

研究終了報告書

「アーキアゲノムの分配機構と染色体工学への応用」

研究期間：2020年11月～2024年3月

研究者：竹俣 直道

1. 研究のねらい

(1) アーキアセントロメアの探索と解析

アーキアは真核生物の起源となった原核生物であるだけでなく、高い極限環境耐性や独自の代謝系をもつことから、基礎・応用の両面において重要な微生物である。しかし、アーキアでは染色体分配の起点となるセントロメアが同定されておらず、染色体分配というゲノム機能の根幹部が未解明となっている。また、このような知見の欠如により、アーキアではゲノム機能の大規模改変を可能にする人工染色体が未だ開発されていない。

研究実施者は、超好熱性アーキア *Pyrobaculum calidifontis* においてセントロメアに似た高次構造を形成する領域を3C-seqにより同定した。この領域(Secondary Diagonal Forming Region、以下 SDFR とする)はタンパク質遺伝子を含む約 15 kb の領域で、大きく折れ曲がることで3C-seq の contact matrix において対角線状のシグナルを形成する。また、SDFR は多くの細胞で極に位置することがDNA FISHから明らかになった。このような折れ曲がり構造や極への移動は、真核生物やバクテリアのセントロメアでもみられる特徴となっている。本研究では、「SDFR 領域にセントロメア配列が存在する」という仮説のもと、アーキアの染色体分配機構の解明とそれを応用したアーキア人工染色体の開発を目指した。

(2) 原核生物における SMC タンパク質の研究

ゲノムの三次元構造を規定する原理の解明は、機能的なゲノムを人工的に設計する上で不可欠である。SMC タンパク質は、真核生物においてDNAループを押し出すことで染色体ドメインの形成を引き起こす。一方、SMC タンパク質が原核生物において同様の機能を果たしているのかは十分に解明されていない。そこで本研究では、*Thermococcus kodakarensis* アーキアにおいて SMC 複合体が染色体ドメインの形成に関わるかを検証した。

2. 研究成果

(1) 概要

テーマ1: アーキアセントロメアの探索と解析

3C-seq の分解能を向上させるとともに、近縁種についても3C-seq解析を行うことで、SDFR 中で実際に折れ曲がり構造を形成する領域を6 kb にまで絞り込んだ。この領域に結合する因子を探索することで染色体分配タンパク質の候補を同定することを試みたが、結合タンパク質の同定には至らなかった。また、SDFR の細胞極への局在が転写に依存するという予想外の事実を明らかにした。SDFR は、自身から転写されるRNAの働きによって細胞極へと局在し、この機能を通じて染色体分配を促進しているのかもしれない。予想された SDFR の機能をより直接的に検証するため、*P. calidifontis* における遺伝子破壊系の構築を試みた。

テーマ 2: 原核生物における SMC タンパク質の研究

T. kodakarensis アーキアにおける SMC 複合体 (Smc-ScpAB) の機能を解明するため、3C-seq 解析を行なった。その結果、*T. kodakarensis* においてこれまで見過ごされていた染色体逆位の存在を明らかにした。さらに、*T. kodakarensis* の Smc-ScpAB が染色体ドメインの形成に関わることを発見するとともに、このドメインの境界を規定する DNA 結合タンパク質やドメイン境界の配列的特徴を同定した。

(2) 詳細

テーマ 1: アーキアセントロメアの探索と解析

(i) セントロメア候補配列の絞り込み

SDFR 中で実際に折れ曲がり構造を形成する領域をより高分解能で決定することで、セントロメアとして働く可能性のある領域を絞り込むことを試みた。そのために 3C-seq プロトコルの改良を行い、*P. calidifontis* の染色体構造を分解能 300 bp で再度決定した。この分解能は、これまで原核生物で行われてきた Hi-C/3C-seq 解析では最高のものとなっている。実験の結果、当初は約 15 kb の領域でみられた染色体の折れ曲がり構造は、実際には約 6 kb のオペロン領域で起きていることがわかった。また、近縁種である *Pyrobaculum oguniense* に対しても高分解能 3C-seq を実施したところ、この種においても同一のオペロン領域が折れ曲がり構造を形成していることが明らかとなった。以上の結果から、このオペロン領域を SDFR として再定義し、セントロメアの候補領域とした。

(ii) 染色体分配タンパク質の探索

セントロメア候補配列である SDFR に結合する因子を探索することで、アーキアにおける染色体分配タンパク質の候補を同定することを試みた。具体的には、SDFR に結合するタンパク質を ePICH (Ide et al., *Nat. Commun.* 2015) と呼ばれる手法により同定することを試みた。この手法では、ホルマリン固定した染色体を制限酵素により断片化した後、標的領域を LNA プローブとアニーリングさせることで単離し、そこに結合しているタンパク質を同定する。まず、*P. calidifontis* の SDFR に対して ePICH を実施し、DNA が実際に回収できていることをリアルタイム PCR により確かめた。続いて、結合タンパク質を SDS-PAGE と銀染色によって検出することを試みたが、明瞭なバンドはみられなかった。今後は実験条件の更なる最適化を行うか、DNA アフィニティ精製による結合タンパク質の同定を目指す予定である。

