの、これらの複合体がゲノム上で局在する領域の詳細が不明であることがその理由の一つとして挙げられる。

本研究ではコンデンシン I と II の分裂期ヒト染色体における局在を詳細に解析するため、Chromatin immunoprecipitation-sequence (ChIP-seq) 法を用いて、これらの複合体の結合領域を塩基配列レベルで同定することを試みた。ChIP-seq 法は対象のタンパク質に対する抗体を

用いて、そのタンパク質とそれに結合する DNA 配列を合わせて精製し（クロマチン免疫沈降）、得られた DNA を次世代シーケンサーで配列決定する手法である。この方法によって、コンデンシン I と II が分裂期染色体上で間期に転写活性の高い遺伝子領域に特に強く結合することを明らかにした。さらに、コンデンシン I の遺伝子領域への結合が正常な染色体凝縮の促進に重要であることが示唆された。

## 2. コンデンシン I は転写活性の高い遺伝子の転写開始点近傍に結合する

コンデンシン I の結合領域を網羅的に明らかにするため、ノコダゾールで分裂期に同調したヒトの HeLa 細胞を用いて、コンデンシン I (NCAPG サブユニット) の ChIP-seq 解析を行った。その結果、これまでの顕微鏡観察による報告と一致して、ChIP-seq 解析でもコンデンシン I は染色体全域で局在がみられた。次に、より高解像度で解析を行ったところ、約 8 千箇所の統計的に有意なコンデンシン I の結合領域が同定された。遺伝子領域との比較解析から、これらの結合領域の 70% がタンパク質をコードする遺伝子の転写開始点 (TSS) 近傍に位置していることが明らかとなった。また、コンデンシン I の遺伝子の TSS での結合量とそれらの遺伝子の間期における転写活性には正の相関がみられた。さらに、コンデンシン I は間期に転写活性の高い tRNA 遺伝子の近傍に結合することも明らかとなった。

## 3. コンデンシン I は RNA ポリメラーゼ 2、3 の分裂期染色体からの解離を促進する

ほ乳類の細胞において、分裂期における転写は強く抑制されていることが知られている。実際、ChIP-seq 解析で分裂期の RNA ポリメラーゼ 2、3 (RNAP2, 3) の染色体への結合はほとんどみられなかった。そこで、間期に転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に分裂期になって結合するコンデンシン I が、分裂期の転写抑制機構に関与しているかを検証した。コンデンシン I (NCAPG サブユニット) を siRNA でノックダウンした細胞において、分裂期の RNAP2、3 の結合を ChIP-seq / quantitative (q) PCR で解析した結果、これらの RNA ポリメラーゼの結合の顕著な増加がみられた。一方で、reverse transcription (RT) -qPCR 解析などから、このとき結合の増加がみられた RNAP2 は転写伸長の活性を有していないことが示唆された。これらの結果から、コンデンシン I は TSS 近傍において RNAP2、3 の分裂期染色体からの解離を促進することが示された。一方で、分裂期における転写阻害剤処理でコンデンシン I の結合に変化がみられなかったことから、コンデンシン I の TSS 近傍への結合は RNA ポリメラーゼ自体には依存しないことが考えられた。

## 4. コンデンシン I は分裂期染色体上で単鎖 DNA に結合する

転写において鋳型となる DNA は二重鎖から単鎖 DNA に開裂することが必要である。また、

コンデンシン I のコアサブユニットは *in vitro* で二重鎖より単鎖 DNA に高いアフィニティーをもつことから、コンデンシン I は単鎖 DNA 構造を標的として TSS 近傍に結合している可能性が考えられた。そこで、コンデンシン I の ChIP により得られた DNA を免疫沈降用のビーズ上で、単鎖 DNA を特異的に消化するヌクレアーゼ P1 で処理し、精製した DNA を qPCR で定量した。その結果、ヌクレアーゼ P1 処理でコンデンシン I の ChIP シグナルが顕著に減少したことから、コンデンシン I の結合領域には単鎖 DNA 構造が含まれることが明らかとなった。さらに、DNA 配列の解析から、TSS 近傍のコンデンシン I 結合領域の 94% で、その 1 キロベース以内に CpG island (CGI) が存在していることが示された。最近、このような TSS 近傍の CGI 領域では単鎖 DNA 構造を伴う DNA-RNA ハイブリッドの R-loop 構造が多く形成されることが報告されている。そこで、次に R-loop 構造が分裂期染色体凝縮へ及ぼす影響を解析した。RNA の輸送などに関わるタンパク質、THOC1 の欠損により細胞内での R-loop 構造の増加が報告されていることから、siRNA で THOC1 をノックダウンした細胞で分裂期染色体を観察した。その結果、THOC1 をノックダウンした細胞ではコンデンシン I のノックダウンでみられるような染色体が肥大化した異常な表現型が多くみられた。この結果から、R-loop 或いは単鎖 DNA 構造は正常な染色体凝縮を妨げることが示唆された。

これまでに、*in vitro* の解析において、コンデンシン I コアサブユニットが相補的な単鎖 DNA 同士を二重鎖 DNA に巻き戻す活性が知られている。この分子活性と本研究での解析結果を合わせて考えると、コンデンシン I は転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に生じた R-loop や単鎖 DNA 構造を二重鎖 DNA に戻して解消しているのではないかと推測された。

## 5. コンデンシン I、II とトポイソメラーゼ II $\alpha$ の分裂期染色体上における相互関係

分裂期の HeLa 細胞において、コンデンシン I と同様に、コンデンシン II (NCAPH2 サブユニット) の ChIP-seq 解析を行ったところ、約 6 千箇所の結合領域が同定され、その 89% が遺伝子の TSS 近傍に位置することが明らかとなった。また、コンデンシン II の遺伝子の TSS での結合量とそれらの遺伝子の間期における転写活性にも正の相関がみられた。そこで、コンデンシン I と II の結合領域について比較解析を行ったところ、コンデンシン II の結合領域の 68% がコンデンシン I と一致した。また、コンデンシン II (NCAPD3 サブユニット) をノックダウンした細胞では、特に II の結合領域において、I の結合の顕著な増加がみられた。一方で、コンデンシン I (NCAPG サブユニット) のノックダウンでは II の結合にあまり変化はみられなかった。

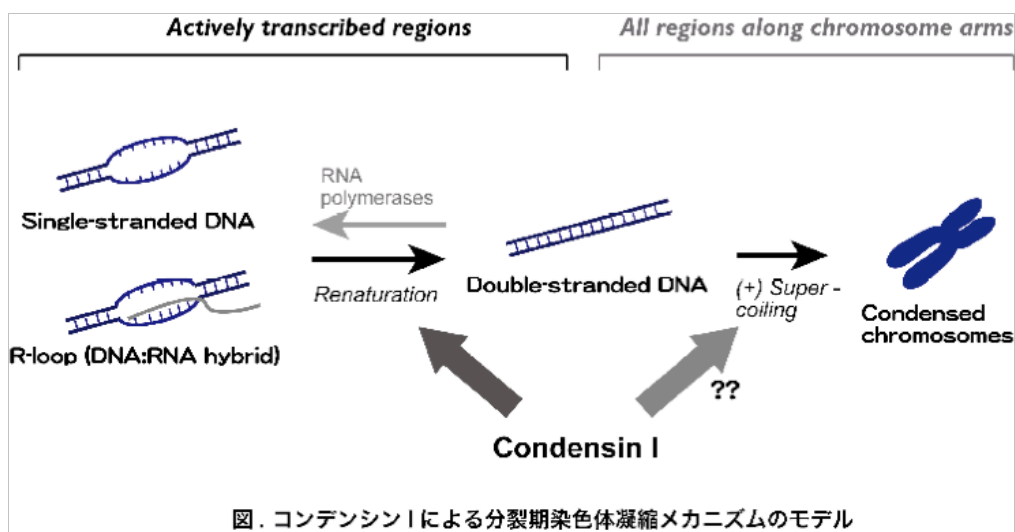
コンデンシン複合体と同様に、ヒトの細胞においてトポイソメラーゼ II $\alpha$  (TOP2A) も正常な分裂期染色体形成に必須であることが知られていることから、TOP2A についても ChIP-seq 解析を行った。その結果、約 2 万 8 千箇所の TOP2A の結合領域が同定され、コンデンシン I と II の結合領域は TOP2A とよくオーバーラップすることが明らかとなった。また、TOP2A をノ

ックダウンした細胞において、コンデンシン I の TSS 近傍における結合が増加する一方で、II の結合にはあまり変化がみられないことが ChIP-qPCR 解析により明らかとなった。

以上の結果から、コンデンシン I と II は同じように転写活性の高い遺伝子領域に結合していても、その染色体への結合の制御や凝縮における役割は異なっていることが示唆された。今後、コンデンシン I と II の機能の違いや TOP2A との関係性についてさらに解析していく必要がある。

## 6. 総括

本研究により、コンデンシン I がこれまでに知られていたような染色体全域への局在に加えて、転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍へ特に強く結合しており、その結合領域には単鎖 DNA 構造が含まれることが明らかとなった。また、R-loop 或いは単鎖 DNA 構造は正常な分裂期染色体凝縮を妨げることが示唆された。以上の結果から、コンデンシン I は分裂期染色体全域でゲノム DNA を折り畳むことと並行して、転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に生じた R-loop や単鎖 DNA 構造を二重鎖 DNA に戻して解消することで、染色体凝縮を促進していると考えられた(図)。



## 発表論文

Sutani T\*, [Sakata T\\*](#), Nakato R, Masuda K, Ishibashi M, Yamashita D, Suzuki Y, Hirano T, Bando M, Shirahige K.

“ Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation. ”

*Nature Communications*. 2015. (\*These authors contributed equally to this work.)