

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570204

研究課題名(和文)二つのコンデンシンによるM期染色体動態の制御機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of regulation of mitotic chromosome dynamics by condensins

研究代表者

木下 和久 (Kinoshita, Kazuhisa)

国立研究開発法人理化学研究所・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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞のM期染色体構築に中心的役割を果たすコンデンシンは五つのサブユニットからな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I複合体を再構成しその分子機能の解析をおこなった。その結果、SMCサブユニットのATP加水分解のサイクルがコンデンシンIの作用に異なる貢献をしていること、またSMC ATPaseによる継続的な加水分解が染色体構造の形成・維持に必要であることを見出した。さらにコンデンシンI特有のHEATリピートを持つ二つのサブユニットがダイナミックな染色体の軸構造の形成に必須であり、お互いに拮抗的に作用しながら機能することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Condensin complexes play an essential role in regulation of mitotic chromosome organization in eukaryotic cells. Using an experimental system to reconstitute recombinant condensin complexes in vitro, we analyzed the molecular functions of condensin I. We found that ATP binding and hydrolysis by SMC subunits have distinct contributions to condensin I's action, and that continuous ATP hydrolysis is required for structural maintenance of chromosomes as well. We also found that balancing acts of two non-SMC subunits containing HEAT repeats support dynamic assembly of chromosome axes.

研究分野：分子生物学 細胞生物学

キーワード：染色体 細胞周期 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

真核細胞のゲノム DNA が、間期から M 期への遷移において高度に折り畳まれ構造変換する過程は、染色体構築と呼ばれ、わずか十数 μm の細胞空間内で一对の複製されたゲノム DNA を正確かつ迅速に娘細胞に分配することを可能にしている。この染色体構築の過程に重要な役割を果たすのが、コンデンシン (condensin) と呼ばれる分子複合体である。

これまでの長年の研究から、コンデンシンが酵母からヒトにいたるまで真核生物において広く M 期染色体構築に必須であることが明らかになっている。2003 年には脊椎動物において第 2 のコンデンシン複合体が発見され、それをコンデンシン II、従来型の複合体をコンデンシン I と呼ぶようになった。2 つのコンデンシン複合体は、SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) 二量体 (SMC2-SMC4) をコアサブユニットとして共有する一方、異なるセットの non-SMC 制御サブユニット (それぞれ 3 つ) を持つ。コンデンシン機能は細胞の生育に必須であり、いずれのサブユニットの変異も染色体分離異常を起こして致死となるため、遺伝学的手法によって各サブユニットの役割を理解することは困難である。そこで、コンデンシンの各サブユニットがどのようにして染色体構築に関わるのか、そのメカニズムを理解するためには、生化学的アプローチが必須となる。初期の研究において、カエル卵抽出液 (あるいはヒト培養細胞) から精製したコンデンシン I 複合体を用いていくつかの重要な知見が得られている。しかし、native な複合体を用いる限り、その収量は限られており、変異を導入して機能解析をすることも不可能であった。こうした問題を克服するために、これまで組換えサブユニットからコンデンシン複合体を再構成する試みがなされてきたが、分子量 600-700 kDa におよぶ巨大分子複合体を従来の通常の発現系において発現・精製することは技術的に大きな困難を伴うことが明らかとなった。事実コンデンシンの発見から 15 年以上経っていた研究開始当初時においても、組換えサブユニットからなる活性型ホロ複合体の再構成と精製に成功した例は報告されていなかった。

本研究の申請当時、研究代表者は前述の技術的困難を克服し高純度かつ高収量の 2 つのコンデンシン複合体を再構成することに成功した。これは組換え体を用いた機能的なコンデンシン複合体の再構成の世界初の成功例であり、この非常に強力な実験材料を手にすることができたことが、本研究の実現の基盤となった。

2. 研究の目的

本研究では、染色体構築に必須なタンパク質複合体コンデンシン I を組換えサブユニットから再構成し、その分子機能と制御を解明することを目的とした。

組換えサブユニットを用いることが出来るという本実験系の利点を生かし、特定の部位への変異導入およびサブユニット欠失などの複合体の改変を行った。具体的には主に以下の二点、すなわちコンデンシン I の機能における (1) SMC コアサブユニットの ATPase の加水分解サイクルの役割と (2) non-SMC 制御サブユニットの役割を明らかにすることを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

