

令和元年6月10日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06959

研究課題名(和文) 組換えコンデンシン複合体を用いたM期染色体構築の分子解剖

研究課題名(英文) Molecular dissection of the condensin complex by using recombinant subunits

研究代表者

木下 和久 (Kinoshita, Kazuhisa)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：60447886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞のM期染色体構築において中心的役割を果たすコンデンシンIは五つのサブユニットからなる分子複合体である。組換えサブユニットから再構成したコンデンシンI複合体とカエル卵抽出液を用いたアッセイ系において、その分子機能の解析をおこなった。本研究では特にkleisinサブユニットCAP-Hの役割について注目し、進化的に高度に保存された領域の変異体を作製した。変異体解析の結果、CAP-Hの中央領域にあるモチーフIIIとIVと名付けた二つのサブドメインが、染色体構築におけるコンデンシンIの機能に対してそれぞれ固有の機能的および構造的貢献をしていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報の継承を担う分裂期染色体の構築のメカニズムは、染色体そのものが生存に必須であるという本質的な性質のために、解析の方法が極めて限られている。染色体構築に中心的役割を担うコンデンシン複合体もまた生存に不可欠であり、その分子機能の解析に困難を伴ってきた。本研究結果の意義は、前述の技術的問題を克服し、染色体構築のメカニズムを分子レベルで詳細に調べることを可能にした点にある。新たな視点を提供するモデルを提唱しており、今後の染色体研究においてさらなる新展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Condensin I is a five-subunit protein complex that plays a central role in mitotic chromosome assembly in eukaryotes. To dissect its molecular mechanism of action, we had established a functional assay that combines reconstituted recombinant complexes and *Xenopus* egg extracts. In the current study, we investigated the role of CAP-H, the kleisin subunit of this complex, by introducing mutations in its conserved subdomains. We found that two sets of the subdomain of CAP-H, referred to as 'motifs III and IV', have functional and structural contributions to condensin I's essential function in mitotic chromosome organization.

研究分野：分子生物学 細胞生物学

キーワード：染色体 細胞周期 細胞分裂

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞のゲノム DNA が細胞周期間期から M 期 (分裂期) への遷移において高度に折り畳まれる過程は染色体構築と呼ばれ、一对の複製されたゲノムを正確かつ迅速に二つの娘細胞に分配することを可能にしている。この染色体構築において中心的役割を果たすのが、コンデンシン (condensin) と呼ばれる分子複合体である (Hirano 2016, Cell 164:847)。多くの真核生物は二種類のコンデンシン (コンデンシン I と II) を持つことが知られている。それぞれの複合体は、二つの SMC ATPase サブユニット (SMC2-SMC4) と三つの non-SMC サブユニット (kleisin サブユニットと二種の HEAT サブユニット) から構成される (図 1a 参照)。「コンデンシンは分子レベルでいかにして染色体構築に貢献しているのか?」という問いに答えるためには、個々のサブユニットの分子機能を理解することが不可欠である。しかしながら、コンデンシンの機能は細胞の生育に必須であり、いずれのサブユニットの変異も染色体分離異常を起こして致死となるため、従来の遺伝学的手法によって各サブユニットの役割を理解することは困難であった。一方、初期の生化学的研究において、カエル卵抽出液や培養細胞から精製した複合体を用いていくつかの重要な知見が得られていたが (e.g., Kimura et al 1997, Cell 90:625)、native な複合体を用いる限りその収量は限られており、変異を導入するような機能解析のアプローチにも踏み込めない状態であった。このような背景から、個々のサブユニットの分子機能を理解するために、組換えサブユニットから出発して機能的なコンデンシン複合体を再構成することがコンデンシン研究の分野において長らく待ち望まれていた。そこで、研究代表者は先行研究において、バキュロウイルスの昆虫細胞のタンパク質発現系を用いた組換え体によるコンデンシン複合体の再構成に着手した。分子量 600-700 kDa におよぶ巨大分子複合体の発現・精製は試行段階において種々の技術的困難を伴ったが、最終的にこれらの困難を克服し、高純度かつ高収量のホロ複合体を再構成することに成功した。野生型複合体に加えて、さらに non-SMC サブユニットを欠失した変異型複合体のセットと SMC ATPase に点変異を導入した変異型複合体のセットを再構成し、これらの比較解析を通してコンデンシン I の個々のサブユニット独自の機能を検定できるアッセイ系を確立した (Kinoshita et al 2015 Dev Cell 33:94)。この非常に強力な実験系の確立によって、各サブユニットの機能を組織的に解析出来るようになったことが、本研究課題の立案と実現に直接つながった。

