

令和元年5月9日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19348

研究課題名(和文) 分裂期染色体の自律的集合活性の同定

研究課題名(英文) Identification of self-assembly activity on mitotic chromosome

研究代表者

西山 朋子(Nishiyama, Tomoko)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90615535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アフリカツメガエル卵抽出液およびヒト培養細胞を用い、分裂期染色体自己集合活性の同定を試みた。アクチンおよび微小管の非存在下で、集合活性のある染色体特異的に結合する因子を網羅的に同定したところ、いくつかの非ヒストン性DNA結合因子が同定された。そのひとつPARP-1を卵抽出液から除去すると、染色体が個別化するというよりは、むしろ染色体凝縮に異常をきたすことが分かった。染色体個別化活性と染色体凝縮活性とは不可分であることから、不完全な染色体凝縮が個別化の表現型をマスクしている可能性はあるものの、これまで知られていなかった染色体凝縮におけるPARP-1の新しい役割を見出す結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新しい細胞生物学の概念として、染色体自己集合活性の実体を同定することを目指した。染色体自己集合活性はこれまで存在こそ示唆されていたものの、分子的な実証がなされていなかったが、本研究において、複数の染色体自己集合活性候補因子の同定に成功した。それらすべての具体的な分子機能の理解には至っていないが、候補因子の一つであるPARP-1の、分裂期染色体形成における新たな役割を明らかにできた。今後の研究でその他の因子の解析が進めば、染色体自己集合活性のみならず、染色体凝縮機構も含めた新しい分子ネットワークを描くことができ、そのシーズを作成できた本研究の学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify self-assembly activity of mitotic chromosomes by using *Xenopus* egg extract and human somatic cells. First, proteinaceous factors specifically bound to self-assembled mitotic chromosomes were systematically detected by mass-spectrometry, and several non-histone DNA binding proteins were identified. Among them, poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) was tested for function in mitotic chromosome assembly and we found that PARP-1 is required for chromosome condensation rather than self-assembly of chromosomes. Though the deficient condensation could prevent chromosome disassembly, we could reveal a novel function of PARP-1 in mitotic chromosome condensation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：染色体構造構築

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、二つの異なる遠心分離条件で作製したアフリカツメガエル卵分裂期抽出液 (LSS と HSS) において、分裂期染色体の形態が大きく異なることが観察されていた。LSS 中では凝縮した染色体が集まって一つの染色体塊を形成するのに対して、HSS においては染色体凝縮は正常であるにもかかわらず、染色体同士が完全に個別化し、散在してしまう。このことは、LSS 中に染色体同士が自律的に集合するための活性が存在すること、そしてその活性が HSS では失われる可能性を示唆していた。特に巨大な卵母細胞などの細胞において、遠距離にある染色体同士が微小な紡錘体に捕捉されるために集合する必要があるという「染色体集合 (chromosome congression)」のアイデアは、すでに 10 年以上前から提唱されており、実際にアクチンの網目構造の収縮が染色体を紡錘体近傍に引き寄せることがヒト卵母細胞において報告されていた。またマウス卵母細胞においてもアクチン依存的な染色体集合が観察されており、これらの知見から、アクチンが遠距離にある染色体を紡錘体近傍に引き寄せ、最終的に紡錘体微小管が染色体を捕捉するという考えが世界的に定着しつつあった。しかしながら、ツメガエル無細胞系ではアクチン重合阻害剤および微小管重合阻害剤存在下においても染色体の集合現象が観察されており、アクチン重合にも微小管重合にも依存しない「染色体の自律的集合活性」の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分裂期染色体の自律的な集合機構の存在を明らかにすること、さらにその分子メカニズムを明らかにすることである。卵母細胞のような巨大な細胞 (百数十 μm から数 mm) においては、巨大な卵核胞 (細胞核) の崩壊後、紡錘体微小管が全ての染色体を捉える作業は困難を極める。これまでの研究から、このような巨大な細胞ではアクチンと微小管に依存した 2 段階の染色体集合機構が存在することが知られている。本研究では、アフリカツメガエル卵無細胞系を用いて、アクチンにも微小管にも依存しない染色体の自律的な集合機構、あるいは染色体解離防止機構の存在を証明し、その分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではまず、染色体自己集合活性の有無の異なる二種類のアフリカツメガエル卵分裂期抽出液を作製し、卵抽出液作製時の超遠心分離操作の有無によって染色体に結合する因子がどのように変化するのかを調べた。染色体のソースとして、ツメガエルの精巣から単離・調整した精子核クロマチンを用いた。それぞれの卵抽出液中に精子核クロマチンを添加し、所定の時間インキュベート後、分裂期染色体の形成を DNA 染色で確認、スクロースクッションを通して分裂期染色体を精製し、染色体結合因子を質量分析によって網羅的に同定した。

