

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：2010～2011

課題番号：22770201

研究課題名（和文） 姉妹染色分体接着の分子基盤：再構成コヒーシンを用いたアプローチ

研究課題名（英文） Molecular dissection of sister chromatid cohesion

研究代表者

新富 圭史 (SHINTOMI KEISHI)

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・研究員

研究者番号：60462694

研究成果の概要（和文）：

コヒーシンは姉妹染色分体の接着に中心的な役割を果たすタンパク質複合体である。本研究では、組換えタンパク質から再構成したコヒーシンを用いて、接着を実現する分子メカニズムを理解することを目指した。おもに技術的な理由から、計画通りに研究を進行できなかったが、カエル卵無細胞系を用いた解析によって、コヒーシンとコンデンシン（染色体凝縮に必要な複合体）の機能のバランスが染色体形状の決定に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Cohesin is a protein complex essential for sister chromatid cohesion. The goal of this study is to understand molecular basis behind the cohesion process. My initial approach using the cohesin complexes reconstituted from recombinant subunits fell through because of some technical reasons. Unexpectedly, I have found that balancing action between cohesin and condensin, which is required for chromosome condensation, determines shapes of metaphase chromosomes in a cell-free system from frog eggs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：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：染色体、姉妹染色分体、コヒーシン、コンデンシン、カエル卵無細胞系

1. 研究開始当初の背景

染色体はゲノム DNA とタンパク質から構成される細胞内構造体である。真核細胞では、DNA 複製によって生じた染色体のコピー（姉妹染色分体）を細胞分裂の直前までつなぎ止めておく（接着する）ことによって、染色体分配の正確さが保証されている。近年、コヒーシンと呼ばれるタンパク質複合体が、姉妹染色分体の接着プロセスに中心的な役割を果たすことが明らかにされた。

コヒーシンは、2 つの SMC (structural maintenance of chromosomes) ATPase ファミリーに属するサブユニット (Smc1 と Smc3) と、2 つの non-SMC サブユニット (Rad21 と SA1 または SA2) から構成される。このうち複合体のコアとして機能する Smc1 と Smc3 は、両端に ATP 結合性のヘッド領域をもつ V 字型のヘテロ二量体を形成する。一方、Rad21 サブユニットの N および C 末端のドメインは、それぞれ Smc3 および Smc1 のヘッド領域と結合し、直径 50 nm にもおよぶ巨大なリング状構造を形成する。こうした構造的特徴に基づき、コヒーシンが自身のリング構造の内側に姉妹染色分体を抱え込むことでそれらを接着させるというモデル（リングモデル）が提唱されている（図 1）。

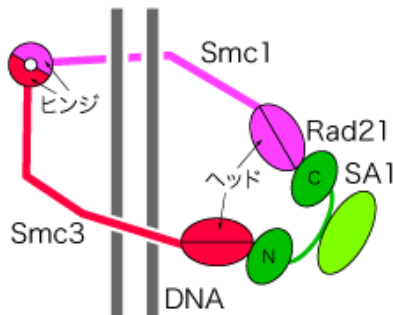


図1. コヒーシンの分子構造とリングモデル

実際に、出芽酵母の遺伝学的解析によって、Smc1 と Smc3 による ATP の加水分解によってコヒーシンと DNA との結合、ひいてはリングの開閉が制御されると予想されている。しかし、この仮説を直接的に支持する証拠は得られていない。また、動物細胞では、分裂前期から中期にかけて染色体腕部の接着が部分的に解消されることが知られている。このプロセスは染色分体の分割 (resolution) と呼ばれ、コヒーシンに結合する 2 つのタンパク質 Wapl と Pds5 が必要であることが申請者自身の解析によって示された。ところが、Wapl や Pds5 がコヒーシンの構造や機能をどのように制御するのかについては不明な点が残されてい

る。一方、ヒト細胞から精製したコヒーシンを用いた解析では、コヒーシンが DNA の連結 (ligation) や連環 (catenation) を促進することを示されており、細胞内での機能を理解する手がかりになると期待されている。しかし、こうした生化学的活性が産み出されるメカニズムは殆ど理解されていない。

2. 研究の目的

本研究の目標は、姉妹染色分体の接着におけるコヒーシンの作用メカニズムを分子レベルで理解することである。当初は、組換えタンパク質から再構成したコヒーシン複合体と、姉妹染色分体接着過程を試験管内で再現できるカエル卵無細胞系を組み合わせたユニークなアプローチを用いて研究を進める予定だった。具体的には、(1) コヒーシンの ATP 加水分解活性・DNA 結合活性の検定とその制御、(2) コヒーシンの分子活性とその染色体上での動態の連関、(3) 姉妹染色分体分割の制御因子 (Wapl-Pds5) によるコヒーシンの制御の 3 点について理解することを目指した。計画を進める過程で、コヒーシンを無細胞系から除去すると、姉妹染色分体接着だけでなく、分裂中期の染色体の形状そのものにも影響が及ぶことを見出した。そこで、(4) コヒーシンとコンデンシン (染色体凝縮に中心的な役割を果たすタンパク質複合体) の機能的相互作用について、独自の解析方法を用いて検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) 昆虫細胞発現系を用いて、Smc1-Smc3 コア二量体や Rad21-SA1 複合体を調製し、これらを混和してホロコンプレックスを調製した(図 2)。また、Smc1 と Smc3 については、ATP の結合や加水分解ができなくなる変異の導入も行った (それぞれ、WA 変異体、TR 変異体と呼ぶ)。再構成したコヒーシンをプロテアーゼ処理し、限定分解パターンの比較によって、各サブユニットにコンフォメーション変化が起こる可能性を検討した。さらに、

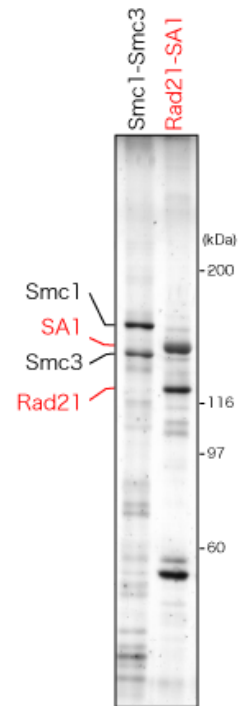


図2. 再構成コヒーシン複合体

再構成コヒーシと [alpha-32P]ATP を混和した反応液を薄層クロマトグラフィーで展開し、ADP 産生量を指標にして ATPase 活性の測定を試みた。

(2) 様々な再構成コヒーシをカエル卵無細胞系でインキュベートし、単離した染色体成分をウェスタン解析することによって、染色体への結合の成否を検定した。この無細胞系では、抗体を用いてコヒーシを除去(免疫除去)すると染色分体の接着に異常が生じるので、内在性のコヒーシを除去した後に抽出液に様々な再構成コヒーシ複合体を加え、それらが接着異常を相補できるか否かについて検討した。

(3) 姉妹染色分体の分割におけるコヒーシの制御メカニズムについては、方法(1)で述べた実験系に Pds5 や Wapl の組換えタンパク質を加え、これらの相互作用がコヒーシの分子活性に与える影響を解析する実験を計画した。

(4) カエル卵無細胞系において、従来の免疫除去法を改良して、染色体凝縮に必要なコンデンシン複合体(IおよびIIの2種類が存在する)やコヒーシ複合体の存在量を正確に操作する方法を確立した。様々な操作を施した無細胞系で染色体を形成させ、その形状(染色体軸の長さ、姉妹染色分体間の距離)を詳細に比較することによって、染色体の形状が決定されるメカニズムを検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型の Smc1-Smc3 二量体を ATP の有無の異なる条件でインキュベーションし、プロテアーゼ(トリプシン、キモトリプシン)による限定分解を行ったところ、それぞれの条件に特徴的な分解パターンが観察された。このうち ATP 依存的な分解パターンは、WA および TR 変異体を用いた同様の実験では、見られなくなることから、コヒーシは ATP の加水分解依存的にコンフォメーションを変化させる可能性が示唆された。また、この実験系に一本鎖 DNA や二本鎖 DNA を加えた場合にも、それぞれに特徴的なコンフォメーション変化が起こることが示唆された。しかし、再構成したコヒーシの ATPase 活性については、野生型ホロ複合体でも、DNA の有無にかかわらず検出することができなかった。同じ活性測定系で、大腸菌の RecA タンパク質の一本鎖 DNA 依存的な ATPase 活性が検出できたことから、コヒーシの ATPase 活性は極めて低いものと推測された。

(2) カエル卵無細胞系における再構成コヒーシのホロ複合体挙動を調べた。

予想に反して、WA 変異体と TR 変異体のいずれでもクロマチンへの結合が認められ、そのクロマチン結合量には野生型と大きな差が認められなかった。また、相補実験においても、再構成コヒーシの機能を十分に検討することができなかった。この原因は、おもに卵無細胞系からコヒーシの除去を行ったときの染色分体の接着異常はそれほど顕著ではないことと、解析に十分な濃度の複合体を調製するのが困難であるといった技術的な理由に依拠すると考えている。

(3) Pds5 や Wapl の組換えタンパク質を調製することはできたが、結果の(1)に述べたようにコヒーシの ATPase 活性を検定することができなかったため、これらの組換えタンパク質の存在下でのコヒーシ生化学的検定は行わなかった。

(4) カエル卵無細胞系でコヒーシを除去した際の接着異常はそれほど明瞭でなかったが、染色体凝縮に中心的な役割を果たすコンデンシン I と II の挙動を手がかりにして、間接的にコヒーシの機能を理解することを試みた。その結果、コヒーシは、その大半が分裂前期に染色体腕部から解離することによってコンデンシン II の染色体軸への集積を促すが、染色体上に残ったものはコンデンシン I と協調して姉妹染色分体の並列性の維持に貢献することが判明した。さらに、コヒーシとコンデンシンの機能的相互作用を検討するために新しい実験手法を開発した。通常の免疫除去法では、解析対象のタンパク質を完全に(検出限界以下まで)除去するが、新し

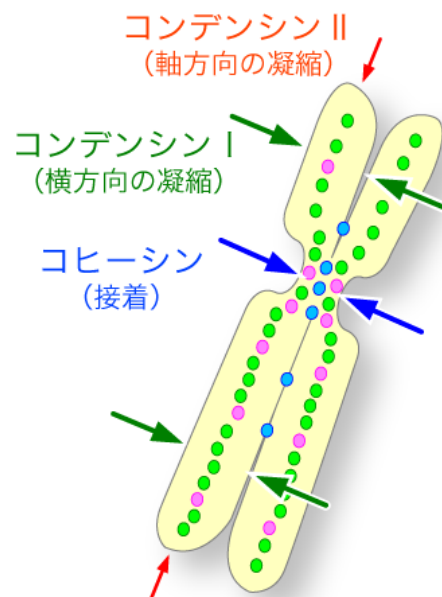


図3. コヒーシとコンデンシンによる染色体形状決定メカニズム

い方法では、除去抽出液を未処理のコントロール抽出液と任意の割合で混和することによってそのタンパク質の存在量を正確に操作できるようにした。こうした操作的手法を駆使し、コンデンシン I と II は、それぞれ、染色体軸に直行する横方向、軸に沿った縦方向に凝縮を促すことが明らかになった。これらの結果に基づいて、分裂期染色体の形状は、コヒーシンとコンデンシン I と II の機能のバランスで決定されるというモデルを発表した (図 3、雑誌論文 1)。

5. 主な発表論文等

① Keishi Shintomi and Tatsuya Hirano (2011). The relative ratio of condensin I to II determines chromosome shapes. *Genes Dev.* 25: 1464-1469. 査読有り.

② Daisuke Yamashita, Keishi Shintomi, Takao Ono, Ioannis Gavvovidis, Detlev Schindler, Heidemarie Neitzel, Marc Trimborn, and Tatsuya Hirano (2011). MCPH1 regulates chromosome condensation and shaping as a composite modulator of condensin II. *J Cell Biol.* 194: 841-854. 査読有り.

③ Keishi Shintomi and Tatsuya Hirano (2010). Sister chromatid resolution: a cohesin releasing network and beyond. *Chromosoma.* 119: 459-467. 査読有り.

[学会発表] (計 3 件)

① 新富圭史、平野達也。精製タンパク質を使って染色体を作ることができるか？ 第 29 回染色体ワークショップ。2012 年 1 月 26 日。仙台。

② Keishi Shintomi。How condensins and cohesin shape chromosomes: Lessons from frog eggs. RIKEN 2011 Joint Retreat. 2011 年 2 月 1 日。掛川。

③ 新富圭史、平野達也。2 つのコンデンシンの存在比と作用タイミングが染色体形状を決定する。第 33 回日本分子生物学会年会 (BMB2010)。2010 年 12 月 7 日。神戸。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新富 圭史 (SHINTOMI KEISHI)

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・研究員

研究者番号：6 0 4 6 2 6 9 4