

研究終了報告書

「ゲノム三次元構造とゲノム機能をつなぐハブ構造構築」

研究期間：2019年10月～2023年5月

研究者：西山 朋子

1. 研究のねらい

近年のシーケンス解析を中心としたゲノム構造研究によって、Mb から sub-Mb 規模の TAD (Topologically associated domain) やループドメインと呼ばれるゲノムの三次元構造が見出されており、新しいクロマチン構造の制御単位として注目されている。しかしながら実際にどのようなメカニズムでこれらのループドメインが形成されているのか、その分子レベルでの解明は進んでいない。

本研究では、ループドメインの形成原理を理解するため、ループドメイン形成に必要であると考えられている因子の一つ、コヒーシ複合体に着目し、コヒーシが制御するループ様構造のダイナミクスと、その DNA 構造がどのようにゲノム機能と連動しているかを明らかにすることを目指す。コヒーシはリング状のタンパク質複合体で、これまでの研究から、DNA 複製に依存した姉妹染色分体間接着に必須であることが知られている。同時に、TAD をはじめとしたゲノム高次構造の形成に必要であり、実際にいくつかの遺伝子座ではプロモーターとエンハンサーを近接させることで転写を活性化していることが知られている。しかしながら、一般に「ループ」と呼ばれているクロマチン高次構造(凝縮形態)の実体は不明であり、どのような仕組みでゲノム上の遠距離にある領域同士が近接しているのかは分かっていない。

上記のように、コヒーシ複合体は、複製された2本の異なるDNAを束ねる *in trans* の機能(接着)と、同一DNA鎖上の遠距離にある領域同士を近接させる *in cis* の機能(ループ様構造構築)を有し、異なる二つのタイプのゲノム三次元構造を制御している。これら二つの制御機構の共通性や相違性、相互独立性の問題は未解決であるが、すくなくともコヒーシは、「DNA複製」「転写」などのゲノム機能と、*cis/trans* のゲノム三次元構造との接点に存在し、これら構造と機能をつなぐハブの役割を果たしていると言える。本研究ではこのコヒーシを中心としたハブ構造を、ゲノム機能の制御モジュールととらえ、その構造構築機構の理解と、その *in vitro* 再構成を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、コヒーシ複合体依存的に形成されるクロマチンのハブ構造が、遺伝子発現・DNA複製・接着等のゲノム機能の発現を誘起あるいは制御するしくみを一分子レベルで理解し、人工ゲノム設計における制御モジュールとしての利用を目指した。なかでもコヒーシが形成するDNAループ構造は、ゲノム高次構造の基本モジュールとして重要な役割を担っていると考えられているが、その形成機構は不明な点が多い。本研究では、以下の5つの課題にわけ、DNAループモジュールの形成メカニズムとその応用について研究を行った。

1) 顕微鏡下におけるDNAループ形成再構成系および一分子観察系の構築

全反射顕微鏡を用い、カバーガラス上に U 字に貼り付けた 50kb 長の λ DNA がコヒーシオンおよびコヒーシオンローダーに依存して DNA ループを形成する様子を 1 分子レベルで観察できる系を構築した。

2) DNA ループ形成に必要なコヒーシオン複合体の構造的特徴の解明

上記で確立した系を用い、コヒーシオン複合体のどのような構造的特徴が DNA ループ形成に必要なかを検証した。その結果、コヒーシオンを含む SMC タンパク質複合体に共通する、ATP 加水分解活性と、それに伴うリング構造の開放が、効率的なループ形成に必要なことが明らかになった。

3) 細胞内におけるコヒーシオン構造変化の役割

上記の試験管内再構成系で明らかにしたメカニズムについて、その構造変化を細胞内で阻害した場合の表現系を解析した。DNA ループ形成が阻害されることによると考えられる遺伝子発現の変化やゲノム構造の変化に加え、染色分体間の過剰接着や、DNA 複製阻害など、複数の表現型が明らかになった。

