

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840073

研究課題名(和文) 早期染色体凝縮システムとリン酸化プロテオミクスを用いた染色体凝縮機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of chromosome condensation mechanism using premature chromosome condensation system and phosphoproteomics

研究代表者

高田 英昭 (Takata, Hideaki)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20455207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分裂期にクロマチンが凝縮するメカニズムを明らかにするために、クロマチン凝縮時にリン酸化される蛋白質を質量分析により網羅的に同定した。その結果、これまでに報告がある分裂期にリン酸化される蛋白質に加えて、未知のリン酸化蛋白質も同定された。また、染色体構造との関連が大きい蛋白質は、クロマチン凝縮時にリン酸化を受ける傾向があり、分裂期にクロマチンが染色体へと凝縮するためにはリン酸化が大きく寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is identification of phosphorylated proteins from condensed chromatin to elucidate the mechanism of chromatin condensation during mitosis. We identified some unknown phosphorylated proteins during mitosis in addition to known phosphorylated proteins. Furthermore, we found the tendency that proteins which are closely related to chromosome structure get phosphorylation during chromatin condensation. It suggests that protein phosphorylation has key functions to trigger chromosome condensation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：クロマチン 染色体 リン酸化プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

真核生物では、遺伝情報である DNA は細胞核内に納められており、細胞周期に従って複製される。細胞周期は大きく 4 つの時期に分類され、DNA 複製の準備期間である G1 期、DNA 複製が行われる S 期、細胞分裂の準備期間である G2 期、細胞分裂により複製された DNA が 2 つの細胞に分配される分裂期 (M 期) が存在する。間期 (G1 期から G2 期) において、直径 2 nm の DNA はまず塩基性の蛋白質ヒストンに巻かれ、ヌクレオソームとよばれる構造体を形成し、非ヒストン蛋白質と結合したクロマチンとして核内に納められている。分裂期に入ると、核膜が崩壊し、クロマチンは染色体と呼ばれる構造体へと凝縮する。しかしながら、染色体構造や凝縮のメカニズムは未だ明らかとなっていない。

申請者らは、これまでに分裂期染色体の凝縮・構造構築に必要な因子を明らかにするために、分裂期染色体のプロテオーム解析を行ってきた (Uchiyama et al., 2004; Takata et al., 2007)。その結果、300 を超える染色体蛋白質を同定した。また、同定した蛋白質の染色体構造構築に関する役割を明らかにするために、RNA 干渉 (RNAi) 法により蛋白質の発現を抑え、染色体構造への影響を調べた。この研究により、複数の蛋白質の染色体での機能が新たに明らかとなった (Takata et al., 2007, 2012)。しかしながら、こうした方法では染色体凝縮に必要な蛋白質の同定は困難であり、染色体凝縮のメカニズムを解明するために、別のアプローチからの研究を要すると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では染色体の凝縮因子として蛋白質のリン酸化に注目し、染色体凝縮時のリン酸化ペプチドの網羅的な同定を行うことにより、染色体凝縮メカニズムを明らかにする。リン酸化に注目する理由は、細胞周期が CDK (cyclin-dependent kinase) と Cyclin からなる複合体による蛋白質のリン酸化により制御されているため、分裂期の染色体凝縮もリン酸化が引き金となって進んでいる可能性が極めて高いためである。実際に、CDK1 を阻害すると染色体が脱凝縮し、核の形成が起こる。また、ヒストンやコンデンシンなどの染色体構造に関わる蛋白質が分裂期特異的にリン酸化を受けることが報告されている。しかしながら、これらのリン酸化が見られない細胞においても染色体凝縮が起こることから (Hsu et al., 2000; Vagnarelli et al., 2006)、分裂期の染色体凝縮にリン酸化が必要かどうかという点に関しては未だ議論が続いている。分裂期へのリン酸化の関与は多くの研究者の興味を集めている分野であり、これまでも分裂期のリン酸化ペプチドを網羅的に同定する試みがなされている (Dephoure et al., 2008; Arminja et al.,

2011; Hegemann et al., 2011)。これらの先行研究により、分裂期のリン酸化ペプチドが 10,000 個以上同定されている。しかしながら、これらの先行研究は、分裂期細胞を用いたプロテオミクスであり、分裂期の様々な現象 (核膜崩壊や紡錘体形成など) に関わるリン酸化の膨大な情報の中から、染色体凝縮に特異的に関わるリン酸化を抽出することは極めて困難である。このため、染色体凝縮に必要なリン酸化の同定には至っておらず、染色体凝縮をターゲットにしたリン酸化プロテオミクスが必要である。

