

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14455

研究課題名(和文)クロマチン基質に対するコンデンシンの機能解析

研究課題名(英文)Functional analyses of condensins on chromatin templates

研究代表者

平野 達也(Hirano, Tatsuya)

国立研究開発法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・主任研究員

研究者番号：50212171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、2つのコンデンシン複合体がクロマチン基質とどのように相互作用しそのコンフォメーションを変化させるかという問題を理解することにあった。カエル卵抽出液中で形成される「ミニ染色体」をビーズ上あるいは溶液中に回収する実験系を確立し、ミニ染色体上でのコンデンシンの挙動を調べた。その結果、コンデンシンIIのミニ染色体への結合はヌクレオソーム形成効率と拮抗関係にあるという知見を得た。コンデンシンIにはそのような性質は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Two multiprotein complexes, condensins I and II, are central to mitotic chromosome assembly. The current project was aimed at understanding how condensins interact with chromatin templates and induce their conformational changes. To this end, we established protocols for isolating “mini-chromosomes” assembled in *Xenopus* egg cell-free extracts, either on beads or in solution, and then analyzes the behavior of condensins on those mini-chromosomes. We found that binding of condensin II to mini-chromosomes competes with nucleosome assembly. Such a property was not observed for condensin I.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体 クロマチン ヌクレオソーム コンデンシン

1. 研究開始当初の背景

コンデンシン複合体は、分裂期染色体の構築と分離において中心的な役割を果たす。研究代表者・平野は、1997年にはこの複合体を世界にさきがけて発見 (Hirano et al, 1997, Cell) して以来、その生化学的・細胞生物学的解析において世界をリードしてきた (Hirano, 2012, G&D に総説)。特に、その分子メカニズムについては、カエル卵抽出液から精製したコンデンシンが ATP 加水分解に依存して DNA に正の超らせんを導入する (Kimura and Hirano, 1997, Cell; Kimura et al, 1999, Cell) ことを見だし、染色体ダイナミクスの分野に新たな視点をもたらした。さらに、単一 DNA 分子操作技術 (Strick et al, 2004, Curr. Biol.) や特殊な原子顕微鏡技術 (Bazett-Jones et al, 2002, Mol. Cell) を適用してその活性の理解を深めるとともに、組換えサブユニットを用いたコンデンシンの再構成にも成功している (Onn et al, 2007, EMBO J; Kinoshita et al, 2015 Dev. Cell)。しかし、これまでのすべての機能解析は裸の DNA を基質としたものであり、コンデンシンがいかにしてクロマチン基質と相互作用するかという問題についての理解は決定的に欠けていた。この問題は、研究代表者のグループに限らず、分野全体に残された大きな課題の一つであった。

2. 研究の目的

本研究計画の目標は、コンデンシンがクロマチン基質とどのように結合し、そのコンフォメーションを変化させるのかを理解することにあった。そのためには、生化学的解析に利用してきた裸の DNA 基質と形態学的解析に利用してきた精子核基質とは異なる、操作性に優れたクロマチン基質を調整し、コンデンシンとの相互作用を調べる必要があった。

3. 研究の方法

(1) カエル卵抽出液で形成されるミニ染色体を用いた解析

ビオチン標識した 2 重鎖環状 DNA をカ

エル卵抽出液とインキュベートし、ヌクレオソーム及び他のタンパク質が結合した「ミニ染色体」を構築する。これをストレプトアビジンビーズ上に回収する。長さの異なる DNA やヌクレオソームを作りにくい配列を持つ DNA を導入し、それぞれのミニ染色体上でのコンデンシンの挙動を精査する。

(2) 精製したミニ染色体を用いた解析

ビオチン標識していない 2 重鎖環状 DNA をカエル卵抽出液とインキュベートして形成されるミニ染色体をショ糖勾配遠心によって溶液中に単離して、コンデンシンの挙動を解析する。また、内在性のコンデンシンを除去した抽出液中で構築したミニ染色体を単離し、ここに精製したコンデンシンを加えてその挙動を調べる。