2. 研究の目的

本研究では、組換えサブユニットから再構成したタンパク質複合体コンデンシン I を用いてその分子機能と制御のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

組換えサブユニットを用いることによる最大の技術的利点である、特定部位への変異導入によるコンデンシン I 複合体の遺伝的改変を行い、特に kleisin サブユニット CAP-H の役割と HEAT サブユニットとの相互作用について精査・検討することによって、染色体構築におけるコンデンシン I の分子レベルでの貢献の解明を目指した。

3. 研究の方法

主に以下に述べる二つの方法によって研究を進めた。

(1) 組換えサブユニットへの点変異導入と変異型サブユニットを含むコンデンシン I 複合体の再構成

コンデンシン I 複合体を構成するサブユニットの一つ、kleisin サブユニット CAP-H の昆虫細胞発現用コンストラクトにおいて特定の部位に複数の変異を導入した点変異型 CAP-H を作製した。この変異型コンストラクトを野生型コンストラクトと同様にバキュロウイルスの昆虫細胞の発現系に導入し、他の組換えサブユニットと共発現させたものを精製することにより、目的の変異を含むコンデンシン I のホロ複合体およびサブ複合体を再構成した。

(2) カエル卵細胞抽出液を用いた染色体形成アッセイ系による機能解析

上記(1)の方法によって再構成した変異型複合体の活性を検定するためのアッセイ系を用いて機能解析した。カエル卵から調製した M 期細胞抽出液中の内在性 *Xenopus* コンデンシンを特異抗体によって免疫除去し、その抽出液中に組換えサブユニットから再構成した複合体を添加し、さらに基質として精子由来のクロマチンを加えることによって、M 期染色体形成過程におけるその複合体の活性および機能を生理的条件下で検定した。このアッセイ系では、主にカエル精子核由来のクロマチンをこれまで主に基質として用いてきたが、後述するように本研究課題ではマウス精子核由来のクロマチンを用いることによって、二つの基質の間で全く異なる欠損表現型を示すコンデンシン I の変異体が見出された。各種変異体に対してこの二種類の基質を用いてアッセイを行い、染色体形成における変異体の欠損表現型を比較解析した。

4. 研究成果

(1) kleisin サブユニット CAP-H の変異体の作製

先行研究において研究代表者らは、コンデンシン I の五つのサブユニットのうち SMC2-4 ATPase と HEAT サブユニットの重要性を明らかにした (Kinoshita et al 2015 Dev Cell 33:94)。これに対し、残る kleisin サブユニットの機能については不明なままであった。これは kleisin サブユニット自体がホロ複合体中で SMC2-4 二量体と HEAT サブユニットの両者をつなぐハブ的な役割を担っており (図 1a)、kleisin サブユニットを単独で欠失するような四量体を作成することが構造的に不可能なためであった。そこで、kleisin サブユニット CAP-H の役割を明らかにする目的で、CAP-H の特定部位に点変異を導入する mutagenesis によるアプローチをおこなった。

点変異導入にあたり、異生物種間で進化的に保存された CAP-H の五つのドメイン構造 (モチーフ I-V と呼ぶ) に注目した。これらモチーフのうち特に高度に保存されているモチーフ II、III、IV 中の芳香族アミノ酸残基に変異を導入し親水性のグルタミン残基 (Q) に置換した五種類の変異体を作製した (図 1b)。さらに各種変異を持つ CAP-H を昆虫細胞発現系においてコンデンシン I の他のサブユニットと共発現することにより、五種類の変異型複合体の再構成に成功した。得られた変異型複合体を内在性のコンデンシンを除去したカエル卵抽出液中に添加し、機能検定をおこなったところ、特に二つの変異体 (III-6Q および IV-5Q) において明らかな染色体形成異常が観察されることがわかり、以下主にこの二つに焦点を絞って解析を進めた。

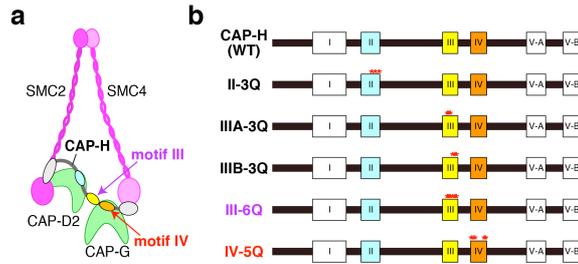


図 1 コンデンシン I のサブユニット構成 (a) と kleisin サブユニット CAP-H (WT: 野生型) のドメイン構造および五種類の変異体 (b)

