

平成23年 5月 30日現在

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20570009

研究課題名(和文)

2つのコンデンシンの染色体分布を規定するメカニズム

研究課題名(英文) Distribution of condensins and chromosome architecture

研究代表者

小野 教夫 (ONO TAKAO)

独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・専任研究員

研究者番号： 20291172

研究成果の概要(和文)：真核細胞では、コンデンシン I と II と呼ばれる 2つのタンパク質複合体が分裂期染色体の構築に中心的な役割を果たしている。これらは、分裂中期染色体上では姉妹染色分体の軸上に局在する一方で、互いに異なる分布パターンを示す。本研究において細胞生物学的手法を駆使した解析の結果、コンデンシン II は DNA 複製直後に染色体への結合を開始して、複製された染色体を分裂期で適切に凝縮するために、S 期での姉妹染色分体の構造変換に大きく貢献している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic cells possess two different condensin complexes, known as condensin I and II. Both play essential yet distinct functions in the processes of mitotic chromosome assembly and segregation. Interestingly, condensin II tends to be enriched in G-band regions. It has long been known that G-band regions are replicated later in S phase and condense earlier in prophase. This set of information allows us to propose the working hypothesis that condensin II may play a role in linking DNA replication in S phase to chromosome condensation in M phase. Quantitative cell imaging analyses combined with immunostaining show that condensin II start to associate with chromosomes during S phase. Interestingly, in the presence of replication stress, the depletion of condensin II, but not of condensin I, induced a critical abnormality in chromosome in M phase. These results suggest that condensin II may play a crucial role in structural conversion of replicated chromosomes during S phase to facilitate chromosome condensation in M phase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：①コンデンシン I ②コンデンシン II ③染色体凝縮 ④姉妹染色分体 ⑤DNA複製 ⑥複製ストレス ⑦人工染色体 ⑧ヒストン修飾

### 1. 研究開始当初の背景

コンデンシン I とコンデンシン II は、染色体の構築に中心的な役割を果たしているタンパク質複合体である。これらは構造的によく似ているが、細胞周期の過程で互いに異なる制御を受けている。HeLa 細胞では、コンデンシン I が間期で細胞質に存在し、核膜崩壊後の染色体凝縮に関与するのに対して、コンデンシン II は細胞周期を通じて核内に検出され、核膜崩壊以前の早い時期の凝縮に貢献する。加えて、分裂中期染色体上では、2つのコンデンシンはいずれも姉妹染色分体の軸上に局在するが、その分布パターンは互いに重ならない。これらの背景から、2つの複合体は染色体構築において異なる機能をもつことが示唆されている。しかし、それらの機能の相違点とその時空間制御についての理解はあまり進んでいなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、コンデンシンの分布を規定する染色体側の要因について明らかにすることを通じて、染色体構築におけるコンデンシンの時空間制御を理解することを目指すものである。この課題とともに、コンデンシン I とコンデンシン II が担う分子活性の解析と、それぞれが特異的に相互作用する制御因子の同定も必要とされるが、それだけでは目的を達成できないと考えた。すなわち、コンデンシンの分子レベルの素反応過程が、その機能発現の「場」である染色体上でどのように発現し、関係されているのかを理解していなくてはならない。

そこで本研究では、コンデンシンの染色体分布パターンが個々の染色体に特異的であるという申請者の観察を手がかりにして、中期染色体における2つのコンデンシンの動態を規定するメカニズムを明らかにすることを目指す。コンデンシンの分布を規定する因子の候補として、染色体バンド、ヒストン修飾、DNA塩基組成に注目し、細胞生物学と分子細胞遺伝学的手法を駆使して、この目的の達成を目指した。

この研究課題のなかでは、以下の3つの課題について解析を行った。細胞は主としてHeLa細胞を用いた。

#### (1) 細胞遺伝学的な染色体バンド(分染パ

ーン)とコンデンシン I と II の染色体分布がどのような関係にあるのかを明らかにする。

- (2) ヒストン修飾パターンおよびその変化が、2つのコンデンシンの分布や機能発現にどのように影響するのかを解明する。
- (3) 染色体として維持される最小規模の人工染色体における、コンデンシンの分布と染色体構築における機能を明らかにして、コンデンシンの動態を探るモデルとして確立する。

