

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21770222

研究課題名（和文） 細胞周期M期特異的な染色体動態を制御する分子メカニズムの研究

研究課題名（英文） Molecular mechanism of regulation of mitosis-specific chromosome dynamics

研究代表者

木下 和久 (KINOSHITA KAZUHISA)

独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・専任研究員

研究者番号：60447886

研究成果の概要（和文）：

M期特異的な染色体動態の制御に必須な役割を果たすコンデンシンは、五つのサブユニットから成る分子複合体である。組換えサブユニットを用いてコンデンシン複合体の発現・精製系の構築を試み、活性型の組換え複合体の再構成に成功した。さらにサブユニット欠失型およびATPase変異型複合体を再構成し野生型複合体と比較することにより、コンデンシンの機能発現におけるATP加水分解のサイクルとnon-SMCサブユニットの役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Condensin complexes play an essential role in regulation of mitotic chromosome dynamics. We developed an experimental system to express, purify and reconstitute recombinant condensin complexes *in vitro*. Finally, we have succeeded in reconstituting active, recombinant holo-complexes. Using the recombinant complexes, we elucidated the contributions of the ATPase cycle and the non-SMC subunits to condensin functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学 分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞周期 細胞分裂 染色体 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

真核生物の遺伝情報を担うゲノムDNAは、細胞分裂時において高度に凝縮した染色体として一つの細胞から二つの子孫細胞へ分

配・継承される。細胞周期M期において観察されるスピンドル形成から染色体の分配にいたる一連の細胞内構造変換は、「生命の継承性」という生命システムの本質的な性質を担う重要なイベントである。

1980年代後半から90年代にかけて、酵母細胞を用いた遺伝学的解析、そしてアフリカツメガエル *Xenopus laevis* の卵細胞抽出液を用いた生化学的解析という二つの異なるアプローチを中心にして、M期における染色体の動態制御に関わる因子の探索がおこなわれ、それによって実際数多くの遺伝子、タンパク質がその制御因子の候補として同定されてきた。こうして同定された因子のうち、特に染色体の凝縮と分配の過程において中心的役割を担っていると考えられているのが、コンデンシンと呼ばれる分子複合体である。コンデンシンは SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) ATPase と呼ばれる進化的に保存されたタンパク質ファミリーに属する SMC2 と SMC4 という二つのサブユニットが作るヘテロ二量体に、さらに三つの non-SMC サブユニットが結合した五量体からなるホロ複合体を形成している。分裂酵母においては、五つのサブユニットのうちどれか一つでも欠失させると細胞は致死となり、各々のサブユニットがコンデンシンの機能に必須であることが示されている。また一部のサブユニットが細胞周期 M 期特異的にリン酸化されること、またこのリン酸化がコンデンシンの *in vitro* における活性に影響を及ぼすことが報告されていた。さらにヒトを含む高等真核細胞において二つのコンデンシンの存在が明らかになり、二種類のコンデンシンでは SMC2 と SMC4 のコア二量体のみ共通で、残りの三つの non-SMC サブユニットが二つのコンデンシンの違いを生み出すことが明らかにされていた。

以上のように、コンデンシンが M 期特異的な染色体動態制御におけるキー因子であること、かつその機能に個々のサブユニットとそのリン酸化による制御が必須な役割を果たすことが示されていたにも関わらず、コンデンシンの機能の分子レベルでのメカニズムの詳細についてそれ以上の解析が進んでいなかった。この背景には、コンデンシンの機能が細胞の生存に必須であるがゆえに、詳細な機能解析が困難であるという技術的な問題が存在しており、この問題を克服するためのアプローチが必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究では、コンデンシン複合体の分子機能の解析を中心として、M期における染色体凝縮と分配がいかにしておこるかを解明することを目標としている。この目標を達成するためには、より直接的にコンデンシンの機能解析ができるような生化学的アプローチが有効であると考えられた。

先行研究において、カエル卵細胞抽出液から精製したコンデンシン複合体を用いた生化学的解析が既に行われていたが、native な複合体を用いている限り、特定の部位への変異導入やサブユニット欠失などの複合体の改変を行うことは不可能である。

そこで、本研究では組換えサブユニットから出発してコンデンシン複合体を再構成し、その組換え複合体を用いた実験系を開発すること、さらにその実験系を用いて、コンデンシンの個々のサブユニットの役割を明らかにすることを研究の目的として位置づけた。

3. 研究の方法

前述の目的を達成するために、以下の(1)から(3)までのアプローチによって研究を進めた。

(1) 組換えサブユニットを用いたコンデンシンホロ複合体の発現・精製系の開発

バキュロウイルスを用いた昆虫細胞のタンパク質発現系において、組換え体の各種サブユニットを発現するコンストラクトを作製した。この発現コンストラクトを様々な条件下で発現・精製し、コンデンシンホロ複合体の再構成系の確立を試みた。再構成ホロ複合体の活性の検定にはカエル卵細胞抽出液のアッセイ系を用いた。

