

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14629

研究課題名（和文）コンデンシンの制御機構が明かす転写複製と染色体構築の連携

研究課題名（英文）The regulation of condensin complex reveals cooperation between transcription or duplication and chromosome organization.

研究代表者

高橋 元子 (TAKAHASHI, Motoko)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 実験病理部・特任研究員

研究者番号：60793594

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：分裂期にクロマチンを高度に凝縮させ染色体を構築することで、細胞はゲノムを安定的に維持・継代することができる。本研究は、染色体構築において主たる役割を担う2種のコンデンシン複合体（IとII）のクロマチンへの結合制御と、それに連動した機能の理解を目的とした。コンデンシンの細胞周期依存的な一本鎖DNAへの親和性を見出したことを手掛かりに、転写・複製機構といったクロマチンダイナミクスとコンデンシンの動態制御との関連性について新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コンデンシン複合体の機能不全は、染色体異数性やDNA損傷を引き起こし、一部のがんの要因となることが知られている。よって、コンデンシンの機能・制御機構を理解することは、基礎生物学的知見としてのみならず、がんの基礎研究としても重要な意味を持つ。本研究ではヒトの2種類のコンデンシン複合体のそれぞれの局在や機能制御について、複製・転写機構という染色体構築と一見かけ離れたクロマチン動態が実は密接に関わっていることを明らかにした。こうした視点は、がんにおけるゲノム構造異常や染色体不安定性の新たな機序の解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Mitotic chromosome assembly is crucial for cells to maintain and inherit the genome safely and accurately. Condensin complexes (I and II in human) are key players for chromosome condensation. Their dysfunction causes chromosome missegregation and DNA damage, is implicated in developing some cancers. Despite their importance, how condensins are regulated for their localization and function on chromatin or chromosomes remains largely unsolved. In this study, we revealed that condensins show significant affinity to single stranded DNA depending on the cell cycle and that how replication and transcription mechanisms are involved in regulating condensins. The relationship among chromosome condensation, replication and transcription might shed light on new aspects of cancer etiology.

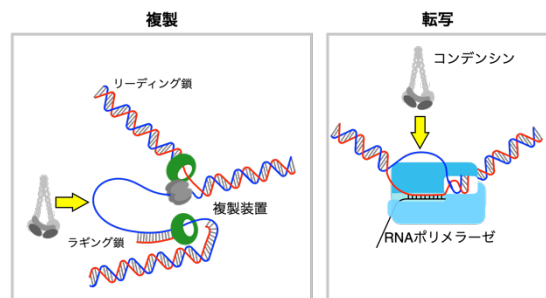
研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：コンデンシン 一本鎖DNA 二本鎖DNA 染色体凝縮 転写 複製

1. 研究開始当初の背景

(1) クロマチンは高次構造を形成することで、転写、複製、染色体形成といった生命維持に必須の細胞機能を保証する。コンデンシン複合体はクロマチンの高次構造制御において重要な役割を果たすことが知られている SMC 複合体の一つであり、ヒトでは 2 種類のコンデンシン複合体 (I と II) が特に染色体構築の過程で主要な役割を果たす。コンデンシンの機能不全は染色体分配異常や DNA 損傷、一部のがんの要因であることが示されており、コンデンシンの細胞内動態やクロマチンとの相互作用の機構を解明することは、細胞生物学的知見としてのみならず、がんの基礎研究としても重要である。しかし、コンデンシンの局在・機能制御機構は未解明な点が多い(高橋ら 2017)。

(2) コンデンシン I と II は間期はそれぞれ細胞質と核内という異なる空間的制御下に置かれ、分裂期になると染色体上に局在して協調して染色体を形成する。コンデンシンのクロマチン局在化機構は未解明であるが、手がかりとしてこれまでに ChIP-seq 解析からコンデンシン I がセントロメア、転写が行われている遺伝子領域の転写開始点 (TSSs) と rDNA に特に多く結合することが報告されており (Sutani 2015)、TSSs に形成される ssDNA を介してクロマチンに結合するというモデルが提唱されている (Akai 2011, Sutani 2015)。一方、コンデンシン II は S 期にクロマチン結合が生じ、S 期の進行とともに結合量が増加する (Ono 2013) ことから、TSSs を介した結合以外の、コンデンシン I とはことなる制御機構の存在が示唆されている。



