

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03201

研究課題名(和文) 分裂期染色体とその構築因子の力学感受メカニズム

研究課題名(英文) Mechanosensing properties of mitotic chromosomes and chromosome assembly factors

研究代表者

島本 勇太 (Shimamoto, Yuta)

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・准教授

研究者番号：80409656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,750,000円

研究成果の概要(和文)：分裂期染色体に対して制御された力学摂動を付与可能な顕微鏡システムを構築し、紡錘体極から微小管を通して与えた染色体の過剰な牽引による姉妹染色分体間の接着安定性の変化とDNA結合因子であるトポイソメラーゼIIの関与を明らかにした。特に、染色体の運動速度の増加に伴う姉妹染色分体間の解離率の線形的な上昇、速度超過に伴う解離率の抑制と染色体腕の損傷などを明らかにした。さらにこの性質を単一染色体レベル、一分子レベルで解析するための新規実験系の開発を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報を格納する染色体の力学応答特性を高分解能で測ることのできる顕微鏡システムを開発し、細胞分裂期に染色体が示す機械感受性と背後の分子メカニズムを明らかにした。この機械感受性の消失は染色体の異数化やDNA損傷の原因となる可能性があり、がんなどの関連疾病のメカニズム解明に貢献する重要な生物物理学的知見となることが期待される。

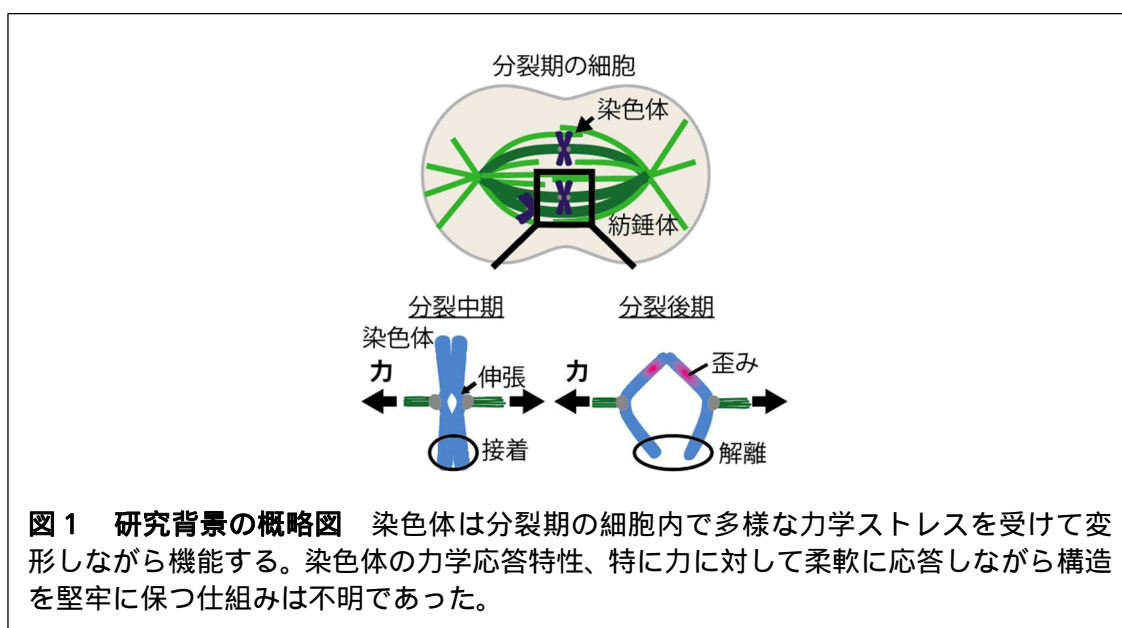
研究成果の概要(英文)：This research project aimed at elucidating the biophysical properties of mitotic chromosomes in vertebrates. A novel assay integrating *Xenopus* egg cytoplasmic extracts with high-resolution confocal fluorescence imaging and force-calibrated microneedles allowed us to determine the force sensitivity of sister chromatid cohesion in anaphase and the contribution of topoisomerase II, a DNA decatenation enzyme. The project also involved the development and use of *in vitro* assays dissecting the mechanical properties of single mitotic chromosomes and DNA-crosslinking molecules such as cohesin and topoisomerase II.

