

機関番号：88001  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21770185  
 研究課題名（和文） コンデンシン複合体の染色体離脱機構の解明による染色体「脱」凝縮の研究  
 研究課題名（英文） Study on chromosome de-condensation by analyzing the mechanism of condensin dissociation from mitotic chromosomes  
 研究代表者  
 中沢 宜彦（NAKAZAWA NORIHIKO）  
 独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構・柳田ユニット・研究員  
 研究者番号：70514751

研究成果の概要（和文）：細胞の分裂期における染色体の凝縮・分配は遺伝情報を正確に娘細胞に引き継ぐための重要な生命現象である。本研究ではこの過程に必須なコンデンシン複合体が分裂期の開始時のみならず終了時まで持続的に機能しており、染色体「脱」凝縮時にはコンデンシン複合体のタンパク質修飾状態が変換されることを示した。この結果から、細胞が分裂期に染色体を安定に分配し、次の細胞周期に進行して増殖を続けるためにはコンデンシン複合体の継続的な役割とその制御機構が重要であることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：Chromosome condensation and segregation are essential phenomena for precise transmission of genome information from mother to daughter cells. In this study, we showed that the condensin complex, which is necessary for chromosome segregation, has continuous role on chromosomes throughout mitosis. Condensin is modified (phosphorylated) during mitosis, but the modification is removed when cells exit from mitosis to next phase (interphase). These results suggest that continuous role of condensin throughout mitosis and its modification changes are important for the stable transmission of genome information and progression of mitotic cells to next cell cycle.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学、細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体分配、染色体凝縮、細胞周期、遺伝子、ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

(1)染色体分配は細胞が遺伝情報を正確に娘細胞に引き継ぐための重要な生命現象である。正確な染色体分配には分裂期で染色体が10分の1以下の体積に凝縮し、よりコンパクトな状態になる必要がある。これまでに、「コンデンシン」とよばれるタンパク質複合体が染色体凝縮に中心的な役割を

果たすことが報告されており、コンデンシンの機能欠損が染色体の凝縮異常を引き起こすことが多くの生物種で明らかとなっていた。そして、染色体の凝縮欠損は染色体分配の異常をもたらし、細胞のがん化を誘発する一因となる。

(2)一方で、染色体の「脱」凝縮については、その仕組みや役割は謎に包まれていた。分

裂期を終了した細胞は再び弛緩した染色体（クロマチン）に戻ることが古くから観察されており、この「脱」凝縮過程にも厳密な制御機構や生理的意義があると推測された。

## 2. 研究の目的

分裂期における染色体凝縮は正確な染色体分配のために不可欠であり、コンデンシン複合体が染色体に結合することで成し遂げられる。しかし、分裂期終了時の染色体「脱」凝縮の制御機構やその役割についてはまったく理解が進んでいない。そこで、本研究ではコンデンシンが染色体から離れる仕組みを解析することによって、染色体「脱」凝縮の制御機構と生理的意義を理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究課題の申請時当初、主な研究方法として、コンデンシン複合体の染色体離脱を引き起こす因子をスクリーニングによって同定することを想定していた。しかしながら、本研究の進行中にコンデンシン複合体の Cnd2 サブユニットがリン酸化を受けることが判明し、このリン酸化がコンデンシンの機能に密接に関わる可能性が浮上した（後述）。また、コンデンシンが分裂期の後半でも必要であり、染色体脱凝縮の直前まで機能し続ける可能性が出てきた（後述）。これらの点をふまえて、研究方法を以下のように一部変更して本課題を進めた。

### (1) コンデンシン複合体の分裂中期および分裂後期進行後における必要性の検討

コンデンシン複合体が分裂期の染色体凝縮を完了した後（分裂中期）でも必要かどうかを、分裂酵母微小管遺伝子の変異体を用いた遺伝学的方法により検証した。分裂酵母微小管遺伝子の低温感受性変異体 *nda3-KM311* 株は低温下（20℃）で微小管重合に欠損を示すため、分裂期前中期で細胞周期を停止させることができる。この停止は培養温度の上昇（30-36℃）によって可逆的に解消されるため、細胞周期を再開させることが可能である。一方、コンデンシン高温感受性変異体 *cut14-208* 株は高温培養時（36℃）でのみ、コンデンシンの機能を失う。したがって、*nda3-KM311* 株と *cut14-208* 株を組み合わせた二重変異株（以下 *nda3 cut14* 株）を 20℃ で 8 時間分裂期前中期に停止させた後、36℃ で培養することで、分裂期進行後に始めてコンデンシンの機能を失わせることができた（図 1）。さらに、*nda3 cut14* 株を 30℃ で短時間（7-9 分）培養して細胞を分裂期後期に進