3. 研究の方法

最近、申請者らは、分裂期以外の細胞 (G1、S、G2 期) から染色体凝縮を誘導するシステム (早期染色体凝縮、Premature Chromosome Condensation; PCC) を利用して、凝縮状態の異なる染色体を調製することに成功した。本研究では、PCC を用いることで、凝縮に必要なリン酸化の効率的な同定を図る。PCC は、ホスファターゼ阻害剤である Calyculin A を用いることで細胞周期のどの時期からでも染色体凝縮を誘導するシステムである。PCC には以下のような特徴がある。A) G2 期のみならず、DNA 複製前の G1 期の細胞からも染色体凝縮を誘導できる。B) 1 時間程度の Calyculin A 処理で 90% 以上の細胞で染色体凝縮が起こる。C) 核膜崩壊や紡錘体形成、完全な動原体構築が認められない。

特に、C) の理由から、PCC では、通常の分裂期で生じる染色体凝縮以外に関わるリン酸化が抑制された状態にあると考えられ、染色体凝縮に必要なリン酸化を同定するために非常に有効であると考えられる。また、ホスファターゼ阻害剤である Calyculin A 処理を行った細胞は、細胞内の蛋白質のリン酸化状態が維持されている環境にあると考えられ、先行研究では見逃されていた微量のリン酸化ペプチドの同定できる可能性がある。

本研究の特色である PCC を最大限に活用し、染色体凝縮に必要な蛋白質のリン酸化を同定するために次のような工夫・検討を重ねて目的の達成を図った。

(1) 細胞同調条件・Calyculin A 処理時間の検討による PCC 誘導の最適化

Calyculin A 処理により、間期の細胞から染色体を調製するために、細胞同調条件の検討を行う。用いる細胞株は、大量培養が容易であり、増殖能が高いため細胞同調が容易である HeLa 細胞 (ヒト子宮頸部癌由来) を利用する。同調方法としては、一般的に用いられているダブルチミジンプロック法を用いる。同調率の確認は、FACS (fluorescent-activated cell sorter) により細胞の DNA 含量を調べることで行う。用いるチミジンの濃度や処理時間を検討することで高い同調率が得られる条件を決定する。次に、間期に同調した細胞に Calyculin A を添

加することで PCC を誘導する。また、M 期細胞の調製は、コルセミドを培地に添加し培養することで細胞周期を分裂期で停止させることで行う。

(2) HAMMOC 法によるリン酸化ペプチドの濃縮

リン酸化されたペプチドを質量分析法で同定することは難しく、同定にはリン酸化ペプチドの濃縮が必須である。このため、本研究では、ヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー (HAMMOC) 法によるリン酸化ペプチドの濃縮を検討する。HAMMOC 法は、蛋白質のリン酸基が酸化金属に親和性を示すことを利用したリン酸化ペプチドの濃縮方法で、親水性ヒドロキシ酸を競合剤として加えることで非リン酸化ペプチドの混入を抑え、非常に高い選択性でリン酸化ペプチドを濃縮する手法である (Sugiyama et al., 2007)。本研究では細胞からクロマチン画分を抽出し、Lys-C と Trypsin で蛋白質を消化した後、HAMMOC 法によりリン酸化ペプチドを濃縮し、nano LC-MS/MS により同定する。

(3) 比較リン酸化プロテオミクスによる染色体凝縮に必要なリン酸化ペプチドの同定

間期の細胞、PCC 誘導した細胞、分裂期細胞間のリン酸化蛋白質を比較することで、染色体凝縮に関わる蛋白質のリン酸化の同定を行う。そのためには、リン酸化ペプチドの定量的な同定が不可欠である。本研究では、Scaffold という解析ソフトを用いて、質量分析により得られた MS スペクトルデータを元に、サンプル間での半定量解析を行うことにより、クロマチン凝縮時にリン酸化状態が大きく変化するペプチドの同定を図った(図 1)。