(2) コンデンシン I の作用における CAP-H の保存された中央領域 (モチーフ III) の機能的貢献の解明

(1) で作製した五種類の変異型複合体のうち、モチーフ III と呼ばれる領域の芳香族アミノ酸をグルタミン (Q) 残基に置換した変異型複合体 (III-6Q) は、野生型複合体 (WT) が誘導するような分裂期特異的な染色体凝縮を引き起こすことができず、極めて特徴的な染色体構造異常を示した。III-6Q 複合体は、基質となるカエル精子核に結合するが、染色体の軸様の構造が絡まり合っ一本一本の染色体が分離できず、バナナ様の形態異常を引き起こす (図 2 左)。この形態異常は、これまでで作られた各種変異体でも見られなかった全く新しいタイプの欠損表現型であった。興味深いことに、カエル精子核の代わりにマウス由来の精子核 (Shintomi et al 2017 Science 356:1284) を基質にした場合には、III-6Q 複合体ではより正常に近い染色体軸の形成が観察されることがわかった (図 2 中央)。マウス精子核ではカエル精子核に比べて DNA 間の絡まり合いが元々弱いために、こうした表現型の違いが現れるのではないかと推測された。この結果は、基質として用いる精子核 DNA の絡み合いの程度が最終表現型に多大な影響を及ぼす可能性を示唆している。そこで、基質 DNA の絡み合いとの関係をさらに調べる目的で、カエル卵抽出液からトポイソメラーゼ II を免疫除去し、精子核 DNA の絡み合いが解けない環境を強制的に作り出し、そこでの III-6Q 複合体の染色体形成能を調べた。トポイソメラーゼ II 非存在下では、マウス精子核 DNA の絡み合いを解くことができないため、野生型複合体を加えた抽出液においても染色体を個別化することができない (図 2 右上)。しかし、III-6Q 複合体を加えた抽出液では絡み合った DNA がさらにコンパクトになり「豆 (bean)」状の構造を取ることが観察された (図 2 右下)。このとき、III-6Q 複合体は DNA 基質の中心 (コア) 領域へと集積していた。この観察から、コンデンシン I が染色体上で自己集合する特性を有しており、III-6Q ではこの能力が異常に強化されている可能性が示唆された。「豆」表現型が変性したタンパク質のランダムな凝集によって引き起こされる可能性を否定するため、SMC 二量体の ATP 結合部位に変異を導入した III-6Q 複合体を新たに作製し、機能アッセイ系に導入し検定した結果、「豆 (bean)」表現型は SMC 二量体の ATP の加水分解サイクルに依存していることが示された。

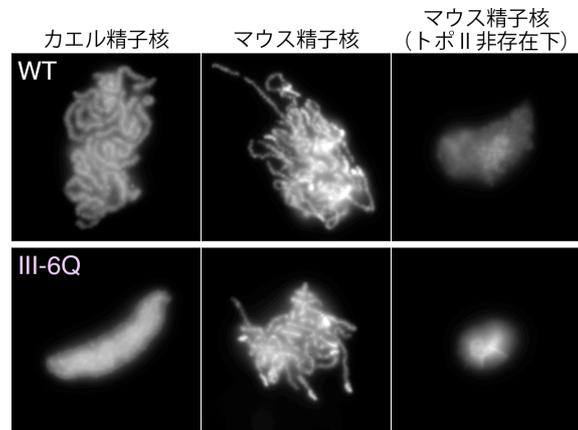


図 2 内在性コンデンシンを除去したカエル卵抽出液に野生型 (WT: 上段) と III-6Q 変異型 (下段) ホロ複合体を添加した場合の染色体構造の比較 (DAPI 染色像)。左はカエル精子核、中央と右がマウス精子核を基質として用いている。右ではトポイソメラーゼ II (トポ II) を免疫除去している。

以上の結果から、CAP-H のモチーフ III はこれまで明らかにされていなかったコンデンシン I の ATPase 依存性の染色体上での自己集合能の制御に関与することが示唆された。この自己集合能は基質 DNA の絡み合いの程度とのバランスが重要であり、III-6Q 変異ではそのバランス制御が崩れているのではないかと考えられる。