(iii) セントロメア候補配列の機能検証 1

真核生物では、セントロメアから転写される RNA がセントロメアの機能に重要であることが示唆されている (Zhu et al., *Chromosoma* 2023)。SDFR と転写の関連を調べるため、*P. calidifontis* を転写阻害剤であるアクチノマイシン D で処理した条件で 3C-seq を行ったら、SDFR の折れ曲がり構造が消失していた。一方、*P. calidifontis* を翻訳阻害剤であるピュロマイシンで処理しても折れ曲がり構造の消失は起こらなかったことから、アクチノマイシン D の効果はグローバルな遺伝子発現の減少によって間接的に引き起こされるわけではないことが示唆された。

SDFR が何らかの力によって細胞極へと牽引されると、染色体全体は SDFR で折れ曲がった

構造をとりやすくなると考えられる。また、細胞極へと移動した SDFR がその位置にとどまれば、空間的な制約から染色体は折れ曲がり構造を維持するはずである。研究実施者は、SDFR の細胞極への局在が転写によって駆動されることで、転写依存的な SDFR の折れ曲がりが起こるのではないかと考えた。これを検証するため、アクチノマイシン D で処理した *P. calidifontis* に対して DNA FISH を行うことで SDFR の局在を調べた。すると、SDFR の極局在はアクチノマイシン D によって大きく減じていた。ピューロマイシンで処理した細胞においても SDFR の極局在はやや阻害されていたが、アクチノマイシン D に比べてその効果は弱いものであった。

転写依存的な SDFR の細胞極局在はどのようにして起こるのだろうか？ 原核生物では、膜タンパク質の膜挿入が転写・翻訳と共役して起こる (transertion) ことで、膜タンパク質遺伝子が細胞膜近傍へと移動することが知られている。また、古い説ではこの移動が染色体分配を駆動する力として働くことが提唱されている (Norris, *Mol. Microbiol.* 1995)。一方、SDFR の極局在は翻訳阻害の影響をあまり受けなかったことから、この移動は transertion とは異なる機構によって引き起こされると予想される。研究実施者は、SDFR から転写される RNA が転写と共役して細胞極に移動することで SDFR の極局在を促し、さらにこの運動が染色体分配も促進するのではないかと現在考えている (図 1)。真核生物では、このような RNA 局在化機構が実際に特定のゲノム領域の局在を制御することが示唆されている (Quinodoz et al., *Cell* 2021)。

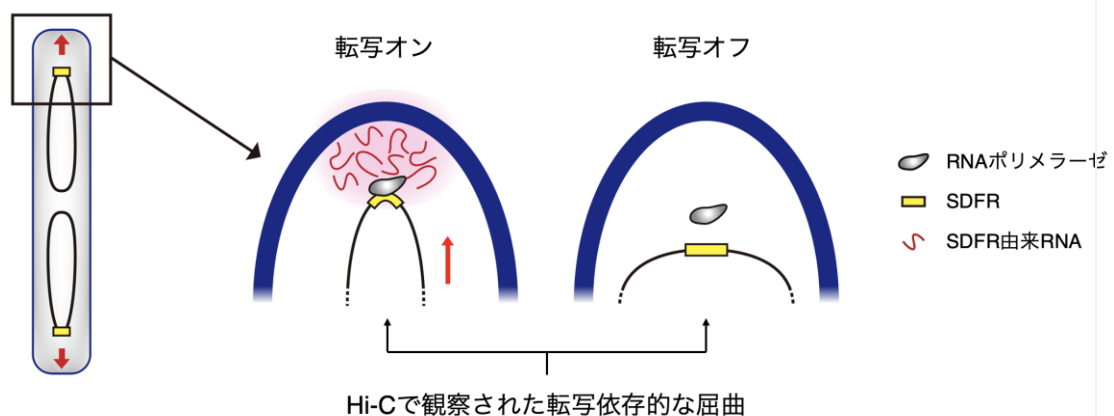


図 1. *P. calidifontis* における染色体分配モデル

(iv) セントロメア候補配列の機能検証 2

SDFR がセントロメアとして働きうるかを直接的に検証するため、*P. calidifontis* における遺伝子破壊系の構築を試みた。DNA 導入のための実験条件を確立するため、ウラシル生合成遺伝子 *pyrE* を標的とした破壊用コンストラクトをエレクトロポレーションによって細胞へ導入し、破壊株を 5-FOA によるカウンターセクションによって単離することを目指した。しかしながら、現在までに破壊株の創出には至っていない。今後はエレクトロポレーション条件を更に検討するとともに、異種アーキアを介したプラスミド接合伝達 (Catchpole et al., *Nat. Microbiol.* 2023) によって遺伝子破壊コンストラクトを導入できないか検討する予定である。