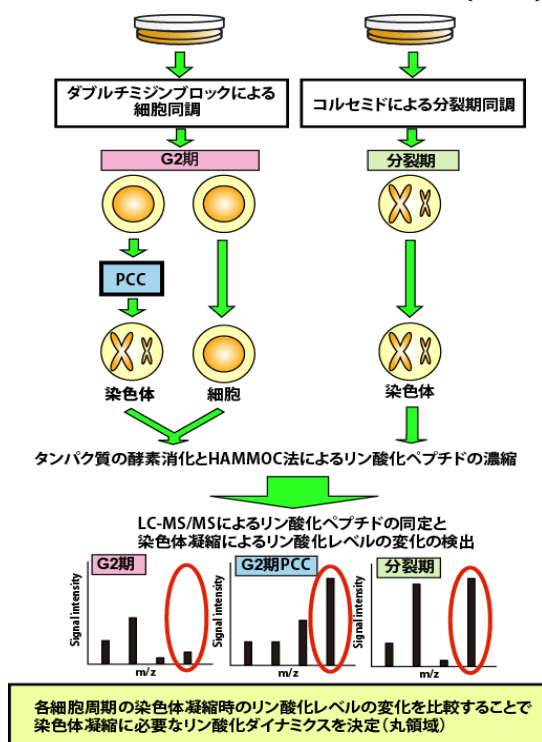


図 1. 比較リン酸化プロテオミクス

4. 研究成果

(1) 細胞同調条件・Calyculin A 処理時間の検討による PCC 誘導の最適化

HeLa 細胞をダブルチミジンブロックにより G1/S 期に同調後、リリースしてからの細胞周期の移行を FACS によりモニタリングした結果を図 2 に示す。リリースから 4 時間後に S 期の細胞が 68%、6 時間後に G2/M 期の細胞が 63.4%、12 時間後に G1 期の細胞が 90.1% の割合で得られることが示された。PCC の誘導は 50 nM の Calyculin A で G2 期の細胞を 1 時間処理することで最も分裂期染色体に類似したクロマチンの凝縮形態が得られることが分かった(図 3)。そこで、ダブルチミジンブロックからリリースして 6 時間後の細胞を用いて、PCC を誘導した細胞と誘導していない細胞を調製した。また、分裂期の細胞は、100 ng/ml のコルセミドで 14 時間処理し、Shake off により細胞を回収することで 95%以上の割合で分裂期細胞を回収することができた。

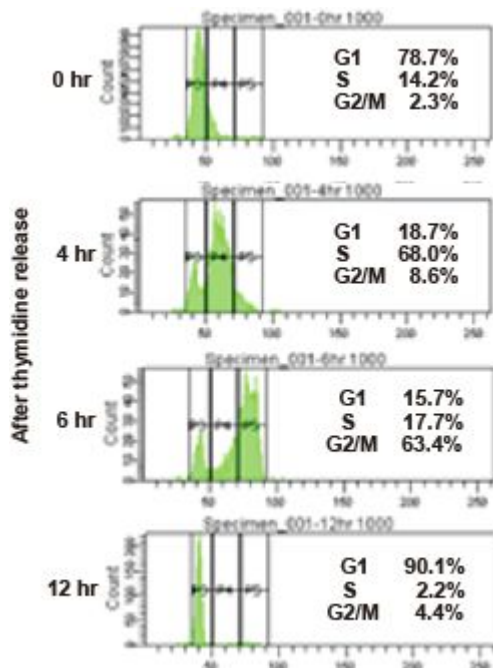


図 2. ダブルチミジンブロックからリリースした細胞の FACS による細胞周期解析

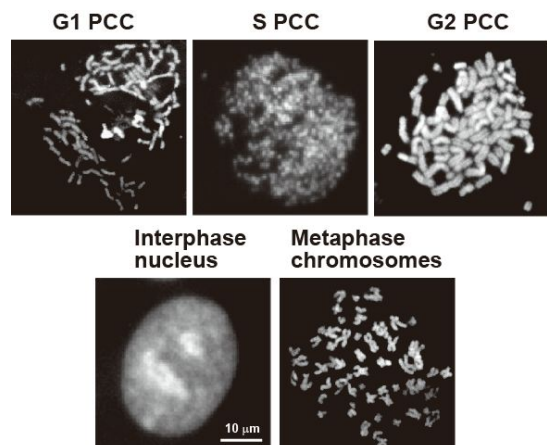


図 3. 各細胞周期で誘導した PCC の比較

(2) HAMMOC 法によるリン酸化ペプチドの濃縮

HAMMOC 法によってリン酸化ペプチドが濃縮できているかどうかを確認するために、リン酸化蛋白質として知られているカゼインを用いて検討を行った。その結果、リン酸化ペプチドの濃縮を行わなかった場合、MALDI TOF-MS を用いてカゼインのリン酸化ペプチドのスペクトルは検出されなかったが、リン酸化ペプチドの濃縮後にはリン酸化ペプチドが検出されており、本手法による濃縮がリン酸化ペプチドの同定に有効であることが示された(図4)。

