

研究終了報告書

「ゲノム構築における DNA トポロジーの役割」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：Canela Andres

1. 研究のねらい

すべての生物のゲノムは、細胞内に収まるように折り畳まれなければならない。この折り畳みはランダムではなく、連れ立って折り畳まれる領域があり、これによってゲノム間の相互作用がより頻繁に起こる。このような相互作用のある領域はドメインと呼ばれ、遺伝子発現や細胞分裂を制御するために重要である。進化的に保存されている染色体構造維持 (SMC) タンパク質複合体は、ゲノムの折り畳みを仲介し、トポイソメラーゼ 2 活性部位と関連している。本研究の目的は、トポイソメラーゼ 2 活性が、細菌および哺乳類のゲノム構成にどのように寄与しているかを解明することにある。DNA へのタンパク質の結合、ねじれストレス、ゲノム構成をアッセイするゲノム技術を用いて、(i)哺乳類細胞におけるトポイソメラーゼ II β (TOP2 β) の SMC コヒーシ機能への寄与、(ii)大腸菌におけるトポイソメラーゼ IV と SMC 複合体である MukBEF のゲノム構成への寄与を研究した。

2. 研究成果

(1) 概要

バクテリアから哺乳類に至るまで、ゲノムはドメインと呼ばれる相互作用しあう領域で折り畳まれている。この構造には、進化的に保存されてきた染色体構造維持 (SMC) 複合体が重要な役割を担っている。哺乳類では、SMC コヒーシが、CTCF の結合によって区切られた一連のループに間期染色体を折り畳み、トポロジカル・アソシエイテッド・ドメインと呼ばれている。大腸菌では、SMC は MukBEF 複合体であるが、ドメイン形成への寄与はまだ不明である。SMC 複合体は、トポイソメラーゼ II 型 (TOP2) 酵素と会合し、スーパーコイルやカタネーション (エンタングルメント (絡み合いの意味) ともいう) といった DNA のねじれを緩和する。TOP2 β の活性はコヒーシと関連し、コヒーシと CTCF が結合したループアンカーに局在することを以前に発見したが、これらの場所での TOP2 β の機能、ゲノム構築への重要性は不明であった。大腸菌では、SMC 複合体 MukBEF も TOP2 であるトポイソメラーゼ IV (TopoIV) と相互作用している。

本研究では、さきがけプロジェクトでゲノム技術を用い、哺乳類と大腸菌のゲノム構成における TOP2 の機能を解析した。哺乳類では、TOP2 とコヒーシの構成要素を枯渇させる誘導性オーキシニベースデグロンシステム (mAID) を用いた細胞株を用いて、TOP2 がコヒーシによるクロマチンの圧縮に必要であることを発見した。大腸菌では、MukBEF と TopoIV が高転写領域、特にドメイン境界であるリボソーム RNA オペロンに結合する。驚くべきことに、これらの場所での MukBEF の機能は、コヒーシのようにドメインの形成を促進するのではなく、むしろそれを阻止していることが判明した。このことは、これらのドメインは哺乳類におけるような

調節相互作用の場ではなく、高い転写と複製によって生じる DNA ねじれの毒性副産物、DNA の絡みあったもつれ(エンタングルメント)であることを示している。

(2) 詳細

1: 大腸菌のゲノム構成における MukBEF とトポイソメラーゼ IV の役割の研究

1.1 MukBEF と TopoIV の結合位置の同定

大腸菌では、ゲノムはマクロドメインで構築されている。近年、Hi-C などの染色体構造解析技術により、マクロドメインの内部に小さな染色体相互作用ドメインが存在することが明らかになった。このドメインの境界は、リボソーム RNA 遺伝子 (rRNA) のような高転写領域と重なっている。MukBEF は大腸菌の SMC 複合体であり、細菌の TOP2 で一種のデカテナーゼであるトポイソメラーゼ IV (TopoIV) と相互作用している。さらに、大腸菌は、正のスーパーコイルを緩和する第 2 の TOP2 であるジャイレースを持っている。エピトープタグを用い、ChIP-seq によりこれらのタンパク質の結合位置をマッピングした。MukBEF の分布は高転写領域、特に 7 つの rRNA オペロンに集積し、ドメイン境界と重なっている。このような場所は TopoIV の結合や活性と一致するが、ジャイレースの結合とは重ならない。転写領域における MukBEF の結合は、RNA ポリメラーゼ (RNAP) の結合と関連しており、転写終結部位 (TES) に優先的に蓄積していた。

