

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07399

研究課題名(和文) Ki67抗原が分裂期染色体構築に寄与する分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms on which Ki-67 contributes to the organization of mitotic chromosomes

研究代表者

高木 昌俊 (Takagi, Masatoshi)

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：60324779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：分裂期の染色体形成におけるKi67抗原とコンデンシン複合体の機能的関係性を調べるために、Ki67抗原とコンデンシン複合体のサブユニットを条件的に分解除去できるヒト培養細胞株を樹立して種々の観察を行った。Ki67抗原とSMC2(コンデンシン複合体のコアサブユニット)の両方を同時に分解除去すると、スレッド状の構造が見られないボール状の染色体クラスターが観察された。このような深刻な染色体形態異常は、Ki67抗原とSMC2のどちらか一方のみを分解除去した際には観察されなかった。以上により、Ki67抗原とコンデンシン複合体は、それぞれが独立した機構で分裂期染色体構造を支持していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「分裂期染色体がどのような機構で構築されるか」は、古くから細胞生物学の重要課題の一つであるが未だ十分に解明されていない。従来はコンデンシン複合体を中心に解析が進められてきたが、そこに本研究で注目するKi67抗原の解析を融合することで、課題解明に向けた新たな展開が期待される。本研究成果はKi67抗原とコンデンシン複合体の機能的関係性についての基礎的な知見を多く含むものであり、今後の研究の礎になるという点で学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：To examine the respective roles of Ki-67 and condensins in mitotic chromosome assembly, we generated a set of HCT116-based cell lines expressing Ki-67 and/or condensin subunits that were fused with an auxin-inducible degron for their conditional degradation. Both the localization and the dynamic behavior of Ki-67 on mitotic chromosomes were not largely affected upon depletion of condensin subunits, and vice versa. When both Ki-67 and SMC2 (a core subunit of condensins) were depleted, ball-like chromosome clusters with no sign of discernible thread-like structures were observed. This severe defective phenotype was distinct from that observed in cells depleted of either Ki-67 or SMC2 alone. Our results show that Ki-67 and condensins, which localize to the external surface and the central axis of mitotic chromosomes, respectively, have independent yet cooperative functions in supporting the structural integrity of mitotic chromosomes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分裂期染色体 Ki-67抗原 コンデンシン

1. 研究開始当初の背景

(1) 増殖する細胞は、細胞分裂の際に染色体の高次構造を劇的に変換し、高度に凝縮した分裂期染色体を構築する。この過程にコンデンシン複合体や II 型トポイソメラーゼ α (TopoII α) が重要な貢献をすることが古くから知られているが、無論これらの因子のみでこの過程は達成されない。最近、これらの因子を含む 5 種類の因子を用いることで分裂期染色体様の構造を試験管内で再構成できることが示された (Shintomi ら、2015) が、細胞内で構築される分裂期染色体の構造とは乖離があり、未同定の関与因子があることは疑いない。

(2) Ki67 抗原は分裂期染色体の表層領域 (PCL: perichromosomal layer) の主成分であり、また細胞増殖マーカーとして汎用されている因子である。申請者は、有袋類およびアフリカツメガエル Ki67 抗原の同定 (Takagi ら、1999) を端緒に、Ki67 抗原および PCL の機能解析に取り組み、PCL が「特定因子 (モータータンパク質、脱リン酸化酵素、アセチル基転移酵素など) を特定のタイミングで染色体上に蓄積させるための場」として機能することを示した (Vanneste, Takagi ら、2009; Takagi ら、2014; Booth, Takagi ら、2014)。また申請者はごく最近、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム改変により内在性 Ki67 抗原にオーキシン誘導性デグロン (auxin-inducible degra: AID) を付し、オーキシン添加により短時間で Ki67 抗原を分解除去できるヒト培養細胞株の樹立に成功した (遺伝研・鐘巻将人博士との共同研究)。この細胞を利用して、Ki67 抗原が分裂期染色体の構築や維持に寄与することを明瞭に示した (Takagi ら、2016)。コンデンシン複合体が染色体の芯部に局在するのに対して、Ki67 抗原は染色体を包みこむように局在するので、両者は異なるメカニズムで染色体構築に寄与していると予想される。従来のコンデンシン複合体を中心とした解析に Ki67 抗原の解析を加えることで、分裂期染色体構築の原理に新たな視点から迫れるであろうと予想された。

2. 研究の目的

細胞が分裂期染色体を構築する過程の詳細はいまだ明らかにされていない。申請者は研究開始に先立って、分裂期染色体の表層に局在する因子 (Ki67 抗原) が同過程に貢献していることを報告した。コンデンシン複合体などが染色体構造を内側から支持するのに対し、Ki67 抗原は染色体構造を外側から支持すると考えられた。本研究では「Ki67 抗原が分裂期染色体構造を支持する分子機構」を明らかにしようとした。また「分裂期染色体の表層領域」の性状を分析し、その形成機構の理解を目指した。「特定のゲノム領域が常に染色体の表面に露出している可能性」についても初めて検討した。これまでに重要性が見過ごされてきた Ki67 抗原の解析を通じて、分裂期染色体構築過程の背後にある原理や分子機構をより深く理解することを目的とした。

