

令和元年6月11日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07455

研究課題名(和文) コンデンシンによる染色体軸構造の形成メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of axial formation in chromosomes mediated by condensins

研究代表者

小野 教夫 (Ono, Takao)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：20291172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：コンデンシンIおよびIIは、有糸分裂染色体の構築において中心的な役割を果たす複合体であるが、どのように染色体形態の形成に寄与し得るかは不明のままである。物理化学的観点からこれらの問題に取り組むために、我々は染色体構造の可逆的な再組織化を誘導する実験系を確立した。このアッセイとsiRNAを組み合わせた解析を行って、クロマチンの形態がコンデンシンIIに基づく軸の再編成と密接に関連していることを明らかにした。一方、コンデンシンIまたはトポイソメラーゼIIの貢献は比較的小さいことが分かった。さらに、機械学習アルゴリズムwndchrmを使用した定量的形態解析は我々の結論を支持した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では塩濃度の変化させることによって、コンデンシンIIの軸とクロマチンの再組織化への貢献があぶり出された。この成果は、分裂期染色体の構築における染色体軸とクロマチン凝縮の分子メカニズムに、物理化学的側面が存在することを示している。最近になって、クロマチンはそれ自体で液体のような性質をもち、溶液に含まれる金属イオン濃度などに依存して、動的な性質をもち、染色体表面の電荷が染色体形態を構築する要因として認識され始めている。したがって、今後これらの問題を解明していく上で、本研究で確立されたSCC assayの実験系と、これによる軸構造とクロマチンの再組織化の解析は非常に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Condensins I and II are multisubunit complexes that play a central role in mitotic chromosome assembly. Although both complexes become concentrated along the axial region of each chromatid by metaphase, it remains unclear exactly how such axes might assemble and contribute to chromosome shaping. To address these questions from a physico-chemical point of view, we have established a set of two-step protocols for inducing reversible assembly of chromosome structure in situ. This assay combined with siRNA depletion demonstrate that the recovery of chromatin shapes and the reorganization of axes are highly sensitive to depletion of condensin II, but less sensitive to depletion of condensin I or topoisomerase II. Furthermore, quantitative morphological analyses using the machine-learning algorithm wndchrm support the notion that chromosome shaping is tightly coupled to the reorganization of condensin II-based axes.

研究分野：生物学

キーワード：コンデンシンII 染色体軸 クロマチン 再組織化 HEATリピート 機械学習

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が分裂するとき、複製された遺伝情報(ゲノム)を娘細胞に正しく分配するためには、染色体が適切に構築される必要がある。この過程で、ヒトでは約 2 m もある長大な DNA が染色体に詰め込まれる。最近になって、DNA とヒストンによって形成されるヌクレオソームや、ヒストンの修飾によるクロマチン構造の変化の理解は大きく進んでいるが、これらの集合体である染色体構築の分子メカニズムの理解はあまり進んでいない。申請者はこの課題を解くためには染色体高次構造の理解が重要であると考えた。染色体構造の古典的なモデルの一つに、ラジアルループ(radial loop)モデルがある。このモデルの基盤は、”chromosome scaffold”と呼ばれる、ヒストンを除去した後に観察される構造体が、あたかも染色体の背骨のような形態を示すことにある。この scaffold を構成する主な因子として、トポイソメラーゼ II α (トポ II)とコンデンシン複合体のサブユニットが同定され、両者は細胞内の染色体においても軸上に集中して局在していた。これらの背景から、ラジアルループモデルを現在の分子の言葉で再検討する必要性が高まっていた。

染色体軸に局在する因子のうち、コンデンシンは5つのサブユニットならなる複合体で、酵母からヒトにいたるまで、真核細胞での M 期染色体構築に必須であることが明らかになっている。さらに、真核細胞は2つのコンデンシンを持ち、一部重複する機能があるものの、染色体凝縮の異なる局面で働いていることが分かってきた。また、精製タンパク質を用いた染色体再構成系においても、コンデンシンとトポ II が染色体構築に必要な不可欠であることが示されていた。しかしながら、コンデンシンによる軸がどのように染色体内部に集合するのか、そして軸構造が染色体全体や局所的なクロマチンの形態にどの程度寄与しているかは不明であった。

