

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19870013

研究課題名（和文） アフリカツメガエル HP1 の姉妹染色体接着における機能

研究課題名（英文） Roles of *Xenopus* HP1 for sister chromatid cohesion

研究代表者

高橋 達郎（TAKAHASHI TATSURO）

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50452420

研究成果の概要：

正確な染色体分配には姉妹染色体の接着が必須である。接着はコヒーシン蛋白質が担っており、コヒーシンの染色体結合には *Sec2-Scc4* 複合体が必須である。我々はツメガエルを脊椎動物のモデル系として用い、ツメガエル *Sec2* が染色体の構造に重要な機能を持つ HP1 蛋白質と相互作用することを見いだした。この結果から、姉妹染色体の接着と染色体の機能構造は、HP1 を介して密接に関係すると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：染色体分配、姉妹染色体接着、ヘテロクロマチン、コヒーシン、HP1

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を次の世代に正確に伝えるには、複製された姉妹染色体のペアを正確に分配する必要がある。姉妹染色体を正確に同定し分配するため、DNA 複製後の姉妹染色体はコヒーシン複合体により接着されている。コヒーシンによる姉妹染色体の接着は DNA 複製と共役して成立し、M 期中期まで維持される。

コヒーシンの染色体結合には、*Sec2-Scc4* 複合体が必須である。従って *Sec2-Scc4* の染色体結合は、コヒーシンの染色体結合の位置とタイミングを決定する重要な要素で

あると考えられる。しかしながら一方で、*Sec2-Scc4* 複合体の染色体結合機構はほとんど分かっていなかった。本研究者はツメガエル卵抽出液をモデル系に用いて、ツメガエル *Sec2* とコヒーシンが、DNA 複製開始の初期段階に依存して染色体に結合することを発見していた。一方で、この時点ではどのような分子が直接 *Sec2-Scc4* の染色体結合と DNA 複製を結びつけているか分かっていなかった。また *Sec2-Scc4* が DNA 複製開始とは独立した機構で染色体に結合するかどうかについては全く分かっていなかった。

分裂期での染色体分配には、染色体のセントロメア領域が重要な機能を持つ。セントロメアには動原体が形成され、動原体に結合する微小管束が染色体を正しく整列させ両極に動かす原動力となる。セントロメアのクロマチンは密に凝集してヘテロクロマチン構造を取っており、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基はメチル化修飾を受けている。このメチル化リジン残基は、ヘテロクロマチンの形成・維持に重要な機能を持つ HP1 タンパク質の結合部位として機能する。セントロメアは微小管からの張力を受けるため、この張力に対抗するセントロメア領域の接着は染色体分配に重要であり、多細胞生物ではセントロメア領域のコヒーシンは分裂期に Shugoshin タンパク質による保護を受ける。また分裂酵母では HP1 タンパク質がセントロメア周辺領域へのコヒーシン結合に重要である。

興味深いことに、脊椎動物の Scc2 タンパク質には、よく保存された HP1 結合モチーフが存在する。しかしながら、分裂酵母以外の生物、特に脊椎動物では、セントロメアのヘテロクロマチンが、姉妹染色体の接着や正確な分配にどのように機能するかは分かっていなかった。従って、Scc2 と HP1 の機能的な関係を明らかにすることは、コヒーシン、Scc2-Scc4 の染色体結合機構の解明に重要な手がかりとなる可能性が期待されるだけでなく、脊椎動物でのセントロメア接着の制御機構の解明にも繋がる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

HP1 はセントロメア周辺のヘテロクロマチン形成に必須の機能を持つ蛋白質であり、HP1 結合モチーフと呼ばれる短いアミノ酸配列 (PXVXL:X は任意のアミノ酸) を持つ蛋白質と相互作用する。脊椎動物では HP1 には三つのアイソフォーム、 α 、 β および γ が存在し、それぞれがある程度重複した機能を持つと考えられている。三つのアイソフォームの存在は、HP1 の機能解析を複雑かつ困難にしている。分裂酵母では HP1 がセントロメア周辺の接着に必要であるが、脊椎動物では HP1 の染色体分配への寄与は明らかではなかった。一方脊椎動物 Scc2 には HP1 結合モチーフが存在することから、脊椎動物では Scc2 と HP1 に機能的な繋がりが予想された。本研究ではツメガエル卵抽出液をモデル系に用い、HP1 が Scc2-Scc4 の機能にどのように関わるかを解析した。

3. 研究の方法

脊椎動物の HP1 が Scc2-Scc4 の機能に果たす役割を解析するため、ツメガエル卵抽出液を用いた無細胞 DNA 複製反応系をモデル

系として利用した。ツメガエル卵の遠心分離により得られる細胞質画分に精子核 DNA を加えると、精子核の周囲に核膜が形成され、次いで DNA 複製や姉妹染色体接着が起こる。この系は試験管内で DNA 複製、姉妹染色体接着を再現する唯一の実験系である。この反応系は試験管内系であるため、抗体を用いた任意の蛋白質の除去や、薬剤あるいは蛋白質の添加が容易である。

HP1 には三つの機能的に重複するアイソフォームが存在するため、培養細胞での siRNA を用いた三者同時除去は非常に困難であった。ツメガエル卵抽出液では複数の抗体を用いて同時に複数の蛋白質を除去可能であることを利用し、本研究ではツメガエル卵抽出液中での HP1 の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) ツメガエル Scc2 と HP1 の直接相互作用
ツメガエル Scc2 は 2950 アミノ酸からなる巨大タンパク質であり、N 末から約 1200 アミノ酸の位置に HP1 結合モチーフを持つことから HP1 との相互作用が予想された。Scc2 と HP1 が相互作用するかどうか調べるため、組み換えタンパク質を用いた試験管内プルダウンアッセイを行った。結果、HP1 の各アイソフォームと Scc2 の間に相互作用が認められた。この相互作用は Scc2 の HP1 結合モ

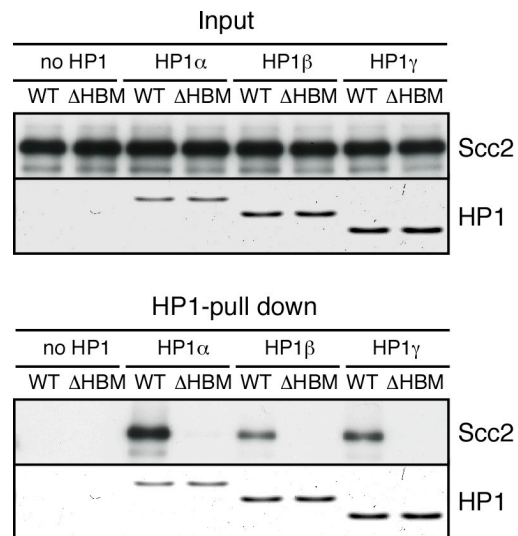


図 1 : ツメガエル HP1 と Scc2 の相互作用
組み換え HP1 α 、 β 、 γ 蛋白質と Scc2 断片との相互作用を試験管内 pull down を用いて解析した。Scc2 断片は HP1 結合モチーフ (HBM) に依存して HP1 蛋白質と相互作用を示した。

モチーフに依存していた。また相互作用は Scc2 と HP1 α の間で最も強く、HP1 β との間で最も弱かった。従って、ツメガエル Scc2 は HP1 結合モチーフを介して HP1 α 、 β 、 γ と直接相互作用し、特に HP1 α と強く結合すると考えられる。

(2) ツメガエル HP1 の染色体局在

クロマチン上での HP1 の挙動を調べるため、ツメガエル卵抽出液中で核を形成させ、HP1 α 、 β 、 γ に対する抗体を用いて核の免疫染色を行った。結果、HP1 α はクロマチン状にドット状の局在を示し、HP1 γ は染色体全域に局在を示した (図 1)。一方、HP1 β の染色体上での有意な局在は観察されなかった。ツメガエル卵抽出液中の各 HP1 アイソフォームの存在量を定量したところ、HP1 β の存在量は HP1 α 、 γ の 1/100 以下であった。従ってツメガエル初期胚では HP1 α 、 γ が相対的に多量に存在し、HP1 α は染色体上の特定領域に、HP1 γ は染色体全域にわたって局在すると推定される。

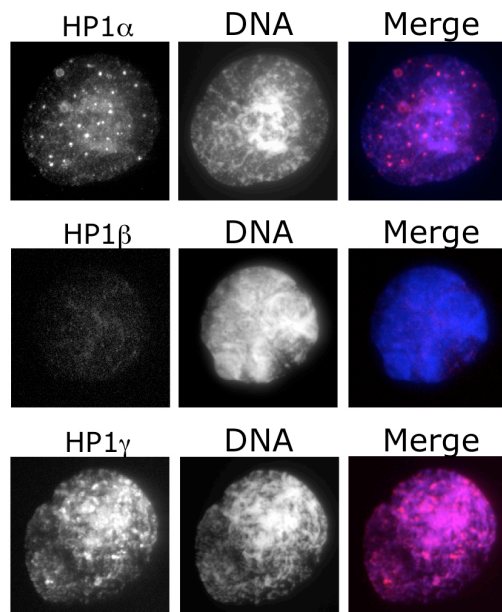


図 2 : ツメガエル HP1 の染色体局在

ツメガエル卵抽出液中で形成させた精子核を、抗 HP1 α 、 β 、 γ 抗体を用いて免疫染色した。HP1 α は染色体上でドット状の局在を示し、HP1 γ は染色体全域にわたって局在を示した。

(3) HP1 が Scc2 の染色体結合に果たす役割
HP1 はクロマチン結合タンパク質であるため、HP1 が Scc2 との相互作用を介して Scc2 の染色体結合に寄与する可能性が考えられた。この可能性を検証するため、ツメガエル卵抽出液から HP1 α 、 β 、 γ を同時に除去し、Scc2 とコヒーシンの染色体結合を解析した。結果、Scc2 とコヒーシンの染色体結合に大きな影響は見られなかった。従って、HP1 は大半の Scc2-Scc4 の染色体結合には不要であると考えられる。しかしながら HP1 が一部の Scc2-Scc4 の染色体結合に関わっている可能性は残されている。特に HP1 α が Scc2 と強く相互作用することを考慮すると、Scc2 は HP1 α の局在する領域で HP1 α に依存して染色体に結合する可能性が考えられる。他の生物種では HP1 α はセントロメア領域に局在することから、HP1 α と Scc2 の相互作用はセントロメアでの接着に重要な機能を持つ可能性が予想され、現在この可能性を検討している。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 木下 淳、東 寅彦、中川 拓郎、升方 久夫、高橋 達郎

Interaction of *Xenopus* Scc2 with HP1
第三十一回日本分子生物学会年会
2008 年 12 月 11 日 神戸

- ② 木下 淳、中川 拓郎、升方 久夫、高橋 達郎
アフリカツメガエル Scc2 は HP1 と相互作用する
第二十五回染色体ワークショップ
2008 年 1 月 31 日 熱海

- ③ 木下 淳、中川 拓郎、升方 久夫、高橋 達郎

ツメガエル Scc2 の HP1 との相互作用
第三十回日本分子生物学会年会
2007 年 12 月 12 日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 達郎 (TAKAHASHI TATSURO)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：50452420

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者