

令和 元年 5 月 30 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15068

研究課題名(和文) 瞬時に分解すれば見えてくる、MCMヘリカーゼとコヒーシンの共役と多彩な機能

研究課題名(英文) Rapid protein degradation reveals functional coupling between the MCM helicase and cohesin, and their pleiotropic functions

研究代表者

夏目 豊彰 (NATSUME, Toyoaki)

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・助教

研究者番号：10435513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：染色体DNAを娘細胞や子孫に正しく伝承する事は、生命や種の維持の根幹に関わる重要な課題である。本研究では、私が以前ヒト細胞で確立した、オーキシンドェグロン法による目的遺伝子の急速な不活化を駆使し、染色体伝承の2つのステップであるDNA複製と染色体分配の重要因子の役割を、これまでにない時間的分解能で解析し、興味深い結果を得た。とりわけ、未だその役割について世界中で論争中である、SMC5/6複合体の解析が進み、今後のさらなる研究の土台となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体DNAの伝承は、生命科学において重要な課題である一方、この過程の異常は、癌や様々な遺伝性疾患と密接な関わりがある。特に最近、幾つかの遺伝性疾患、癌、母年齢効果が、コヒーシンやSMC5/6の異常によって引き起こされることが分かってきた。本研究では、私が以前確立したヒト細胞におけるオーキシンドェグロン法を用いて、コヒーシンに比べて研究が遅れているSMC5/6の基礎的な理解が大きく進んだ。今度は、患者のSMC5/6遺伝子の変異を含めた解析を進めることにより、これらの疾患の分子機構の解明及び治療に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：It is of critical importance for organisms to precisely transmit chromosomal DNA to daughter cells and offsprings for the maintenance of life and species. In this study, by taking advantage of the auxin-inducible degron technology in human cells that enables rapid inactivation of target genes, I studied two important steps in chromosome transmission, DNA replication and chromosome segregation, with unprecedented time-resolution observation, and gave some critical and interesting findings. Especially, this study made a major breakthrough in the study of the SMC5/6 complex, whose role is still controversial in the world, giving foundations of future studies.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：オーキシンドェグロン法 MCM2-7ヘリカーゼ SMC複合体 コヒーシン コンデンシン SMC5/6

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA を娘細胞や子孫に正しく伝承する事は、生命や種の維持の根幹に関わる重要な課題である。この染色体伝承に関わる因子の多くは細胞増殖に必須であるため、遺伝学的解析において遺伝子ノックアウトを利用できない。また、RNA 干渉等による目的遺伝子の枯渇は、染色体伝承のダイナミックな過程を研究するにはスピードが足りない。このような理由から、染色体伝承のサイクルである細胞周期の最も重要な二つのステップ、DNA 複製と染色体分配の詳細な解析は、巧みな遺伝学が利用できる酵母に比べて、ヒト等の高等生物では遅れていた。この問題を克服するため、私は以前、標的タンパク質を迅速に分解できるオーキシソグロン (AID) 法を、ヒト細胞において利用する系を確立することに成功し、ヒト細胞においても酵母と同様な遺伝学的解析を行う土台を築いた。

### 2. 研究の目的

DNA 複製と染色体分配のそれぞれにおいて中心的な役割を果たす MCM2-7 ヘリカーゼと SMC 複合体の解析を、ヒト細胞における AID 法と細胞周期の同調を駆使してこれまでにない時間的分解能で行い、これら因子の多彩な役割や互いの共役を統合的に理解する。

### 3. 研究の方法

本研究では、私が確立したヒト細胞における AID 法を駆使する。複数のヒト細胞株において MCM2-7 ヘリカーゼおよび SMC 複合体のデグロン株を構築し、細胞周期特異的にこれらの因子を分解する。姉妹染色分体の接着、細胞周期の進行、転写、DNA 複製、中心体複製に与える影響等を、様々な分解の条件において、フローサイトメーターや蛍光顕微鏡を用いて解析する。また、得られた表現型をもとに、MCM2-7 および SMC 複合体と関連する因子を同様に解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) MCM2-7 ヘリカーゼ

ヒト HCT116 細胞において G1 期に MCM2-7 ヘリカーゼを分解すると、DNA 合成を伴わずに細胞周期が進行し、最終的に G2 期で停止する興味深い表現型を得た。しかし、その G2 期停止の分子メカニズムの解明には至らなかった。また、S 期に複製フォーク上の MCM2-7 ヘリカーゼを分解すると、そのパラログである MCM8-9 ヘリカーゼ依存的なバックアップ DNA 合成が生じることを見だし、論文発表した (雑誌論文 7、図 1)。