分裂期染色体の形態は、それがさらされる緩衝液条件に非常に敏感で、可逆的変化を示すことが古くから知られている。例えば、EDTA(Mg²⁺のキレート剤)を含む低塩濃度のバッファーにさらすと染色体は大きく膨らんでその棒状形態を失う(膨潤化)が、そこに MgCl₂ を加えることで元の凝縮した形態に戻すことができる(再組織化)。この実験系において、siRNA によってコンデンシンをノックダウンした細胞では染色体の再組織化が起こらないことが報告されていたが、トポ II を含めた染色体軸と染色体形態との関係は不明なままであった。一方で、カエル卵抽出液を用いた再構築実験において観察される染色体においても、コンデンシンによる染色体軸の形態が塩濃度に影響されることから、バッファー組成に依存して染色体の形態を操作する実験系はコンデンシンの振る舞いと染色体軸形成のメカニズムを解析する上で優れた手段を提供してくれるものと考えられた。

そこで、研究代表者は染色体形態の可逆的変化を解析する手法の改良に取り組み、MgCl₂ の代わりに NaCl をもちいることにより染色体全体(クロマチン)の再組織化と軸の構成因子であるコンデンシン、およびトポ II の追跡が可能な実験系を確立した(sodium chloride-induced chromosome conversion [SCC] assay)。本研究は、この方法を基盤として進め、さらに染色体・クロマチンの形態とそれらの変化を定量化し、統計的な解析に供するため、研究開始当初、細胞形態に応用され始めていた機械学習アルゴリズム(wndchrm)を染色体形態の解析に適用した。

2. 研究の目的

分裂期における染色体構築には、コンデンシンと呼ばれるタンパク質複合体が中心的な役割を果たしている。この複合体は姉妹染色分体のそれぞれの中心軸に集中して局在するが、この軸様構造(染色体軸)がどのようにして形成されるのか、その構造が分裂期染色体の形態の確立にどのように貢献しているのかという根本的な問題が未解明のまま残っている。本研究では、申請者自身が確立した染色体・クロマチンと染色体軸の形態を可逆的に操作することのできる新たな実験系を用いて、染色体軸の分子的特性を解明し、その特性がどのように染色体構築に貢献しているのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では主に細胞生物学的手法、生化学的手法を用いて研究を進めた。そのなかで特に重要な事項について下記に記した。

- (1) 細胞培養：解析には HeLa 細胞を用いた。細胞はカバーがガラス上で培養し、必要に応じて siRNA 処理を行った後、コルセミド処理(3時間)によって分裂期に停止させた細胞を SCC assay に用いた。一部の解析ではサイトスピンにより展開した標本を用いた。
- (2) 染色体と軸の再組織化アッセイ(SCC assay)：この方法は膨潤化(ステップ1)と再組織化(ステップ2)からなる。膨潤化には TEEN buffer (1 mM triethanolamine-HCl [pH 8.5], 0.2 mM EDTA \cdot 2Na, and 25 mM NaCl) を用いた。この処理によってカバーガラス上の染色体は大きく膨潤する。再組織化には RSB buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 10 mM NaCl, and 5 mM MgCl₂)、もしくは 25-300 mM NaCl 溶液を用いた。再組織化を施した標本は PFA によって固定し免疫染色によりコンデンシン、トポ II などのタンパク質を検出した。本研究の遂行中に、再組織化されたクロマチンでは、MgCl₂ 濃度に依存して免疫染色による検出が困難となり、RSB buffer では実際にタンパク質が局在するにも拘らず、コンデンシンやトポ II が検出できなかった。一方で、NaCl に

よる再組織化クロマチンではこの問題は起こらなかった。

- (3) 機械学習による形態変化の定量化：顕微鏡撮影された画像標本は長さや太さの異なる多数の染色体の混合物であり、処理によって染色体表層の滑らかさも異なってくる。これらを定量化し現象を正しく理解するために、自動画像分類や画像類似性の検出用に開発された機械学習アルゴリズム (wndchrn) を、クロマチン・染色体の顕微鏡画像に適用した。各処理群の画像 (100 細胞) を無作為に 2 つのグループ (各 50 細胞) に分け、デジタル画像の特徴から形態的な相違 (MD: morphological distance) を算出し、系統樹を描いた。