主に以下に述べる (1) から (3) までの方法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 I ホロ複合体およびサブ複合体の再構成
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、各種の組換えサブユニットを発現・精製し、コンデンシン I のホロ複合体およびサブ複合体を再構成した。また SMC コアサブユニットの ATP 結合部位に変異を導入した発現コンストラクトを用いて、野生型と同様に SMC ATPase 変異導入型のホロ複合体およびサブ複合体も再構成した。

(2) カエル卵細胞抽出液を用いた染色体形成アッセイ系による機能解析

上記 (1) の方法によって再構成した各種複合体の活性を検定するためのアッセイ系を確立した。この系では、まずカエル卵から調製した M 期細胞抽出液中の内在性 *Xenopus* 由来のコンデンシンを特異抗体を用いて免疫除去し、その抽出液中に組換えサブユニットから再構成した複合体を添加 (add-back) しさらに精子由来のクロマチンを加えることによって、染色体形成におけるその複合体の機能を生理的条件下で検定することが出来る。

(3) 染色体構築維持におけるコンデンシンの動態・機能を解析するための新規アッセイ系の開発

前述 (2) のアッセイ系は主にコンデンシンの染色体形成過程における役割を解析する目的で用いたが、これに加えて染色体が形成された後のステップすなわち染色体構築が維持されるプロセスにおけるコンデンシンの役割・貢献を調べるための新たな機能的アッセイ系 (逐次添加法: sequential add-back assay) を開発・確立した。まず上記方法 (1) で確立された組換えコンデンシンの再構成系において、non-SMC サブユニットの一つ CAP-H に傾向標識タグ mCherry または EGFP を融合させ、二種類の蛍光標識をした各種複合体を発現・精製する。このうち mCherry で標識した複合体を (2) のアッセイ

系の時と同様に精子由来クロマチンと共に内在性コンデンシンを免疫除去した細胞抽出液に加え、染色体を形成させる。染色体形成後さらに EGFP で標識した複合体を添加することによって、mCherry 標識コンデンシンによって形成された染色体構築に及ぼされる影響を逐次追跡・観察した。

4. 研究成果

(1) コンデンシン I の作用における SMC ATPase サイクルの貢献の解明

コンデンシン I の五量体のサブユニットのうち SMC2 と SMC4 は V 字型のコア二量体を形成している (図 1A)。二つの SMC サブユニットはそのヘッドドメインに ABC (ATP-binding cassette) 型の ATP 結合部位を持つ ATPase である。そこで研究代表者はこの SMC ATPase による ATP の結合と加水分解のサイクルの役割を調べた。SMC コア二量体のヘッドドメインは ABC 型 ATPase の加水分解反応によって会合と解離のサイクルを繰り返す (図 1B)。このドメインに ATP 結合のステップを阻害する Walker A (WA) 変異、あるいは ATP 加水分解のステップを遅延させる Transition state (TR) 変異を導入し、二種類の ATPase 変異型ホロ複合体を再構成した。得られた再構成複合体を方法(2)で述べたアッセイ系で調べてみると、WA 変異型と TR 変異型いずれの複合体も染色体を形成する能力を失っていた。しかし、WA 変異型複合体はクロマチン上にほとんど局在しないのに対して、TR 変異型複合体は野生型と同様クロマチン上に局在しており、ATP 結合と加水分解のステップがコンデンシン I の機能に異なる貢献をしていることが示唆された。