(vi) 同定された染色体分配因子を搭載したアーキア用長鎖 DNA ベクターの開発

染色体分配に必要な因子の同定が完了していないため、実施していない。

テーマ 2: 原核生物における SMC タンパク質の研究

多くの原核生物は Smc-ScpAB と呼ばれる SMC 複合体を有している。バクテリア Smc-ScpAB は染色体ドメインの形成には関わらないことがさまざまな研究から示されているが、アーキア Smc-ScpAB の機能はこれまでにほとんど研究されていない。そこで本研究では、遺伝子破壊が可能な多倍体アーキアである *T. kodakarensis* を用いて Smc-ScpAB の機能解析を行なった。

T. kodakarensis における Smc-ScpAB の機能を調べるための準備として、*T. kodakarensis* に対する高分解能 3C-seq プロトコルを確立した(最高分解能:500 bp)。このプロトコルを用いて *T. kodakarensis* 野生株の染色体構造を調べたところ、染色体逆位の存在を示す相互作用シグナルが観察された。この逆位は、約 10 kb の相同なウイルス由来配列 (TKV2、TKV3) が breakpoint となって生じたことが示唆された。PacBio シーケンシングを含む様々な追加検証の結果、*T. kodakarensis* では逆位を含む染色体コピーとそうでない染色体コピーが 1 細胞レベルで混在していることが示唆された。*T. kodakarensis* のゲノム配列がショットガンシーケンシング法によって決定された際には、このようなヘテロな逆位の存在は見逃されてしまったのだと考えられる (Fukui et al., *Genome Res.* 2005)。今回の予想外の発見は、代表的なモデル生物アーキアである *T. kodakarensis* を研究する上で重要な基礎的知見になると考えられる。

また、上述の 3C-seq 解析では *T. kodakarensis* の環状染色体が 2 つのドメイン構造に区切られることも明らかになった。遺伝子破壊株を用いた解析から、これらのドメインは Smc-ScpAB によって形成されることが確かめられた。真核生物では、SMC 複合体のループ押し出しが特定の DNA 結合因子 (バウンダリー因子) によって止められることで染色体ドメインの境界が形成される。検証の結果、*T. kodakarensis* のドメイン境界の一方は TrmBL2 という DNA 結合タンパク質によって規定されることが明らかになった。TrmBL2 は DNA 上で繊維状構造を形成することで DNA の剛性、すなわち曲がりにくさを大きく上昇させることが *in vitro* の研究から示唆されている (Efremov et al., *JBC* 2015)。このような剛性の増大は、SMC 複合体が DNA 鎖を手繰り寄せながら進行するのを阻害することでループ押し出しを停止させるのかもしれない (図 2)。この発見は、真核型の染色体ドメイン形成機構がアーキアにも存在することを示しただけでなく、染色体高次構造と DNA 物性の関連を示唆した点で新規性の高い知見であるといえる。

続いて、TrmBL2 が Smc-ScpAB のゲノム局在をどう制御しているかを検証するため、ChIP-seq を行なった (九州大・石野教授との共同研究)。その結果、TrmBL2 はドメイン境界領域において Smc-ScpAB を高効率で停止させることがわかった。また、それよりはかなり効率が低いものの、TrmBL2 は非境界部位においても Smc-ScpAB を停止させていた。興味深いことに、この停止効率は停止領域の AT 含量と正の相関を示した。AT リッチな DNA 配列は何らかの構造的性質を介して停止効率に影響するのではないかと考え、停止領域の物性を機械学習を元にしたツール (Li et al., 2022; Li et al., 2024) や分子動力学シミュレーション (京大・高田教授との共同研究) により解析した。その結果、DNA の静的持続長および DNA minor groove の負電荷が停止効率と相関すること、また AT リッチ配列はこれら 2 つの物理量について高い値を示すことがわかった。以上から、*T. kodakarensis* では TrmBL2 および DNA 配列の物性という 2 つの要因がドメイン形成に重要であることが示唆された。本発見は、ゲノムの高次構造が DNA の一次配列によ