4) コヒーシオン類似複合体コンデンシンとのループ形成メカニズムの比較

コヒーシオンと同じ SMC タンパク質複合体の一つであり、コヒーシオンと構造が類似しているコンデンシンによる DNA ループ形成の機能解析を行い、HEAT リピートサブユニットが必須であることが明らかになった。

5) DNA 高次構造形成モジュールとしての応用

ゲノム上でコヒーシオンと共局在することが知られている CTCF を用いて、コヒーシオン依存的に形成されるループ構造を人為的に形成、制御するモジュールの開発を行った。

(2) 詳細

研究テーマ 1 「顕微鏡下における DNA ループ形成再構成系および一分子観察系の構築」

コヒーシオンが有するループ押し出し活性は、DNA ループ構造を形成する原動力となり、ゲノム高次構造の基本モジュールとして重要な役割を担っていると考えられているが、その DNA ループ形成機構は不明な点が多い。図 1 に示す、フローストレッチング法を応用した *in vitro* 一分子観察系を構築し、この系を用いて DNA ループ形成のメカニズムを検証した。コヒーシオン 4 量体の Multibac、およびコヒーシオンローダー NIPBL-Mau2 MultiBac システムを用い、両タンパク質複合体を発現させ、これらの複合体を ATP とともにフローセルに導入すると、図 1

のように、馬蹄形に貼り付けた DNA が DNA ループを形成する様子が観察され、DNA ループ形成の一分子レベルで

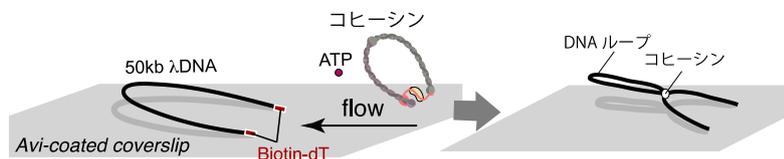


図 1. コヒーシオンによる DNA 高次構造形成解析系

の観察に成功した(図 2 左)。

研究テーマ 2 「DNA ループ形成に必要なコヒーシオン複合体の構造的特徴の解明」

上記の系で観察できたループ押し出し活性に必要な、コヒーシオンの構造変化や生化学的活

性を明らかにするため、本研究ではまず ATP 加水分解活性に着目した。コヒーシンは姉妹染色分体間接着に必須の因子であり、この接着にはコヒーシンの ATP 加水分解活性が必要であることが知られている。そこで DNA ループ押し出しにお

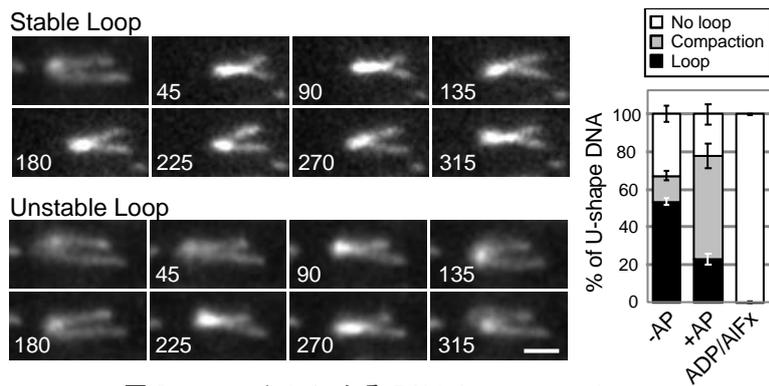


図 2. コヒーシンによる DNA loop extrusion

ける ATP 加水分解活性の必要性を調べるため、ATP の加水分解されないアナログである ADP/AIFx を ATP の代わりに一分子観察系に添加したところ、DNA ループ形成が完全に阻害された(図 2 右)。

さらにコヒーシンの構造変化の重要性を調べるため、ATP 加水分解

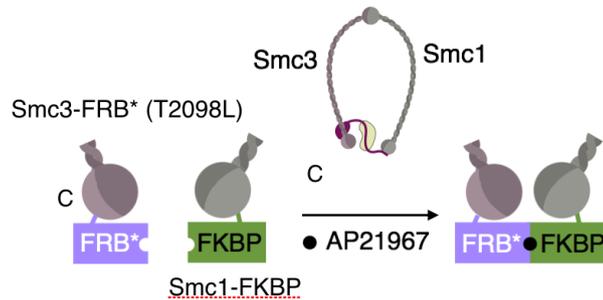


図 3. Smc1/3 ヘッドドメイン強制会合システム

に連動しているヘッドドメイン解離に着目した。ヘッドドメインの解離によるコヒーシン複合体の構造変化は、ATP 加水分解と連動しているが故に、その重要性がこれまで検証されてこなかった。そこで本研究では、コヒーシンサブユニットの Smc1 および Smc3 のヘッドドメイン同士を強制的に会合させることができるコヒーシン複合体を設計した(図 3)。このコヒーシンは Smc1/3 のヘッドドメインにそれぞれ FKBP、FRB タンパク質を融合させたもので、ラパマイシンアナログ(AP21967)を添加すると安定した二量体を形成する。この強制会合型複合体がラパマイシンアナログ存在下で DNA ループ押し出し活性を持つかどうかを調べたところ、ラパマイシンアナログ(AP)存在下で、ループ形成が顕著に減少し、代わりに DNA 凝縮を引き起こす割合が上昇した(図 2 右)。また、DNA ループを維持できる時間も、ラパマイシンアナログ存在下では顕著に減少した。一方、コヒーシンの ATP 加水分解活性を測定したところ、興味深いことに、ヘッドドメインを強制的に会合することにより加水分解活性はむしろ上昇した。このことは、ATP の加水分解活性それ自体というより、むしろ、ヘッドドメインが解離することが、安定した DNA ループの形成に必要であることを示している。以上の結果から、コヒーシンによる DNA ループ押し出しには、ATP 加水分解活性に依存した DNA ループ形成の initiation と、コヒーシンリングの開放によるループ安定化の両方が重要である可能性が示唆された。

研究テーマ 3 「細胞内におけるコヒーシン構造変化の役割」

ヘッドドメインの強制会合が細胞内機能におよぼす影響を明らかにするため、DNA 複製に着目した。コヒーシンは G1 期の間クロマチン上に結合するが、このときすでに DNA とトポロジカルに結合(コヒーシンのリング構造が DNA を抱え込んだ状態の結合)していることが知られている。このことは、コヒーシンリングの構造変化が DNA 複製の進行

に重要である可能性を示唆しているが、その直接的な作用を調べた研究は無い。HCT116 *Smc3-FKBP/Smc1-FRB* 細胞を Double Thymidine Arrest によって G1/S 期に同調させ、AP21967 添加によりヘッドドメインを強制的に会合させたのち、細胞周期を S 期にリリースし、EdU の取り込みによって DNA 複製を定量したところ、ヘッドドメインを会合させた細胞では、DNA 複製が有意に遅れることが明らかになった。さらに詳細に DNA 複製を定量するため、IdU/CldU によりラベルした DNA をスライドガラス上に展開し、IdU/CldU の取り込み領域の長さを計測することで、相対的な DNA 複製量を定量した。その結果、複製フォークの相対的な速度は AP21967 依存的に有意に減少した一方、複製起点間の距離は変化がなかった(図 4)。また、EdU をまったく取り込んでいない細胞の割合は AP21967 の有無によらず変化がなかったため、複製量減少の原因は、複製開始の失敗ではなく、複製の進行そのものに起因している可能性が考えられた。

一方、複製遅延の原因のひとつの可能性として、DNA 損傷チェックポイントの活性化が疑われる。この可能性を検討するため、DNA 損傷チェックポイントの活性化に必要な ATM/ATR の活性化を、Chk1 のリン酸化(ATR 経路)と ATM のリン酸化(ATM 経路)を指標に調べた。その結果、ヘッ

ドメインを会合した細胞では、いずれの活性化も十分に検出されず、DNA 複製の遅延は、チェックポイント活性化による間接的な細胞周期遅延ではないことが分かった。

DNA 複製遅延の原因をあきらかにするため、次に、コヒーシ複合体自身の分解を試みた。ゲノム編集によって、コヒーシサブユニットのひとつである *Scc1* にオーキシシン感受性タグロン(mAID)を付加し、オーキシシンの添加によって *Scc1* を分解できる系を構築した(図 5 左)。この細胞を用い、AP21967 でヘッドドメインを会合させた状態で *Scc1* を分解したところ、複製フォークの相対速度が有意に回復した。このことから、コヒーシ複合体の存在そのものが、複製の進行を阻害している可能性が強く示唆された。

以上の結果は、ヘッドドメインを AMP-PCP(ATP アナログ)や AP21967 によって強制的に会合させた場合、in vitro における DNA 上のコヒーシ自由拡散運動が顕著に抑制される事実を考慮すると、クロマチン上に閉じたリング構造をと

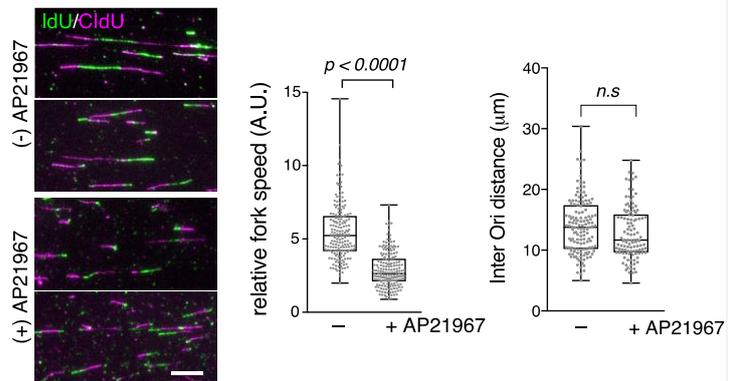


図 4. HCT116 *Smc1-FKBP/Smc3-FEB* 細胞における DNA 複製の定量

以上

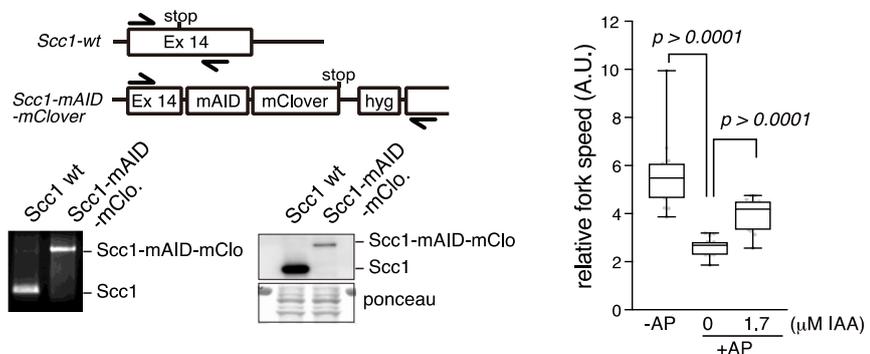


図 5. *Scc1* の分解により複製フォークの速度が回復する

るコヒーシスが DNA 複製をはじめとしたゲノム上のイベントの障害となり得る可能性を示唆している。この研究は、コヒーシンの分子構造と細胞機能のつながりを実証したはじめての報告となった(文献リスト 1)。

研究テーマ 4 「コヒーシン類似複合体コンデンシンとのループ形成メカニズムの比較」

コヒーシンによるループ形成メカニズムを明らかにするための、別の戦略として、類似複合体コンデンシンによるループ形成機構の解明も並行して行った。研究テーマ 1 の系を用い、コヒーシンおよび Scc2/4 の代わりに、哺乳動物コンデンシンを用いたところ、顕微鏡下、一分子レベルでループ形成が確認された。コンデンシンは、Smc2、Smc4、および non-Smc である CAP-H/D2/G の 5 つのサブユニットからなる。Non-Smc サブユニットのうち、HEAT リピートタンパク質である CAP-D2 および CAP-G はいずれもループ形成に必須であり、これらのいずれかを欠いたコンデンシンは、まったく DNA ループを形成できなかった。また、kleisin サブユニットである CAP-H も必須であるが、特に、CAP-H 中央の保存領域 III に存在する 6 箇所の芳香族アミノ酸が、ループ形成に必要であることが明らかになった(文献リスト 2)。

研究テーマ 5 「DNA 高次構造形成モジュールとしての応用」

DNA ループをゲノム合成の試験管内モジュールとして使用するにあたり、ゲノム上でコヒーシン依存的な DNA ループサイズを制御すると考えられる CTCF や転写カセットをモジュール内に組み込むこと、そしてそれらのハイスループット系を開発することが重要である。そのために、まず 50 kb 長の λ DNA に CTCF 結合カセットを 2 か所挿入した DNA を作成した。また、ハイスループット系構築の準備段階として、 λ DNA の両端に蛍光標識を行い、ループを一分子 FRET の手法で観察する系も同時に開発中である。ここでは、DNA 二本鎖に入り込むペプチド核酸を用いた標識方法を検討し、 λ DNA の 5' および 3' 末端配列とトリプレットを形成するペプチド核酸を設計し、これを ATTO550 および ATTO647N で蛍光標識したものを合成した。

3. 今後の展開

本研究では、主に、ゲノム高次構造の一つの構成単位である「DNA ループ構造」が形成される仕組みを、SMC タンパク質複合体であるコヒーシンやコンデンシンの機能と結びつけて明らかにした。しかしながら、本研究で明らかにしたメカニズムは、ループ形成メカニズムの一部に過ぎず、全体像を理解するためには、さらなる研究が、おもに構造学分野において必要である。さらに SMC タンパク質複合体に依存しない高次ゲノム構造の形成メカニズムや、コヒーシンの必須機能である姉妹染色分体間接着メカニズムとの相違点についても、不明な点が多く残されている。ゲノム高次構造形成メカニズムの包括的な理解には、さらなる研究を要する。

これらのメカニズムが解明されれば、「ゲノム合成」にむけて、ボトムアップの手法で人工ゲノムを設計したとき、人工ゲノム高次構造形成エレメンツを導入することで、本来一次元のゲノム情報を三次元化することができ、より複雑な制御を可能にする。将来的なゲノム設計の基盤となる技術である。社会実装への主なタイムラインを以下に示す。

- A. SMC タンパク質複合体による DNA ループ形成機構の解明:2 年
- B. SMC タンパク質複合体非依存的な DNA 高次構造形成機構の解明:5 年

- C. ボトムアップ人工ゲノムエレメントの開発:5年
- D. (A)(B)の人工ゲノムへの実装:5-8年
- E. 医療分野への応用:10-15年

4. 自己評価

研究目的の達成状況

DNA 高次構造(とくに DNA ループ)形成メカニズムの一分子レベルでの解明は、他グループとの共同研究もあり、予想以上に進展した。一方で、その全容解明には至っておらず、今後解明すべき課題が多く残されている。

人工ゲノムのエレメントとしての応用を見据えた研究は、長鎖ゲノムを改変する技術が予想以上に困難であり、時間を要した結果、当初の計画通りには進まなかった。一方で、領域内研究者に助言を頂いたことで、当初想定していなかったペプチド核酸技術の導入を検討することができ、新たな技術開発の方向性が拓かれた。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

研究実施体制、研究費執行状況ともに、問題はなかった。新型コロナウイルス蔓延の影響を受け、平時に比べて研究実施体制が脆弱であった傾向はある。研究費執行は、一分子 FRET 可能な顕微鏡をセットアップでき、本研究遂行にとって大きなメリットとなった。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

現在世界的に進んでいる人工ゲノム合成プロジェクト Synthetic Yeast2.0 では、染色体高次構造が極めて単純な出芽酵母の染色体合成に取り組んでいる。抗生物質の生産や産業応用には極めて絶大な波及効果をもっているが、その一方で、真核生物ゲノムの高次構造的側面における複雑性を有さない染色体を扱っている点で、将来的な医療応用に向けた限界も示唆される。本研究は、ヒトを含む高等真核生物の複雑な染色体構造を人為的に合成するために必要な、「ゲノム高次構造化エレメント」の開発につながるものである。その社会的な波及効果は、現在の Yeast2.0 プロジェクトの先にある、医療応用に直結する次世代の人工ゲノム合成プロジェクトに現れることが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:2件

1. Ryota Sakata, Kyoma Niwa, Diego Ugarte La Torre, Chenyang Gu, Eri Tahara, Shoji Takada, Tomoko Nishiyama.

Opening of cohesin's SMC ring is essential for timely DNA replication and DNA loop formation. Cell Reports (2021) April 27. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108999

真核生物におけるゲノムの均等分配には、姉妹染色分体間接着が必須である。本論文では、この染色分体間接着に必須の因子コヒーシンの立体構造変化を人為的に制御し、正常に機能できない状態にすると、DNA複製が正常に進行しないこと、分裂前期における姉妹染色分体間の解離ができなくなること、また、DNAループ形成が効率よく行われなくなることを発見した。この発見は、染色体の複製と分配という、真核生物にとって生存に不可欠の2つの事象が、お互いに密接に関係していることを示すものであり、さらにコヒーシン依存的なDNAループ形成のメカニズムの理解を深めるものとなった。

2. Kazuhisa Kinoshita, Yuko Tsubota, Shoji Tane, Yuuki Aizawa, Ryota Sakata, Kozo Takeuchi, Keishi Shintomi, Tomoko Nishiyama, Tatsuya Hirano.

A loop extrusion-independent mechanism contributes to condensin I-mediated chromosome shaping. *J Cell Biol* (2022) 221 (3): e202109016. doi: 10.1083/jcb.202109016

本論文では、コンデンシン I 依存的な DNA ループ形成のメカニズムを解析した。コンデンシン I の HEAT リピートサブユニットである CAP-D2 および CAP-G は、いずれも DNA ループ形成に必須であるが、CAP-D2 はある種の染色体凝縮構造の形成に必須であるのに対し、CAP-G は必須ではなかった。また、CAP-G と類似の表現型が、kleisin サブユニットである CAP-H の中央保存領域の変異体で観察された。これらの結果から、コンデンシン依存的な染色体凝縮には、ループ形成依存的なメカニズムと、非依存的なメカニズムの両方が存在していることが明らかになった。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際会議における招待講演

Nishiyama T Ring conformation of cohesin regulates DNA loop extrusion and genome functions, MBSJ Annual meeting, Dec. 2022, Chiba Japan

Nishiyama T Opening of Cohesin's SMC ring is essential for timely DNA replication, EMBO Workshop: SMC proteins, Sep. 2022, Edinburgh UK

Nishiyama T. Single-molecule approach for understanding genome architecture, 30th Hot Spring Harbor International Symposium, Jan. 18, 2022 Online.

Nishiyama T. Single-molecule approach for understanding genome architecture, 2nd SingAC Workshop, Dec. 10, 2021 Online.

Nishiyama T Understanding cohesin dependent structural organization of DNA in single molecule resolution, The 2nd HMGU-Japan Symposium "Epigenetics and Chromatin Potential" Mar. 27-28, 2020, Tokyo, Japan

Nishiyama T Understanding cohesin dependent structural organization of DNA in single molecule resolution, Chromosome Dynamics 2019 Dec. 8-10, 2019, Basel, Switzerland