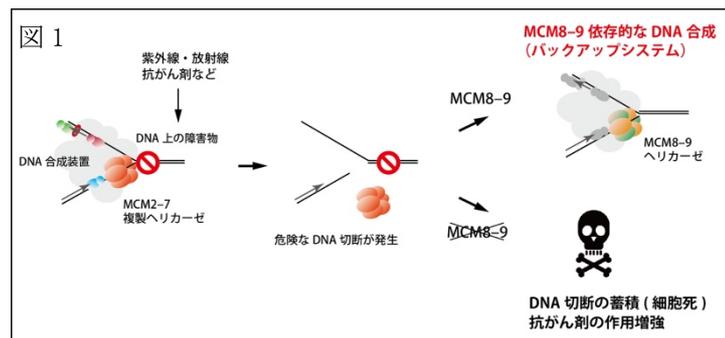
#### (2) コヒーシン

コヒーシンを G1 期に分解した場合、S 期の進行には大きな問題がないであろうという当初の予想に反して、G1 後期の制限点の手前で停止することがわかった。一方、G2 期に分解した場合は、予想通り、M 期における染色体の分配異常が見られた。そこで、G1 期の制限点の後、S 期開始の直前で分解した場合は、S 期の進行には大きな影響がなく、G2 期分解と同様な表現型を示した。よって、コヒーシンは、1) G1 後期における新しい細胞周期への進入に必要、および 2) コヒーシンの欠如を監視する新しいチェックポイントの存在、の二つの可能性が少なくとも考えられたが、その区別や分子メカニズムの解明までには至らなかった。

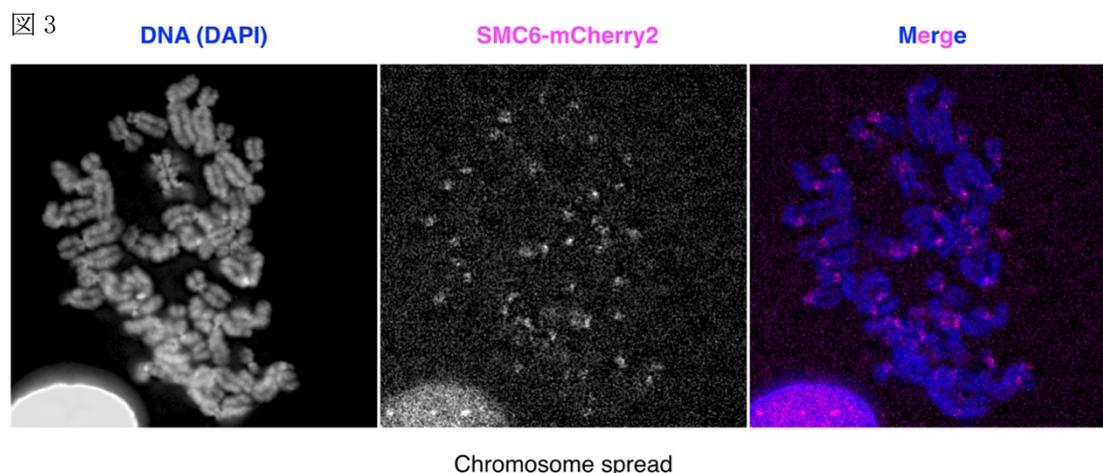
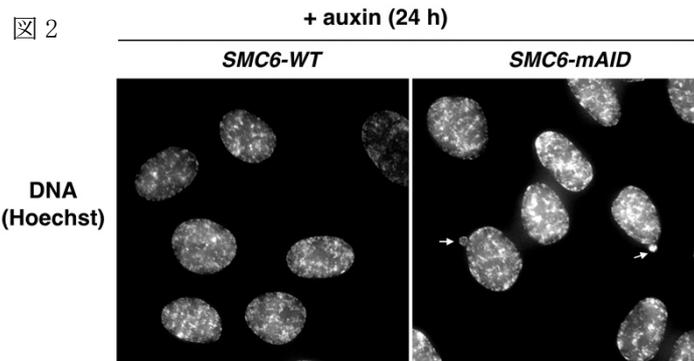
#### (3) コンデンシン

他のグループとの AID 法を駆使した共同研究において、コンデンシンと細胞増殖マーカーとして知られる Ki67 の分裂期染色体構造の確立・維持における協調的な役割を明らかとした (雑誌論文 5)。

#### (4) SMC5/6



AID法を駆使した解析により、SMC5/6は複製等の染色体上の反応によって生じる、姉妹染色分体間の「絡まり」の解消に機能しており、SMC5/6が不活化された場合は、染色体分配の異常、微小核の形成(図2)とDNAダメージ発生を伴ったG1期停止を示す事を見つけた。また、染色体上のSMC5/6の結合部位をクロマチン免疫沈降法や蛍光顕微鏡で解析した結果、セントロメア等の高度なリピート配列(図3)や遺伝子密度が高く転写が活発な領域に多く結合し、一部でコヒーシンと共局在する事がわかった。さらに、染色体上の反応によって生じるDNAの「ひずみ」(スーパーコイル)の調節にも関わる事を示唆する結果を得た。本結果は、未だ論争的であるSMC5/6の役割が、DNAの「絡まり」や「ひずみ」といったトポロジカルストレスの制御にある可能性を示した。SMC5/6の異常によって観察される染色体分配異常や微小核の形成は、癌を含め様々な疾患と関連がある。また最近、SMC5/6がB型肝炎ウイルスの感染に対する宿主制限因子である事が報告された。今後は、これら疾患の分子機構の解明にも取り組む予定である。また、本結果に関しては現在論文発表の準備中である。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

