

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02381

研究課題名(和文) 発展型再構成系を用いた分裂期染色体構築メカニズムの解析

研究課題名(英文) In-vitro reconstitution of mitotic chromosomes

研究代表者

新富 圭史 (Shintomi, Keishi)

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：60462694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：トポイソメラーゼ (トポII) は分裂期染色体構築に不可欠なタンパク質である。本研究では、染色体再構成を用いてトポIIの作用機序に迫った。まず、トポIIの染色体軸への集積にC末端ドメイン(CTD)が重要であることを示した。次に、トポIIが、異なる染色体間のDNAの絡まりをほどくだけでなく、CTDに依存的に染色体軸周辺で同一染色体内に絡まりを作ることを見いだした。さらに、トポIIがCTDを利用して異常なクロマチン凝集体の形成を抑制することも明らかにした。これらの結果から、トポIIが染色体内の「密」な環境に入り込んで酵素活性を発揮するという、新しい染色体構築メカニズムを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、細胞の分裂期におけるトポIIの役割を初めて明確に示したものであり、染色体の構造と機能を大きく進展させるものである。さらに、トポIIは抗がん剤の標的タンパク質として知られているだけでなく、核移植によってクローン個体を作成する技術との関連も示唆されていることから、実学的研究にも大きなインパクトを与えると期待される。

研究成果の概要(英文)：Topoisomerase II (topo II) is one of the six proteins essential for mitotic chromatid reconstitution in vitro. It is not fully understood how this enzyme regulates chromosome assembly remains elusive. In this project, we found that chromosomal binding of topo II is sensitive to buffer conditions and depends on its C-terminal domain (CTD). Enzymological assays using circular DNA substrates supports the idea that topo II first resolves inter-chromatid entanglements to drive individualization and then generates intra-chromatid entanglements to promote thickening. Importantly, only the latter process requires the CTD. By using frog egg extracts, we also show that the CTD contributes to proper formation of nucleosome-depleted chromatids by counteracting anomalous aggregated. Our results demonstrate that topo II utilizes its CTD to deliver the enzymatic core to crowded environments created during mitotic chromatid assembly, thereby fine-tuning this process.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体 再構成 トポII コンデンシン カエル卵抽出液

1. 研究開始当初の背景

細胞が分裂する直前に、核膜が崩壊すると、核内に収納されていたクロマチンはロッド状の染色体へと変化する。この現象は分裂期染色体構築と呼ばれており、細胞分裂を通じて遺伝情報の正確な継承するために不可欠なプロセスだと考えられてきた。これまでに、染色体構築の分子メカニズムの解明のためさまざまな研究手法が用いられてきたが、カエル卵抽出液の無細胞系は、染色体構築に必須のタンパク質複合体であるコンデンシンの同定、その後の機能解析において多大な貢献を果たした。しかし、コンデンシン以外の染色体構成タンパク質がどのように染色体構築に貢献しているかについては、いまだに不明な点が多い。とくに、DNA トポイソメラーゼ II α (トポ II α) やヒストンは、DNA で起こるあらゆるプロセスに関与しているといっても過言ではなく、分裂期染色体における役割のみに焦点を絞って解析することが困難であった。

この技術的課題を克服するために、私たちは、カエル卵抽出液の無細胞系を極限まで簡略化し、精製タンパク質とカエル精子核の DNA を使って試験管内に染色体を再構成する方法を開発した (文献①)。とくに、再構成系に含まれるタンパク質が、コンデンシン I、トポ II α 、ヒストンなど 6 種類だけであることは注目に値する。この再構成系によって、染色体タンパク質の機能だけでなく、染色体周囲の環境の役割にも解析が及ぶようになった。

2. 研究の目的

本研究では、私たちが独自に開発した染色体再構成系をより洗練されたものへの発展させること、さらに、その優れた操作性を最大限に活用することを通じて、従来の研究では顧みられてこなかった重要な問題の解決を目指した。具体的な目標として、(1) 染色体周囲の物理化学的環境、(2) トポ II α によって作られる染色体軸、(3) ヌクレオソームの動的性質、という 3 つの要素が染色体構造に与える影響を検討し、染色体構築メカニズムの包括的な理解することを掲げた。

3. 研究の方法

(1) 染色体周囲の物理化学的環境のうち、陽イオンの濃度を変化させることが再構成染色体の形状に与える影響を検討した。とくに、コンデンシン I やトポ II α の染色体結合量、染色体の個別化、染色体の太さに着目し、定量的な比較を行った。また、こうした実験操作を通じて、再構成染色体の形状を、卵抽出液の無細胞系で作られるものに近づけられるかを検討した。

(2) 全長のトポ II α とその C 末端領域 (CTD) を欠失させた変異体の組換えタンパク質を調製し、それらを染色体再構成系に加えて機能を比較した。また、より単純な DNA 基質を用いた酵素活性検定系、あるいは、より細胞内に近い条件での解析が可能なカエル卵抽出液の無細胞系を併用して、トポ II α の CTD の重要性を多角的に検討した。