これら同定した因子の中で、染色体集合条件下には存在し、散在条件下では存在しない、または有意に減少するタンパク質性因子を選び、染色体自己集合活性に必要な候補因子として、卵抽出液およびヒト培養細胞を用いてその必要性と機能の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 染色体自己集合活性因子の探索

染色体自己集合活性に必要な因子を同定するため、自己集合活性をもつ卵抽出液と、自己集合活性を持たない卵抽出液中にそれぞれ精子核クロマチンを添加し、所定時間インキュベーション後、形成された分裂期染色体を精製して、その結合タンパク質を質量分析により網羅的に解析した。その結果、それぞれの条件下におけるいくつかのタンパク質性結合因子に差異が存在

することが明らかになった。代表的なクロマチン結合因子であるコアヒストンやリンカーヒストン、また、分裂期染色体凝縮に必須であることが知られているコンデンシン複合体の結合量は、質量分析においても、また結合タンパク質を電気泳動で検出した場合においても、両条件の間に差異は認められなかった。この結果は、ヒストンやコンデンシンが自己集合活性因子であることを否定するものではないが、少なくともその可能性が低いことを示唆している。一方、いくつかのタンパク質性因子には結合量の顕著な差異が認められ、これらのタンパク質性因子を自己集合活性に必要な候補因子としてリストアップし、分裂期染色体における機能解析を行った。

(2) 染色体自己集合活性候補因子の機能解析

上記の実験で候補となった因子の一つである Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1)は、DNAダメージに応答して DNA 損傷部位にリクルートされるクロマチン結合タンパク質として知られており、標的タンパク質に ADP-ribose chain を付加するポリメラーゼ活性を持つ。PARP-1 は自己集合活性存在下で有意に分裂期染色体上に結合するが、染色体散在条件下でその結合量は顕著に減少していた。この PARP-1 の分裂期染色体上における機能を解析するため、ツメガエル PARP-1 に対する抗体を作製し、精製抗体を用いて内在性 PARP-1 タンパク質のツメガエル卵抽出液からの免疫除去を試みた。抗体を付加したビーズを卵抽出液と混合し、ビーズを除去することで、PARP-1 除去卵抽出液を作製し、ここに精子核クロマチンを添加することで PARP-1 除去卵抽出液中における分裂期染色体の形態を観察した。その結果、コントロールの未除去卵抽出液では分裂期染色体の凝縮とそれらの染色体の集合が観察されたのに対し、PARP-1 除去卵抽出液中では、分裂期染色体の凝縮が不十分で、コントロールの染色体で見られるような明瞭な軸構造をもった染色体が形成されないことが明らかとなった。このことは、PARP-1 が、自己集合活性制御というよりも、むしろ染色体凝縮機能を有している可能性があることを示唆している。ヒト培養細胞における PARP-1 活性阻害実験においても同様の結果が得られ、PARP-1 の分裂期染色体凝縮における機能が動物細胞の間で保存されている可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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。