

令和 2 年 4 月 15 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860542

氏 名 竹俣 直道

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: インディアナ州ブルーミントン (国名: アメリカ合衆国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

染色体三次元構造の進化: アーキアを用いた解析3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Biology Department, Indiana University5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

背景

すべての生物は、細胞の千倍以上も長大なゲノム DNA を染色体として細胞内に収納している。これを可能にし、かつゲノム情報を正確に複製・分配・発現するためには、細胞周期や遺伝子発現プログラムに応じて染色体の三次元構造を適切に制御することが不可欠である。我々ヒトを含む真核生物の染色体は特に複雑かつダイナミックな構造をとることが古くから知られており、今日まで多くの研究者がそのメカニズムの解明に取り組んできた。また近年の技術の発達により、真核生物よりはるかに小さい原核生物の染色体構造についても詳細な解析を行うことが可能となり、特にバクテリア(細菌)の染色体構造についての理解が急激に加速した。その結果、真核生物染色体の構造やそのダイナミクスは原核生物のものと大きく異なることが明らかになってきたが、真核生物がどのような道筋を辿ってその染色体構造を進化させてきたのかは未だ解明されていない。

真核生物染色体の構造およびそのダイナミクスの進化を解く上で鍵となるのがアーキア(古細菌)である。アーキアは真核生物、バクテリアとともに生物界の3ドメインを構成する生物群である。ゲノム情報の比較などから、アーキアは真核生物の起源となった原核生物であると考えられている。実際に、遺伝情報の複製や転写に関わるタンパク質はアーキアと真核生物で高い相同性を示す。また、細胞周期における染色体動態にもアーキアと真核生物で共通性がみられる。以上から、アーキアの染色体構造を研究することで、真核生物の染色体構造の構築原理が原核生物からどのように進化してきたかについて様々な知見が得られると期待される。しかし、アーキアの染色体がどのような構造をとるのか、またその構造がどのような因子によって制御されるのかは明らかにされていない。

研究の目的・方法

本研究では、*Sulfolobus* 属アーキアにおける染色体構造およびその分子基盤を解明することで、染色体構造の進化に迫ることを目指す。*Sulfolobus* には次の様な利点がある。

1. *Sulfolobus* は分子生物学的研究が最も進んでいるアーキア群の一つであり、ゲノム編集や細胞周期同調を行うことが可能である。
2. 培養可能なアーキアの中では、*Sulfolobus* は系統学上最も真核生物に近いアーキア群の一つである。したがって、真核生物の進化をたどる上で *Sulfolobus* は有用な研究対象である。
3. *Sulfolobus* は系統学的に真核生物に近いだけでなく、実際に真核生物と類似した染色体ダイナミクスを示す。例えば、一般的な原核生物と同様 *Sulfolobus* の染色体は環状 DNA からなるが、その一方で (i) 複数の複製起点をもつ (Robinson & Bell et al., *Cell* 2004)、(ii) 染色体の複製と分配が異なる時期に起こる、(iii) G2/M 期に姉妹染色分体が対合する (Robinson & Bell et al., *EMBO J.* 2007) といった性質をもつ。

このように、*Sulfolobus* は分子生物学的手法が適用可能なだけでなく真核生物のプロトタイプの性質を数多く有しており、本研究に適した研究対象である。

本研究では、**Hi-C** (Lieberman-Aiden et al., *Science* 2009) と呼ばれるシーケンシング手法を用いて *Sulfolobus* の染色体構造を決定した。Hi-C では、まず細胞内で相互作用している DNA 領域同士をホルマリンにより架橋する。続いて、架橋した染色体 DNA を制限酵素で切断し、切断面を Klenow fragment とビオチン標識ヌクレオチドで標識する。これをライゲーション処理すると、相互作用している領域同士がライゲーションされた「キメラ DNA」が一定の確率で生じる。このキメラ DNA をストレプトアビジンにより精製し、次世代シーケンサーで解析することで、細胞内での DNA-DNA 相互作用を網羅的に検出することができる。