行させた後、36℃ で再培養することで、コンデンシンを分裂期後期以降に失活させる実験も行った。なお、30℃ では *cut14-208* 株におけるコンデンシン機能は阻害されない。

### (2) コンデンシン複合体 Cnd2/Barren サブユニットのオーロラキナーゼ依存的リン酸化、脱リン酸化の解析

コンデンシン複合体は 5 つのサブユニットから成り立つが、そのうちの一つである Cnd2 タンパク質（Barren ファミリータンパク質）の分裂期リン酸化部位を質量分析法により同定した。次に、これらリン酸化部位のうち 1 カ所に対する抗リン酸化抗体を作製し、この部位のリン酸化、脱リン酸化の時期を詳細に確認した。また、このリン酸化が分裂期リン酸化酵素オーロラキナーゼに依存するか否かを、この酵素の変異体を用いて検討した。さらに、これらのリン酸化が細胞の増殖や染色体分配における生理的意義をもつことを調べるため、各リン酸化部位をアラニン（常に非リン酸化状態となるアミノ酸）もしくはグルタミン酸（常にリン酸化模倣状態となるアミノ酸）に置換し、その分裂酵母内での機能を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) コンデンシンは染色体凝縮完了後も継続的に必要である

*nda3-KM311 cut14-208* 二重変異株（方法参照）を用い、コンデンシンサブユニット Cut14 を分裂期進入後に染色体凝縮が完了してから失活させた。その結果、その後の染色体分配が著しく阻害され、引き伸ばされたような異常な染色体が分裂期後期に高頻度で観察された（図 1）。このことから、コンデンシンは分裂期の染色体凝縮のみならず、凝縮後も引き続き必要であることが明らかとなった。

### (2) コンデンシンは分裂期後期進行後も継続的に必要である

*nda3-KM311 cut14-208* 二重変異株を用い、コンデンシンサブユニット Cut14 を分裂期後期進入後、大方の姉妹染色体が分離してから失活させた。その結果、染色体凝縮後に失活させたときと同様に、分裂期終期で異常な染色体分配を示す細胞が高頻度で観察された。このとき、染色体の一部が「塊」のように細胞中央に残存してしまう表現型が特徴であった（図 2、矢印）。このことから、コンデンシンは細胞が分裂期後期に進入して姉妹染色体が分離した段階であっても依然として機能し続ける必要があると考えられる。

(3) トポイソメラーゼ II も分裂期後期以降必要であるが、コンデンシンとは異なった染色体領域の分配に関与する

*nda3-KM311* 変異体を用いた同様の実験により、トポイソメラーゼ II も分裂期後期以降でも継続的に必要であることがわかった。リボソーム DNA の分配を FISH (Fluorescent in situ hybridization) 法で調べたところ、トポイソメラーゼ II 失活時には、リボソーム DNA 領域の分配異常が 70%以上の細胞で確認されたが、コンデンシン Cut14 失活時には 25%程度にとどまった。一方、コンデンシンを後期以降で失活させた場合、染色体末端部であるテロメア領域が 80%以上の細胞で分配異常を示した。この結果から、コンデンシンとトポイソメラーゼ II はともに染色体分配に継続的に必要であるが、それぞれが作用する染色体領域は異なることが示唆された。

(1), (2), (3) の結果より、コンデンシン複合体は分裂期に進入し、染色体凝縮が完了した後でも継続的に分裂期終期まで働いており、この機能が正確な染色体分配にとって不可欠であることが明らかとなった。このことは、染色体凝縮因子コンデンシンが、染色体「脱」凝縮の直前まで働く必要があることを示している。