1. A. Yesbolatova, T. Natsume, K. I. Hayashi, and M. T. Kanemaki, Generation of conditional auxin-inducible degron (AID) cells and tight control of degron-fused proteins using the degradation inhibitor auxinole. *Methods*, 2019. (印刷中) doi:10.1016/j.ymeth.2019.04.010 査読有

2. I. Morii, Y. Iwabuchi, S. Mori, M. Suekuni, T. Natsume, K. Yoshida, N. Sugimoto, M. T. Kanemaki, and M. Fujita, Inhibiting the MCM8-9 complex selectively sensitizes cancer cells to cisplatin and olaparib. *Cancer Sci*, 2019. 110(3): p. 1044-1053. doi:10.1111/cas.13941 査読有

3. H. Goto, T. Natsume, M. T. Kanemaki, A. Kaito, S. Wang, E. C. Gabazza, M. Inagaki, and A. Mizoguchi, Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell cycle progression. *J Cell Sci*, 2019. 132(2). doi:10.1242/jcs.223123 査読有

4. M. Okumura, T. Natsume, M. T. Kanemaki, and T. Kiyomitsu, Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble. *Elife*, 2018. 7. doi:10.7554/eLife.36559 査読有

5. M. Takagi, T. Ono, T. Natsume, C. Sakamoto, M. Nakao, N. Saitoh, M. T. Kanemaki, T.

Hirano, and N. Imamoto, Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms. *J Cell Sci*, 2018. 131(6). doi:10.1242/jcs.212092 査読有

6. J.D. Eaton, L. Davidson, D.L.V. Bauer, T. Natsume, M.T. Kanemaki, and S. West, Xrn2 accelerates termination by RNA polymerase II, which is underpinned by CPSF73 activity. *Genes Dev*, 2018. 32(2): p. 127-139. doi:10.1101/gad.308528.117 査読有

7. T. Natsume, K. Nishimura, S. Minocherhomji, R. Bhowmick, I.D. Hickson, and M.T. Kanemaki, Acute inactivation of the replicative helicase in human cells triggers MCM8-9-dependent DNA synthesis. *Genes Dev*, 2017. 31(8): p. 816-829. doi:10.1101/gad.297663.117 査読有

8. T. Natsume and M.T. Kanemaki, Conditional Degrons for Controlling Protein Expression at the Protein Level. *Annu Rev Genet*, 2017. 51: p. 83-102. doi:10.1146/annurev-genet-120116-024656 査読有

〔学会発表〕 (計 6 件)

1. 染色体制御におけるヒト SMC5/6 の独自の役割を探る、夏目豊彰、第 36 回染色体ワークショップ・第 17 回核ダイナミクス研究会 2019 年 1 月 23 日

2. ゲノムの安定性を維持するためのヒト MCM8-9 依存的な複製フォークの再生機構、夏目豊彰、第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日

3. Elucidating the unique and essential role of human SMC5/6, the yet-to-be-named SMC complex、夏目豊彰、The 11th 3R&3C Symposium 2018 年 11 月 12 日

4. ヒト染色体の維持における第三の SMC 複合体「SMC5/6」の独自の機能を探る、夏目豊彰、日本遺伝学会第 90 回大会 2018 年 9 月 19 日

5. Acute degradation of the human SMC complexes using the auxin-inducible degron (AID) technology reveals their cell-cycle specific roles in maintaining genome stability、夏目豊彰、Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance 2017 年 9 月 5 日

6. Acute degradation of the human SMC complexes using the auxin-inducible degron (AID) technology reveals their distinct cell-cycle specific roles、夏目豊彰、SMC Proteins 2017 2017 年 6 月 13 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：オーキシンドェグロンシステムにおけるタンパク質分解阻害剤及びその使用

発明者：鐘巻将人、夏目豊彰、林謙一郎

権利者：大学共同利用機関法人情報・システム研究機構、学校法人加計学園

種類：特許

番号：特願 2017-228310

出願年：2017 年

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究所内 HP

<https://www.nig.ac.jp/nig/ja/research/organization-top/laboratories/kanemaki>

研究室 HP

<http://kanemaki-lab.sakura.ne.jp/jpn/>

リサーチハイライト

[https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2019/05/research-highlights\\_ja/rh20190510.html](https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2019/05/research-highlights_ja/rh20190510.html)

[https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/11/research-highlights\\_ja/20171122.html](https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/11/research-highlights_ja/20171122.html)

[https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/05/research-highlights\\_ja/20170510.html](https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/05/research-highlights_ja/20170510.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

なし

※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。