### 3. 研究の方法

前項の課題について、それぞれ次の方法で解析を進めた。

#### (1) 細胞遺伝学的な染色体バンド(分染パターン)とコンデンシンの染色体分布の比較

蛍光免疫染色によるヒト正常細胞とHeLa細胞におけるコンデンシン I と II の染色体分布と、蛍光色素によって描画した分染パターンを詳細に比較した。

#### (2) ヒストン修飾パターンとコンデンシンの分布と関連についての検討

①ヒストンのメチル化およびアセチル化を検出する抗体(H3-pan-Ac, H3K4me2, H3K27me3など)とコンデンシン抗体の二重染色により、両者の分布に関連があるかどうか検討した。

②ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である(Trichostatin A(TSA)で処理したときに、染色体の形態、およびコンデンシン I と II の局在と動態が変化するのかどうかを細胞生物学的手法により解析した。

#### (3) コンデンシン分布のモデルとしての人工染色体をもちいた研究

①ヒト人工染色体におけるコンデンシンの分布パターンとヒストン修飾パターンを蛍光免疫染色により検索する。なお人工染色体はかずさDNA研究所の舛本寛博士から提供を受けた。

②コンデンシン I 或いは II に対する siRNA を行い、人工染色体における染色体構築異常を検討する。特に、キネトコア・テロメア領域における異常が、細胞が本来持っている染色体と比較して顕著に現れるかどうかに着目して解析を進めた。

また、当初の計画には無かったが、DNA複製部位やDNA損傷部位と、コンデンシンの染色体結合部位との関連を調べた。ここでは、形態学的染色体異常の解析を含め、姉妹染色分体交換の解析や染

染色体や核内での局在の顕微鏡解析を DeltaVision Core を用いて行った。また、細胞周期の解析や核内のタンパク質の量的解析には、主に CELAVIEW (Olympus) を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞遺伝学的な染色体バンド(分染パターン)とコンデンシンの染色体分布の比較

G-band パターンとコンデンシンの免疫染色パターンを、中期染色体で比較したところ、コンデンシン II の分布は S 期後期に複製される G-band 領域に集まる傾向が見られた(図 1)。G-band に対応するヒストン修飾パターンとの比較においても、この傾向は確かめられた。したがって、コンデンシンの染色体分布は G-band/R-band の属性と関連する可能性がある。

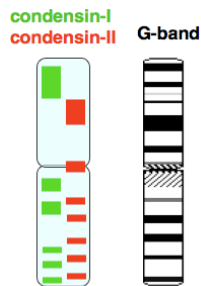


図 1. ヒト 1 番染色体におけるコンデンシン I と II と G-band パターンの比較

G-band 領域は、AT に富んだ塩基構成をしており、特異的な散在性反復配列(L1 配列)が分布する。しかし、現在までのところ特異的な DNA 配列とコンデンシンの分布との関連を見だせていない。一方で、G-band 領域は S 期において、遅い時期に複製される領域である。そこで申請者らは、染色体の複製と凝縮という 2 つの事象がコンデンシン II を介して機能的に連係しているのではないかとこの作業仮説を立てた。これを発展させた研究は(4)で述べる。

##### (2) ヒストン修飾とコンデンシンの分布と関連についての検討

上で述べたように、染色体のバンド構造と対応するヒストン修飾パターンは、コンデンシンの分布と関連がある可能性が示された。すなわち、G-band に対応する H3K36me3 はコンデンシン II と重なった分布を、R-band に対応する H3-pan-acetylation はコンデンシン I と重なる分布を示す傾向が見られた。

そこで、脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A で処理した細胞を調べたところ、セントロメア間の距離が離れ、染色体が太くなる変化が見られた。逆に、コンデンシン I と II の染色体上での局在は、姉妹