4. 研究成果

- (1) SCC assay ではクロマチンとともに染色体軸も再組織化される

一旦膨潤化した (ステップ 1) クロマチンを様々な濃度の NaCl で再組織化 (ステップ 2) したところ、形態の変化は塩濃度に依存して大きく変化した (図 1)。このなかで、100 mM NaCl での処理が細胞内の染色体に最も近い形態を示したため、以後の解析ではステップ 2 では 100 mM NaCl を用いて解析を行った。

ステップ 1 で膨潤化したクロマチン上では、コンデンシン I と II、およびトポ II からなる染色体軸も大きく緩み染色シグナルが減弱した。ステップ 2 で再組織化したクロマチンでは、コンデンシンとトポ II は再び軸上に局在した。したがって、SCC assay ではクロマチンと染色体軸の変化は関連して変化すると考えられた。

また SCC assay では CENP-A によって示されたセントロメア自体の領域の大きさは変化しないが、膨潤化によって、姉妹セントロメア間の距離が大きくなる。再組織化されるとその距離は元に戻っていた。一方、H3K9me3 を指標としてペリセントロメア領域に分布するヘテロクロマチンの動態を解析したところ、TEEN を用いたステップ 1 では H3K9me3 陽性領域は、処置前の細胞において観察されたものと比較して約 4 倍まで非常に大きく拡大した。100 mM NaCl を用いたステップ 2 では、H3K9me3 陽性領域は再び元のレベルに近くまで縮小した。これらの結果は、バルククロマチンだけでなくペリセントロメアクロマチンも SCC assay で大きく形態変化を起こすことを示している。加えて、少なくとも H3K9me3 によって判断されるように、ヒストン修飾は大部分これらの過程を通して保たれることが示唆された。

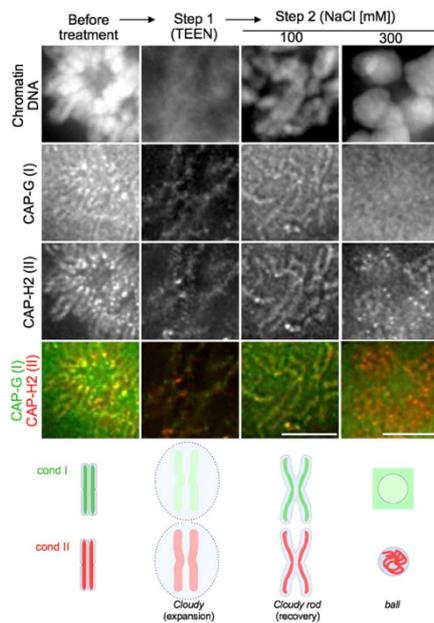


図 1. SCC assay におけるクロマチンと染色体軸の変化

3 時間のコレミド処理後、カバーガラス上で増殖させた HeLa 細胞を ステップ 1 で膨潤化し、次いでステップ 2 で 100 mM もしくは 300 mM NaCl をもちいて再組織化した。各ステップにおける標本を PFA 固定し、コンデンシン I 特異的サブユニット (CAP-G) および、コンデンシン II 特異的なサブユニット (CAP-H2) に対する抗体で免疫染色した。クロマチンは DAPI で染色した。各ステップの代表的な画像を上にし、下にはコンデンシン I (緑) とコンデンシン II (赤) の局在変化を模式的に示した。100 mM NaCl では染色体が元の形態に近く、回復していることがわかる。一方、300 mM NaCl ではクロマチンがボール状に固まり、コンデンシン II の軸は折れ曲がってボール状のクロマチン内に押し込められている。面白いことに、このときコンデンシン I の大部分は軸から離れており、軸上における 2 つのコンデンシンの物理科学的性質が異なる。バーは 5 μm 。

- (2) クロマチンの再組織化にはコンデンシン II のつくる軸が大きく貢献している

SCC assay における再組織化で染色体軸が果たす役割を明らかにするために、コンデンシンとトポ II を siRNA によって除去されたクロマチンの再組織化を試みた。その結果、コンデンシン II を除去した細胞が、コンデンシン I を除去した細胞よりもクロマチン形態と軸が回復していないことが示された (図 2)。また、トポ II の除去はクロマチンとコンデンシンによる軸にはほとんど影響を与えなかった。したがって、SCC assay における再組織化には、染色体軸も再組織化される。解析したタンパク質のなかではコンデンシン II が再組織化に大きな貢献をしていると考えられる。コンデンシンの軸は検出できないが、MgCl₂ を用いた再組織化でも、コンデンシン II の除去細胞ではクロマチン形態の回復が悪いことを観察しており、再組織化にもちいた塩の種類の影響ではないことを確認している。他の研究グループからの再組織化実験ではコンデンシン I と II の相対的な貢献度が今回と異なるものがある。しかし、これらは別種の細胞を用い