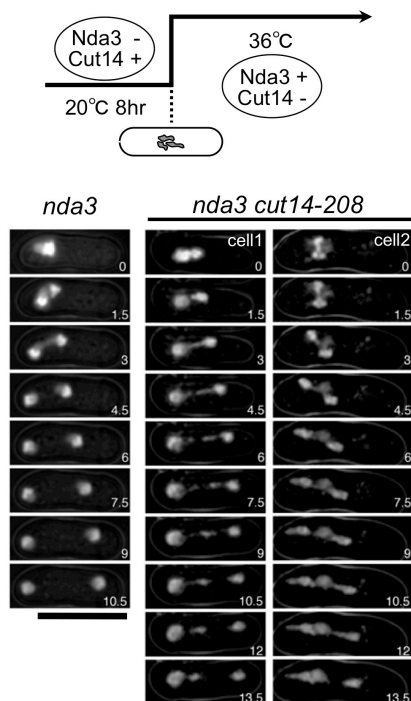


図1. コンデンシンは染色体凝縮後も継続的に必要である (赤色タンパク質融合ヒストンによる染色体分配の生細胞観察)

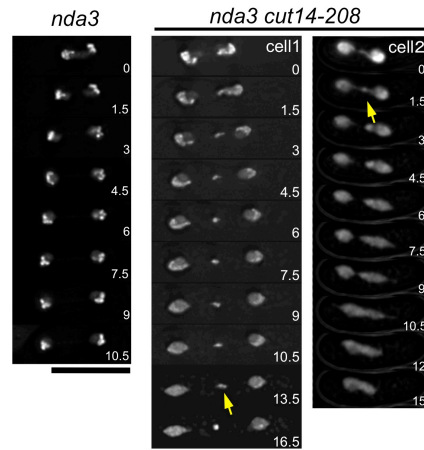


図2. コンデンシンは分裂期後期進行後も継続的に必要である

(4) コンデンシン Cnd2/Barren サブユニットは分裂期にオーロラキナーゼ依存的なリン酸化を受ける

分裂期に細胞を停止させ、コンデンシン複合体を免疫沈降し、沈降物を質量分析計で測定した結果、計 20 カ所のリン酸化部位が 4 つのコンデンシンサブユニットから同定された。そのうち半数近くの 9 カ所のリン酸化部位は Cnd2 サブユニットから同定され、さらにその中の 3 カ所(セリン 5 番目、41 番目、52 番目) が分裂期リン酸化酵素オーロラキナーゼの基質候補の配列と合致した。52 番目のセリン残基に対する抗リン酸化酵素を作製し、リン酸化の時期を調べた結果、分裂期の初期のみならず後期、終期まで継続的にリン酸化が確認され、細胞質分裂が起こる時期には脱リン酸化されていた (図 3)。これは、コンデンシンの核内移行に必要で分裂期前期にのみ起こる Cdc2 キナーゼによる Cut3 サブユニットのリン酸化の時期とは異なっていた。さらに、オーロラキナーゼの変異体を用いた実験より、この Cnd2 のリン酸化がオーロラキナーゼ依存的に起こることも分かった。

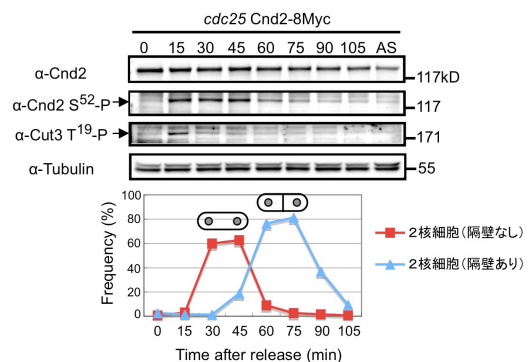


図3. Cnd2 サブユニットは分裂期を通じてリン酸化される (隔壁をもたない2核細胞が分裂期の細胞の指標)

(5) オーロラキナーゼ依存的な Cnd2 のリン酸化は正常な染色体分配に必要である

コンデンシン Cnd2 サブユニットのリン酸化部位(セリン 5, 41, 52 番目)をアラニン(A, 非リン酸化型)およびグルタミン酸(E, リン酸化模倣型)に置換し、その分裂酵母細胞内における生理的意義を調べた。その結果、3 カ所のリン酸化部位のうち2カ所をアラニンに置換した Cnd2-2A 変異体は顕著な染色体分配異常を示した(図4)。3カ所全てをアラニンに置換した cnd2-3A 変異型遺伝子は、cnd2 の温度感受性変異体に導入してもその感受性を回復せず、野生型に導入すると毒性効果を示した。一方、グルタミン酸に置換した cnd2-3E 変異体はオーロラキナーゼの機能低下を一部回復させる能力をもっていた。これらの結果から、Cnd2 の分裂期リン酸化は正常な染色体分配に必須であり、オーロラキナーゼの主要な基質の一つであることが理解される。

