

平成21年5月28日現在

研究種目： 若手研究 (A)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18681032
 研究課題名 (和文) 染色体構造タンパク質の相互作用ネットワーク解析
 研究課題名 (英文) Interaction network analysis of chromosome structural proteins
 研究代表者 内山 進 (UCHIYAMA SUSUMU)
 大阪大学大学院工学研究科・助教
 研究者番号： 90335381

研究成果の概要：報告者らが行ったヒト染色体プロテオーム解析において染色体高次構造への関与が推定された BP74 をターゲットの一つとして研究を進め、免疫沈降法などにより相互作用タンパク質を網羅的に同定した。また、BP74 と相互作用することが分かった HP1 との相互作用パラメータを物理化学的手法により決定した。さらに、BP74 の立体構造決定と組換えヒト染色体タンパク質を用いた実験から、BP74 がクロマチン高次構造形成へと繋がるクロマトソーム構造形成を担っていることが判明した。本研究により染色体プロテオーム解析で同定された染色体を中心とする相互作用ネットワークを明らかとすることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	20,400,000	6,120,000	26,520,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：染色体、タンパク質、相互作用解析、プロテオーム解析、ネットワーク、高次構造、質量分析

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初以前の4年間、報告者らは染色体構造解明の第一歩として従来から未解明であった構成要素のカタログ化を行ってきた。染色体の単離手法の開発、タンパク質抽出、分離法の開発、および質量分析装置を用いた同定によりヒト染色体のプロテオーム解析を行ってきた。その結果200種類以上の染色体タンパク質の同定に成功した。更に、比較プロテオーム解析および局在解析を進め、染色体タンパク質を4グループに分類し

た染色体タンパク質4層モデルを新たに提唱した。この染色体プロテオーム解析から、染色体蛋白質の質量の大部分はヒストンによって占められており、その他の染色体蛋白質の存在量はヒストンの1/10にも満たないため、染色体構造はヒストンからなるクロマチン繊維を基本としているものの、30nmほどの太さのクロマチン繊維を更に折りたたみ高次構造形成へと導くようなタンパク質は存在しないことが明らかとなった。従来から高次構造への関与が指摘されていたトポイ

ソメラゼ II α やコンデンシンサブユニットも同定されたが、存在量から考えると幾つか想定される高次構造ブロックの中でもより高次の構造形成に関与する事が分かった。プロテオーム解析ではこうした従来から知られている染色体構造タンパク質 20 種類に加え、染色体構造に関与する可能性が高い新規タンパク質を 10 種類見いだした。これらの新規染色体タンパク質の染色体構造における役割を他の研究者と協力し、GFP 融合タンパク質の動態解析や RNAi 等の細胞生物学的手法により進めていた。

2. 研究の目的

高等真核生物において DNA は塩基性タンパク質であるヒストンと相互作用し、クロマチン繊維を形成する。ヒトの DNA は 2m にも及ぶがコンパクトに折りたたまれ間期では 20 μ m 程の核にうまく収納されている。そして、細胞分裂期にはクロマチン繊維は更に凝縮し数 μ m 程の分裂期染色体を形成する。染色体形成はゲノム情報を娘細胞に正確かつ均等に配分するために必須である。染色体が発見されてから既に 100 年以上が経過し、これまでに形態学的観点から幾つかの染色体モデルが提唱されているが、染色体の高次構造に関する情報は限られている。特に、染色体を構成タンパク質から解析した研究例は少なく、近年、ようやく染色体タンパク質の構成が報告者らにより明らかとなったばかりである。

本研究では以下に述べる方法により染色体タンパク質の相互作用ネットワーク解析を行う。染色体高次構造への関与が推定された 30 種類の染色体構造タンパク質をターゲットに絞り、免疫沈降法などの生化学的手法により各タンパク質の相互作用関係を定性的に理解する。更に染色体タンパク質同士の親和性、化学量論などの相互作用パラメータを物理化学的手法により定量的に解明する。また、組み換えヒト染色体タンパク質から再構築したヌクレオソームやクロマチンを用いて各タンパク質のクロマチン高次構造形成における役割を構造生物学的観点から解明する。研究期間の 3 年間で各染色体タンパク質の相互作用関係を把握し、細胞生物学的結果と併せることで染色体高次構造構築原理を解明する。