(2) non-SMC サブユニットを欠失させたサブ複合体および ATPase 変異型ホロ複合体の再構成と *in vitro* アッセイ系における機能解析

上記(1)において確立に成功した複合体の再構成系をベースとし、特定の non-SMC サブユニットを欠失させたサブ複合体の発現・精製をおこなった。さらに SMC2、SMC4 サブユニットの ATP 結合部位に変異を導入した発現コンストラクトを作製し、ATPase 変異型ホロ複合体を再構成させた。再構成した欠失型サブ複合体と変異型ホロ複合体について、*in vitro* の ATPase アッセイ系とカエル卵細胞抽出液の系を用いて、これら複合体の機能の解析をおこなった。

(3) 質量分析によるコンデンシンの M 期特異的リン酸化部位の同定

上記の再構成複合体を用いた解析に加えて、native なコンデンシン複合体を M 期卵細胞抽出液から精製し、コンデンシンの各サブユニットにおける M 期特異的リン酸化部位の同定を質量分析によっておこなった。

4. 研究成果

(1) 組換えサブユニットを用いたコンデンシンホロ複合体の再構成系の確立

特定分子の生化学的活性の解析には通常組換え体を用いた *in vitro* における再構成実験系が有効である。コンデンシン複合体についてもこれまで既にいくつかの試みがなされてきているものの、分子量 670 kDa にもおよぶ巨大分子複合体であるがゆえにその発現は容易でなく、*in vitro* の生化学的解析に用いるのに十分な複合体はまだ得られていなかった。そこで本研究においては、比較的分子量の大きなタンパク質の発現も可能であるバキュロウイルスの昆虫細胞発現系を用いて組換え体サブユニットからなる活性型コンデンシン複合体の再構成を試みた。新たに作製した昆虫細胞発現用コンストラクトに改良を加えることにより、SMC の二量体、あるいは二種類のホロ複合体コンデンシン I とコンデンシン II のサブユニットを同時に効率よく発現できる発現系の確立に成功した。これにより、特に困難であった分子量の大きい SMC 二量体についても安定発現が可能となった。さらに、この発現系を用いて大量発現した複合体を精製するために詳細な条件検討をおこない、高純度の二種のホロ複合体の再構成系確立に成功した (図 1)。

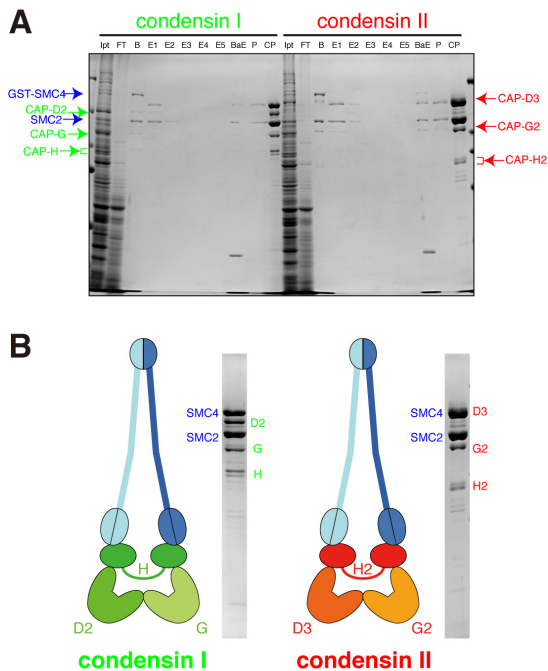


図 1 (A) 組換えコンデンシンの精製
(B) 再構成された二種類のホロ複合体(左:コンデンシン I、右:コンデンシン II)

上記において再構成した組換えホロ複合体を、内在性の native コンデンシン複合体を免疫除去したカエル卵細胞抽出液 (Δ Xcondensin) に添加すると M 期染色体の形成が誘導され、この組換えサブユニットからなるホロ複合体が native 複合体と同様な活性を持つことが確認された (図 2 B 参照)。以上の結果は、活性型のコンデンシン複合体を組換え体を用いて再構成した初めての例であり、染色体構築研究の進展に寄与するきわめて重要な成果である。

(2) non-SMC サブユニットと SMC2-SMC4 ATPase のコンデンシン機能における役割の解明

前述した研究成果(1)において確立した複合体の再構成系を出発点として、コンデンシンを構成する各サブユニットの役割を明らかにするために、個々の non-SMC サブユニットを欠失させたサブ複合体の再構成をおこなった。加えて SMC2-SMC4 コア二量体の ATPase の役割についても注目し、二つの SMC サブユニットの ATP 結合部位に変異導入した ATPase 変異型複合体の発現・精製をおこない、それぞれの欠失型および変異型複合体の再構成に成功した (図 2 A)。

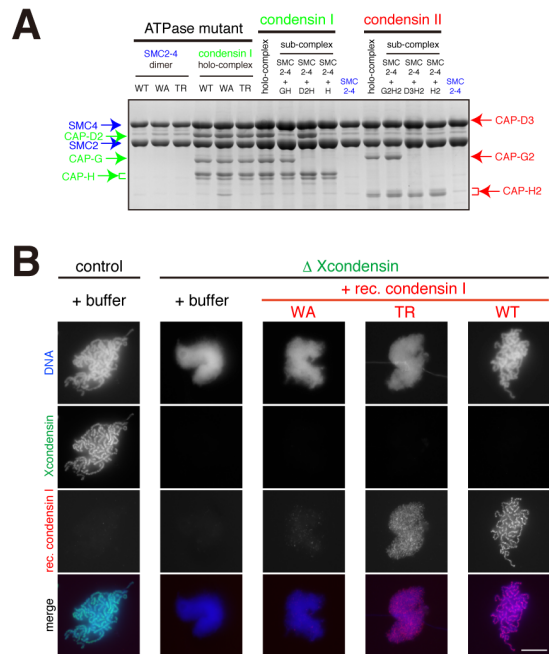
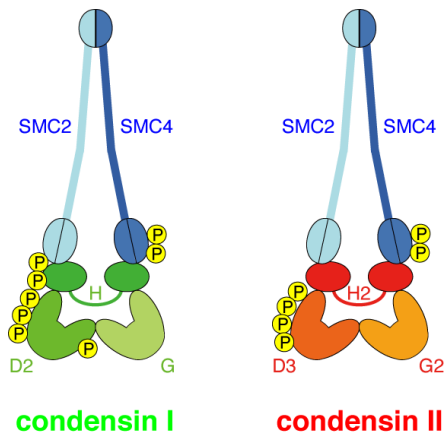


図 2 (A) 再構成された SMC ATPase 変異型およびサブユニット欠失型複合体
(B) ATP の結合と加水分解はコンデンシンの M 期染色体形成誘導能に必須な役割を果たす

得られた各種複合体を用いて *in vitro* における ATPase アッセイ系を構築し、その ATPase 活性を測定したところ、コンデンシンの ATP 加水分解能には non-SMC サブユニットが必須な役割を果たすことが明らかになった。さらにカエル卵細胞抽出液を用いた M 期染色体形成のアッセイ系において、各種複合体を用いて解析した結果、コンデンシンの染色体への標的化には ATP の結合が必要でありさらに染色体形成の誘導に ATP の加水分解が必要であることが明らかになった (図 2 B)。この結果は、コンデンシンの染色体上におけるふるまいと機能が ATPase の加水分解サイクルに連動していることを明らかにした点できわめて重要である。

(3) コンデンシンサブユニットの M 期特異的リン酸化部位の同定

染色体の構築を含む細胞周期 M 期特異的イベントは、G2 期から M 期への遷移時において MPF キナーゼである Cdk1/サイクリン B の活性化をトリガーとして、標的タンパク質のリン酸化反応を介して起こると考えられている。このリン酸化は Cdk1/サイクリン B 単独によるものではなく、Cdk1 とほぼ同時期に活性化される M 期キナーゼ群が協調して働くことによってもたらされる。コンデンシンもまた Cdk1 を含む M 期キナーゼ群によってリン酸化され、その活性制御を受けていると考えられる。そこで、カエル卵細胞抽出液から精製したコンデンシンの質量分析から、SMC サブユニットおよびコンデンシン I と II の non-SMC サブユニットの M 期特異的なリン酸化部位を同定した。その結果、これまで既に報告されていたコンデンシン Inon-SMC サブユニットの Cdk1 キナーゼによるリン酸化部位だけでなく、これまで知られていなかった新たなリン酸化部位が同定された (図 3)。



さらにこれらのリン酸化部位を認識する

図 3 同定されたコンデンシンサブユニットのリン酸化部位 (黄色丸印の P)

リン酸化ペプチド抗体を作製し解析したところ、各々のリン酸化が M 期に同時ではなく、異なるタイミングで起きていることが見出された。以上の結果は、コンデンシンの活性が M 期進入時における単純なオン・オフによって制御されているのではなく、M 期の中でも時期特異的、サブユニット特異的な複雑な制御を受けて機能することを示している。染色体構築の過程がコンデンシンのリン酸化によって厳密に制御されていることを示唆しており、今後さらに解析を進めることによって、染色体構築におけるコンデンシンの作用機序の全容解明が期待される。

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 1 件)

①木下和久、平野達也、SMC ATPase: コンデンシンとコヒーシンのコアサブユニット、生体の科学、査読無、62 巻、2011 年、pp.446-449

[学会発表] (計 1 件)

①木下和久、組換えコンデンシン複合体の再構成と機能解析、第 29 回染色体ワークショップ、2012 年 1 月 26 日、宮城県仙台市

[図書] (計 1 件)

①木下和久、共立出版、細胞周期フロンティア (分担執筆:「細胞周期 M 期におけるコンデンシンの動態とリン酸化による制御機構」の項)、2010 年、pp.70-76

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 和久 (KINOSHITA KAZUHISA)
独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・専任研究員
研究者番号: 6 0 4 4 7 8 8 6