たものであることから、コンデンシン I と II の細胞内の量的、質的な貢献度の違いを反映している可能性があり、今後の課題である。

コンデンシンとよく似た構造をもち、姉妹染色分体の接着因子であるコヒーシンを除去した細胞でも、NaCl による再組織が適切に起こっていることを確認した。

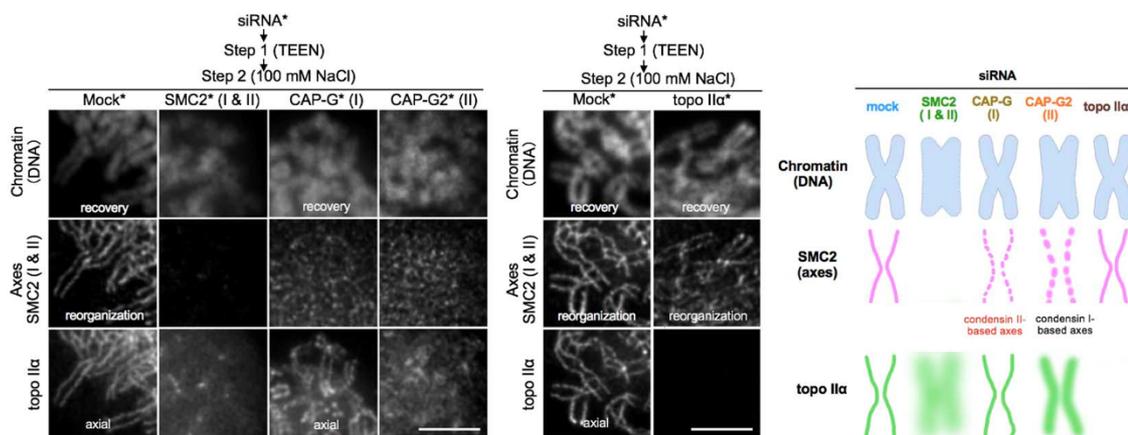


図 2. コンデンシンとトポ II を除去した細胞をもちいた SCC assay

モック (siCont)、コンデンシン除去 (siCAP-G/cond-I, siCAP-G2/cond-II, および siSMC2/I & II に共通するサブユニット)、およびトポ II (siTopoII) を siRNA で除去した HeLa 細胞を、ステップ 1 で膨潤化し、100mM NaCl をもちいたステップ 2 で再組織化した。クロマチンを DAPI で、コンデンシン (SMC2) とトポ II を免疫染色で検出した。バーは 5 μ m。観察結果の模式図を右に示す。コンデンシン II の除去がクロマチンと軸の形態に大きく影響するのに対して、コンデンシン I とトポ II の除去は、比較的影響が少ないことが示された。

- (3) 機械学習による形態変化の定量化はコンデンシン II の染色体軸への貢献を支持した
 最初に我々は、コンデンシン I あるいは II を除去した細胞の、SCC assay 処理前、ステップ 1、そしてステップ 2 におけるクロマチン形態の変化を解析した。その結果、処理前に既に、コンデンシン II 除去細胞のクロマチン形態は、コントロールとコンデンシン I 除去群とは大きく異なる画像特徴を持つことが明らかとなった。面白いことに、TEEN による膨潤化で、各処理群の違いは一旦小さくなるが、ステップ 2 の再組織化を行うと、再び処理前に示されていた違いが現れた。これらの結果は、SCC assay におけるクロマチン形状の適切な回復 (再組織化) において、コンデンシン II がコンデンシン I よりも重要な役割を果たすという結論が、定量的な解析で実証されたことを示している。
 さらに、再組織化と染色体軸との関係を調べるために、免疫染色によるコンデンシンとトポ II の顕微鏡イメージを機械学習に加えた。それぞれのタンパク質を siRNA によって除去したときのクロマチン形態と軸 (コンデンシンとトポ II) の形態的な関係を図 3 に示した。形態的な相違度 (MD) から作成された系統樹から、コントロールとコンデンシン I、およびトポ II を除去したクロマチンの再組織化形態は互いに近い位置になるのに対して、コンデンシン II を除去したものは、これらとは別のグループを示した (図 3A)。これと対応して、コンデンシンによる軸は非常に類似した系統樹形を示した (図 3B)。これは染色体の軸をトポ II で検出したときも同様であった (図 3BC)。これらの結果から、本分析では、SCC assay におけるクロマチン形状の適切な回復において、コンデンシン II がコンデンシン I およびトポ II よりも重要な役割を果たすという結論が検証された。