コンデンシンの結合標的となりうる細胞内ssDNA

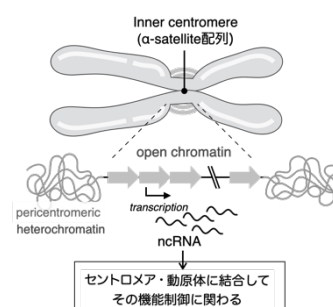
(3) 研究代表者の高橋と所属研究室*では、長年、分裂期の染色体構築機構やコンデンシンの制御機構の解明に取り組んできた。これまでに、コンデンシン I の局在機構と機能制御の一端を明らかにし (Takahashi 2016a, Takahashi 2016b)、コンデンシン I は分裂期に微小管の牽引力に耐えうるセントロメア構造の剛性を確立する上で不可欠であり (Hirota* 2004, Takahashi 2016b)、コンデンシン I の機能不全はセントロメアの脆弱化と染色体分配異常を誘引することを報告した (Uchida* 2009)。また、コンデンシン II は I が未だクロマチンから隔絶されている分裂前期において、染色体凝縮を担い、この分裂前期の凝縮が姉妹染色分体の解離を促すために重要なステップであること (Nagasaka* 2016)、コンデンシン II が分裂前期に速やかにかつ十分な活性を発揮するための制御機構が存在すること (Abe* 2011) を報告した。さらに、Hi-C 法を用いた分裂期染色体の構造解析を行い、I と II がそれぞれ異なる高次構造をクロマチンに形成することも見出している (高橋ら、未発表)。こうした研究成果から、コンデンシンの機能は、コンデンシンとクロマチンの結合制御と密接に関連していることが予想される。

2. 研究の目的

本研究ではコンデンシン I、II それぞれの機能・動態制御の相違に着目しながら、各々のクロマチン局在化機構の解明を目指す。とりわけ、クロマチン高次構造の制御に決定的な役割を担うコンデンシン複合体の制御機構における、転写や複製機構といったクロマチンの高次構造変化を伴う細胞現象が果たす役割について検討し、細胞周期を通じた一連のクロマチン動態の理解を深めるべく、次の課題を設定した。

(1) セントロメアへのコンデンシン I の局在化機構の解明

前述のように、コンデンシン I は遺伝子領域の TSSs に形成される ssDNA を介してクロマチンに結合することが示唆されているが、一方、セントロメアを含めた非コード DNA 領域へのコンデンシン I の濃縮機構は不明であり、これを明らかにする。セントロメア領域における α -satellite 繰り返し配列が M 期においても転写が維持される点に着目し、セントロメア領域の転写がコンデンシン I のセントロメア局在に寄与するのかを検討する。また、近年 non-coding RNA によってタンパク質がクロマチンにリクルートされる機構が報告されていることから、転写された後にセントロメアに留まる α -satellite RNA がコンデンシンの局在化を促すのかを検討する。



(2) 複製・転写機構に依存したコンデンシン II のクロマチン局在化機構の解明

コンデンシン II には S 期のクロマチン局在制御機構の存在が示唆されているが、複製機構に依存したコンデンシン II のクロマチン局在化機構の可能性について検証する。

また、転写機構がコンデンシン II のクロマチン局在に及ぼす影響についても検証する。

3. 研究の方法

(1) 精製コンデンシンと DNA 基質の相互作用評価

コンデンシンがどのような状態の DNA に親和性が高いのかを *in vitro* で検討する。そのために、タンパク精製用タグを付加したヒトのコンデンシンサブユニットを発現した HeLa 細胞株を樹立し、薬剤同調をすることで、各細胞周期のコンデンシン複合体 (I 及び II) のタンパク精製系を確立する。また DNA 基質として ssDNA、dsDNA (リラックス型、スーパーコイル型) を用いて、DNA 結合実験を行う。

(2) セントロメア領域へのコンデンシン I の局在化機構

分裂期における inner centromere の α -satellite 繰り返し配列の転写がコンデンシン I の局在と機能制御にかかわるのかを検討する。 α -satellite RNA によってコンデンシン I が同部にリクルートされる可能性について、RNA プルダウン法を行い、両者の相互作用の有無を評価する。また分裂期に転写を阻害した際のコンデンシン I によるセントロメア構築への影響を、コンデンシン I の機能不全時に見られる姉妹動原体間距離の拡大を指標として、免疫染色で評価する。

(3) 複製・転写機構に依存したコンデンシン II のクロマチン局在化機構

複製機構と同調したコンデンシン II の局在化機構の可能性を検証するため、複製フォークの近傍にコンデンシン II の集積が見られるか、iPOND 法で評価する。iPOND 法では、EdU を短時間処理することで新生 DNA を標識し、ラベル化された DNA をプルダウンすることで、複製されて間もない DNA 上に結合しているタンパク質の同定が可能であり、コンデンシン II が共沈するかを検証する。