って規定される可能性を示すものであり、基礎分野だけでなくゲノムデザインの観点からも重要な知見をもたらすと期待される。

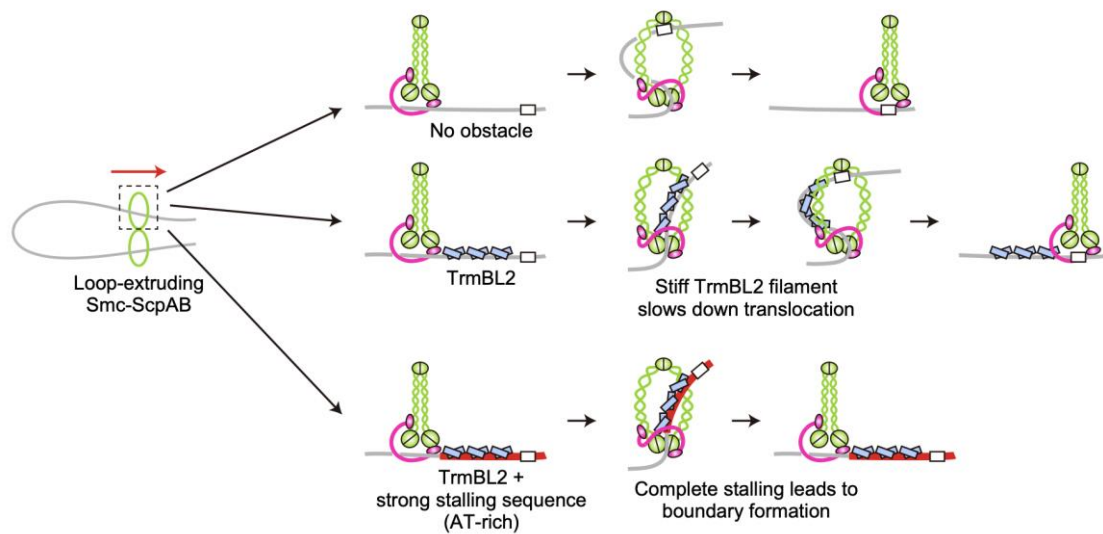


図 2. TrmBL2 がループ押し出しを停止させる機構のモデル

3. 今後の展開

テーマ 1: アーキアセントロメアの探索と解析

SDFR 領域について更なる研究を行うことで、この領域が実際にセントロメアとして機能するかを 1-2 年以内に検証する。特に、SDFR の機能を直接的に検証するための遺伝子破壊系構築に注力する。その後、得られた知見を用いることで、アーキアで機能する人工染色体ベクターを 3 年以内に開発することを目指す。

テーマ 2: 原核生物における SMC タンパク質の研究

アーキア SMC 複合体について得られた知見の一般性を検証するため、真核生物やバクテリアにおける SMC 複合体のループ押し出しが剛性などの DNA 物性によってどのような影響を受けるのかを検証する。

4. 自己評価

アーキアセントロメアの探索とその応用については、遺伝子破壊系の構築が思うように進まなかったことなどが要因となり、当初の研究目標を十分に達成できなかった。一方、今回示唆された転写依存的なアーキア染色体の分配モデルは高いオリジナリティを有しており、これを立証することができればインパクトの大きい基礎研究成果になると考えている。メタゲノム解析などによってアーキアの遺伝資源的価値は今後ますます高まると考えられるが、これらの遺伝資源を活用するためのアーキア人工染色体を開発する上で本知見は重要な一歩になると考えている。

SMC タンパク質の研究については、染色体ドメインの起源や本質に迫るような研究成果が得られただけでなく、*T. kodakarensis* における逆位の発見など予想外の発見も得られており、当初の計画以上の進展が達成できたと考えている。

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. Hirai H, Takemata N, Tamura M, Ohta K. Facultative heterochromatin formation in rDNA is essential for cell survival during nutritional starvation. *Nucleic Acids Res.* 2022 Apr 22;50(7):3727-3744. doi: 10.1093/nar/gkac175.

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件

(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)

学会発表

1. Molecular mechanism of SMC-mediated domain formation in archaea.
Chromosome Dynamics Gordon Research Conference (Lucca, Italy, June 2023).
2. Archaeal Smc-ScpAB and the Xer recombinase create TAD-like structures.
Genome Organisation by SMC Complexes (Edinburgh, United Kingdom, September 2022).
3. Condensin-mediated organization of archaeal chromosomes.
EMBO Molecular Biology of Archaea (Frankfurt, Germany, August 2022).
4. 第三の生物ドメイン「アーキア」はセントロメアをもつか?第 45 回日本分子生物学会年会
(千葉、2022 年 12 月)(招待あり)

受賞

令和 4 年度 極限環境生物学会 研究奨励賞受賞

競争的資金

令和 6-12 年度 アーキアがもつ始原的クロマチン構造の理解と操作に向けて(JST 創発的研究支援事業)

令和 6-8 年度 A tale of tails – reconstructing evolutionary transition between archaeal and eukaryotic chromatin(ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム)