

## 審査の結果の要旨

氏名 坂田 豊典

分裂期染色体凝縮は次世代の細胞に遺伝情報を正確に伝えるために非常に重要であるが、この過程において中心的に機能するタンパク質複合体として、コンデンシン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、どちらの複合体も正常な分裂期染色体構造の構築及び染色体分配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。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、これらの局在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。そこで、申請者はタンパク質の染色体での結合領域の網羅的な解析に広く用いられている **Chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing (ChIP-seq)** 法により、ヒトコンデンシン複合体の解析を行った。

申請者がヒト培養細胞株の HeLa 細胞を分裂期に同調して、コンデンシン I の ChIP-seq 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。

次に、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をもつことから、申請者はコンデンシン I が単鎖 DNA 構造を標的として TSS 近傍に結合している可能性を考え、検証を行った。コンデンシン I の ChIP により得られた DNA を、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 で定量したところ、ChIP シグナルが顕著に減少したことから、これら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、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 と DNA-RNA ハイブリッドの R-loop 構造が安定に形成されることが報告されている。そこで、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。

次に、同様の方法で、コンデンシン II 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。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 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 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。これらの結果から、コンデンシン I と II は同じような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、現在までのところ示唆されている。申請者は今後、コンデンシン I と II の機能の違いについてさらに解析していく予定である。

これまでに、コンデンシン I は分裂期染色体全域に局在して、ゲノム DNA を折り畳むことで染色体凝縮を促進すると考えられてきた。今回の研究から、コンデンシン I は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、これらの転写活性の高い領域に生じる R-loop や単鎖 DNA 構造は正常な染色体凝縮を妨げることが示唆された。以上の結果から、コンデンシン I は転写活性の高い領域に生じたこれらの DNA 構造に作用して、凝縮に阻害的な影響を解消することで、染色体凝縮を促進しているというモデルが申請者により新たに提唱された。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。