また、転写機構がコンデンシン II の間期のクロマチン上での動態に影響を及ぼすか、転写阻害下に FRAP 法にて評価する。細胞内局在の変化から細胞周期の指標となる DNA helicase B (DHB) を外来性に発現させ、内在性コンデンシン II とをそれぞれ蛍光標識した細胞株を樹立し、G1、S、G2 期でのコンデンシン II の DNA 結合の動的状態を評価できる系を樹立する。

4. 研究成果

(1) コンデンシンと DNA の相互作用制御について

コンデンシンと DNA の相互作用を詳細に調べるために、HeLa 細胞より S 期 M 期のコンデンシン I と II を精製し、DNA 基質 (ssDNA と dsDNA (リラックス型、スーパーコイル型)) を用いて、DNA 結合能を評価した。その結果、コンデンシン I と II で各 DNA 基質への結合能が異なること、細胞周期に応じてその結合能が変化すること、コンデンシン I、II ともに ssDNA への結合能がより高いことを見出した。

(2) コンデンシン I のセントロメア局在化機構の解明

① コンデンシン I の α -satellite RNA を介したセントロメアへの局在化を検討するため、分裂期に同調した HeLa 細胞を用いて α -satellite RNA をプルダウンし、コンデンシン I の共沈の有無を解析した結果、結合は認められなかった。この結果から、コンデンシン I のセントロメア局在化は α -satellite RNA を介したものではなく、他の機序が示唆された。

② 一方、転写阻害をした分裂期の細胞では姉妹動原体間距離がコンデンシン I のノックダウン時と同程度に拡大することを見出し、転写機構がコンデンシン I の機能制御に関与する知見を得た。

③ 上記 (1) で精製した分裂期のコンデンシン I が *in vitro* で自己集合能があることを見出したことから、コンデンシン I の自己集合能がセントロメアへの局在と同部の剛性維持に重要なのではないかと考えた。そこで、コンデンシン I の自己集合能を阻害したところ、姉妹動原体間距離が増大し、セントロメアの剛性が維持できなくなることを見出した。これにより、コンデンシン I の染色体局在と染色体凝縮機構の新たなモデルとなりうる知見を得た。

(3) 複製・転写機構に依存したコンデンシンのクロマチン局在化機構の解明

① DNA 複製機構と連動したコンデンシン II のクロマチン局在化機構の有無を調べるため、iPOND 法を用いて、複製されて間もない EdU ラベル化クロマチンを精製し、同部へのコンデンシン II の集積の有無を評価した。その結果、同方法ではコンデンシン II の複製直後の DNA への結合を

検出できなかった。

② コンデンシン II の間期におけるクロマチンへの動的結合状態に複製機構が与える影響について FRAP 法により解析した。DHB 局在を指標に G1、S、G2 期でのコンデンシン II の DNA 結合の動的状態を評価した結果、コンデンシン II は M 期と比べ間期においてクロマチンとよりダイナミックに結合すること、また S 期以降にクロマチンへの結合がより安定的な成分が増加する傾向を見出した。このことから複製とリンクしたコンデンシン II の安定的なクロマチン局在化機構の存在が示唆された。そこで、S 期におけるコンデンシン II のクロマチン上への結合の意義について検討するため、AID 法により短時間でコンデンシン II をノックダウンできる細胞株を樹立し、細胞周期特異的にコンデンシン II がクロマチンに結合できない状態を作り出した際のクロマチン・染色体構造への影響について解析した。

③ コンデンシン II のクロマチン局在制御と転写機構との関係性を調べるため、転写を阻害した間期の核内において、コンデンシン II のクロマチン結合動態を FRAP 法にて解析した。転写阻害により安定的にクロマチンへ結合するコンデンシン II が有意に増加することを見出した。この結果は、転写阻害時に生じる一本鎖 DNA の露出がコンデンシンのクロマチン結合を促している可能性や、転写装置の活動がコンデンシンのクロマチン結合を阻害する可能性を示唆した。また転写阻害剤で処理した細胞の分裂期染色体上のコンデンシン II 局在を免疫染色法で検討したところ、コンデンシン II の染色体局在量が低下することを見出した。このことは、転写機構がコンデンシン II のクロマチン局在に正に働く可能性を示唆した。

