

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770172

研究課題名(和文) 精製タンパク質を用いた染色体の再構成：凝縮メカニズムの包括的理解を目指して

研究課題名(英文) Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified proteins

研究代表者

新富 圭史 (Keishi, Shintomi)

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・研究員

研究者番号：60462694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：分裂期における染色体構築は細胞増殖に不可欠なプロセスである。本研究では、染色体がいかにして構築されるかを理解するために、主要な染色体構成タンパク質(コアヒストン、トポイソメラーゼII、コンデンシン)を精子クロマチンに適切に結合させることによって染色体構造へと変換させられるかを検討した。その結果、上記の因子に加えて3種類のヒストンシャペロン(ヌクレオプラスミン、Nap1、FACT)とATPが含まれるシンプルな組成の反応液を用いて、染色体構築プロセスを再現できることが判明した。今後、この新しい再構成系を用いた解析によって、各々の因子が染色体構築に果たす役割の詳細な解析が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mitotic chromatids assembly helps guarantee error-free transmission of the genome during cell division. To understand mechanistically how chromatids might be assembled, I have aimed to reconstitute them with as few purified proteins as possible in a test tube. Intensive surveys on ingredients of the assay, which are based on the hypothesis that proper targeting of major chromosomal proteins to sperm DNA is the key for the reconstitution, enable me to recapitulate the chromatid assembly process using only six protein factors (core histones, topoisomerase II, condensin I, nucleoplasmin, Nap1, FACT) and ATP. These results indicate that chromatid assembly during mitosis hinges on much simpler mechanisms than previously thought. Equally important, the chromatid reconstitution system established in this study will undoubtedly open a new avenue of dissecting specific functions of individual factors as well as their cooperation in the future.

研究分野：細胞生物学・生化学

キーワード：染色体 周期
コンデンシン トポイソメラーゼ ヒストン ヒストンシャペロン 再構成 分裂期 細胞

1. 研究開始当初の背景

分裂期における染色体凝縮は遺伝情報の分配に不可欠なプロセスである。細胞分裂に先立って染色体の形態がダイナミックに変化することは古くから知られおり、近年ではコンデンシンとトポイソメラーゼ (トポ) の染色体構築過程への関与が見いだされたのを端緒として、その分子メカニズムに理解が及ぶようになりつつある。しかし、「どのようにして一本のクロマチン繊維が染色体内に折り畳まれるのか。」あるいは「何種類のタンパク質が染色体構築に必要なのか。」といった本質的な疑問に対しては、依然として明確な解答は得られていない。これらの問題を解決するには、できるだけ少ない種類の精製因子を用いて試験管内に染色体を再構成できる方法の開発が有効であると考えられた。事実、真核生物における微小管や細菌のプラスミド分配装置などは、精製因子のみを用いて試験管内で再構成され、それらの細胞内構造の分子基盤やダイナミクスが極めて詳細に理解できるようになった。

これまでに精製因子のみを使った染色体の再構成に成功した報告はなかったが、従来から用いられてきたカエル卵抽出液の無細胞系が大きなヒントを与えると考えた。この無細胞系では、精子由来のゲノム DNA を卵抽出液で1時間程度インキュベートすると試験管内に染色体を作ることができる。こうして作られた染色体の構成タンパク質の組成は極めてシンプルであり、コアヒストン、コンデンシン I、トポ の含有量が突出して多い。また、これまでに数多くのタンパク質について無細胞系から除いたときの影響が詳細に調べられているが、染色体全体の構造に大きな欠損を与えるものは、コンデンシン I、トポ のそれぞれを除いたとき以外に知られていない(コアヒストンの除去は実現していなかった)。したがって、上記の3種類の染色体構成タンパク質と DNA の適切な結合の制御に必要な因子や条件が見いだすことさえできれば、染色体を再構成できるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、染色体の構成タンパク質(コアヒストン、コンデンシン、トポ)とそれらの制御因子のみに焦点を絞ることにより、一見すると複雑な染色体凝縮という現象の背景にあるシンプルな原理を描出すること、また、その分子メカニズムの詳細な理解に必要な基盤技術を開発することにある。このように生物学における往年の課題に本質的な理解をもたらすことに加え、染色体の再構成には実学的分野においても魅力的な発展を遂げる可能性が潜んでいることを付記したい。例えば、分化した細胞のゲノム DNA は、分裂期に染色体凝縮を経験することによって、効率のよい全能性の回復がなされるこ

とが古くから知られている。再構成染色体を用いた解析によって、こうした経験則に対して分子的な解釈を与え、クローン動物や幹細胞の作出技術の開発に貢献することを見据えた発展研究は魅力的である。

この研究課題の期間内には、精製タンパク質を用いて染色体を再構成する方法を確立するという大胆な挑戦を通して、「分裂期染色体の構築に必要なかつ十分な因子を特定する」、「コンデンシンとトポ」の時間軸に沿った機能制御の意味を明らかにする、「染色体の根幹にある階層構造の実体を明らかにする」という3つの具体的な目標を掲げて研究に着手した。

3. 研究の方法

研究計画を立案した際に掲げた3つ目標のうち、専ら、「分裂期染色体の構築に必要なかつ十分な因子を特定する」を達成することに注力し、実際に大きな成果が得られたので、それについてのみ詳細に記載する。

(1) 仮説の検討

背景の項で述べた通り、これまでに発表された知見を総合すると、「主要な染色体構成タンパク質であるコアヒストン、コンデンシン I、トポ とゲノム DNA の適切な結合を再現できれば、分裂期染色体を試験管内に再構成できるのではないかと考えた。まず、この仮説を検証するために、次に挙げる精製標品の調製を行った。精子クロマチン：アフリカツメガエルの精子を単離し、界面活性剤処理によって原形質膜を透過させたもの、ゲノム DNA とコアヒストン H3-H4、プロタミン様タンパク質を含む、リコンビナントタンパク質(コアヒストン H2A-H2B、ヒストンシャペロン Nap1 およびヌクレオプラズミン、トポイソメラーゼ)：大腸菌または出芽酵母を宿主として発現させ、2段階以上のクロマトグラフィーを使って精製した。コンデンシン：CAP-G サブユニットに対する特異抗体を用いて、分裂期カエル卵抽出液から5つのサブユニットからなるホロコンプレックス(CAP-C, -D2, -E, -G, -H)を精製した。次に、精子クロマチンとコアヒストン H2A-H2B、Nap1、ヌクレオプラズミンを混和し、ゲノム DNA 上にヌクレオソームを形成させた。これを「基質クロマチン」と呼ぶ。

基質クロマチンを再構成した後、トポ とコンデンシン の精製標品を(単独で、または、両者を同時に)ATPの有無が異なる条件で作用させ、それらのタンパク質が基質クロマチンに結合するか、また、基質クロマチンの形状がどのように変化するかを免疫染色と蛍光顕微鏡観察によって検討した。

(2) 染色体再構成に必要な未同定因子の検索と決定

まず、分裂期のカエル卵抽出液にポリエチ

レングリコール (PEG) を添加し、抽出液に含まれる成分を3つに分画した。次に、各々のPEG分画を順次精製タンパク質で置き換えた様々な反応液を調製し、そこに基質クロマチンを加えたときのクロマチン形状変化を観察し、未同定因子がどのPEG分画に含まれるのかを絞り込んだ。

PEG分画A (0-4.5%のPEGで沈殿する成分を再懸濁したもの) に未同定因子が含まれると考えられる結果を得たので、さらにPEG分画Aをクロマトグラフィーで順次分画しつつ、各々の分画と残り5つの精製因子 (H2A-H2B、Nap1、ヌクレオプラズミン、トポ、コンデンシン) さらにATPを混合した反応液を作製した。各反応液に精子クロマチンを加えてインキュベートし、その形状変化を指標として未同定因子を追跡した。phosphocelluloseカラムとQ-Sepharoseカラムを使って順次分画したところで、未同定因子を含む分画の内容物は大きく絞り込まれたので、質量分析によって、そこに含まれるタンパク質を決定した。

未同定因子の有力候補であるFACTのリコンビナントタンパク質を発現させ (宿主: 昆虫細胞) NiカラムとQ-Sepharoseを使って精製した。その標品をH2A-H2B、Nap1、ヌクレオプラズミン、トポ、コンデンシンと混和し、6つの精製因子からなる反応系で染色体が再構成できるかを検討した。さらに、6つの因子のいずれかひとつを加えなかったときの影響を調べ、これらの因子で染色体再構成に必要なかつ十分であるかどうかを検討した。

(3) 染色体構築に重要な分裂期特異的な翻訳後修飾の決定

これまでに確立した再構成系では、コンデンシン以外はリコンビナントタンパク質を用いているにもかかわらず、十分な機能を発揮していた。そこで、唯一の分裂期細胞由来因子であるコンデンシンには分裂期特異的な翻訳後修飾が残っており、その修飾が染色体構築に貢献している可能性を検討した。具体的には、コンデンシンを間期卵から精製し、それを用いた場合には染色体を再構成できないこと確認した。その後、「間期型」反応系に分裂期のキナーゼ (Cdk1: ヒトデ卵から精製したもの、オーロラB: リコンビナントタンパク質) を添加したときに、クロマチン上のコンデンシンやヒストンはリン酸化されるのか、さらに、染色体を再構成できるのかを検討した。

4. 研究成果

方法の項に述べた通りに実験を行った。ここでは、それぞれで得られた結果と解釈を述べ、最後に計画全体を総括する。

(1) コンデンシンIとトポだけでは基質

クロマチンから染色体を再構成することはできない

各々の因子について高い精製度の標品を得ることができた。基質クロマチンの調製については、SDS-PAGEや免疫染色によって、精子クロマチンからのプロタミン様タンパク質の除去およびH2A-H2Bの結合が適切かつ効率良くに行われていることを確かめた。また、ヌクレアーゼ処理パターンの解析によって、長大なゲノムDNAをテンプレートとしていながら、ヌクレオソームアレイからなるクロマチンを再構成できたことを確かめた。ここまでは、当初、想定したスキームで再構築が進んだ。

トポは、単独で加えた場合には、ATPの有無に関係なく基質クロマチンに結合し、ATPが存在する時には、バナナ型の形状をしている基質クロマチンを不定形の雲状の構造へと変化させた。コンデンシンは、ATPが存在するときのみ基質クロマチンに結合するものの、その時クロマチンの形状変化は起こらなかった。両者を同時に加えた場合には、ATPがあっても、クロマチンの形状はバナナ型のままだった。添加量を滴定するなどの検討を行ったものの、基質クロマチンから出発して、卵抽出液の無細胞系で作られるような染色体が作られる条件は見いだせなかった。これらの結果から、コンデンシンIとトポだけは基質クロマチンから染色体を再構成できない、すなわち、まだ実験系に不足している因子があると判断した。

(2) 染色体を再構成するのに必要な未同定因子はFACTである

先に述べた通りの方法で、染色体を再構成するのに必要な未同定因子の候補を絞り込んだところ、Q-Sepharoseの溶出物に未同定因子に起因する活性が検出された。その分画を分析したところ、Spt16とSsrp1と呼ばれるタンパク質が等モル比で含まれていた。これらのタンパク質はヘテロ二量体を作り、FACTと呼ばれるヒストンシャペロンとして機能することが知られていることから、FACTが未同定因子の候補として推定された。