染色分体のより中心に集まり、コントロールと比較して細く見える傾向がみられた(図 2)。

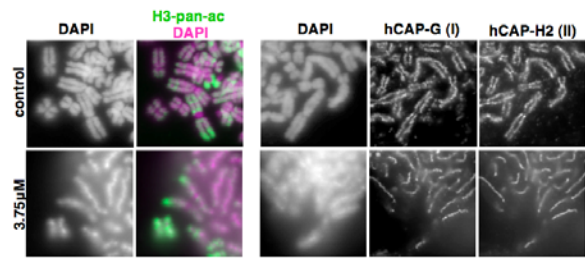


図 2. TSA 処理による染色体の形態とコンデンシンの局在変化

この結果は、ヒストン修飾パターンがコンデンシンの局在に直接もしくは間接的な影響を与えている可能性を示した点で意義がある。

##### (3) コンデンシン分布のモデルとしての人工染色体をもちいた研究

①人工染色体において、機能的セントロメアを構成する CENP-A クロマチン領域にはコンデンシン II が局在している一方、ヘテロクロマチンを構成するヒストンメチル化領域(H3K9me3)にはコンデンシン I が優位に分布していることが示された。人工染色体は、全長にわたってヒトセントロメア配列を含むが、その一部にしかセントロメアは形成されない。したがって、コンデンシン I と II のセントロメアにおける局在の違いは、DNA 配列ではなく、クロマチンの高次構造と密接に関連することが示唆された。これは、上に記述したトリコスタチン A で処理によって高アセチル化したクロマチン上では、コンデンシンの局在変化するという観察を支持している。

これらの結果から人工染色体は、セントロメアの形成におけるコンデンシン I と II の役割の違いを解析するモデルとしても有効であることが示された。

②しかしその一方で、細胞が本来持っている染色体とは異なり、コンデンシンを除去しても人工染色体の形態には変化は見られなかった。これは人工染色体の大きさが非常に小さいことによるものか、あるいはコンデンシンの機能がセントロメア以外の領域において、より重要であるのかは今回の研究では判断できなかった。

##### (4) S 期におけるコンデンシン II の役割

上に述べたように染色体バンドとコンデンシンの染色体分布を解析した結果から、申請者らは染色体の複製と凝縮という 2 つの事象がコンデンシン II を介して機能的に連係しているのではないかとこの作業仮説を立てた。細胞生物学手法を駆使して、その検証を進めたところ、コンデンシン II が染色体凝縮以前の S 期に染色体への結合を開始していることが分かった(図 3)。その一方で、コンデンシン II を除去しても複製は阻害されず、DNA 損傷や姉妹染色分体交換は増加しなかった。また、DNA 損傷部位とコンデンシン II の染色体局在にも関連はみだせなかった。ところが、コン

デンシン II を除去したのちに、複製を弱く攪乱した細胞の中期では、単独の処理では見られない染色体の形態異常が引き起こされた (図 4)。コンデンシン I の除去では、複製を攪乱してもこのような異常は起こらなかった。これらの結果は、正常に DNA 複製が進行しているときには、S 期コンデンシン II の働きは染色体構築に大きな貢献はしていないが、複製が何らかの原因で遅延したり阻害されたときには、分裂期の染色体の構築に大きく貢献していることを示している。したがって、コンデンシン II は S 期での障害を乗り越えて染色体を構築するために必要と考えることができる。

さらに、S 期におけるコンデンシン II の染色体結合は姉妹染色分体の接着に働くコヒーシンの動態にも影響を受ける可能性があることが分かった。これらの結果から、コンデンシン II は DNA 複製や DNA の損傷・修復には直接は関与していないが、複製後の染色体に結合して、コヒーシんとともに適切に分割・凝縮しうる構造へ S 期の間に変換する役割をもつことを示唆する。コンデンシン II の染色体分布が分裂期だけでなく S 期での役割を反映している可能性は、本研究で初めて示された。