(4) 得られた成果の位置づけと今後の展望

本研究によりヒトの 2 種のコンデンシン複合体のクロマチン上への局在と機能発現において、複製や転写機構を介した制御の新たな知見を得た。染色体凝縮、複製、転写という 3 つのクロマチン動態が密接に関わっているというこうした視点は、がんにおけるゲノム構造異常や染色体不安定性の新たな機序の解明につながるものが期待される。またコンデンシン I の自己集合能がコンデンシンの機能発現を促すことを見出し、コンデンシン I による染色体構築機構に新たなモデルを導くことが期待される。

<引用文献>

- ① 高橋元子、広田 亨 (2017) 総説「M 期における染色体構築のメカニズム」. *生化学* 89(4):515-524.
- ② Sutani T., Sakata T., Nakato R., Masuda K., Ishibashi M., Yamashita D., Suzuki Y., Hirano T., Bando M., Shirahige K. (2015) Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation. *Nat Commun.* 6:7815.
- ③ Akai Y., Kurokawa Y., Nakazawa N., Tonami-Murakami Y., Suzuki Y., Yoshimura SH., Iwasaki H., Shiroya Y., Nakamura T., Shibata E., Yanagida M. (2011) Opposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing. *Open Biol.* 4:110023.
- ④ Ono T., Yamashita D., Hirano T. (2013) Condensin II initiates sister chromatid resolution during S phase. *J Cell Biol.* 200:429-41.
- ⑤ Takahashi M., Wakai T., Hirota T. (2016b) Condensin I-mediated mitotic chromosome assembly requires association with chromokinesin KIF4A. *Genes Dev.* 30:1931-1936.
- ⑥ Takahashi M., Tanaka K., Wakai T., Hirota T. (2016a) Phosphoproteomic analysis of human mitotic chromosomes identified a chromokinesin KIF4A. *Biomed Res.* 37:161-165.
- ⑦ Uchida KS, Takagaki K., Kumada K., Hirayama Y., Noda T., Hirota T. (2009) Kinetochore stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 184:383-90.
- ⑧ Nagasaka K, Hossain MJ, Roberti MJ, Ellenberg J, Hirota T. (2016) Sister chromatid resolution is an intrinsic part of chromosome organization in prophase. *Nat Cell Biol.* 6:692-9.
- ⑨ Abe S, Nagasaka K, Hirayama Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Aoyagi Y, Obuse C, Hirota T. (2011) The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* 25:863-74.
- ⑩ Hirota T., Gerlich D., Koch B., Ellenberg J., Peters JM. (2004) Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J Cell Sci.* 117:6435-45.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uchida Kazuhiko S.K., Jo Minji, Nagasaka Kota, Takahashi Motoko, Shindo Norihisa, Shibata Katsushi, Tanaka Kozo, Masumoto Hiroshi, Fukagawa Tatsuo, Hirota Toru	4. 巻 31
2. 論文標題 Kinetochore stretching-mediated rapid silencing of the spindle-assembly checkpoint required for failsafe chromosome segregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1581 ~ 1591.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.01.062	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 -
1. 著者名 Nozawa Ryu Suke, Yamamoto Tatsuro, Takahashi Motoko, Tachiwana Hiroaki, Maruyama Reo, Hirota Toru, Saitoh Noriko	4. 巻 111
2. 論文標題 Nuclear microenvironment in cancer: Control through liquid liquid phase separation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3155 ~ 3163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14551	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 -
1. 著者名 Motoko Takahashi, Toru Hirota	4. 巻 60
2. 論文標題 Folding the genome into mitotic chromosomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 19-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceb.2019.03.005.	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 -
1. 著者名 Takahashi Motoko, Hirota Toru	4. 巻 217
2. 論文標題 Dynamics of sister chromatids through the cell cycle: Together and apart	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1887 ~ 1889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201804091	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 高橋 元子、広田 亨
2. 発表標題 細胞周期を通じたクロマチン構造変換機構の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi M, Hirota T
2. 発表標題 Single stranded DNA in interphase is a key chromatin structure for mitotic chromosome organization
3. 学会等名 The 11th 3R & 3C Symposium（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahashi M, Hirota T
2. 発表標題 Characterization of DNA binding mode of human condensin I and II
3. 学会等名 The 7th Chromosome OS meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahashi M, Hirota T
2. 発表標題 Single stranded DNA in interphase is a key chromatin structure for mitotic chromosome organization
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

がん研究会 がん研究所 実験病理部
<https://www.jfcr.or.jp/tci/exppathol/index.html>

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
---------	---------