3. 研究の方法

(1) 塩処理を用いた特定の染色体タンパク質の同定

異なる塩濃度に単離した染色体をインキュベートとし、染色体の形態の変化を観察し、染色体構造が大きく変化する塩濃度を見出す。染色体構造が大きく変化する塩濃度で解離したタンパク質を質量分析を用いて網羅

的に解析し、構造変化に関与する可能性があるタンパク質を特定する。

(2) 特定の染色体タンパク質の免疫沈降による相互作用タンパク質の同定

塩処理により解離したタンパク質について 2 段階免疫沈降法 (TAP 法) を実現する発現系を構築し、相互作用タンパク質を質量分析を用いて同定する。

(3) 相互作用タンパク質との in vitro 相互作用解析

同定されたタンパク質同士の相互作用を解析するため、複数のタンパク質の大量発現・精製系を構築し、組換えタンパク質を準備する。得られたタンパク質について、報告者が多くの実績を持つ超遠心分析などの物理化学的手法を用いて染色体タンパク質間相互作用を定量的に解析する。

(4) BP74 の立体構造解析と染色体高次構造形成における役割の解明

BP74 のヒストン H1 ドメインについて NMR を用いて立体構造解析を行う。また、in vitro で再構築したヌクレオソームやクロマチンを用いて、標的とする染色体タンパク質の構造的役割を解明する。

(5) 相互作用タンパク質同士の in vivo ネットワーク解析

同定されたタンパク質と他の染色体タンパク質との関係を、RNAi 法条件での局在解析により解明する。これにより細胞内での染色体タンパク質同士のネットワークに関する情報が得られる。

以上より、染色体タンパク質間の相互作用および構造形成における機能的役割が解明する。

4. 研究成果

本研究の結果、以下が明らかとなった。

(1) 塩処理を用いた特定の染色体タンパク質の同定

0.4MNaCl 条件で染色体が膨化し、その際にリンカーヒストン H1 が染色体から解離することが判明した (図 1)。また、40 種類以上の染色体タンパク質が染色体から解離する

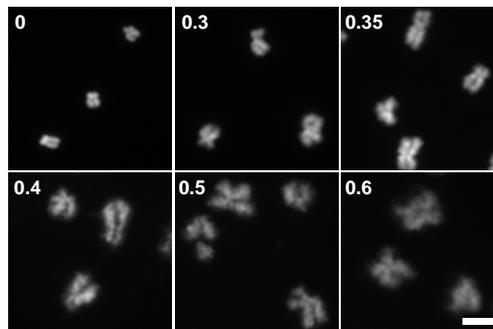


図 1 0.4MNaCl で染色体は膨化する

ことも分かった。プロテオーム解析の手法により、解離した 44 種類のタンパク質の網羅的同定に成功し (図 2)、その中に染色体タンパク質 BP74 が含まれていることが分かった。なお、BP74 は報告者らのプロテオーム解析により既に同定されており、ヒストン H1 様ドメインを持ち、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 と相互作用することが知られている。

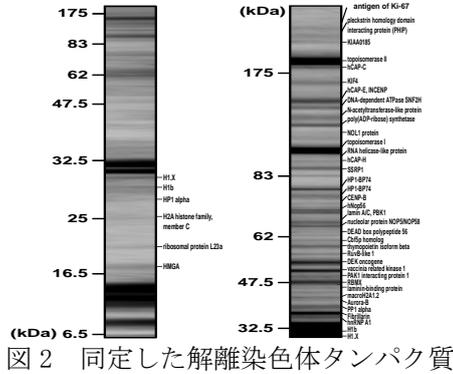


図 2 同定した解離染色体タンパク質

(2) 特定の染色体タンパク質の免疫沈降による相互作用タンパク質の同定
複数の染色体タンパク質について TAP 法を行い、それぞれの染色体タンパク質の相互作用パートナーの同定に成功した。本報告書では BP74 の TAP 法による解析結果を記載する。

プロテオーム解析の結果、20 種類の特異的相互作用タンパク質の同定に成功した (図 3)。同定したタンパク質にはヒストンバリエントやセントロメアに局在するタンパク質も含まれていた。