- (4) コンデンシン II を基盤とする染色体軸の重要性

SCC assay において、クロマチンの形態回復とともに、染色体軸の再組織にもコンデンシン II の貢献が大きいことが示された (図 2、図 3)。この結論は、細胞内での染色体構築過程でのコンデンシン II の役割と一致する。細胞が分裂期に入ると、まず最初にコンデンシン II が複製した姉妹染色分体の中心に軸状に集中し、分裂期前期の染色体の凝縮に関与する。トポ II は遅れて軸に集中し、コンデンシン I は核膜崩壊後の前中期から軸に局在し凝縮に貢献する。多くの研究により、この順序は適切な染色体を構築するのに重要であることが示されている。本研究で見出された SCC assay における、コンデンシン II が軸とクロマチンの再組織化における大きな貢献をしていることは、分裂期染色体の構築における染色体軸とクロマチンの凝縮の分子メカニズムに、物理化学的側面が存在することを示している (図 4)。

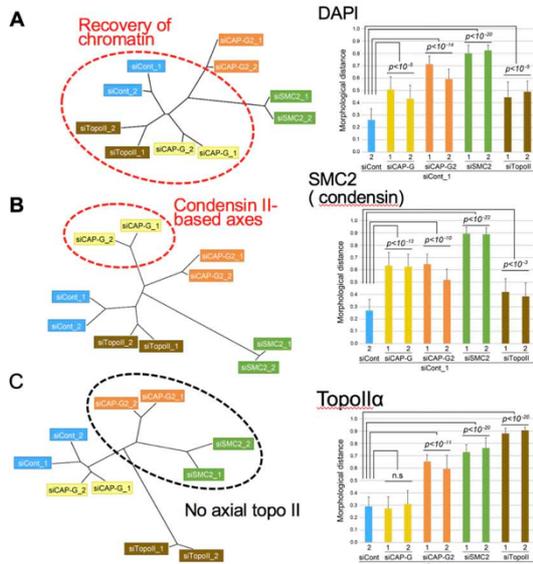


図3.機械学習アルゴリズムをもちいた再組織化クロマチンと染色体軸の形態学的相違
 図2と同様にsiRNA処理したHeLa細胞をステップ1で膨潤化し、100mM NaClをもちいたステップ2で再組織化した。DAPI染色で観察されるクロマチン形態(A)と、コンデンシン(B)とトポII(C)に対する抗体で免疫染色して検出される軸を撮影し、それらの顕微鏡画像を機械学習(wndchrm)に供した。系統樹間の相関係数は以下の通りである。A vs. B: $r = 0.903$, A vs. C: $r = 0.821$, B vs. C: $r = 0.750$. グラフにおける値は20回の交差検定試験の平均値±SEである。

最近になって、クロマチンはそれ自体で液体のような性質を含み、溶液に含まれる金属イオン濃度などに依存して、動的な性質をもつことが示されている。また、染色体表面間の電荷に基づく反発力に貢献するタンパク質の存在(例えばKi-67)も明らかにされつつある。2つのコンデンシン複合体は共に、2つのHEATサブユニットを含んでおり、このバランスをとる作用が必要であることが示されていることや、HEATリピートの構成要素である両親媒性ヘリックスの性質からも、コンデンシンの作る軸の物理化学的性質の解明は重要であると考えられる。今後これらの問題を解明していく上で、本研究で確立されたSCC assayの実験系と、これによる軸構造とクロマチンの再組織化の解析は有用であると考えられた。