4. 研究成果

(1) カエル卵抽出液で形成されるミニ染色体を用いた解析

平成 27 年度は、ビオチン標識した 2 重鎖環状 DNA をカエル卵抽出液とインキュベートしてミニ染色体を構築し、これをストレプトアビジンビーズに回収してタンパク組成を解析する実験系を確立した。このミニ染色体に回収されるタンパク質の種類は精子核を基質として形成される染色体に回収されるタンパク質の種類とよく一致していた。主要な構成因子として、トポイソメラーゼ II、コンデンシン I、ISWI 李モデラー、リンカーヒストン、コアヒストンが含まれていた。このことは、ミニ染色体が分裂期染色体構築を研究する上で大変優れたモデル系をなりうることを示唆した。

平成 28 年度は、異なる長さの 3 種の環状 DNA (5.2 kb, 9.7 kb, 25 kb) 上に形成されるミニ染色体を比較した。この実験では、コンデンシンがより長いクロマチン繊維に対してよく働くのではないかという可能性を問いたかったのである。実験の結果、単位長あたりに回収されるコンデンシン I の量は異なる長さの基質の間で大きく変わらなかった。これに対して、コンデンシン II は

長いミニ染色体により高密度で回収されていた。しかし、同時に長い DNA 上ではヌクレオソームの形成効率（すなわち単位長あたりのヒストンの回収効率）が低減していることに気がついた。すなわち、コンデンシン II の高い回収率は、単にミニ染色体の長さに依存するのではなく、むしろコンデンシン II の DNA への結合がヌクレオソーム形成と拮抗関係にあることを示唆していた。

以上の知見は大変興味深いものであったが、同時にこの実験系に大きな改良の余地が残っていることを示唆していた。例えば上記の実験では、長さの異なる基質の間で同じ密度のヌクレオソーム形成が起こっていれば、結果の解釈はより容易になるはずである。では、カエル卵抽出液ではなぜ長い DNA 上でヌクレオソーム形成効率が低減しているのか？残念ながらこの問題に対する回答は未だに得られていない。一方、精製したヒストンと裸の DNA から塩透析法によってヌクレオソームを調整し、それをカエル卵抽出液に加えるという実験系も原理的には考えられる。しかし、この場合も異なる長さの DNA 上に等間隔でヌクレオソームを置くことは必ずしも簡単でないことが知られている。操作性の高い、優良なクロマチン基質を調整するためにはさらなる技術的挑戦が必要であろう。

(2) 精製したミニ染色体を用いた解析

平成 27 年度は、カエル卵抽出液中でミニ染色体を構築し、その反応液からショ糖勾配遠心を通してミニ染色体を溶液中に回収する方法を確立した。次に内在性のコンデンシンを除去した卵抽出液を用いて同様の操作を繰り返し、コンデンシンを持たないミニ染色体を調整した。沈降係数や DNA のトポロジーの視点から両者を比較したが、期待に反して大きな特徴の違いを見出すことはできなかった。一因として、コンデンシンとミニ染色体間の相互作用は必ずしも安定ではなく、ショ糖勾配遠心中にその一部が解離してしまう可能性が考えられた。

平成 28 年度は、内在性のコンデンシンを

除去した卵抽出液中で調整した「コンデンシンを持たない」ミニ染色体に焦点を合わせて解析を進めた。このコンデンシンを持たないミニ染色体と、別途カエル卵抽出液から精製したコンデンシン I とインキュベートすることにより、両者の相互作用を解析した。これまでの実験から、裸の DNA と精製コンデンシン I 間の相互作用には ATP 依存性が見られないのに対し (Kimura and Hirano, 1997, Cell; Strick et al, 2004 Curr Biol)、精子核から形成された染色体と組換え型コンデンシン間の相互作用には明確な ATP 依存性が観察されていた (Kinoshita et al, 2015, Dev. Cell)。本研究計画の目標の一つは、上記の異なる基質のギャップを埋めるものとしてミニ染色体を位置付けようとするものであった。単離したミニ染色体と精製コンデンシン I 間の相互作用に ATP 依存性を見出すことを期待しての計画であったが、残念ながらそうした性質を再現性よく検出することはできなかった。一つの理由として、ミニ染色体には十分な密度を持つヌクレオソームアレイが形成されていないことが考えられた。また、両者の相互作用を検出するための手法にも改良の余地があると考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/chromdyna/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 達也 (HIRANO, Tatsuya)

国立研究開発法人理化学研究所・平野染
色体ダイナミクス研究室・主任研究員

研究者番号：50212171