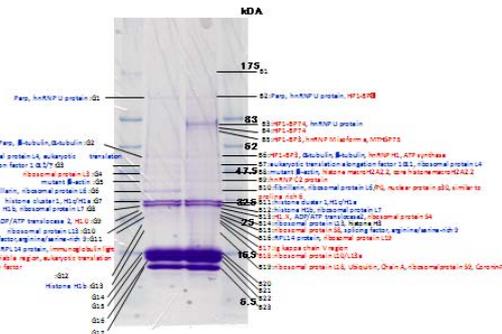


図 3 同定した BP74 相互作用タンパク質群

(3) 相互作用タンパク質との in vitro 相互作用解析
BP74 と相互作用するタンパク質として HP1 について解析を進めた。HP1 および BP74 の双方について大量発現・精製系を構築し、大量調製を行った。プルダウン法により、これらのタンパク質は直接相互作用しており、さらに変異体を用いた実験から HP1 のトリプトファン 174 が相互作用に中心的な役割を果たしていることが判明した。また、超遠心沈降平衡法による実験から両者の相互作用が確認さ

れ、平衡定数と化学量論を決定することにも成功した。

(4) BP74 の立体構造解析と染色体高次構造形成における役割の解明

BP74 の 15N, 13C ラベル体を用いて NMR により立体構造決定を行った (図 4)。決定した立体構造をトリヒストン H1 (H5) と比較すると骨格は類似しており、加えて αヘリックスが 1 本多く存在することが明らかとなった。

BP74 のクロマチン構造への寄与については、組換えヒトヒストンを用いて再構築したヌクレオソームと BP74 のゲル電気泳動アッセイにより BP74 はヌクレオソームに結合することが分かった。また、MNase 解析から BP74 は、ヌクレオソームより高次の構造であるクロマトソームストップ構造の形成に寄与している事が分かった。

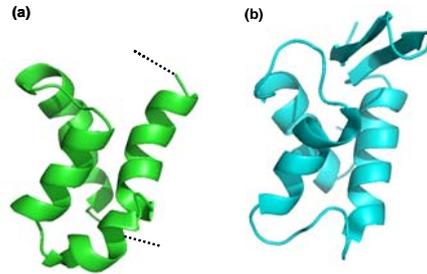


図 4 決定した BP74 の立体構造 (左) とトリヒストン H1 の立体構造 (右)

(5) 相互作用タンパク質同士の in vivo ネットワーク解析

BP74 の RNAi を行ったところ、細胞分裂期に異常が観察された。そこで、染色体分離に関わる複数のセントロメア・キネトコアタンパク質について抗体を用いた局在解析を試みた。HP1 についてはわずかに局在パターンの変化が観測されたものの、他のタンパク質については、特に大きな局在パターンの変化は観測されなかった。

以上の研究により、BP74 はリンカーヒストン H1 と同様にクロマチンの DNA リンカー部分に結合し、更に HP1 と相互作用することで、クロマチン高次構造構築のための相互作用ネットワークを形成していることを明らかにすることが出来た。本研究の結果は、クロマチン高次構造に複数のタンパク質が直接関与していることを構造および相互作用から解明した初めての例で、染色体構造形成に寄与するタンパク質同士のネットワーク解析に新たな道を開く成果である。

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 22 件)