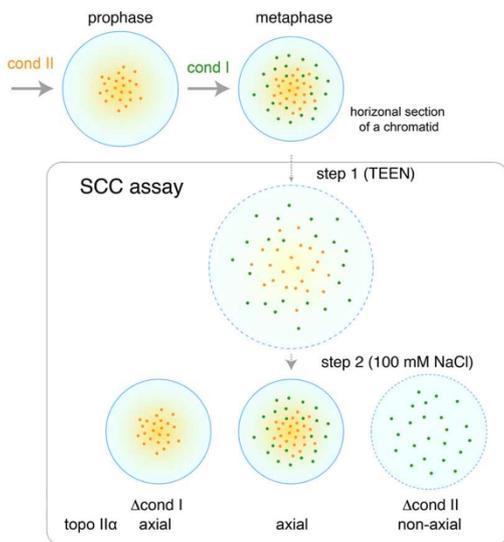


図4.細胞内およびSCCアッセイにおけるコンデンシンIおよびIIの異なる挙動

細胞内では分裂前期に、コンデンシンII(オレンジ)は最初に、染色分体の中心部に蓄積する。次に、コンデンシンI(緑)は、コンデンシンIIのより外側に局在し、共に染色体軸を構成するようになる。SCC assayでは、ステップ1で膨潤した軸は、ステップ2では、コンデンシンIおよびIIの働きによってほぼ元の外観に再編成される(下図、中央)。コンデンシンIIはコンデンシンIの非存在下でも適切に染色体軸を回復させることができる(下図、左)。一方、コンデンシンIは単独ではそうすることができず、クロマチン形状も不完全な回復を示す(下図、右)。この図では、染色分体の水平断面を示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Takagi, M., T. Ono, T. Natsume, C. Sakamoto, M. Nakao, N. Saitoh, M. T. Kanemaki, T. Hirano and N. Imamoto. (2018). Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms. *J Cell Sci.* 131: jcs212092 doi: 10.1242.
- ② Ono, T., C. Sakamoto, M. Nakao, N. Saitoh and T. Hirano. (2017). Condensin II plays an essential role in reversible assembly of mitotic chromosomes in situ. *Mol Biol Cell.* 28:2875-2886. 査読有. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-04-0252>

[学会発表] (計3件)

- ① Takao Ono, Chiyomi Sakamoto, Noriko Saitoh, Tatsuya Hirano. Condensin II plays an essential role in reversible assembly of mitotic chromosomes in situ. The 2nd meeting on SMC proteins, 2017年6月15日、南陽市民文化会館(山形県南陽市)

- ② Takao Ono, Chiyomi Sakamoto, Noriko Saitoh, Tatsuya Hirano. Physicochemical properties of condensin-based chromosome axes as revealed by in situ reorganization assay. 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ③ 小野教夫、坂本智代美、斉藤典子、平野達也. 再組織化アッセイをもちいた染色体軸の物理化学的特性の解析. 第 65 回染色体学会年会、2016 年 11 月 4 日、東京大学弥生講堂（東京都文京区）

〔図書〕（計 1 件）

- ① 小原良孝（編集）、多田政子、小野教夫、押田龍夫、岩佐真宏、川田伸一郎. 東海大学出版部. 染色体から見える世界 哺乳類の核型進化を探る. ISBN978-4-486-02146-9 C3045. 2018 年、総ページ数 400p（執筆担当範囲. 第 1 章：染色体の構造、染色体研究の礎と発展-細胞遺伝学的な染色体研究の歴史-、第 2 章：翼手類の捕獲方法、第 4 章：ヒナコウモリ科翼手類の核学的特性）

〔その他〕

- ① 平野染色体ダイナミクス研究室ホームページ
<http://www2.riken.jp/chromdyna/>
- ② フリー百科事典ウィキペディア「染色体」
<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E6%9F%93%E8%89%B2%E4%BD%93>
- ③ フリー百科事典ウィキペディア「姉妹染色分体」
<https://ja.wikipedia.org/w/index.php?title=%E5%A7%89%E5%A6%B9%E6%9F%93%E8%89%B2%E5%88%86%E4%BD%93&oldid=66088792>
- ④ フリー百科事典ウィキペディア「染色体凝縮」
<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E6%9F%93%E8%89%B2%E4%BD%93%E5%87%9D%E7%B8%AE>
- ⑤ フリー百科事典ウィキペディア「コンデンシン」
<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%B3%E3%83%B3%E3%83%87%E3%83%B3%E3%82%B7%E3%83%B3>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。