1.2 転写により MukBEF がゲノム上に配置される

TES における MukBEF の濃縮が、一本鎖 DNA によって仲介されるものではないことを発見した。そこで、活発な転写が MukBEF の位置を決めるかどうかを解析した。転写活性を抑制したり修飾したりするいくつかの実験によって、MukBEF は RNAP のダイナミクスに追従し、その蓄積は転写に依存することがわかった。また、MukBEF が結合するためには、MuliB の ATP 結合と加水分解活性が必要であることも判明した。結論として、転写は MukBEF をゲノムに位置づける力であり、MukBEF の ATP 結合と加水分解が必要であることがわかった。

1.3 MukBEF は高転写による短距離相互作用の形成を回避している

rRNA クラスターや高転写領域は染色体ドメインの境界であり、MukBEF はこれらの場所に結合する。ドメイン形成における MukBEF の役割を理解するため、野生株と MukBEF オペロン欠失株で Hi-C を実施した。これは、さきがけ領域内共同研究の一環として実施した竹俣直道氏との共同研究である。MukBEF SMC が存在しない場合、染色体ドメインは消滅せず、むしろ野生型細胞よりも多く小さくなり、近距離の相互作用が増え、境界が強化された。これらの結果は、MukBEF がドメインの形成に否定的な影響を与えていること、促進するのではなくむしろ抑制していることを示唆している。MukBEF を欠く大腸菌は低温でしか成長せず、染色体の分離に問題があり、無核細胞や、融合した多核の DNA の塊を含む糸状細胞になっている。栄養価の低い培地での培養や rRNA オペロンの欠失によって rRNA 転写を減少させると、短距離相互作用と染色体分離欠損の両方が回復した。このように、rRNA の転写はこれらの相互作用の原因である。転写は、DNA にスーパーコイルという形でのねじれストレスを与え

うるし、また、姉妹染色体間のカテネート(絡み合い)を引き起こすと考えられ、Hi-C で近距離相互作用の増大として示されている。これらの相互作用は正のスーパーコイルではないことを同定した。そこで、Hi-C で検出された相互作用は姉妹染色体間のもつれであるとすれば、MukBEF 欠損時の染色体分離不全が説明されると仮説を立てた。rRNA クラスターの高転写がポジティブスーパーコILINGを発生させ、それが複製中に姉妹染色体を絡み合わせる(タングルメントを引き起こす)という仮説である。MukBEF が TopoIV と連携することで、これらの領域での絡み合いが解消され、そうでなければ染色体分離が損なわれることになる。

1.4 MukBEF 非存在下での短距離 DNA 相互作用の解析

現在、姉妹染色体間の DNA の絡み合いの存在の検証に取り組んでいる。プラスミド中のカテネートの存在をゲル電気泳動で解析したところ、MukBEF 欠失株から分離したプラスミドにはカテネートが多く蓄積されており、染色体相互作用が姉妹染色体間の絡み合いであることを裏付けている。また、姉妹染色体間と染色体内の相互作用を区別できる Hi-C 法を用いて、姉妹染色体間の絡まりを検出する方法を確立しているところである。

2.: TOP2 非存在下での哺乳類細胞ゲノム構成の解析

2.1 TOP2 非存在下でのゲノム構成の解析

TOP2 β はコヒーシと CTCF が結合したループアンカーで作用し、その活性はコヒーシの結合と関連している。TOP2 活性を全て除去するために、誘導性オーキシシ(mAID)デグロンシステムを用いて、G1 で TOP2 α を枯渇させる TOP2 β $-/-$ マウス由来 preB 細胞を作成した。TOP2 の欠損は、コヒーシの結合をある程度減少させることを ChIP-seq により発見した。次に、このシステムを CTCF やコヒーシアンローダーである WAPL のようなコヒーシ構成要素のデグロンと組み合わせた。WAPL 枯渇は、間期においてクロマチン凝集・圧縮するコヒーシを蓄積し、バーミセリと呼ばれるミズ状の軸構造を生成する。TOP2 が欠損しているとバーミセリ構造形成が阻害され、TOP2 β の再発現によりその形成が回復することから、TOP2 β がコヒーシによる DNA コンパクションに必要であることが明らかとなった。