- 1) Gambe, A. E., Matsunaga, S., Takata, H., Ono-Maniwa, R., Baba, A., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2009) A nucleolar protein RRS1 contributes to chromosome congression. *FEBS Letters*, *in press*.
- 2) Wada N., Kajiyama S., Akiyama Y., Kawakami S., No D., Uchiyama S., Otani M., Shimada T., Nose N., Suzuki G., Mukai Y. and Fukui K. (2009) Bioactive beads-mediated transformation of rice with large DNA fragment containing *Aegilops tauschii* genes. *Plant Cell Reports* in press.
- 3) Amin MA, Matsunaga S, Uchiyama S, Fukui K. (2008) Nucleophosmin is required for chromosome congression, proper mitotic spindle formation, and kinetochore-microtubule attachment in HeLa cells. *FEBS Lett.*, 582, 3839-44.
- 4) Hayashihara, K., Uchiyama, S., Kobayashi, S., Yanagisawa, M., Matsunaga, S., Fukui K. (2008) Isolation method for human metaphase chromosomes. *Nature Protocol Network* nprot.2008.166
- 5) Amin MA, Matsunaga S, Uchiyama S, Fukui K. (2008) Depletion of nucleophosmin leads to distortion of nucleolar and nuclear structures in HeLa cells. *Biochem J.* 415, 345-351,
- 6) Kurihara, D., Matsunaga, S., Uchiyama, S., Fukui, K. (2008) Live cell imaging reveals plant Aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol.* 49, 256-1261.
- 7) Fukui, K., Takata, H., and Uchiyama, S., (2008) Preparation Methods of Human Metaphase Chromosomes for their Proteome Analysis. *Methods Mol. Biol.* **432**, 149-160.
- 8) Cartagena, J.A., Matsunaga, S., Seki, M., Kurihara, D., Yokoyama, M., Shinozaki, K., Fujimoto, S., Azumi, Y., Uchiyama, S., Fukui, K. (2008) The Arabidopsis SDG4 contributes to the regulation of pollen tube growth by methylation of histone H3 lysines 4 and 36 in mature pollen. *Dev. Biol.* **315**, 355-368.
- 9) Nakagawa, M., Ohmido, N., Ishikawa, K., Uchiyama, S., Fukui, K., and Azuma, T. (2007) Anti-peptide antibodies for examining the conformation, molecular assembly, and localization of an intracellular protein, ribosomal protein S6, in vivo. *J. Biochemistry* **143**, 325-332.
- 10) Takata, H., Matsunaga, S., Morimoto, A., Ma, N., Kurihara, D., Maniwa-Ono, R., Nakagawa, M., Azuma, T., Uchiyama, S., Fukui, K. (2007) PHB2 protects sister chromatid cohesion in mitosis. *Current Biology* **17**, 1356-61..
- 11) Takata, H., Matsunaga, S., Morimoto, A., Maniwa-Ono, R., Uchiyama, S., Fukui, K. (2007) H1.X with different properties from other linker histones is required for mitotic progression. *FEBS Lett.* **581**, 3783-8.
- 12) Amin, M.A. Matsunaga, S., Ma, N., Takata, H., Yokoyama, M., Uchiyama, S., Fukui, K. (2007) Fibrillarin, a nucleolar protein is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 360, 320-6.
- 13) Higashi, T., Matsunaga, S., Isobe, K., Morimoto, A., Shimada, T., Kataoka, S., Watanabe, W., Uchiyama, S., Itoh, K., and Fukui, K. (2007) Histone H2A mobility is regulated by its tails and acetylation of core histone tails. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **357**, 627-632.
- 14) Fukui, K. and Uchiyama, S. (2007) Chromosome protein framework from proteome analysis of isolated human metaphase chromosomes. *Chemical Rec.* **7**, 230-7.
- 15) Ma, N., Matsunaga, S., Takata, H., Ono-Maniwa, R., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2007) Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J. Cell Sci.*, **120**, 2091-2105.
- 16) Kurihara, D., Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Fujimoto, S., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2007) Characterization of a splicing variant of plant Aurora kinase. *Plant Cell Physiol.* **48**, 369-374.
- 17) Gambe, A. G., Maniwa, R., Matsunaga, S., Kutsuna, N., Higaki, T., Higashi, T., Hasezawa, S., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2007) Development of a multistage classifier for a monitoring system of cell activity based on imaging of chromosomal dynamics. *Cytometry*, **71**, 286-296.
- 18) Takata, H., Uchiyama, S., Nakamura, N., Nakashima, S., Kobayashi, S., Sone, T., Kimura S., Lahmers, S., Granzier, H., Labeit, S., Matsunaga, S., and Fukui,