(3) HEAT サブユニット CAP-G との相互作用に必須な CAP-H の領域 (モチーフ IV) の同定と役割の解明

本研究において注目したもう一方の CAP-H 変異は、前述のモチーフ III 近傍のカルボキシル末端側にあるモチーフ IV と名付けた領域の保存された芳香族アミノ酸をグルタミン (Q) 置換した IV-5Q 変異体である。IV-5Q 変異を持つ CAP-H サブユニットを他の四つのコンデンシン I のサブユニットと同時に共発現し (図 3a)、野生型と同様に SMC4 サブユニットに付加してある GST タグを用いて精製を行うと、IV-5Q 変異体では HEAT サブユニットの一つ CAP-G が複合体中からほとんど検出されなくなることがわかった (図 3b)。IV-5Q 変異型複合体をカエル卵抽出液中に添加し、染色体形成能を調べたところ、クロマチンが特徴的な細い染色体軸構造を中心に大きく広がった不完全な染色体が形成された。この IV-5Q 変異型複合体で観察される染色体形成の欠損表現型は、CAP-G サブユニットを欠失させて再構成した ΔG 四量体サブ複合体を添加した場合の表現型とほぼ同じであった (図 4)。 ΔG サブ複合体に IV-5Q 変異を導入しても欠損表現型はほとんど変化しないことも同様の実験において確認された。以上の結果から、CAP-H のモチーフ IV は、HEAT サブユニット CAP-G との相互作用に重要なドメインであり、この両者の相互作用がコンデンシン I の染色体形成能に必須であることが示された (Hara et al 2019 EMBO Reports 20:e47183)。

さらにここで重要なのが、IV-5Q 変異型複合体でも、 ΔG サブ複合体でも、不完全ではあるものの染色体の軸構造がある程度形成されるという観察である (図 4 参照)。この観察結果は、他の研究グループによる「CAP-G と CAP-H の相互作用領域がシートベルト様の構造を形成し、コンデンシン I の DNA 上への loading に必須である」という結果 (Kschonsak et al 2017 Cell 171:588) と一見矛盾している。我々の結果は、この相互作用領域 (シートベルト様構造を含む) によるメカニズム以外にも、コンデンシン I が DNA およびクロマチン上に loading されるメカニズムがあることを示唆している。別のグループの報告によると、酵母のコンデンシンは loop extrusion 活性 (DNA ループを捕捉し、それを「押し出す」ことによってループを拡大する活性) を有しており (Ganji et al 2018 Science 360:102)、その活性は前述の CAP-G と CAP-H の相互作用領域にある DNA 結合部位に依存するらしい (Kschonsak et al 2017 Cell 171:588)。また我々自身の数理モデリングとシミュレーション解析から、コンデンシン間の相互作用が染色体の形成と分離を促進することが示されている (Sakai et al 2018 PLoS Comput Biol 14:e1006152)。すなわち、CAP-G/CAP-H 依存性の loop extrusion 以外のメカニズムの存在が示唆されており、我々はその一つの有力な候補として、(2)で見出したコンデンシン I の自己集合活性を考えている。潜在的なコンデンシン

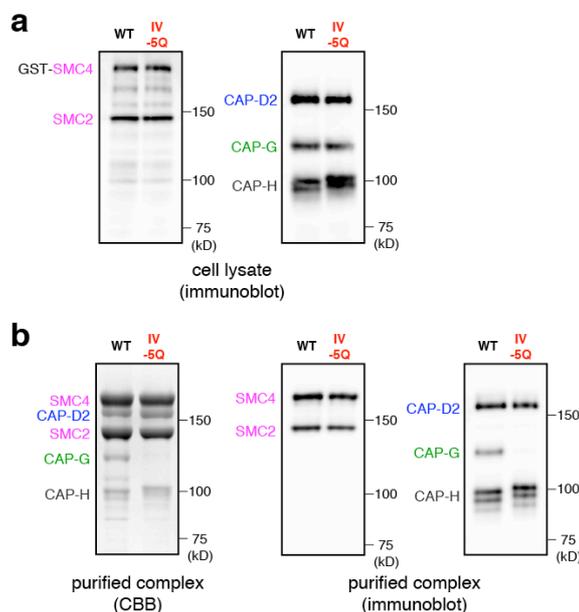


図 3 CAP-H のモチーフ IV は HEAT サブユニット CAP-G との物理的相互作用に必要である。(a) 各サブユニットを発現させた昆虫細胞の lysate に対する免疫プロット。(b) 上記 a の昆虫細胞の lysate から GST タグを用いて精製した複合体の CBB 染色 (左) と免疫プロット。

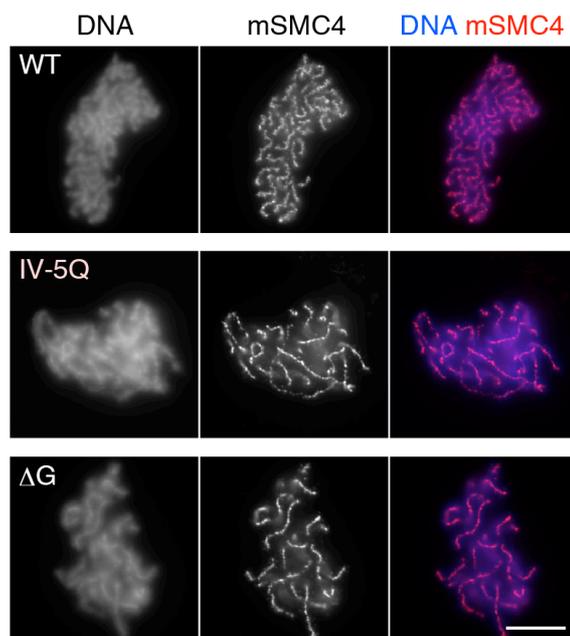


図 4 IV-5Q 変異型複合体は不完全な染色体軸構造を持つ異常な染色体を形成する。カエル卵抽出液に野生型ホロ複合体 (WT: 上段)、IV-5Q 変異型複合体 (中段)、 ΔG サブ複合体 (下段) を添加した場合の染色体構造の比較。DAPI 染色 (左)、mSMC4 抗体による免疫染色 (中央)、両者の重ね合わせ像 (右)。バーは 10 μ m。

間の相互作用によるコンデンシン I の自己集合と、基質 DNA の絡み合いの程度のバランスに加えて、loop extrusion のようなクロマチンの loop を作る活性の三つが統合的に制御されることによって、複雑な染色体構築のプロセスが可能になると予想される。本研究によって得られた知見から我々は染色体構築を三つの素過程に分子解剖するモデルを提唱し、その各素過程と三者の統合のメカニズムの理解をさらに深めることによって、染色体構築の全貌の解明を目指したいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Hara, K., Kinoshita, K., Migita, T., Murakami, K., Shimizu, K., Takeuchi, K., Hirano, T. & Hashimoto, H. Structural basis of HEAT-kleisin interactions in the human condensin I subcomplex. *EMBO Reports* (査読有) 20 巻 2019 年 e47183
DOI: 10.15252/embr.201847183
- ② 木下和久 コンデンシンによる分裂期染色体構築の分子メカニズム
実験医学 (査読無) 36 巻 2018 年 pp.2956-2963
- ③ Sakai, Y., Mochizuki, A., Kinoshita, K., Hirano, T. & Tachikawa, M. Modeling the functions of condensin in chromosome shaping and segregation. *PLoS Computational Biology* (査読有) 14 巻 2018 年 e1006152
DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006152
- ④ Kinoshita, K. & Hirano, T. Dynamic organization of mitotic chromosomes. *Current Opinion in Cell Biology* (査読有) 46 巻 2017 年 pp.46-53
DOI: 10.1016/j.ceb.2017.01.006
- ⑤ 木下和久、平野達也 コンデンシン I による染色体の軸構造の形成機構
ライフサイエンス 新着論文レビュー (査読無) 2015 年
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/10028>
DOI: 10.7875/first.author.2015.047
- ⑥ Kinoshita, K., Kobayashi, T. J. & Hirano, T. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. *Developmental Cell* (査読有) 33 巻 2015 年 pp.94-106
DOI: 10.1016/j.devcel.2015.01.034

[学会発表] (計 9 件)

- ① 木下和久. コンデンシン I の kleisin サブユニット CAP-H による染色体軸形成の制御機構. 第 91 回日本生化学会大会 シンポジウム「新しい染色体生物学を切り拓く最先端のアプローチ」. 2018 年
- ② Kinoshita, K. Regulation of dynamic assembly of chromosome axes by the kleisin subunit of condensin I. EMBO/EMBL Symposium on “Principles of Chromosome Structure and Function”. 2018 年
- ③ Kinoshita, K. Functional contribution of the kleisin subunit of condensin I to dynamic assembly of chromosome axes. The 2nd international meeting on SMC proteins - Chromosomal organizers from bacteria to human. 2017 年
- ④ Kinoshita, K. Functional contribution of the kleisin subunit of condensin I to dynamic assembly of chromosome axes. Gordon Research Conference - Chromosome Dynamics. 2017 年
- ⑤ Kinoshita, K. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. International Symposium on “Chromosome Orchestration System”. 2016 年
- ⑥ Kinoshita, K. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム. 2016 年
- ⑦ Kinoshita, K. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. NIG International Symposium 2016 Japan Q-BIO WEEK. 2016 年
- ⑧ Kinoshita, K. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015) ワークショップ「ヘリカルリピートタンパク質の構造特性と細胞内機能」. 2015 年
- ⑨ Kinoshita, K. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. EMBO workshop on “SMC proteins: chromosomal organizers from bacteria to humans”. 2015 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。