研究実施状況

(1) *Sulfolobus* は真核生物と同様の染色体コンパートメントを形成する

はじめに、*Sulfolobus* 属アーキアの代表的な種である *Sulfolobus acidocaldarius* を用いて Hi-C を実施した。実験条件の最適化を行った後、非同調条件で培養した *S. acidocaldarius* を用いて DNA ライブラリを作製し、所属機関のファシリティが保有する Illumina 社の NextSeq を用いてシーケンシングを行った。得られたデータをリファレンスゲノムにマッピングし、15 kb ごとに区切ったゲノム領域同士の相互作用頻度を網羅的に算出し、ヒートマップ化した。

解析の結果、*S. acidocaldarius* の染色体 (全長 2.2 Mb) は大きさ数百 kb 程度のドメインに区切られることがわかった。これらのドメインは2種類に分けられ、同種のドメイン同士は高い頻度で相互作用する一方、異なる種類のドメイン同士では相互作用が抑制されていた。この結果は、同種のドメイン同士は空間的に近接する一方、異種ドメイン同士は空間的に離れて存在することを示している。すなわち、2種類のドメインは細胞内で異なる空間領域 (コンパートメント) を占めることを意味する (Lieberman-Aiden et al., *Science* 2009)。興味深いことに、同様のコンパートメント構造はヒトを含む多くの真核生物でみられる一方、バクテリアでは発見されていない。以上の結果から、*Sulfolobus* はバクテリアと同じ原核生物でありながら、コンパートメント構造という真核生物により近い染色体構造を形成することが明らかとなった。

(2) DNA FISH による Hi-C 実験の検証

Hi-C から示唆された *S. acidocaldarius* の染色体構造を別の実験系で検証するために、DNA fluorescence in situ hybridization (DNA FISH) を行なった。異なる蛍光色素で標識した2つの DNA プローブを用いて2つの遺伝子領域の三次元距離を測定したところ、2領域が同じコンパートメントに属する場合はそうでない場合に比べて距離が有意に小さくなった。この結果は Hi-C から示唆されたコンパートメント構造の存在を支持するものであった。

(3) *Sulfolobus* 染色体のコンパートメント構造は細胞周期を通じて維持される

上記のコンパートメント構造は、細胞周期を同調させていない *S. acidocaldarius* でみられたものである。この構造が細胞周期に応じてどう変化するかを調べた。具体的には、"baby machine"と呼ばれる特殊な装置 (Duggin & Bell et al., *PNAS* 2008) を用いることで細胞の同調培養を行い、各細胞周期段階で細胞を回収して Hi-C に用いた。すると、コンパートメントはどの細胞周期段階においても観察され、これらの構造に大きな変化はみられなかった。一方で、一部の細胞周期段階では特定の遺伝子座において局所的な構造変化が観察された。この構造変化のメカニズム・意義については現在検証中である。

(4) B コンパートメントに局在する新規の SMC 様タンパク質"Coalescin"の発見

Sulfolobus 染色体のコンパートメント構造がどのような分子によって形成されるのかを検証するために、structural maintenance of chromosomes (SMC) ファミリータンパク質に着目して研究を行った。SMC は染色体の高次構造形成において非常に重要な役割を果たしている ATPase ファミリーであり、DNA に結合しその構造を制御することで様々な機能を果たす。なかでも、コンデンシンと呼ばれる SMC タンパク質複合体は真核生物・バクテリア・アーキアの 3 ドメインで広く保存されており、最も普遍的な染色体構造制御因子の一つと考えられている (Hirano, *Genes Dev.* 2012)。興味深いことに、*Sulfolobus* 属を含む一大アーキア群であるクレンアーキオータ門には、コンデンシンのホモログが存在しない。

我々は、*Sulfolobus* ではコンデンシンとは異なる SMC タンパク質が染色体の主要な構造因子として働くのではないかと考えた。そしてそのような因子の候補として機能未知の SMC 様タンパク質を発見し、後述する理由からこの因子を"Coalescin"と名付けた。Coalescin は N 端側に walker A モチーフを、C 端側に walker B モチーフを有する。またタンパク質配列情報から、これらのモチーフは長大なコイルドコイルで結ばれていることが予想された。これらは全ての SMC ファミリーに共通する特徴である一方、Coalescin は既知の SMC タンパク質と配列相同性を示さなかった。これらの特徴から、Coalescin は新規の SMC タンパク質であることが示唆された。