- K. (2007) A comparative proteome analysis of human metaphase chromosomes isolated from two different cell lines reveals a set of conserved chromosome-associated proteins. *Genes to Cells* **12**, 269-284.
- 19) Lin, L., Nakano, H., Nakamura, S., Uchiyama, S., Fujimoto, S., Matsunaga, S., Kobayashi, Y., Ohkubo, T., and Fukui, K. (2007) Crystal Structure of *Pyrococcus horikoshii* PPC Protein at 1.60 Å Resolution. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **67**, 505-507.
- 20) Engelhardt, P., Meriläinen, J., Zhao, F., Uchiyama, S., Fukui, K., and Lehto, V.-P. (2007) Whole-Mount Immuno-Electron Tomography (IET) of Chromosomes and Cells. *Methods in Molecular Biology* **369**, 387-405.
- 21) Kurihara, D., Matsunaga, S., Kawabe, A., Fujimoto, S., Noda, M., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2006) Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *Plant journal* **48**, 572-580.
- 22) Kobayashi, S., Uchiyama, S., Sone, T., Noda, M., Lin, L., Mizuno, H., Matsunaga, S., and Fukui, K. (2006) Calreticulin as a new histone binding protein in mitotic chromosomes. *Cytogenet. Genome Res* **115**, 10-15.
- [学会発表] (計 35 件)
- 1) 内山 進「Protein Composition of human metaphase chromosomes」、染色体学会年会、学会賞記念講演、2008年12月3日、大阪大学コンベンションセンター
- 2) 内山 進「ヒト染色体のプロテオーム解析」蛋白質科学会、若手奨励賞講演、2008年6月11日
- 3) 内山 進、林原加代子、小林昇平、高田英昭、松永幸大、福井希一；分裂中期ヒト染色体のプロテオーム解析、**分子生物学会、生化学会合同年会** (2007年12月12日) パシフィコ横浜
- 4) 内山進、林原加代子、高田英明、小林昇平、松永幸大、福井希一；構成タンパク質から見たヒト染色体、**染色体学会** (2007年11月27日)、総研大 (葉山)
- 5) Susumu Uchiyama, Shouhei Kobayashi, Hideaki Takata, Sachihito Matsunaga, and Kiichi Fukui. ;Proteome analyses of human metaphase chromosomes, **International Chromosome Conference** (August 28, 2007) RAI, Amsterdam
- 6) 内山進、小林昇平、高田英昭、石原武、林原加代子、曾根岳史、松永幸大、福井希一；ヒト染色体のプロテオーム解析、**染色体学会 2006年度(第57回)年会** (2006年11月24日) 千葉大学西千葉キャンパスけやき会館
- 7) 林原加代子、若松秀和、農大輔、小林昇平、内山進、松永幸大、福井希一；ヒト染色体の塩処理による新規染色体蛋白質の同定および局在解析、**染色体学会 2006年度(第57回)年会** (2006年11月24日) 千葉大学西千葉キャンパスけやき会館
- 8) 野田勝紀、島原秀登、楯真一、岩崎憲治、鷹岡昭夫、内山進、松永幸大、福井希一；ヒト組替えタンパク質を用いたクロマチン再構築、**染色体学会 2006年度(第57回)年会** (2006年11月24日) 千葉大学西千葉キャンパスけやき会館
- 9) 福井希一、松永幸大、内山進、真庭理香、馬場朋子；染色体関連タンパク質、特にRRSIのRNAiによる機能解析、**日本遺伝学会第78回大会** (2006年9月27日) つくば国際会議場
- 10) 森本晃弘、東恒仁、真庭理香、内山進、渡辺歴、松永幸大、伊東一良、福井希一；GEPを用いた染色体タンパク質の局在およびFRAP、**第58回日本生物工学会大会** (2006年9月12日) 大阪大学豊中キャンパス
- 11) 山川真理子、高田英昭、内山進、松永幸大、福井希一；RANI法を用いた分裂期におけるトポイソメラーゼIの機能分析、**第58回日本生物工学会大会** (2006年9月12日) 大阪大学豊中キャンパス
- 12) 若松秀和、農大輔、林原加代子、藤本聡、内山進、松永幸大、福井希一；塩処理法を用いたヒト染色体構造維持に関する染色体タンパク質の同定、**第58回日本生物工学会大会** (2006年9月11日) 大阪大学豊中キャンパス
- 13) Susumu Uchiyama, Shouhei Kobayashi, Hideaki Takata, Tsunehito Higashi, Kayoko Hayashihara, Shoko Nakashima, Takefumi Sone, Sachihito Matsunaga, Fukui Kiichi; Proteome analysis of human metaphase chromosomes, **20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology** (June 23, 2006) Kyoto International Conference Hall
- 14) Shoko Nakashima, Shuichi Miyakawa, Susumu Uchiyama, Sachihito Matsunaga, Kiichi Fukui; Interaction analysis of human condensin complex in interphase, **20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology**

