

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15070

研究課題名（和文）コンデンシン の活性化におけるCDK1の役割

研究課題名（英文）Roles of CDK1 phosphorylation of condensin I in mitotic chromosome assembly

研究代表者

田根 将志（Tane, Shoji）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・特別研究員

研究者番号：40770516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、CDK1によるリン酸化がコンデンシン の機能をどのように制御しているのかについて明らかにしていくことを目的としている。脊椎動物間で保存された全てのSP / TP 部位を含む計20ヶ所の CDK1 リン酸化候補部位をアラニン変異に置換した組換えホロ複合体（20A 変異体）を作製し、その変異体が引き起こす染色体形態の異常について観察を行った。その結果、野生型に比べ 20A 変異体を用いて形成された染色体では若干の形態異常が観察されたものの、依然として染色体構造の形成が見られた。このことから今回調べた候補部位以外のリン酸化も染色体形成に関与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

CDK1依存的なコンデンシン I の活性調節については培養細胞や酵母を使った遺伝学的な解析においても報告されている。しかしこうした変異体を用いた *in vivo* での遺伝学的な解析では、染色体分離異常を介した細胞死が引き起こされるため、染色体の形態変化 の詳細を解析することが難しい。本研究で用いる組換えコンデンシン複合体とカエル卵抽出液とを組み合わせた方法は細胞死の問題を回避でき、かつ経時的に染色体構築のしくみについての知見を得ることができる。

研究成果の概要（英文）：It remained unknown which subunits of condensin I (and which sites of them) are phosphorylated and how phosphorylation of those individual sites regulates condensin I's functions. To address these questions, we expressed and purified a mutant holo-complex harboring alanine mutations in 20 the potential CDK1 phosphorylation sites (20A mutant), and examined their ability to assemble chromosomes by adding them back into a *Xenopus* egg extract depleted of endogenous condensin complexes. We found that the 20A mutant was still able to produce fibrous structures although their morphology was poorer than that supported by the wild type complex. Our data suggest that phosphorylation of additional CDK1 sites is required for complete assembly of mitotic chromosomes.

研究分野：染色体構築

キーワード：コンデンシン 染色体形成 CDK1 リン酸化制御 タンパク質修飾

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 1．研究開始当初の背景

コンデンシン複合体は真核生物に広く保存された 5 つのサブユニットからなり、それぞれのサブユニットが 100kDa を超える巨大なタンパク質マシンである。しかし、このタンパク質複合体が分裂期においてどのような制御を受けているのか、そしてそれぞれのサブユニットがどのようなメカニズムを通して染色体形成に貢献しているのか、という本質的な問題についての理解は遅れている。コンデンシン I 複合体は、分裂期の開始に必須なキナーゼである CDK1 によりリン酸化され活性化ことが所属研究室から発表された試験管内における染色体様構造の再構成系によって示された。

## 2．研究の目的

本研究の目的は、コンデンシン I の活性化に必須な CDK1 のリン酸化部位を同定し、それぞれの部位のリン酸化がコンデンシン I の機能や染色体上での挙動に与える影響を明らかにすることにある。

## 3．研究の方法

### (1) 組換えコンデンシン I 複合体の発現と精製

5 つのサブユニットを共発現させた昆虫細胞から細胞破碎液を調整し、野生型および変異型のホ口複合体を精製する。グルタチオンビーズ (SMC4 に GST が付加されたコンストラクトを使用) を用いた精製ステップに加え、陰イオンカラムを使用し、より純度の高いホ口複合体を調整した。

### (2) 組換えコンデンシン I 複合体とカエル卵抽出液を用いた染色体形成の機能解析

(1) で発現・精製されたコンデンシン I 複合体は、内在性コンデンシンを除いたカエル分裂期卵抽出液へ添加され、免疫染色にてその変異複合体が引き起こす染色体形態の異常について観察を行った。また M 期卵抽出液を用いた機能アッセイに加えて、CDK1 活性のきわめて低い間期卵抽出液に組換え cyclin B1-CDK1 複合体を添加する実験系も準備した。これにより、異なる cyclin B1-CDK1 活性の下でコンデンシン I が作り出す染色体形態の違いを観察することが可能となった。どちらのアッセイ系においても本研究においては、基質としてカエル精子クロマチンを用いている。

## 4．研究成果

### (1) 組換えコンデンシン I 変異複合体の精製

これまでに報告のあった CDK1 リン酸化部位に加えて脊椎動物間で保存されたリン酸化部位 (SP / TP 部位) を中心とした複数のアラニン置換変異複合体を、昆虫細胞を用いて作製した。野生型に加えて、計 20 か所の CDK1 リン酸化部位 (SP / TP 部位) を部位特異的にアラニン置換した変異複合体を精製した。

### (2) 組換えコンデンシン I 変異複合体の機能解析

脊椎動物間で保存された全ての SP / TP 部位を含む計 20 ヶ所の CDK1 リン酸化候補部位をアラニン変異に置換した組換えホ口複合体 (20A 変異体) を作製し、その変異体が引き起こす染色体形態の異常について観察を行った。その結果、M 期卵抽出液・間期卵抽出液に組換え cyclin B1-CDK1 複合体を添加する実験系どちらにおいても、野生型に比べ、20A 変異体を用いて形成された染色体ではコンデンシン I クロマチン上へにローディングがやや低下し、若干の形態異常が観察された。しかしながら、依然として染色体構造の形成が見られた。このことから今回調べた候補部位以外のリン酸化も染色体形成に関与していることが示唆された。今後、分裂期染色体形成におけるコンデンシンのリン酸化の詳細な機能制御を理解するために、さらに他の候補

部位にも対象を広げ詳細な解析を進めていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----