所属研究室は以前に Coalescin に対する抗体を作製しており、これを用いた ChIP-seq により *S. acidocaldarius* 染色体上での Coalescin 結合部位を既に決定していた (論文投稿中)。この結合部位と Hi-C データを比較したところ、Coalescin は B コンパートメント領域に特異的に結合していることが明らかになった。

(5) Coalescin は *Sulfolobus* 染色体のコンパートメント化を促進する

Coalescin の局在とコンパートメント構造に相関がみられたことから、このタンパク質に特に注目して以降の解析を行った。まず、*S. acidocaldarius* の近縁種でありゲノム編集がより容易である *Sulfolobus islandicus* を用いて Coalescin の機能を遺伝学的に解析した。なお、*S. islandicus* においても *S. acidocaldarius* と同様のコンパートメント構造がみられること、*S. islandicus* の B コンパートメントにも Coalescin が高度に結合していることを確かめた。

S. islandicus の Coalescin 遺伝子の破壊を試みたが、破壊株を得ることはできなかった。この結果は、Coalescin が生存に必須であることを示唆している。そこで、Coalescin の過剰発現が染色体構造に影響を及ぼすかを検証した。Coalescin の過剰発現用プラスミドを導入した *S. islandicus* 株を用いて Hi-C を行なったところ、この株ではコンパートメント構造が強化されていた。この結果と ChIP-seq の結果から、Coalescin は B コンパートメント領域に結合し、これらの領域が一つの空間に集合する (coalesce: 集合する、合体する) のを促進することで、コンパートメント構造の形成に寄与することが示唆された。

(6) Coalescin の B コンパートメントへの局在は転写によって制御される

真核生物では A コンパートメントに転写の活発な遺伝子が局在する一方、B コンパートメントには転写の不活発な遺伝子が局在する (Lieberman-Aiden et al., *Science* 2009)。そこで我々は、Coalescin の B コンパートメントへの局在に転写が影響するのではないかと考え、これを検証した。RNA-seq を行なったところ、*S. acidocaldarius* と *S. islandicus* では真核生物と同様 A コンパートメントには転写の活発な遺伝子が局在する一方、B コンパートメントには転写の不活発な遺伝子が局在していた。また、転写阻害剤を用いた実験などにより、Coalescin の DNA への結合は転写によって阻害されることがわかった。このメカニズムによって Coalescin は転写の不活発な B コンパートメント領域に局在するようになると考えられる。

(7) Coalescin は B コンパートメント遺伝子の発現抑制に寄与する

Coalescin が転写の不活発な B コンパートメントに局在することから、Coalescin が転写の抑制に関わるのではないかと考え、上述の Coalescin 過剰発現株を用いて RNA-seq を行なった。その結果、過剰発現株では B コンパートメントの遺伝子の多くがコントロール株に比べて発現減少していた。したがって、Coalescin は転写の不活発な遺伝子に結合する一方、結合領域 (=B コンパートメント領域) の遺伝子発現をさらに抑制するというフィードバック的な機構が存在することが示唆された。

以上から、*Sulfolobus* アーキアは Coalescin を介して真核生物と類似した染色体コンパートメント構造を形成すること、またこのような染色体構造制御が遺伝子発現制御に関わる可能性が示唆された。Coalescin は真核生物には保存されていないことから、真核生物と *Sulfolobus* は異なる因子を用いて染色体コンパートメントを形成していると考えられる。このような染色体構造の収斂進化がいかなる理由でどのように起きたのかは興味深い点である。

研究成果の発表・関係学会への参加状況等

研究成果の発表

本研究成果は竹俣を共同筆頭著者とする原著論文として *Cell* 誌に掲載された (Takemata et al., *Cell* 2019)。また、本研究成果を中心としたアーキア染色体構造についての総説執筆を *Journal of Cell Science* 誌から依頼された。この総説は査読の後 2020 年 3 月に当該雑誌にアクセプトされた (Takemata & Bell, *J. Cell Sci.* in press)。

関連学会への参加状況

2018 年に開催された Archaea EMBO Workshop において、受入研究者である Bell 教授が本研究成果についての招待講演を行なった。また 2019 年に開催された Gordon Research Conference Chromosome Dynamics において Bell 教授が本研究成果についての招待講演を、竹俣がポスター発表を行った。