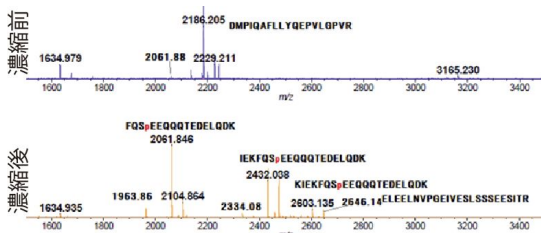


図3. HAMMOC 法によるリン酸化ペプチドの濃縮前後での MS スペクトルの比較

(3) 比較リン酸化プロテオミクスによる染色体凝縮に必要なリン酸化ペプチドの同定

分裂期のクロマチン凝縮に必要なリン酸化の同定を行うために、G2 期に同調した細胞、G2 期に PCC を誘導した細胞、M 期の細胞のそれぞれからクロマチン画分を調製し、蛋白質を抽出した後、Lys-C、Trypsin による酵素消化を行った。得られたペプチドからリン酸化ペプチドを HAMMOC 法により濃縮し、LC-MS を用いて 3 種類の細胞間で同定されたリン酸化ペプチドを半定量的に比較した。その結果、合計で 1475 個のリン酸化ペプチドが同定され、クロマチン凝縮時(M 期と PCC)において染色体構造に必須であることが既に報告されているヒストン蛋白質とスキャフォールド蛋白質においてリン酸化が上昇する傾向があることが分かった(図4)。しかしながら、ヒストンやスキャフォールド蛋白質のリン酸化部位はこれまでに分裂期における役割が分かっていないものが多くあり、これらのリン酸化部位の働きを調べることで、分裂期における染色体凝縮の新たな知見が得られる可能性がある。また、染色体凝縮時にリン酸化が増加する蛋白質の中には、ATF2 のようにこれまで染色体との関連がほとんど報告されていないものも含まれており、こうした蛋白質の分裂期染色体における機能も興味深い。

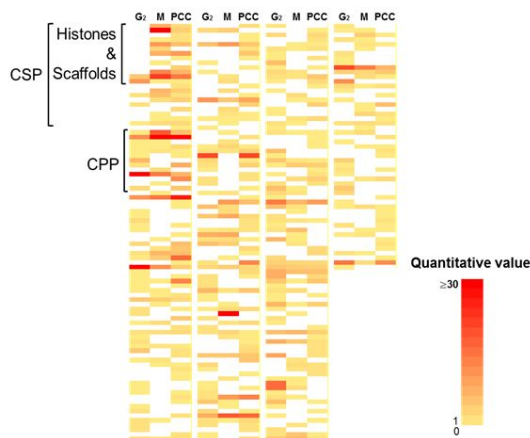


図4. 同定された蛋白質のリン酸化レベルの比較(赤ほどリン酸化レベルが高いことを示す)

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. Hamano T., Dwiranti A., Kaneyoshi K., Fukuda S., Kometani R., Nakao M., Takata H., Uchiyama S., Ohmido N., and Fukui K. (2014) Chromosome Interior Observation by Focused Ion Beam/Scanning Electron Microscopy (FIB/SEM) Using Ionic Liquid Technique. *Microsc. Microanal.* 20, 1340-1347. 査読有 doi: 10.1017/S143192761401280X.
2. Dwiranti, A., Hamano, T., Takata, H., Nagano, S., Guo, H., Ohnishi, K., Wako, T., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2014) The Effect of Magnesium Ions on Chromosome Structure as Observed by Helium Ion Microscopy. *Microscopy and Microanalysis* 20, 184-188. 査読有 doi: 10.1017/S1431927613013792.

[学会発表](計 2 件)

1. 高田英昭. ゲノムクロマチンの凝縮が生み出す新たな放射線耐性, 染色体学会第 65 回年会, 倉敷市芸分館(倉敷・岡山), 2014 年 10 月 24 日
2. Hideaki Takata (2014) The biological significance of chromatin condensation with irregular folding of nucleosome fiber, U.K.-Japan Chromosome Workshop, Harwell (U.K.), 2014 年 2 月 3 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 英昭 (TAKATA Hideaki)
大阪大学大学院工学研究科・助教
研究者番号: 20455207