

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21770196

研究課題名（和文） 染色体凝縮の制御メカニズム：小頭症の原因タンパク質MCPH1の役割

研究課題名（英文） The role of MCPH1, a protein responsible for primary microcephaly, in chromosome condensation

研究代表者

山下 大輔 (YAMASHITA DAISUKE)

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：50462742

研究成果の概要（和文）：小頭症の原因タンパク質の一つである MCPH1 に変異をもつ患者細胞では時期尚早な染色体凝縮（PCC）が観察される。染色体凝縮における MCPH1 の役割を調べるために、カエル卵抽出液を用いた無細胞系を確立した。その結果、ヒト MCPH1 の N 末端領域はコンデンシン II の染色体結合を特異的に阻害することが明らかになった。さらに、患者細胞を用いた相補実験では、PCC のレスキューには N 末端領域だけで充分であることがわかった。本研究により、MCPH1 はコンデンシン II の直接的な制御因子として染色体凝縮に機能することが示された。

研究成果の概要（英文）： Mutations in human MCPH1 (hMCPH1) cause primary microcephaly, which is characterized by a marked reduction of brain size. hMCPH1 mutant patient cells display unique cellular phenotypes, including premature chromosome condensation (PCC), in G2 phase. To examine a role of MCPH1 in chromosome condensation, I developed a cell-free assay using *Xenopus* egg extracts. The results demonstrated that an N-terminal domain of hMCPH1 specifically inhibits the action of condensin II *in vitro*. A complementation assay using patient cells revealed that the N-terminal domain of hMCPH1 is sufficient to rescue the PCC phenotype. Thus, hMCPH1 acts as a direct modulator of condensin II to regulate chromosome condensation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：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：MCPH1、染色体凝縮、コンデンシン、小頭症、カエル卵抽出液、進化

1. 研究開始当初の背景

染色体異常は、染色体数の異常と、欠失や

転座などの構造的異常の2つに大別される。これらの異常はダウン症や白血病といった

深刻な疾患を引き起こしうるため、染色体検査は臨床診断や遺伝カウンセリングを行ううえで、重視される。最近になって、染色体の構築および分離過程に関連する遺伝子の変異を原因とする疾患が明らかになりつつある。それらの疾患の一つに小頭症があり、この患者では脳の発達が悪く、頭蓋および大脳が異常に小さいという症状が見られる。その発症には、遺伝的要因が一因となっており、これまでに七つの原因遺伝子座 (MCPH1-7) が同定されている。このうち *MCPH1* 遺伝子に変異をもつ患者由来の細胞では、分裂期に先立って時期尚早な染色体凝縮 (Premature Chromosome Condensation; PCC) が観察されることが知られていた。この現象はコンデンシン II の制御異常に起因することが明らかにされ、MCPH1 はコンデンシン II の抑制因子として働いている可能性が示されていたが、その機構についてはわかっていなかった。

2. 研究の目的

カエル卵抽出液を用いた生化学的解析とヒト培養細胞を用いた細胞生物学的解析を併用することにより、コンデンシン II の染色体結合活性および染色体凝縮活性の制御における MCPH1 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) カエル卵抽出液を用いた生化学的解析

細胞周期特異的な染色体の構造変換を試験管内で再現できるカエル卵抽出液を用いることにより、コンデンシン II の染色体への結合活性と染色体凝縮活性における MCPH1 の直接的役割を調べた。

(2) ヒト培養細胞を用いた細胞生物学的解析

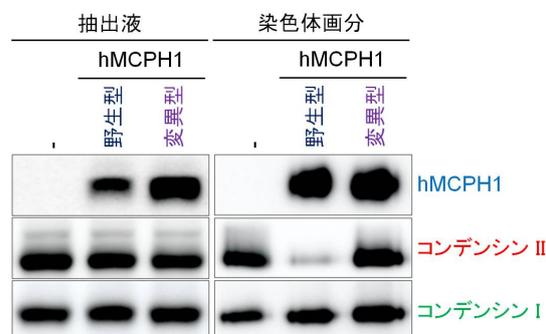
染色体凝縮異常 (PCC と中期染色体の形態異常) が観察される MCPH1 患者細胞に MCPH1 を異所的に発現させる相補実験を行うことにより、生化学的解析で得られた結果がどのように MCPH1 の細胞内機能を反映しているかを調べた。