- (June 23, 2006) Kyoto Interbational Conference Hall
- 15) Hideaki Takata, Naoko Nakamura, Shouhei Kobayashi, Susumu Uchiyama, Sachihito Matsunaga, Kiichi Fukui; Comparative proteome analysis of human metaphase chromosomes, **20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology** (June 23, 2006) Kyoto Interbational Conference Hall
 - 16) Linyen Lin, Sumire Inaga, Tetsuo Katsumoto, Tomonori Naguro, Susumu Uchiyama, Sachihito Matsunaga, Akio Takaoka, Kiichi Fukui; Morphological Changes in Human Chromosomes by Divalent Cations, **20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology** (June 23, 2006) Kyoto Interbational Conference Hall
 - 17) Nan Ma, Hideaki Takata, Susumu Uchiyama, Sachihito Matsunaga, Kiichi Fukui; Nucleolin functions in formation of nucleoli and chromosome congression, **20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology** (June 23, 2006) Kyoto Interbational Conference Hall
 - 18) 林麟晏、内山進、松永幸大、稲賀すみれ、勝本哲央、名黒知徳、鷹岡昭夫、福井希一；二価陽イオンマグネシウム濃度による染色体蛋白質局在の変化及び染色体高次構造の解析、**医学生物学電子顕微鏡技術学会第 22 回学術講演会および総会** (2006 年 5 月 13 日) クリエイト浜松
 - 19) 福井希一、林麟晏、内山進、松永幸大、稲賀すみれ、勝本哲央、名黒知徳、鷹岡昭夫；二価陽イオンマグネシウム濃度による染色体蛋白質局在の変化及び染色体高次構造の解析、**医学生物学電子顕微鏡技術学会第 22 回学術講演会および総会** (2006 年 5 月 12 日) クリエイト浜松
 - 20) 福井希一、松永幸大、内山進、真庭理香、中村直子；細胞周期を通じた β -actin 4 の局在と染色体分配に対する機能、**第 6 回タンパク質科学学会年会** (2006 年 4 月 25 日) 国立京都国際会館
 - 21) 高田英昭、中村直子、小林昇平、木村澄子、内山進、松永幸大、福井希一；比較プロテオームによるヒト分裂期染色体タンパク質のプロテオーム解析、**第 6 回タンパク質科学学会年会** (2006 年 4 月 24 日) 国立京都国際会館

他

[図書] (計 8 件)

- ① Fukui, K. and Uchiyama, S. (2007) Proteome analysis human metaphase chromosomes. Chromosome Nanoscience and Technology, CRC Press.
- ② Uchiyama, S., Tomoyuki, D. and Fukui, K. (2007) Isolation of human and plant chromosomes as nano-materials. Chromosome Nanoscience and Technology, CRC Press.
- ③ Inoue, T., Fujita, Y., Uchiyama, S., Doi, T., Fukui, K and Yokoyama, H. (2007) On-Chip Chromosome Sorter Using Electric and Magnetic Fields. Chromosome Nanoscience and Technology, CRC Press.
- ④ Nakagawa, M., Ohmido, N., Ishikawa, K., Uchiyama, S., Fukui, K., and Azuma, T. (2007) Anti-Peptide Antibodies for Examining the Conformation and Molecular Assembly of an Intracellular Protein. Chromosome Nanoscience and Technology, CRC Press.
- ⑤ Ohkubo, T., Petkova-Andonova, M., Kojima, Y., Nakamura, S., Fujita, H., Nishi, Y., Nakano, H., Uchiyama, S., Fukui, K., and Kobayashi, Y. (2007) Structure and Interactions of the Imitation SWI-Type Chromatin-Remodeling Complex, ATP-Dependent Chromatin-Assembly Factor. Chromosome Nanoscience and Technology, CRC Press.
- ⑥ Ohmido, N., Uchiyama, S., Matsunaga, S., Nakagawa, M., Azuma, T., and Fukui, T. (2007) Dynamic and Functional Analysis of Chromosomal Proteins. Chromosome Nanoscience and Technology, CRC Press.
- ⑦ 内山 進 (2006) 「植物染色体の単離法」121-122 頁 クロモソーム 養賢堂
- ⑧ 内山 進 (2006) 「植物染色体のソーティング法」214-215 頁 クロモソーム 養賢堂

[その他]

- ① ホームページ
<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/cl/>
- ② 2008 年 染色体学会賞受賞
- ③ 2008 年 蛋白質科学会若手奨励賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 進 (UCHIYAMA SUSUMU)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90335381