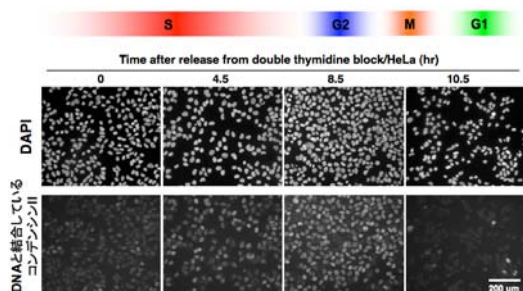


図 3. コンデンシン II の DNA への結合は S 期に開始している。G1/S 期に同調後に細胞周期を進行させた HeLa 細胞の核を免疫染色した。

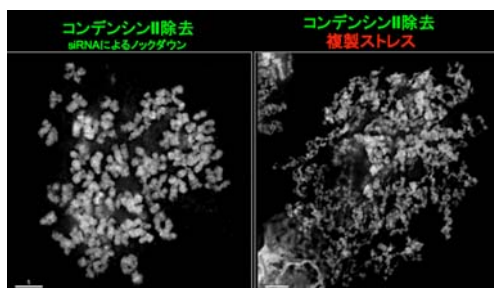


図 4. コンデンシン II の除去に複製ストレスを加えると姉妹染色分体の構造変換に大きな異常が引き起こされる (右)。コンデンシン II のみの除去では大きな変化は無い。

S 期において複製後の姉妹分体の構造変換が起こっていることは、その接着に主要な役割をもつコヒーシンが関与することから予

想されていたことであるが、今回の研究により、コンデンシン II がコヒーシんとともに、この過程に密接に関与していることが示唆された。したがって今回の研究成果は、分裂期以前から始まる染色体構築の「準備」のメカニズムの解明に大きく貢献すると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kamamoto, M., Machida, J., Miyachi, H., Ono, T., Nakayama, A., Shimozato, K., Tokita, Y. A novel mutation in the C-terminal region of RUNX2/CBFA1 distal to the DNA-binding runt domain in a Japanese patient with cleidocranial dysplasia. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 40, 434-437. 2011. 査読有り.
- ② Yamada, K., Fukushi, D., Ono, T., Kondo, Y., Kimura, R., Nomura, N., Kosaki, K.J., Yamada, Y., Mizuno, S., Wakamatsu, N. Characterization of a de novo balanced t(4;20)(q33;q12) translocation in a patient with mental retardation. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 152A, 3057-3067. 2010. 査読有り.
- ③ Machida, J., Felix, T.M., Murray, J.C., Yoshiura, K., Tanemura, M., Kamamoto, M., Shimozato, K., Sonta, S., Ono T. Searching for genes for cleft lip and/or palate based on breakpoint analysis of a balanced translocation t(9;17)(q32;q12). *Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 46, 532-540. 2009. 査読有り.
- ④ 小野教夫. 染色体の形作りとコンデンシンの役割. *生体の科学(増大特集現代医学・生物学の仮説・学説 2008)*, 59(5), 354-355. 2008. 査読なし.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 山下大輔、新富圭史、小野教夫、平野達也. 小頭症の原因タンパク質 MCPH1 によるコンデンシン II の制御. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010 年 12 月 10 日. 神戸.
- ② 高木昌俊、西山祐子、小野教夫、平野達也、今本尚子. Ki67 抗原は分裂期染色体構築にどのように関与するのか. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010 年 12 月 8 日. 神戸.
- ③ 小野教夫、平野達也. S 期におけるコンデンシン II の役割. 染色体学会第 61 回年会. 2010 年 11 月 7 日. 船橋.
- ④ 小野教夫、平野達也. 染色体複製と凝縮の機能関係: コンデンシン II の視点から. 第 26 回染色体ワークショップ. 2009 年 1 月 27 日. 姫路.
- ⑤ Ono T. and Hirano T. Nuclear condensin II in

S phase: linking DNA replication to chromosome condensation. The 3rd Asian Chromosome Colloquium. 2008年12月2日.  
大阪

[その他]  
ホームページ等

[http://www.riken.jp/index\\_j.html](http://www.riken.jp/index_j.html)  
<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/wako/ch-dyna/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 教夫 (ONO TAKAO)  
独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイ  
ナミクス研究室・専任研究員  
20291172

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者