4. 研究成果

(1) ヒト MCPH1 (hMCPH1) によるコンデンシン II 特異的な阻害

カエル卵抽出液を利用して、MCPH1 によるコンデンシン II の制御機構を解析するための無細胞系を確立した。hMCPH1 を添加すると、分裂期抽出液中にあるコンデンシン II の染色体への結合が阻害されることを見いだした (図 1)。一方で、異なる制御サブユニットをもつコンデンシン I の染色体結合は阻害されなかった。欠失変異体を用いることにより、阻害活性を担うのは N

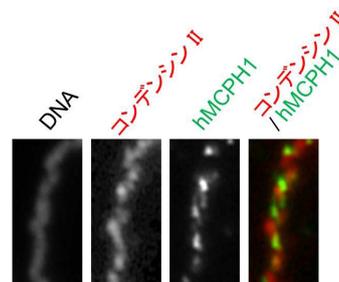
末端領域であることがわかった。さらに重要なことに、小頭症の病因となるミスセンス変異をこの領域に導入すると、コンデンシン II の阻害活性が抑えられた (図 1)。これらの結果から、hMCPH1 の変異によるコンデンシン II の異常な活性化が小頭症の病因の一つであることが示唆された。



(図 1) hMCPH1 によるコンデンシン II 特異的な阻害

(2) hMCPH1 とコンデンシン II との染色体結合領域の競合

hMCPH1 がコンデンシン II を阻害する機構を調べるために、染色体上の両者の局在を比較した。その結果、hMCPH1 の N 末端領域とコンデンシン II は染色体上で相互排他的に観察された (図 2)。この結果から、hMCPH1 の N 末端領域は、コンデンシン II の染色体結合領域を競合することで阻害することが示唆された。

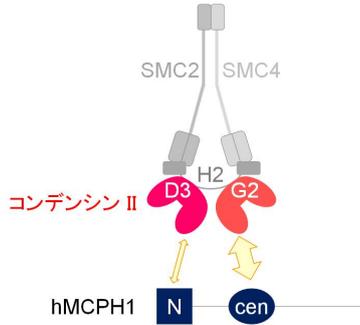


(図 2) hMCPH1 の N 末端領域とコンデンシン II の染色体結合領域の競合

(3) hMCPH1 とコンデンシン II の物理的相互作用

hMCPH1 とコンデンシン II が機能的なだけでなく、物理的にも相互作用しているかを調べるために、ヒト培養細胞抽出液を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、両者は物理的にも相互作用していることを見いだした。そこで、hMCPH1 の領域欠失変異体を用いた実験を行ったところ、hMCPH1 は中央領域 (cen) を介してコンデンシン II と強く相互作用していることがわかった。さらにこの領域内のアミノ酸を置換させた変異体を用いることで、相互作

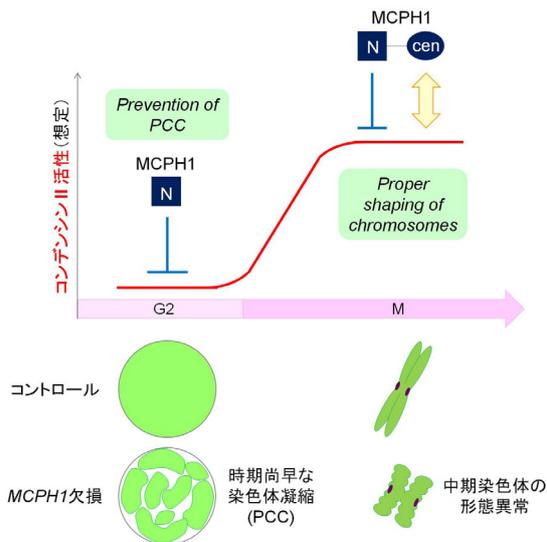
用に必須のアミノ酸を同定した。次に、無細胞翻訳系で発現させた組み換えタンパク質を用いた解析から、hMCPH1の中央領域はコンデンシン II を構成する G2 サブユニットと強く相互作用していることが明らかとなった。さらに、hMCPH1 の N 末端領域は D3 サブユニットと弱く相互作用することを見いだした。つまり、hMCPH1 は二つのドメインを介してコンデンシン II と相互作用していることがわかった (図 3)。