研究分野：生物物理学

キーワード：染色体 紡錘体 細胞分裂 力学特性

1. 研究開始当初の背景

DNA を格納し細胞世代間での遺伝情報の継承を担う染色体は、細胞分裂期に多様な力学的ストレスにさらされ変形しながら機能している(図1)。例えば染色体は紡錘体から nN レベルの大きな張力で牽引され、この力は紡錘体との結合部位であるセントロメア領域を伸張して結合エラーの監視と修正を行う。また複製された染色体対である姉妹染色分体は分裂中期において紡錘体から受ける力に抗して分体間の接着を維持する一方、分裂後期への移行に際してその接着を速やかに解除し、紡錘体の力を利用して姉妹染色分体を左右の極へ解離させる。重要なことに、これらの力は染色体の断片化や姉妹染色分体間の接着疲労などの不可逆的ダメージを引き起こす原因ともなる。したがって、分裂期の染色体はその構造を堅牢かつ柔軟に保ち、さまざまな大きさや速さで作用する力に対して適切に応答しながら機能していると考えられる。この応答の仕組みを理解するためには染色体の力学特性を定量的に明らかにすることが本質的である。しかしながら、染色体構築に関する詳細な生化学メカニズムに比べ、分裂期染色体が有する力学特性は解析の技術的困難さが主因となって今までほとんど知られていなかった。



2. 研究の目的

分裂期染色体の力学特性を解析可能な新しい実験技法を開発し、力学的ストレスに対する染色体の堅牢性と脆弱性の定量的理解から分裂期における遺伝的フィデリティの保証メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

染色体が持つ複雑でヘテロな機械物性を明らかにするため、微小探針を使った顕微機械操作技術に生化学と材料工学の手法を融合した新規のアッセイ系を構築した。具体的には、ガラスを微細加工して作成したファイバー状の力計測探針にアフリカツメガエル卵細胞抽出液と蛍光イメージング、レオロジー計測技術を融合し、紡錘体の捕捉操作によって染色体に力学的摂動を付与することのできる実験系を構築した(図2)。細胞質抽出液は Murray の方法を使って未受精卵から調製し、脱膜した精子を混合した後に細胞周期を回すことで複製された染色体の周囲に紡錘体を形成させた(Murray, 1991)。ファイバー状の探針は研究代表者らが以前に開発した手法を元に作成した(Shimamoto and Kapoor, Nat Protoc, 2012)。蛍光イメージングは、Yokogawa 製のスピニングディスク型コンフォーカルと染色体と紡錘体

をそれぞれ可視化するための二色のダイオードレーザー、高倍対物レンズと高感度 sCMOS カメラを使って行った。

またこれと独立に、単一染色体の顕微操作実験、染色体構築に關与する DNA 結合因子のナノ力学操作実験に必要な技術開発も行った。単一染色体実験はシャーレ上で培養した分裂期の HeLa 細胞を Mitotic Shake-off によって回収し、浸透圧ショックと遠心によって細胞から染色体を単離精製する方法により行った。精製した染色体の力学操作は上記のファイバー型探針を使った顕微操作技術を改良することで行った。DNA 結合因子の再構成実験は全反射照明による一分子蛍光イメージングと光ピンセットによるナノ力学操作が併用可能な顕微鏡システムを構築し、アビジンビオチン結合を介して DNA をガラス基板に固定する方法により行った。

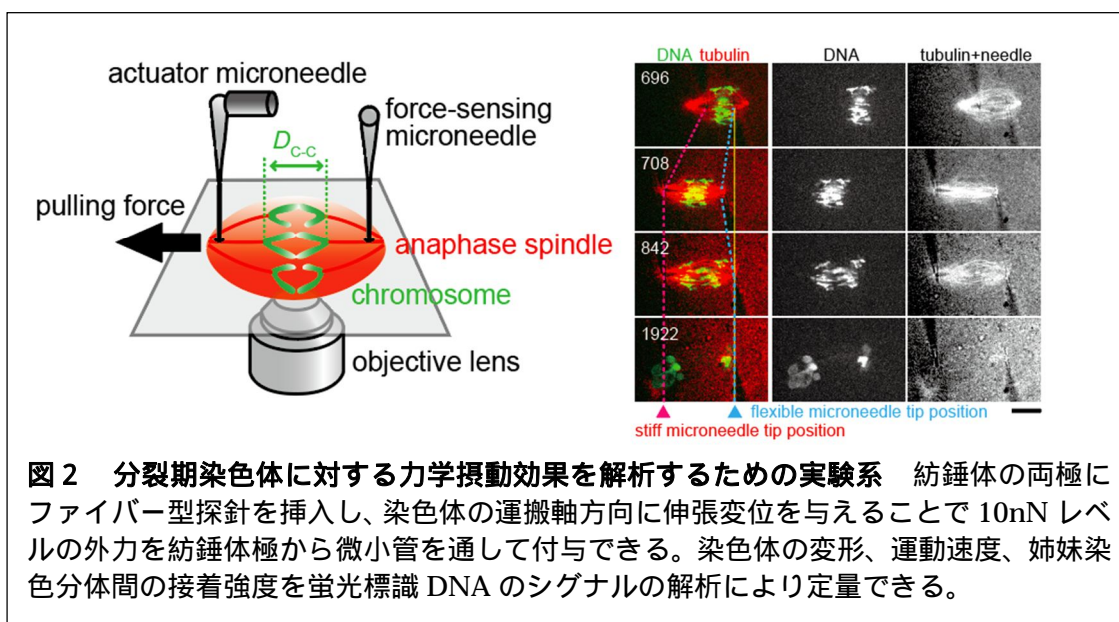
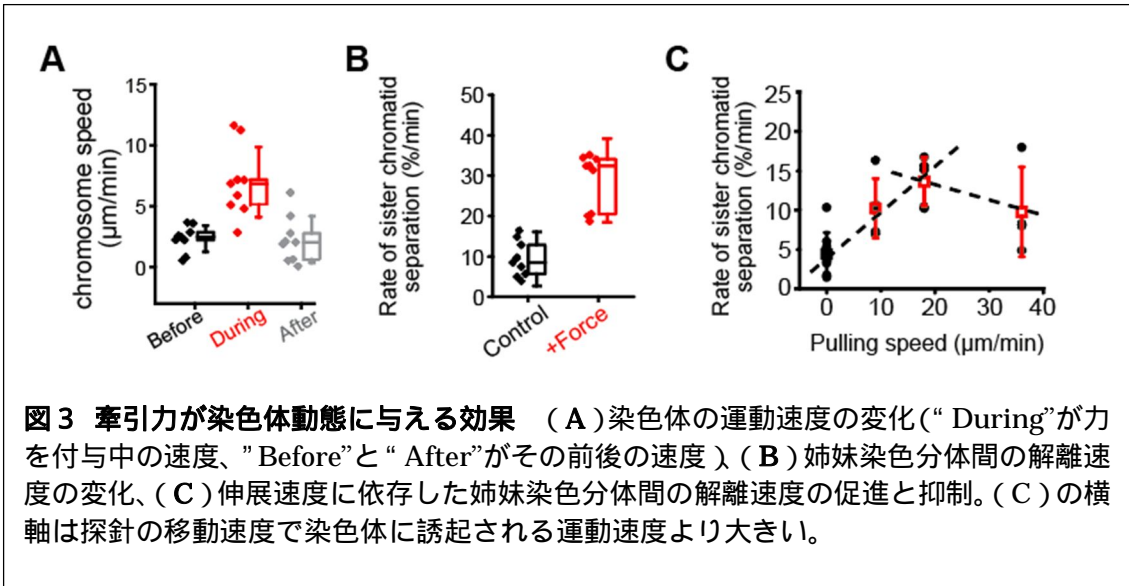


図 2 分裂期染色体に対する力学摂動効果を解析するための実験系 紡錘体の両極にファイバー型探針を挿入し、染色体の運搬軸方向に伸張変位を与えることで 10nN レベルの外力を紡錘体極から微小管を通して付与できる。染色体の変形、運動速度、姉妹染色分体間の接着強度を蛍光標識 DNA のシグナルの解析により定量できる。

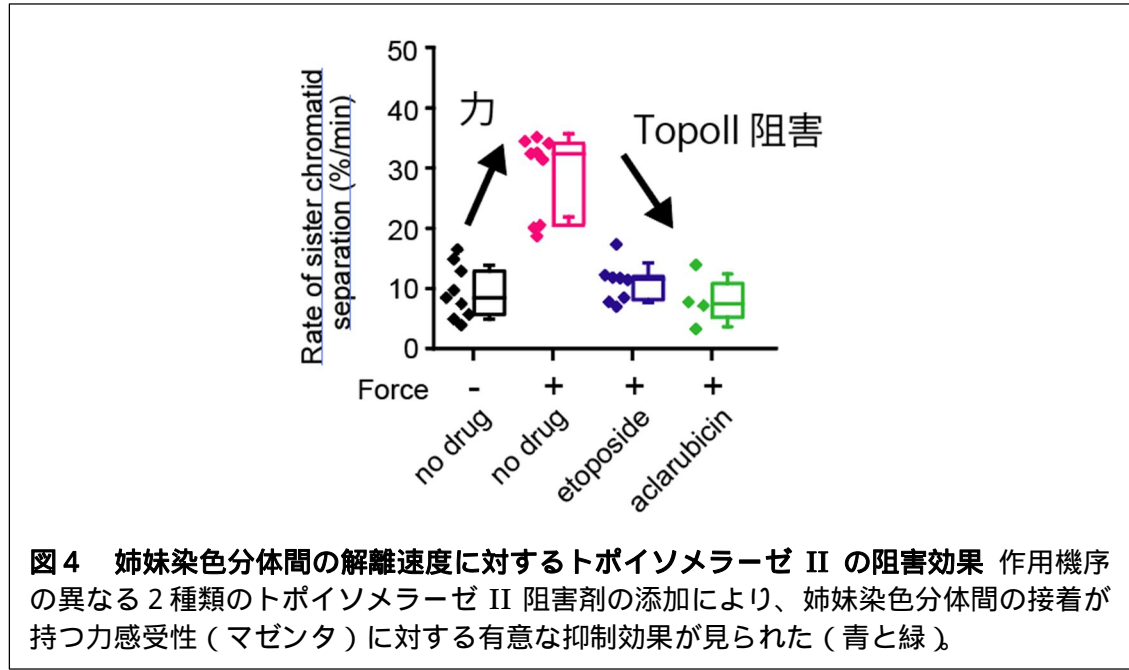
4. 研究成果

(1) 分裂期染色体が持つ力感受性の定量決定と背後の分子メカニズムの解明

細胞質抽出液とファイバー型探針を使った上記の顕微操作アッセイにより、分裂期染色体、特に姉妹染色分体間の接着の力感受性を定量決定することに成功した。2本のファイバー型探針の先端を細胞質抽出液内で形成した紡錘体の2つの極にそれぞれ挿入し、片側の探針を紡錘体の長軸(染色体運搬軸)に沿って動かすことで染色体に牽引力を付与した。紡錘体が自ら発生する染色体牽引力(最大で~0.7nN)と同程度の付加的力を作用させることで、染色体が分裂後期に見せる極方向への運動を2-3倍加速することに成功した(図3A)。力の作用を停止すると染色体の運動速度は元の値近くに帰ったことから、この摂動による紡錘体や染色体の不可逆的損傷は無視できる程度と考えられた。これに伴う姉妹染色分体間の解離レートを蛍光標識 DNA のシグナル強度変化から解析したところ、単位時間当たりの解離頻度も外力の作用によって促進されることが明らかとなった(図3B)。また探針の移動速度を変化させる実験により、染色体の運動速度がその内在的な輸送速度(~2 μm/min)の3-4倍に至るまでは姉妹染色分体間の解離は力によって促進され続けるが、それ以上の運動速度では逆に力は抑制的に作用することが分かった(図3C)。同様の実験を分裂中期の染色体に対しても行ったところ、上記の実験で作用させた以上の力を与えても姉妹染色分体間の解離は誘導されなかった。



