

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06495

研究課題名(和文) ヒトSMC5/6複合体の網羅的アンバイアス解析：オーキシンドグロン法を中心に

研究課題名(英文) Comprehensive and unbiased analysis of the human SMC5/6 complex: Taking advantage of auxin-inducible degron system

研究代表者

夏目 豊彰 (NATSUME, Toyoaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医学研究センター・主席研究員

研究者番号：10435513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SMC5/6複合体は、染色体ダイナミクスにおいて重要な役割を果たすが、その機能についてはよく分かっていなかった。本研究では、目的タンパク質を迅速に分解できるオーキシンドグロン法を駆使し、ヒトSMC5/6複合体の本質的な機能に迫った。その結果、SMC5/6はDNA複製期に生じるDNA間の絡まりを抑制し、染色体のインテグリティを保っていることを明確に示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで謎に包まれていた染色体安定性に必須な因子SMC5/6が、染色体DNAの絡まりを抑制していることをヒト細胞を用いて明確に示した。今後、SMC5/6の異常が引き起こす染色体不安定性疾患の原因解明につながることを期待される。また、SMC5/6は自己炎症性疾患やウイルス感染防御との関連も近年示唆されているが、本研究で開発した研究ツールは、今後これらの課題に取り組む際に大変有用になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The SMC5/6 complex plays a pivotal role in chromosome dynamics, but its function is still elusive. This study aimed to unveil a fundamental function of the human SMC5/6 complex by taking advantage of the auxin-inducible degron technology, which enabled us to rapidly degrade a target protein in cells. As a result, I showed that the SMC5/6 complex suppresses the formation of DNA entanglements during DNA replication, thus maintaining chromosome integrity.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：SMC5/6 オーキシンドグロン法 染色体分配 核内ボディ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

染色体上では、DNA複製、転写、修復等の様々な現象が同時に進行し、細胞周期を通して染色体はその形を大きく変容させる。これらの過程において中心的な役割を果たすのが、Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) タンパク質である。真核生物には、細菌の1つのSMCから進化した6つのSMCタンパク質 (SMC1-6) が存在し、2つのSMCがそれぞれヘテロダイマーを形成することにより、3つの別々のSMC複合体を形成する。全てのSMC複合体は細胞増殖に必須であり、DNAを囲い込むリング状の構造をとる。SMC1/3から形成される「コヒーシン」は、姉妹染色分体の接着や間期クロマチンのドメイン構造の形成に関与する。SMC2/4から形成される「コンデンシン」は、分裂期染色体の形作りに必須であり、姉妹染色分体の絡まりを解消する。一方、SMC5/6から形成される「SMC5/6複合体」に関しては、主に酵母を用いた解析より、DNA組換え、修復、DNA反復配列の維持、転写、DNAトポロジーの制御などの多岐にわたる役割が示唆されてきた。しかし、SMC5/6複合体の独自で細胞増殖に必須な役割に関するコンセンサスは未だ得られていない。この理由の一つとして、他のSMC複合体と比べて「キレ」がよい条件致死変異株が得られておらず、致死の直接的原因の同定が大変難しい。また、SMC5/6の変異が原因となる疾患の理解も、他のSMC複合体に比べて遅れている。

2. 研究の目的

本研究では、私が以前開発したヒト細胞における「オーキシンドェグロン (AID) 法」のシステムを駆使し、迅速なヒトSMC5/6複合体の不活性化を最大限に利用し、以下の重要な問いに迫る。

1. ヒトSMC5/6の独自で細胞増殖に必須な役割は何か？
2. そのSMC5/6の役割は、細胞周期のいつ（時間）、染色体上のどこで（場所）、他のどのような因子と（経路・複合体）果たされるか？
3. 他のSMC複合体との機能的関連や協調は何か？

3. 研究の方法

<ゲノム編集を用いたヒト細胞株の構築>

ヒト正常網膜由来細胞株 hTERT RPE-1 とヒト大腸癌細胞株 HCT116 を使い、内在性のSMC5/6複合体のサブユニットに「タグ」を付加した。AID法によるタンパク質分解にはAIDタグ、蛍光顕微鏡観察には、mCherry等の蛍光タグを用いた。

<細胞周期同調を組み合わせたSMC5/6変異株の表現型解析（時間）>

AIDを用いてSMC5/6を分解した際の致死表現型を、ライブセルイメージング、蛍光免疫染色、フローサイトメトリー等を用いて詳細に解析した。次に、既に最適化してあった細胞周期同調法と組み合わせ、SMC5/6を細胞周期特異的に分解および再発現させて、細胞周期のどの段階で致死性が引き起こされるのかを調べた。

<蛍光顕微鏡による染色体局在の解析（場所）>

SMC5/6が染色体のどこで機能しているかを知るために、タイムラプス蛍光顕微鏡観察を行い、場合によっては細胞周期同調とも組み合わせた。また、局在の分子メカニズムを理解するために、他のSMC複合体などの候補因子をAID法にて分解した際の局在も調べた。

4. 研究成果

<ゲノム編集を用いたヒト細胞株の構築>

OsTIR1を発現するhTERT RPE-1株を使い、内在性SMC6遺伝子 (SMC6-WT) の3'末端にmini-AID (mAID) タグ配列をゲノム編集によって挿入した (SMC6-mAID、図1A)。ウエスタンブロッティングを用い、オーキシン添加後にSMC6の発現がほとんど消失することを確認した (図1B)。同様に、OsTIR1を発現するHCT116株においてもAID株を作製した。さらに、SMC5/6複合体のサブユニットに蛍光タンパク質が付いた株もゲノム編集を用いて作製した。

<ヒト SMC5/6 の不活性化による細胞周期の異常>

次に、SMC6 を分解して SMC5/6 複合体を不活性化した際の、細胞増殖に与える影響を解析した。オーキシン添加後の細胞数の計測から、SMC6 分解後に 1 回細胞が分裂して増殖を停止することが分かった (SMC6-mAID、図 1C 下)。また、細胞の DNA 含有量から細胞周期を解析した結果、SMC6 分解細胞は G1 期に停止していた (SMC6-mAID、図 1C 上)。次に、細胞周期停止の原因を調べるため、オーキシン処理 48 時間後の細胞を用いて、細胞周期制御関連因子の発現を調べた (図 1D)。がん抑制遺伝子であり細胞周期のマスターレギュレーターである p53 や、その下流で働く p21 や p27 の発現が、SMC6 分解時に増加していた。G1 期停止における p53 の関与を調べるために、SMC6-mAID 細胞において p53 をコードする TP53 遺伝子を破壊すると、SMC6 分解後の G1 期の停止は見られなかった (図 1C)。これらの結果から、SMC5/6 複合体の不活性化は、何らかの細胞ストレスを引き起こし、p53 依存的な細胞周期チェックポイント経路を活性化することが明らかとなった。

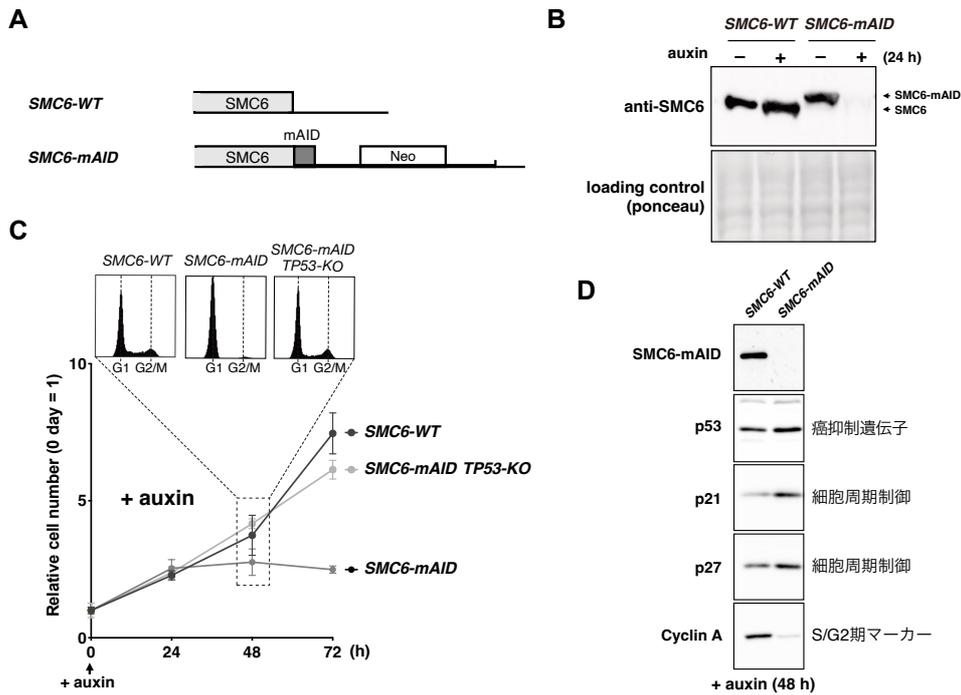


図 1 ヒト SMC5/6 複合体の不活性化は、G1 期停止を引き起こす

(A) SMC6 遺伝子座の模式図。CRISPR/Cas を利用して、両アレルの野生型遺伝子 (SMC6-WT) 3' 末端に mAID タグ配列を付加した (SMC6-mAID)。Neo は G418 耐性遺伝子。(B) AID 法による SMC6 の分解。オーキシン添加 24 時間後の SMC6 発現量をウェスタンブロット解析で調べた。(C、D) SMC6 の分解は、癌抑制遺伝子 TP53 (p53) 依存的な細胞周期停止を引き起こす。SMC6 分解後の細胞数の変化 (C 下) と細胞周期分布 (C 上)、および細胞周期制御関連因子の発現解析 (D)。

<ヒト SMC5/6 は正常な染色体分配に必要なものである>

p53 依存的な細胞周期停止の原因を調べるため、SMC6 分解後の細胞分裂時の様子を顕微鏡で観察した。その結果、複製後の DNA の絡まりが原因となる、Ultra-fine DNA bridge (UFB) が高頻度に生じていた (図 2A)。また、これらの絡まった DNA はペリセントロメア領域で高頻度に見られ、正常な染色体分配を阻害し、分配に失敗した染色体が、主核とは異なる微小核を高頻度で形成した (図 2B)。さらに、これらの微小核の中には、DNA ダメージのマーカである γ -H2AX が蓄積していた (図 2C)。一方、SMC6 の分解は、DNA 複製のスピード自体には影響がなかった。さらに、細胞周期の同調と組み合わせて、細胞周期特異的に SMC5/6 複合体を不活性化する実験から、この染色体分配における必須機能は M 期より前の段階で発揮されることが分かった。これらの結果より、SMC5/6 複合体は DNA 複製時に生じる DNA 間の絡まりを抑制し、その後の正常な染色体分配を促進していることが分かった。本結果は Cell Reports 誌で発表した。

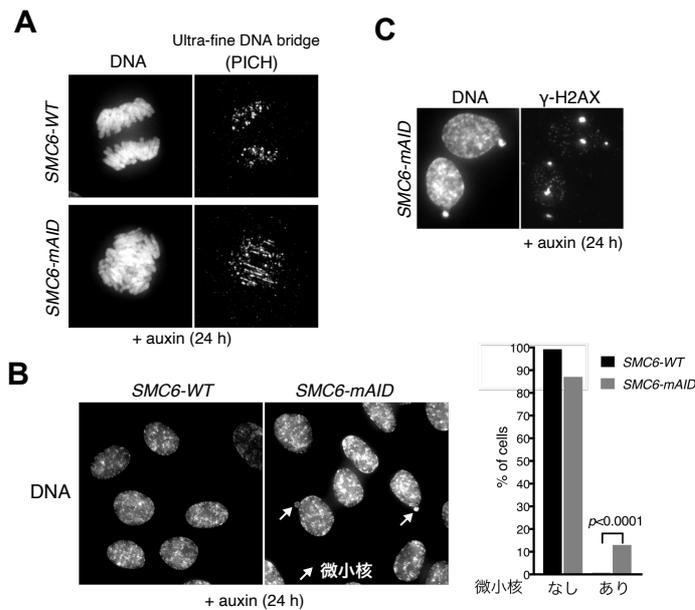


図 2 ヒトSMC5/6複合体の不活性化による染色体の不安定化

(A) SMC6の分解はUltra-fine DNA bridge (UFB) の形成を引き起こす。オーキシシン添加24時間後の細胞を固定し、UFBマーカーであるPICHに対する免疫染色を行った。*SMC6-mAID*株では、分裂途中の姉妹染色体を繋ぐ糸状のUFBが多数見られる。(B) SMC6の分解は微小核形成を誘導する。オーキシシン添加24時間後の細胞染色像(左)と微小核をもつ細胞の割合(右)。(C) 微小核の中には、DNAダメージマーカーである、 γ -H2AXが蓄積する。

<ダイナミックなヒト SMC5/6 の局在変化>

蛍光タンパク質で SMC5/6 複合体が標識された HCT116 株のライブセル観察から、SMC5/6 複合体がペリセントロメア領域やリボソーム DNA 領域に局在することが分かった。さらに、間期においては、近年「膜のないオルガネラ」として注目を浴びる、液-液相分離によって形成される核内ドロプレットに SMC5/6 が局在した。しかし、これら局在の生物学的意義は未だ不明である。

<今後の展望>

本研究では、AID 法を用いた時間的解像度の高い解析から、SMC5/6 複合体が DNA 複製で生じる染色体の絡まりを抑制し、分裂期の染色体安定性維持に寄与することを明確に示した。また、SMC5/6 の変異が小頭症や低身長を特徴とする疾患の原因遺伝子であることも示したが (Nature Communications 誌)、その背景には染色体不安定があると考えられる。

近年、SMC5/6 複合体と他の疾患・感染症との関連も明らかとなってきた。まず、NSE3 サブユニットの変異が、Lung disease, immunodeficiency, and chromosome breakage syndrome (LICS) と呼ばれる、肺炎、免疫不全、染色体切断を症状とする疾患を引き起こす (van der Crabben et al., J Clin Invest 2016)。また、SMC5/6 が、肝炎・肝硬変・肝がんの原因となる、B 型肝炎ウイルス (HBV) の宿主制限因子であることが分かった (Decorsière et al., Nature 2016)。具体的には、HBV のゲノム DNA からのウイルス RNA の転写を SMC5/6 が抑制する。さらに、レトロウイルスの一種であるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) のゲノム DNA からの転写や、RNA ウイルスである A 型インフルエンザウイルス (IAV) のゲノム RNA 複製を阻害することも報告された (Dupont et al., 2021, Cell Host Microbe.; Domingues et al., 2015, Cell Reports)。このように、SMC5/6 の機能は、染色体安定性、炎症、免疫に関連することが示唆されてきたが、その背景にある分子機構は良く分かっていない。本研究で確立した迅速な SMC5/6 複合体の不活性化の系を駆使することにより、今後これらの課題に取り組むことができると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|------------------------------|
| 1. 著者名 Grange Laura J.,Natsume Toyoaki,Stewart Grant S. | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Pathogenic variants in SLF2 and SMC5 cause segmented chromosomes and mosaic variegated hyperploidy | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 6664 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34349-8 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Wiegard Anika, Kuzin Vladislav, Cameron Donald P., Grosser Jan, Ceribelli Michele, Mehmood Rashid, Ballarino Roberto, Valant Francesco, Grochowski Radosław, Karabogdan Ivana, Crosetto Nicola, Lindqvist Arne, Bizard Anna Helene, Kouzine Fedor, Natsume Toyoaki, Baranello Laura | 4. 巻 81 |
| 2. 論文標題 Topoisomerase 1 activity during mitotic transcription favors the transition from mitosis to G1 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Cell | 6. 最初と最後の頁 5007 ~ 5024.e9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2021.10.015 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Andres Bueno Venegas, Toyoaki Natsume, Masato Kanemaki, Ian D Hickson | 4. 巻 31(3) |
| 2. 論文標題 Inducible Degradation of the Human SMC5/6 Complex Reveals an Essential Role Only during Interphase | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 107533 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107533 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Yesbolatova A, Natsume T, Hayashi KI, Kanemaki MT | 4. 巻 164-165 |
| 2. 論文標題 Generation of conditional auxin-inducible degron (AID) cells and tight control of degron-fused proteins using the degradation inhibitor auxinole | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Methods | 6. 最初と最後の頁 73-80 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymeth.2019.04.010 | 査読の有無 有 |
| 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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 夏目 豊彰 |
| 2. 発表標題 ヒトSMC5/6と染色体トランスアクションにおけるDNAトポロジカルストレス：DNAの絡まりと超らせん構造 |
| 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 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 夏目 豊彰 |
| 2. 発表標題 第三のSMC複合体、SMC5/6の染色体トランスアクションにおける役割～DNAトポロジカルストレスの観点から |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toyoaki Natsume |
| 2. 発表標題 Human SMC5/6 and DNA topological stress during chromosome transactions |
| 3. 学会等名 EMBO Workshop: DNA topology and topoisomerases in genome dynamics (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Toyoaki Natsume |
| 2. 発表標題 Elucidating a fundamental role of human SMC5/6 in chromosome transactions: from the viewpoint of DNA topological stress |
| 3. 学会等名 EMBO Workshop: Organization of bacterial and eukaryotic genomes by SMC complexes (国際学会) |
| 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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|