(3) ヌクレオソームに対して自在に実験操作を施すために、カエル精子核ではなく、マウス精子核を出発材料とした染色体再構成系の開発を目指した。マウス精子核からプロタミンを解離させ、ヌクレオソームを作らせるために、新たな実験材料を調製し、それらの反応条件を検討した。

4. 研究成果

(1) 染色体周囲のイオン環境が染色体構築に果たす役割の検討：染色体再構成系で出発材料として用いるアフリカツメガエルの精子核には、染色体の基となる 18 本の長い DNA が、互いに絡まりながら収納されている。再構成の過程では、このコンパクトな核から個別化された 18 本の染色体が現れる。

まず、私たちは、トポ II α や ATP の有無の異なる再構成反応を比較することにより、ATP の加水分解に依存したトポ II α の酵素活性が染色体の個別化に必要であることを確かめた。次に、再構成系に含まれるタンパク質以外の要素の濃度を操作することによって、イオン環境が染色体の形状に与える影響を解析した。その結果、染色体の個別化には、5 mM もの比較的高濃度のマグネシウムイオンが必要だった。さらに、カリ

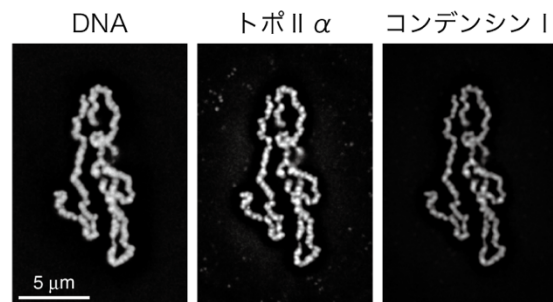


図 1. 再構成系した染色体

ウムイオンが細胞内濃度に近い (80 mM) ときのみ、トポII α の染色体軸への集積が見られ、個別化した染色体が太くなり (幅広化)、さらに、無細胞系で見られる正常な染色体の形状に近づくことを明らかになった。これらの結果から、染色体構築においては、トポII α が酵素として機能すること、また、染色体軸に集積することの両方が重要であると結論された (図1)。

また、同様の滴定実験によって、染色体を再構成するためには1 mM以上という高濃度のATPが必要であることも明かになった。再構成系でATP加水分解する酵素は、コンデンシンIとトポII α のみであり、それらの濃度は合わせても100 nMにも満たない。したがって、ATPは単に反応エネルギー源としてだけでなく、両親媒性溶媒としてタンパク質やDNAの構造を安定させ、染色体構築を促進している可能性も示唆された。

(2) トポII α のCTDが染色体構築に果たす役割の検討: 真核生物のトポII α のC末端には、天然変性領域が存在する (CTD[C-terminal domain]と呼ぶ)。CTDは酵素活性には影響を与えないと考えられていたが、その細胞内での役割はほとんど明らかでなかった。そこで、昆虫細胞のタンパク質発現系を用いて、トポII α の全長とCTDを失させた変異体 (Δ CTD) の組換えタンパク質を調製した。それらのトポII α を用いて再構成した染色体を比較したところ、トポII α のCTDは、染色体の個別化は必要でないものの、トポII α の軸集積と染色体の幅広化に不可欠であることが判明した。

次に、染色体上でのトポII α の作用メカニズムを詳しく理解するため、より精密な実験操作が可能なたポII α の酵素活性検定を行った。まず、あらかじめ絡まりあった環状DNAを基質として、DNAに対して少量のトポII α を加えた。この「疎」な条件では、CTDの有無に関係なく、トポII α は効率的にDNAの絡まりをほどこけることが示された。次に、絡まり合っていない環状DNAを基質として用い、それに対して過剰量のトポII α を加えました。興味深いことに、この「密」な条件では、CTDを持つトポII α のみがDNA同士に絡まりを作る活性を持つことが示された (図2)。これらの結果より、トポII α は次のようなメカニズムで染色体構築に貢献すると考えられる。(A) まず、トポII α は、異なる染色体間の絡まりをほどこくことにより個別化を促すという従来から予想されていた役割を果たす。(B) 次に、CTDを使って染色体軸に集積し、さらに同一染色体内に絡まりを作ることによって染色体の幅広化を促進するという、第二の役割を果たす。