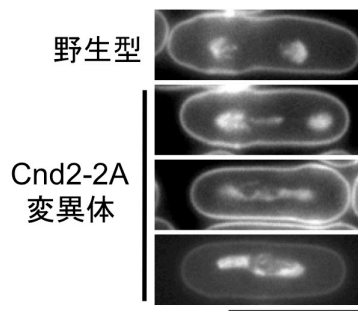


図4. 非リン酸化型Cnd2変異体は染色体分配欠損を示す

(1)~(5)の結果より、コンデンシン Cnd2 サブユニットの分裂期全期を通じたリン酸化により、コンデンシン複合体の働きが染色体「脱」凝縮の直前まで維持され、娘細胞への正確な染色体の分配が保障されるものと推察される。そして、Cnd2 の脱リン酸化を引き金に染色体「脱」凝縮が遂行されると考えられる。実際、リン酸化模倣型である Cnd2-3E 変異株では分裂期を終了してもコンデンシン複合体が核内に長く留まる様子が観察されている。

本研究課題ではコンデンシン複合体を染色体から離脱させ、脱凝縮を積極的に促進する因子の同定までには至らなかった。しかし、Cnd2 の脱リン酸化酵素を同定し、その機能を解析することが染色体「脱」凝縮研究の次のステップの一つであることは間違いないと思われる。本研究の成果を足がかりに、今後

の研究を進めたい。

#### 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2件)

① Nakazawa N, Mehrotra R, Ebe M, Yanagida M., Condensin phosphorylated by the Aurora-B-like kinase Ark1 is continuously required until telophase in a mode distinct from Top2., Journal of Cell Science, 査読有、124 (11)巻、2011、1795-1807

② Takahashi K, Imano R, Kibe T, Seimiya H, Muramatsu Y, Kawabata N, Tanaka G, Matsumoto Y, Hiromoto T, Koizumi Y, Nakazawa N, Yanagida M, Yukawa M, Tsuchiya E, Ueno M., Fission yeast Pot1 and RecQ helicase are required for efficient chromosome segregation., Molecular and Cellular Biology, 査読有、31 (3) 巻、2011、495-506

[学会発表] (計6件)

① 中沢 宜彦, Phosphorylation of Cnd2/Barren by aurora B-like Ark1 ensures continuous requirement of condensin till telophase in the mode distinct from Top2, FEBS Advanced Lecture Course 'Trends in Genetics', 2011年2月20-26日、アルメニア(エレヴァン)

② 中沢 宜彦, Phosphorylation of Cnd2/Barren by aurora B-like Ark1 ensures continuous requirement of condensin till telophase in the mode distinct from Top2, 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月9日、神戸国際会議場他

③中沢 宜彦, Fission yeast condensin and DNA topoisomerase II are required for chromosome segregation EVEN AFTER ENTRY INTO mitosis,  
The 4<sup>th</sup> International Workshop on Cell Regulation in Division and Arrest, 2009年11月29日、沖縄科学技術研究基盤整備機構シーサイドハウス (沖縄県)

④中沢 宜彦, Fission yeast condensin and DNA topoisomerase II are required for chromosome segregation EVEN AFTER ENTRY INTO mitosis,  
国際分裂酵母学会 2009、2009年10月26日、国立オリンピック記念青少年記念センター (東京都)

⑤中沢 宜彦, Fission yeast condensin and DNA topoisomerase II are required for chromosome segregation throughout mitosis,  
Switzerland-Japan Joint meeting 2009、2009年5月14日、ヴィラール (スイス)

[その他]

①中沢 宜彦、京都大学総合博物館・学術映像博 2009、トークイベント (生命科学の動き-映像に込められた思いを聞く-)、ゲストスピーカー、2009年9月19日、京都大学総合博物館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中沢 宜彦 (NAKAZAWA NORIHIKO)  
独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構・柳田ユニット・研究員  
研究者番号 : 70514751

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :