

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 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：2012～2013

課題番号：24770194

研究課題名(和文)コンデンシンの細胞内局在を制御するメカニズムとその生物学的意義

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms for spatiotemporal dynamics of condensins I and II

研究代表者

西出 賢次(Nishide, Kenji)

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・基礎科学特別研究員

研究者番号：70585067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：多くの真核生物はコンデンシン と を持ち、それぞれをうまく使い分けていることが明らかになりつつある。本研究では、哺乳類の受精卵と体細胞を用いて、コンデンシン と の細胞内局在パターンがどのような過程を経て確立するのかを明らかにしようと試みた。その結果、コンデンシン と の局在パターンは細胞種を問わず普遍的に成立しており、コンデンシン の核外排出がパターン形成の要となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Most eukaryotes utilize two different condensin complexes (known as condensins I and II) to regulate mitotic chromosome assembly and segregation. Interestingly, however, condensins I and II exhibit different subcellular localization during interphase. In this study, I have addressed the question of how the subcellular localization of the two complexes is established in mammalian fertilized eggs and somatic cells. It was found that nuclear export of condensin I by an exportin is responsible for the localization pattern, which appears to be conserved among proliferative cells in mammals.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：染色体 コンデンシン 受精卵

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂の際に娘細胞へ遺伝情報を過不足なく伝えるためには、間期クロマチンから分裂期染色体を構築し、正確に分配することが必要である。コンデンシンは染色体の構築と分離に中心的な役割を担うタンパク質複合体として同定された。様々なモデル生物を用いた研究により、多くの真核生物は異なる2つのコンデンシン(コンデンシン と )を持ち、それぞれをうまく使い分けていることが明らかになりつつある。

ヒト培養細胞では、コンデンシン と は分裂期には共に染色体上に局在し、互いに協調して役目を果たすことが報告されている。興味深いことに、間期ではコンデンシン が細胞質にコンデンシン が核内に存在することが知られている。しかし、両者がこのような劇的に異なる細胞内局在を示す理由とその制御メカニズムはほとんど理解されていない。

受精卵には精子と卵子に由来するクロマチンが距離をおいて共存し、それぞれが独立して雄性前核と雌性前核を形成する。それぞれの前核内のクロマチンは、DNA複製を経て、分裂期には染色体へと構造変換される。また、受精卵において雌性前核と雄性前核のエピジェネティック修飾は大きく異なっている。こうした体細胞とは大きく異なった状況下で、コンデンシン と がどのように振る舞い、どのように働いているか、という問題は大変興味深い。

我々は予備実験から、マウス受精卵にはコンデンシン と が存在する証拠をつかんでいた。上記のように核がふたつあるにもかかわらず、コンデンシン が細胞質にコンデンシン がふたつの前核内に局在するという、培養細胞と極めてよく似たパターンを示した。しかし、この結果は固定した受精卵に免疫染色を施して得られたものであり、時間軸に沿った細胞内局在の変化についての情報が望まれていた。

さらに、コンデンシンの局在パターンを確立する分子メカニズムを理解するために、ヒト培養細胞を用いた予備実験を行った。特に、分裂期には染色体上に存在するコンデンシン を核外へと排出することが局在パターン確立の要になると予想していたため、核外輸送メカニズムに焦点をおいた解析を行った。その結果、コンデンシンの核外排出を担う制御因子の有力候補として核外排出を司る exportin (XPO)と総称されるタンパク質のひとつを同定することに成功しており、詳細なメカニズムの検討を行おうとしていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、受精卵におけるコンデンシンの細胞内局在を手掛かりとして、コンデンシンの局在を制御するメカニズムとその生物学的意義を明らかにすることである。そのために、(1)マウスの受精卵におけるコンデンシン と の局在変化をリアルタイムで観察し、培養細胞と同様の局在パターンがどのような過程を経て成立するのかを明らかにしようと試みた。さらに、(2)哺乳類培養細胞を利用し、我々が同定した XPO を中心にふたつのコンデンシンの細胞内局在を制御する分子メカニズムを調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス受精卵における局在解析

GFP 標識されたコンデンシン 特異的サブユニットまたは mCherry 標識されたコンデンシン 特異的サブユニットを全身で発現するトランスジェニックマウスを開発した。得られた複数のトランスジェニックラインにおいて、受精卵における蛍光タンパク質の発現を確認した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡下で受精卵を培養しリアルタイムでコンデンシン と の動態変化を観察した。

### (2) 個体内におけるコンデンシン と の局在解析

個体内においてコンデンシン と の局在パターンを明らかにするために、マウス凍結切片を用いた免疫染色を行った。

### (3) 哺乳類培養細胞を用いた解析

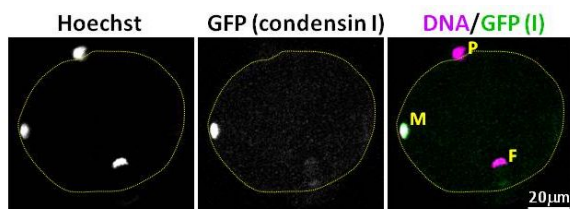
哺乳類培養細胞(ヒト HeLa 細胞とマウス NIH/3T3)にマウス XPO を過剰発現させ、コンデンシンの核外排出を促すか検討した。(Ran-GTP 存在下で)XPO がコンデンシン と 特異的に複合体を形成するかを調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 受精直後にはコンデンシン が精子クロマチンに強く局在する

蛍光標識されたコンデンシン またはを発現するトランスジェニックマウス由来の受精卵を用いて、受精直後から最初の卵割までのコンデンシン と の動態を追跡した。その結果、コンデンシン は受精直後の精子クロマチンに強く局在するが、卵子クロマチンには局在しないという大変興味深いデータが得られた(図1)。これに対して、コンデンシン は両方のクロマチンにほぼ同程度局在していた。このようなコンデンシンの局在パターンはこれまで知られていない。コンデンシン の精子クロマチンへの局

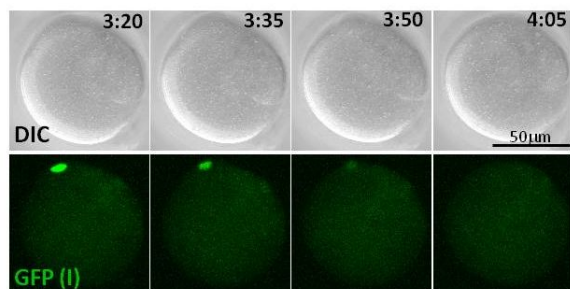
在は、(分裂期における染色体構築とは独立した)何らかの役割を果たしていることを示唆する。



(図1) コンデンシン I は精子クロマチン上に局在する。M は精子クロマチン、F は卵子クロマチン、P は極体のクロマチン、点線は受精卵の形態を示す。

(2) コンデンシン I は雄性前核から排除される

面白いことに、精子クロマチン上のコンデンシン I は細胞周期の進行に伴って、急速に核内から排除されていくことが明らかになった(図2)。これに対し、コンデンシン II は雄性前核および雌性前核内にとどまり続ける。その結果、コンデンシン I が核外に、コンデンシン II が核内に存在するという局在パターンが成立した。すなわち、受精直後にはコンデンシン I が特徴的な動態を示すが、雄性前核の形成に伴って核外への排除がおこり、培養細胞と同様の局在パターンが確立するようだ。



(図2) コンデンシン I は精子クロマチン上から排除される。右上の数字は試験管内受精を開始してからの時間を示す。

(3) コンデンシン I と II の局在パターンには細胞種を超えた普遍性がある

培養細胞の間期におけるコンデンシン I と II の局在パターンはふたつの核を持つ受精卵でも同じであった。次に、生体内において増殖能をもつ幹細胞や前駆細胞ではこの局在パターンが成立するのを確認した。その結果、脳や卵巣を含む様々な組織においてコンデンシン I は核外に存在し、コンデンシン II は核内に存在した。すなわち、コンデン

シン I の局在パターンは細胞種を超えて保存されており、ふたつのコンデンシンの局在制御には普遍的な意義があると推測できる。

(4) XPO はコンデンシン I の核外排出を促進する

XPO がコンデンシン I の核外排出に十分であるかを検討した。マウス XPO を培養細胞に発現させたところ、間期核内に残存しているコンデンシン I の核外への移行が促進された。したがって、XPO はコンデンシン I の局在制御因子である可能性が高い。次に、XPO がコンデンシン I と複合体を形成するかどうかを確認しようと試みた。しかし、過剰発現させた XPO とコンデンシン I の複合体を検出することはできなかった。両者の結合は非常に弱いのではないかと推測している。

(5) 今後の課題

本研究では、受精卵という特殊な状況下におけるコンデンシン I と II の局在変化を明らかにし、細胞種によらない普遍的な制御の存在を示唆する成果を得た。さらに、そのメカニズムの解明へとつながる手掛かりを得ることもできた。最後に、本研究成果から浮かび上がってきたふたつの疑問を議論する。

コンデンシン I の精子クロマチンにおける役割

前述のようにコンデンシン I は精子クロマチン上に強く局在する。そのため、分裂期染色体の構築を超えた、新たなコンデンシン I の役割が示唆されている。受精直後の精子クロマチンは高度に凝縮しているが、受精卵内で再構成され雄性前核へと姿を変える。コンデンシン I が精子クロマチンの構造変換に関与する可能性を考えている。

コンデンシン I を核外排出する生物学的意義

分裂期染色体で機能するコンデンシン I をなぜ核外へ排出するのかという疑問には未だに答えを出すことができていない。我々の研究グループでは、核内のコンデンシン I が最初にクロマチンに作用し、核膜崩壊後にコンデンシン I が作用するという順番が分裂期染色体を構築するために重要であるとの仮説を立てている。この仮説を検証することにより、コンデンシン I と II の普遍的な細胞内局在パターンがもつ真の意義が明らかになるであろう。

本研究によって得られた知見を基礎としてさらなる解析を進めることにより、分裂期染色体構築を含めたクロマチン構造変換メカニズムの本質に迫る成果が期待できる。

## 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 2 件)

小野 教夫、西出 賢次、平野達也、分裂期を超えたコンデンシン の多彩な役割、実験医学、査読無、31巻、2013年、pp.2586-2591

西出 賢次、平野達也、真核生物はふたつのコンデンシンをどのように使い分けているのか？ 細胞工学、査読無、32巻、2013年、pp.304-308.

[学会発表](計 2 件)

西出 賢次、平野達也、大脳皮質発生におけるコンデンシン と の役割、第31回染色体ワークショップ、2013年11月26日、箱根町湯本茶屋 ホテルおかだ

西出 賢次、平野 達也、大脳皮質発生におけるコンデンシン と の役割、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

西出 賢次 (NISHIDE, Kenji)

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・基礎科学特別研究員

研究者番号：7 0 5 8 5 0 6 7