リコンビナントFACTを含む6つの精製因子からなる反応系で、精子クロマチンをATPとともにインキュベートすれば、それだけで染色体が再構成できることが確かめられた。精製因子のうち、どのひとつを欠いても再構成がうまく起こらなかったため、これらの6種類の因子が染色体再構成に必要なかつ十分な因子であると結論した。また、コンデンシンやトポを加えなかったときにできるクロマチンの形状は、それぞれを卵抽出液から除いたときに観察されるものと類似していたことから、試験管内で再現している現象は細胞内 (卵抽出液中) で起こる生理的現象に近いものであると判断した (図1)。

(3) Cdk1によるコンデンシンIは染色体構

築に必要なかつ十分な翻訳後修飾である

間期卵から精製したコンデンシン と残り5種類のリコンビナントタンパク質を加えた反応液を調製し、精子クロマチンを加えてインキュベートしたが、コンデンシン を加えなかったときと同様に、雲状のクロマチン作られた。予想通り、コンデンシン に対する分裂期特異的な翻訳後修飾が再構成には不可欠であると考えられた。Cdk1 を加えた場合には、コンデンシン のいくつかのサブユニットがリン酸化され、繊維状の染色体が再構成できた。一方で、オーロラ B を単独で加えた場合には、クロマチン上のヒストン H3 のリン酸化は起こるものの、コンデンシンのクロマチン結合や染色体再構成は起こらなかった。したがって、Cdk1 によるコンデンシン I が、染色体構築に必要なかつ十分な唯一の翻訳後修飾であると結論した(図1)。

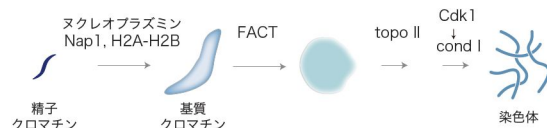


図 1. 染色体再構成の模式図

最後に、得られた研究成果を総括する。方法でも述べたように、研究計画を立案した際に掲げた3つの具体的目標のうち、「分裂期染色体の構築に必要なかつ十分な因子を特定する」については大きな研究成果が得られた。残り2つの目標については、想像以上に膨大な作業を要するものであったこと、詳細な解析に進むには予備知見が足りない、もしくは、必要な技術開発が追いついていないなど、若干準備不足であったと認めざるを得ない。

一方で、複雑な細胞内現象を、最少の要素・分子のみに注目して捉え直す試みこそは、今日の細胞生物学における重要な課題のひとつとして挙げられるものである。したがって、研究期間内に得られた成果だけでも、先駆的研究の一例として関連分野にも大きなインパクトを与えるものである。その証左として、研究期間終了直後(本報告書作成期間中に)、国際学会で口頭発表を行い、関連分野の研究者から高い評価をもって迎えられたとともに、原著論文の学術誌への掲載が受諾された(ともに2015年5月)。すなわち、本研究は、極めて順調に進展したといっても過言ではない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Keishi Shintomi, Tatsuro S. Takahashi, and Tatsuya Hirano: Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors.

Nature Cell Biology, 2015.

掲載決定済み、査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

Keishi Shintomi, Tatsuro S. Takahashi, and Tatsuya Hirano: Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors.

EMBO Workshop - SMC proteins

2015年5月14日、Vienna, Austria

Keishi Shintomi, Tatsuro S. Takahashi, and Tatsuya Hirano: Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified proteins.

The 9th 3R symposium

2014年11月19日、静岡県御殿場市

新富圭史、平野達也：精製タンパク質を用いた分裂期染色体の再構成

第31回染色体ワークショップ

2013年11月25日、神奈川県箱根町

新富圭史、平野達也：受精卵における父性ゲノム動態の試験管内再構成

第65回日本細胞生物学会大会

2013年6月19日、愛知県名古屋

Keishi Shintomi: Can we reconstitute a mitotic chromosome from purified components?

熊本大学発生医学研究所セミナー

2013年6月18日、熊本県熊本市

新富圭史、平野達也：精製タンパク質を用いて染色体を作ることができるか？

第35回日本分子生物学会年会

2012年12月13日、福岡県福岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新富 圭史 (SHINTOMI, Keishi)

理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・研究員

研究者番号：60462694