3. 研究の方法

Ki67 抗原の分裂期染色体構築における役割、およびコンデンシン複合体や TopoII α との機能的関係性について、新しい細胞工学的手法 (CRISPR/Cas9 を利用した蛍光タンパク質のノックインや、オーキシン誘導性デグロンを用いて標的タンパク質を短時間のうちに分解する手法など) を駆使して解析した。また分裂期染色体形態の差異を客観的に評価するために、機械学習を利用した画像情報解析 (wndchrn 解析) を導入した。顕微鏡観察を中心とした細胞生物学的手法に重心を置いたが、Ki67 抗原が染色体表層へと局在する分子機構の解析については生化学的手法も大きく取り入れた。

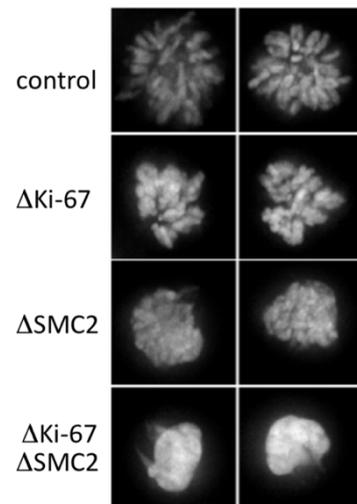
4. 研究成果

(1) 染色体研究に有用な細胞株の樹立

本研究に先立ち、オーキシン添加により短時間で Ki67 抗原を分解除去できるヒト培養細胞株の樹立に成功していた（遺伝研・鐘巻将人博士との共同研究）。本研究ではコンデンシン複合体の構成要素（CAP-H や CAP-H2）や TopoII α などを分解標的とした細胞株を樹立した。さらには個々の因子だけではなく、二因子を同時に分解標的とする細胞株も樹立した。これらの細胞株は本研究の遂行に寄与したばかりでなく、これまでに国内外 15 以上の研究室で使用されており、多くの研究者にとって新知見を生み出す重要なツールとなっている。また同時に多数の新規共同研究のシードにもなった。

(2) Ki67 抗原とコンデンシン複合体の機能的関係性の理解

Ki67 抗原を分解除去したところ、コンデンシン複合体の構成要素の局在（染色体の芯部への局在）に大きな乱れは生じなかった。また逆にコンデンシン複合体の構成要素を分解除去しても、Ki67 抗原の局在（染色体表層への局在）に大きな乱れは生じなかった。両者は独立の機構で染色体上に局在するものと考えられた。続いて個々の因子（Ki67 抗原または SMC2）、または両因子（Ki67 抗原と SMC2）を分解除去した時の分裂期染色体を比較観察したところ、それぞれが異なる形態異常を示した（右図）。形態の差異は直観的に認識されるだけでなく、機械学習を利用した画像情報解析（wndchrm 解析）によって客観的にも示された。両因子を除去すると、染色体同士がひと塊りになり、個々の染色体の形や境界を識別できない（右図の最下段）。これは個々の因子の除去では決して観察されない染色体形態であることから、両因子は異なる機構で分裂期染色体構造を支持していると結論された。以上の成果は 2018 年に JCS 誌上で論文発表された。



(3) Ki67 抗原と TopoII α を含むタンパク質複合体（KiTop 複合体）の細胞内局在

Ki67 抗原と TopoII α の分裂期特異的相互作用を以前に生化学的手法により示した（Takagi ら、2016）。本研究においては、両者を含むタンパク質複合体（KiTop 複合体と呼ぶ）の局在を PLA 法（proximity ligation assay 法）により検出できることを明らかにした。また KiTop 複合体のタンパク質組成を解析するためのツール（内在性 TopoII α にタンパク質精製のタグをノックインした細胞株など）を調製した。後続研究（Ki67 抗原の作用機序を明らかにする研究）を展開するための重要な基礎になると期待する。

(4) Ki67 抗原が分裂期染色体表層領域（PCL）に局在化する分子機構

「Ki67 抗原が PCL に局在化するメカニズム」について新たなモデルを提出するに至った。すなわち「Ki67 抗原には液相分離（LLPS: liquid-liquid phase separation）活性があり、その活性に依存して分裂期染色体上に層状に集積する」というモデルである。また並行して「Ki67 抗原を含む PCL を生細胞において瞬時に除去し、また瞬時に再形成することができる実験系」を構築した。これを薬理的手法などと組み合わせることにより PCL 形成の素過程を分析することが可能となった。いずれも Ki67 抗原の作用機序を理解するための重要な手がかりになると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takagi Masatoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Generation of an antibody recognizing a set of acetylated proteins, including subunits of BAF complexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100720 ~ 100720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100720	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Masatoshi, Ono Takao, Natsume Toyoaki, Sakamoto Chiyomi, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko, Kanemaki Masato T., Hirano Tatsuya, Imamoto Naoko	4. 巻 131
2. 論文標題 Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 212092 ~ 212092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.212092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masatoshi Takagi
2. 発表標題 How Ki-67 functions to support the architecture of mitotic chromosomes
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposium: Principles of Chromosome Structure and Function (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木昌俊
2. 発表標題 Ki-67抗原が分裂期染色体構造を支持する分子機構
3. 学会等名 第36回染色体ワークショップ、第17回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takagi M, Ono T, Natsume T, Sakamoto C, Nakao M, Saitoh N, Kanemaki MT, Hirano T, Imamoto N
2. 発表標題 Ki-67 and condensins cooperates to support the architecture of mitotic chromosomes through distinct mechanisms
3. 学会等名 The 2nd meeting on SMC proteins (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高木昌俊、小野教夫、夏目豊彰、坂本智代美、中尾光善、斎藤典子、鐘巻将人、平野達也、今本尚子
2. 発表標題 Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms
3. 学会等名 第35回 染色体ワークショップ、第16回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------