(図 3) hMCPH1 とコンデンシン II の物理的相互作用

(4) ヒト培養細胞における hMCPH1 によるコンデンシン II の制御

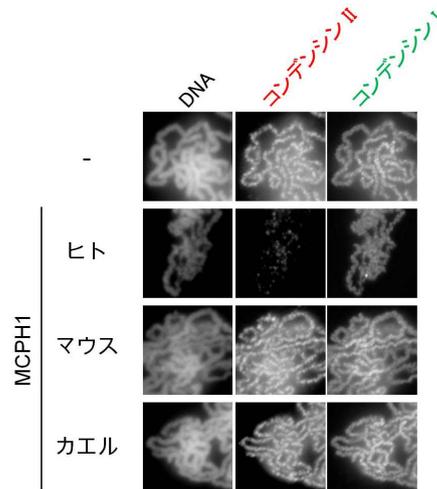
上記の生化学的な解析で得られた結果が、hMCPH1 の細胞内機能をどのように反映しているかを調べるために、患者細胞を用いた相補実験を行った。その結果、PCC を抑制するためには N 末端領域の発現で充分であったが、中期染色体の形作りにはコンデンシン II と強く相互作用する中央領域が貢献していることがわかった (図 4)。これらの結果は、hMCPH1 がコンデンシン II の直接的かつ複合的な制御因子であることを強く示唆している。



(図 4) ヒト培養細胞における MCPH1 によるコンデンシン II の制御

(5) MCPH1 の機能的進化

小頭症の原因タンパク質である MCPH1 の別の側面として、進化における MCPH1 のアミノ酸置換が脳サイズの増大に貢献しているという興味深い可能性が指摘されている。MCPH1 のオルソログはショウジョウバエからヒトまで存在するが、そのアミノ酸配列の保存性は他の細胞周期関連タンパク質に比較して際立って低く、MCPH1 は進化速度の速いタンパク質であることが知られている。そこで、半定量的な解析が可能である無細胞系を利用して生物種間における MCPH1 の活性の違いを検討した。無細胞系にマウス MCPH1 あるいはカエル MCPH1 を添加してみたところ、それらの有するコンデンシン II の阻害活性はヒト MCPH1 に比べて極めて低かった (図 5)。そこで、この実験系の簡便さを活かして、ヒトとマウス間での活性の違いを担うアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、N 末端領域内の複数のアミノ酸残基を組み合わせることにより、マウス MCPH1 をヒト MCPH1 様の高い活性を持つタンパク質に変換させることができた。これらの結果は、MCPH1 によるコンデンシン II の制御活性が進化の過程で大きく変化していることを示唆するとともに、今回開発した無細胞系が MCPH1 の機能的進化を検出するための有力な手段となりうることを示している。



(図 5) 生物種間における MCPH1 の活性の違い

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 Yamashita D., Shintomi K., Ono T., Gavvovidis I., Schindler D., Neitzel H., Trimborn M., and Hirano T.: “MCPH1

regulates chromosome condensation and shaping as a composite modulator of condensin II.” *J. Cell Biol.* 194:841-854 (2011). 査読有

- ② Gavvovidis I., Pohlmann C., Marchal JA., Stumm M., Yamashita D., Hirano T., Schindler D., Neitzel H., and Trimborn M.: “MCPH1 patient cells exhibit delayed release from DNA damage-induced G2/M checkpoint arrest.” *Cell Cycle.* 9:4893-4899 (2010). 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山下大輔、新富圭史、小野教夫、Gavvovidis I.、Schindler D.、Neitzel H.、Trimborn M.、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 29 回染色体ワークショップ、2012 年 1 月 26 日、仙台
- ② 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、第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 大輔 (YAMASHITA DAISUKE)

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：5 0 4 6 2 7 4 2