2.2 TOP2 はループアンカーにどのようにリクルートされるか

コヒーシ成分が TOP2 β と相互作用することを共免疫沈降法により発見した。SMC1、SMC3、NIPBL は TOP2 β と相互作用するが、この相互作用は直接的ではなく、DNA を介したものであった。このことから、TOP2 β の位置や活性はコヒーシ結合に依存していると考えられる。TOP2 β がコヒーシによって直接ループアンカーにリクルートされるのか、コヒーシによるループ形成によってクロマチンへトラップされるのかを検討するために、CLOuD9 と呼ばれるコヒーシに似た人工ループの形成を誘導するシステムを構築した。このシステムは、薬剤誘導可能な二量化ドメインを持つ 2 つの dCas9 が染色体の 2 箇所を繋いでいる。

2.3 ループ形成時のねじり応力の測定

TOP2 β がループアンカーで解放するねじり応力を同定するため、以下の実験系をセットアップした: (i) ソラレン-ビオチンによる負のスーパーコイル形成のマッピング。ソラレンは負のス

ーパーコイル DNA に優先的にインターカレートし、ビオチンカップリングによりソラレンを含む DNA を精製し、塩基配列を決定することができる (ii) 正のスーパーコイルのマッピング。正のスーパーコイル DNA に生体内で会合する細菌タンパク質 GapR の preB 細胞での誘導性発現をセットアップした。タグを用いることで、結合領域のマッピングと ChIP-seq によるポジティブスーパーコイルの同定が可能となる。すでにその測定に成功した。

3. 今後の展開

今後、MukBEF 非存在下での姉妹染色体間のエンタングルメントの有無を Hi-C 法で検証する予定である。次に、スーパーコイルがどのようにエンタングルメントを引き起こすのか、また、転写終結部位への MukBEF のリクルートがスーパーコイルによって媒介されているのかどうかを調べる。また、真核生物の進化的な親戚である SMC5/6 も MukBEF 類似の機能を持っているかどうかを調べたい。さらに、本研究の成果は、MukBEF-TopoIV と同時に rRNA の転写量や正のスーパーコイルを増大させる(たとえばジャイレースを標的として)ことによって、相乗効果を発揮する新世代の抗生物質の開発に利用することができる。

4. 自己評価

全体として、さきがけプロジェクトでの成果に満足している。バクテリアでの研究はサイドプロジェクトとして始まり、今では自身のメインプロジェクトとなった。大腸菌を研究した経験がなかったため、良い結果を得ることができて嬉しく思っている。難易度は高かったが、さきがけ内外の共同研究者に助けられた。哺乳類細胞で培ったゲノム解析技術のほとんどを細菌用に設定することができた。近々、結果を発表したい。この大腸菌での研究が良い結果をもたらしたことで、哺乳類 TOP2 β 研究よりも集中することになったが、哺乳類での研究についても近い将来継続するための予備データを得ることができている。未経験者にとってはリスクの高い細菌プロジェクトに集中させていただいたこと、竹俣直道氏との共同研究にも資金を提供していただいたこと、さきがけアドバイザーの方々に感謝する。将来的には、MukBEF を抗生物質の標的として、転写の増加やスーパーコイルとの組み合わせで、新しい治療法として利用できるようなれればと考えている。

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: 1件

1. Emralino, FL, Majdalani N, Osada N, Huang SN, Takemata N, Canela A. MukBEF ensures proper chromosome segregation of highly transcribed regions. in submission

大腸菌 MukBEF と TopoIV は転写の多い領域に濃縮され、その結合は転写に依存することがわかった。また、ドメイン形成における両者の寄与を解析した結果、これらの部位における MukBEF の機能は形成を促進するものではなく、むしろ阻害するものであることがわかった。このドメインは染色体分離の問題を反映した有害な相互作用であり、MukBEF と TopoIV の組み合わせにより、高転写によって生じる姉妹染色体間の DNA 絡みを解消し、染色体分離を適切に行うことができると提案した。大腸菌の染色体ドメインは、哺乳類のように SMC が積

極的に形成する調節単位ではなく、高転写・複製によって生じる DNA のねじれによる有害な副産物であることを示す成果である。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のものも含む)

(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)

- 第 45 回日本分子生物学会年会, 2022 年 11 月 30 日
- 第 21 回核ダイナミクス研究会, 2022 年 12 月 20-21 日