さらに阻害薬剤を用いた分子摂動実験を行い、この染色体の力感受的応答は姉妹染色分体間の DNA の絡まりを解消することで知られるトポイソメラーゼ II の活性に依存することが明らかとなった(図4)。トポイソメラーゼ II 阻害下では姉妹染色分体間同士が強固に結合して解離せず、牽引された染色体の腕部分が外力によって引きちぎられることも観察された。また HeLa 細胞を使ったトポイソメラーゼ II 阻害実験により、紡錘体依存的に分裂期染色体に DNA 二重鎖損傷が生じる結果が得られた。以上の研究から、分裂後期の染色体は紡錘体から受ける牽引力に応答して姉妹染色分体間の接着解除を促進し、それにより各染色体に生じる過剰な歪みを効果的に緩和しながら左右の紡錘体極への解離を達成していることが示唆された。本研究の成果をまとめた論文を現在投稿準備中である。



(2) 単一染色体の顕微力学操作法の開発

ヒト培養細胞から単離精製した分裂期染色体の腕部位を上記ファイバー型微小探針で捕捉し、変形操作を加えることに成功した(図5A)。また同探針の先端を動原体構成タンパク質である Hec1 の特異抗体で修飾し、これを介してセントロメア部位を特異捕捉して伸張変位を与えることにも成功した(図5B)。現在、細胞質環境で同様の実験をできるように系を改良している。また研究開始時に想定していなかった成果の一つとして DNA の絡まりが姉

妹染色分体間だけでなく異なる染色体の間にも多数形成されていることが高解像の蛍光イメージングにより観察された。我々の知る限りこれを報告した先行研究は無く、観察条件にさらなる検討を加えてその存在の真偽と意義を検証している。

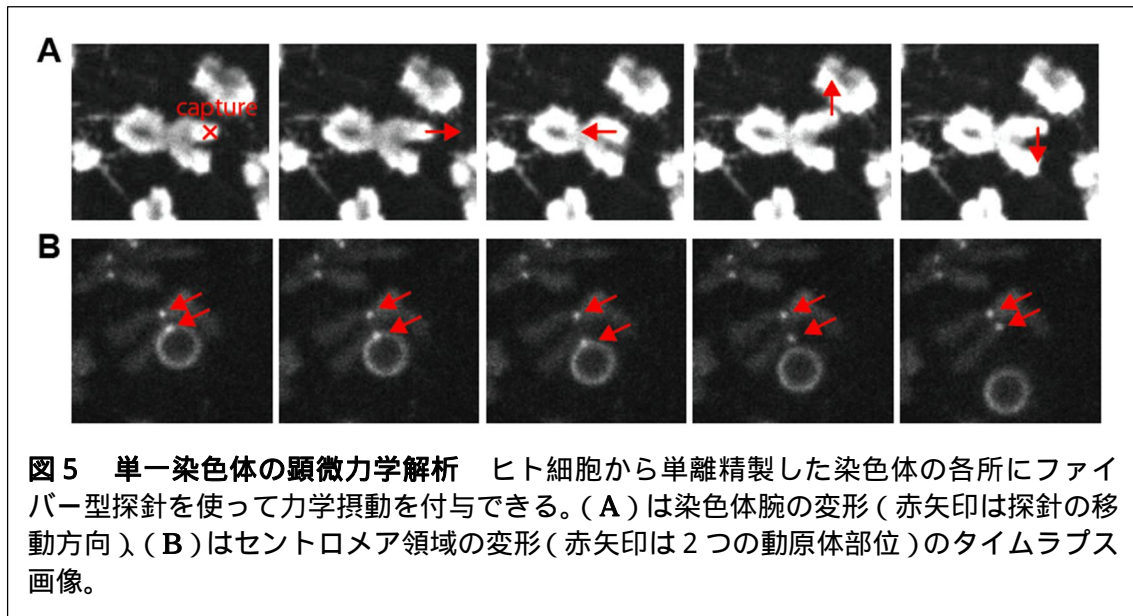


図5 単一染色体の顕微力学解析 ヒト細胞から単離精製した染色体の各所にファイバー型探針を使って力学摂動を付与できる。(A)は染色体腕の変形(赤矢印は探針の移動方向)(B)はセントロメア領域の変形(赤矢印は2つの動原体部位)のタイムラプス画像。

(3) 姉妹染色分体間の結合を担う DNA 結合因子の一分子力学解析系の開発

前述の実験で発見された力感受的な姉妹染色体分離メカニズムを分子レベルで解析するための再構成実験系の構築に着手した。研究代表者らが以前に開発した一分子力学計測アッセイ (Shimamoto et al., Dev Cell, 2015) を改良し、光ピンセットによって捕捉した DNA とガラス基板上に固定した DNA を接近させることで、溶液中に混合した DNA 結合因子 (トポイソメラーゼ II、コヒーシン等) の局在ダイナミクスと DNA 架橋特性を一分子イメージングできる顕微鏡システムを構築した。研究協力者の村山泰斗博士 (遺伝研) と共同で、マイクロパターニングを使った DNA 固定用のガラス基板の作成と DNA 上での分子運動の観察を行った。現在光ピンセットで DNA を捕捉し DNA 結合因子と相互作用させる方法の開発を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimamoto Yuta, Redemann Stefanie, Needleman Daniel	4. 巻 8
2. 論文標題 Mechanics of Cell Division	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.620111	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Lucan Yan, Tatsuya Fukuyama, Megumi Yamaoka, Yusuke T. Maeda, Yuta Shimamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Examining the assembly pathways and active microtubule mechanics underlying spindle selforganization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 arXiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Tanaka Masahito, Shimamoto Yuta	4. 巻 56
2. 論文標題 Local body weight measurement of the spindle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 871～872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2021.03.019	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 8件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 オルガネラ・細胞内構造体のマイクロメカニクス
3. 学会等名 第7回Organelle Zoneセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 機械計測と摂動操作でオルガネラ・細胞内構造体の力学特性を明らかにする
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 オルガネラ・細胞内構造のマイクロメカニクス
3. 学会等名 物理工学・医生物学の融合研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 Measuring and perturbing the micromechanics of intracellular structures
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 紡錘体の構築原理に対する生物物理学からのアプローチ
3. 学会等名 第83回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Mesoscale microtubule mechanics controlling the assembly and function of the chromosome segregation machinery
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Biophysical approaches to elucidate the principle of spindle assembly in cell division
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Micromechanics of cell division: Deciphering the forces that underlie spindle assembly and chromosome segregation
3. 学会等名 NIG Biological Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Examining the emergent mechanics underlying the vertebrate spindle assembly and force generation
3. 学会等名 第9回分子モーター討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Examining the meiotic spindle micromechanics using cell-free extracts and quantitative micromanipulation
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Probing the local mechanical architecture of the vertebrate metaphase spindle
3. 学会等名 ASCB/EMBO annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 紡錘体の構築原理と力学デザイン
3. 学会等名 第37回 染色体ワークショップ 第18回 核ダイナミクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019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
研究協力者	村山 泰斗 (Murayama Yasuto)	国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授 (63801)	

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
---------	---------