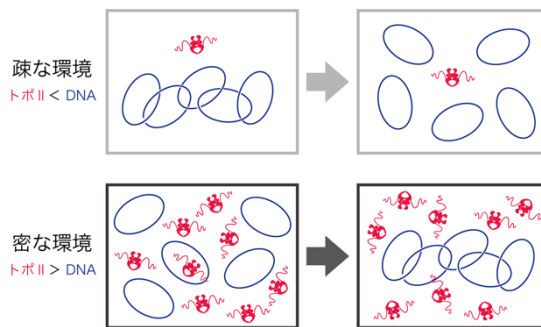


図2. 環境に依存したトポII α の反応

さらに、カエル卵抽出液を用いて、トポII α CTDの役割を新たな視点から検討した。2017年に私たちは、カエル卵抽出液とマウスの精子核を組み合わせ、ヌクレオソーム形成を抑制した特殊な条件下でも染色体様構造を構築できることを報告していた (文献②)。この特殊な条件下で、さらにトポII α を除いた時の影響を解析したところ、興味深いことに、これまで報告されたことのない奇妙な形状のクロマチン凝集体が観察された。このクロマチン凝集体を、線香花火に似ていることから、sparkler (スパークラー) と命名した (図3)。興味深いことに、この後に野生型のトポII α を加えると、sparklerが崩壊し、ヌクレオソームを含まない (そのためコンパクトさに欠ける) 染色体へと変換された。一方、CTDを欠いたトポII α では、そうした活性が著しく減弱していた。これらの結果から、トポII α は、染色体構築のさまざまな局面において、CTDを活用してクロマチン内の混雑した「密」な環境に入り込み、そこで適切に酵素活性を発揮することが示された (文献③)。

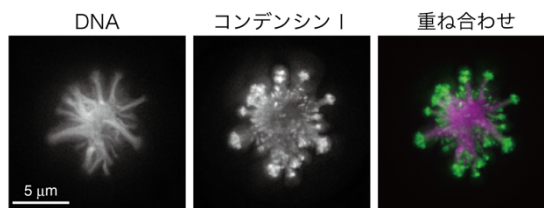


図3. クロマチン凝集体 sparkler

(3) ヌクレオソームを自在に操作できる染色体再構成系の開発: これまでに確立した染色体再構成系では、元来、ヒストンH3-H4を大量に含むアフリカツメガエルの精子核を出発材料としていた。そのため、ヒストンH2A-H2B (厳密には、両者からN末端領域を欠失させたもの) の精製標品と3種類のヒストンシャペロンを加えるだけでゲノムDNA上にヌクレオソームが形成できる。その一方で、この従来法を用いてヌクレオソームの機能を解析するには、ヒストンH3-H4には実験的な操作を施せないという大きな制約を伴う。そこで、この問題を克服し、染色体上のヌクレオソームを自在に操作できるようにするため、ヒストンをほとんど含まないマウス精子核を出発材料とした染色体再構成系の開発を試みた。

具体的には、(A) 精子核のクロマチンからプロタミンを遊離させ、(B) ヒストンH3-H4、H2A-H2Bを、ヒストンシャペロンやクロマチンリモデラーと共に作用させて、ゲノムDNA上にヌクレオソームを作らせる。その後で、(C) トポII α やコンデンシンIを作用させれば良いと

考えた。最初のステップ (A) については、還元剤 DTT 存在下で、マウス精子核と Npm2 タンパク質の精製標品を混和して、プロタミンを遊離させられることを確かめた。ステップ (B) と (C) で必要なるタンパク質の精製は完了したものの、助成期間中には新しい再構成系を確立できなかった。計画の方向性は適切であると考えられるので、今後も継続して良好な反応条件を検索していく予定である。

引用文献

- ① Shintomi et al, 2015, Nature Cell Biology, 17: 1284-1287.
- ② Shintomi et al, 2017, Science, 356: 1014-1023.
- ③ Shintomi and Hirano, 2021, Nature Communications, 12: 2917.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shintomi Keishi, Hirano Tatsuya	4. 巻 79
2. 論文標題 Reconstitution of Mitotic Chromatids In Vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Protocols in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e48 ~ e48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpcb.48	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shintomi Keishi, Hirano Tatsuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Guiding functions of the C-terminal domain of topoisomerase II advance mitotic chromosome assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23205-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keishi Shintomi
2. 発表標題 Making a chromosome from scratch: a powerful approach to dissecting mitotic functions of topoisomerase II alpha
3. 学会等名 EMBO Workshop - DNA topology and topoisomerase in genome dynamics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keishi Shintomi
2. 発表標題 Making a chromosome from scratch: a powerful approach to dissecting mitotic functions of topoisomerase II alpha
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新富圭史
2. 発表標題 染色体再構成によって見えてきたトポ の役割
3. 学会等名 遺伝研研究会：クロマチン・細胞核の形成とダイナミクスによるゲノム制御（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keishi Shintomi, Tatusya Hirano
2. 発表標題 Toward the development of a “ next-generation ” mitotic chromatid reconstitution assay.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新富圭史, 平野達也
2. 発表標題 再構成系の洗練化を通じた染色体構築メカニズムの解明
3. 学会等名 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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keishi Shintomi, Tatusya Hirano
2. 発表標題 Topoisomerase II utilizes its C-terminal domain to work in crowded environments of mitotic chromosome assembly
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keishi Shintomi
2. 発表標題 Reprogramming somatic cell nuclei in Xenopus egg extracts
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所 平野染色体ダイナミクス研究室 http://www2.riken.jp/chromdyna/ 所属研究室ウェブサイト http://www2.riken.jp/chromdyna/research map https://researchmap.jp/k_shintomi

6. 研究組織		
氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------