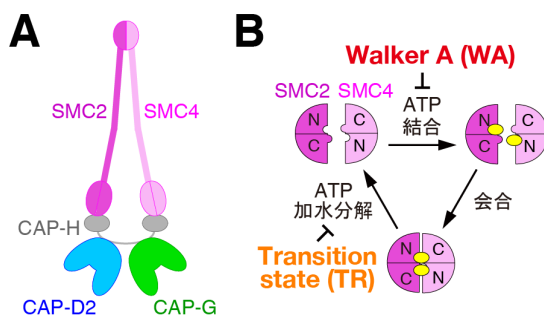


図 1 (A) コンデンシン I の基本構造。(B) SMC2-4 コア二量体のヘッドドメインの会合・解離と ATPase のサイクル。ヘッドドメインは SMC2 と SMC4 それぞれのアミノ (N) 末端側とカルボキシル (C) 末端側の配列から成る。ATP (黄色) の結合と加水分解によってヘッドの会合と解離がそれぞれ起こる。ATP 結合できない変異を Walker A (WA)、加水分解できない変異を Transition state (TR) と呼ぶ。

SMC ATPase の機能をさらに解析するために、方法 (3) で述べた逐次添加法 (sequential add-back assay) による実験を行った。前述したようにこの実験系では、mCherry または EGFP を CAP-H に融合させた二種類の再構成複合体を用いる。まず mCherry 標識した野生型 (wild type: WT) のコンデンシン I ホロ複合体の存在下で正常な染色体を形成させたところに、EGFP 標識した野生型複合体を添加すると、染色体構造が保たれたままで短時間のうちに EGFP 標識複合体が染色体に取り込まれていくことがわかった。この結果から、コンデンシン I が染色体が形成された後もダイナミックにターンオーバーしながら染色体構築の維持に参与していることが示された。さらに今度は、mCherry 標識野生型複合体で形成させた正常な染色体に後から EGFP 標識した TR 変異型複合体を添加すると、興味深いことに染色体構造が崩壊していく様子が観察された (図 3: TR)。すなわち TR 変異型複合体が染色体上で働く野生型複合体に対して強いドミナントネガティブ効果を持つと考えられた。この結果から、コンデンシン I の ATP の加水分解サイクルは染色体の形成のみならず、形成後の染色体の構造維持においても必須であることが示された。

(2) 染色体の軸構造の形成・維持における二つの HEAT サブユニットの役割の解明

コンデンシン I の各サブユニットの役割を調べるため、一つまたは複数のサブユニット

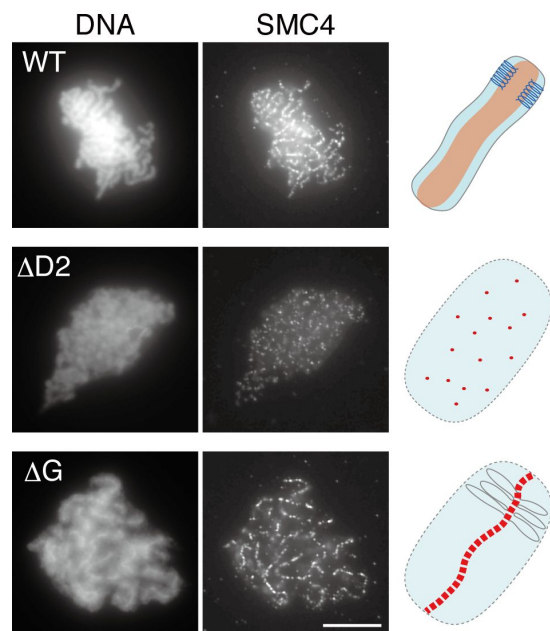


図 2 内在性コンデンシンを免疫除去したカエル卵細胞抽出液に各複合体を添加しクロマチン構造の変化を観察した。右は各条件における一本の染色体の模式図。上段: 野生型 (WT)、中段: $\Delta D2$ 、下段: ΔG 。バーは 10 μm 。

トを欠失させたサブ複合体を再構成した。4種類のサブ複合体 ($\Delta D2$ 、 ΔG 、 $\Delta D2\Delta G$ 、SMC2-4) を内在性のコンデンシンを除去した抽出液に添加すると、いずれも正常な染色体形成を誘導することはできなかった。HEAT サブユニットを欠失した二種類の四量体 ($\Delta D2$ と ΔG) はそれぞれ特徴的な振る舞いを示したため、これらに注目して解析を進めた。まず CAP-D2 を欠く $\Delta D2$ 四量体は、クロマチンの形態変化はわずかに起こるが明確な一本の染色体構造を形成することはできなかった。そしてこの変異型四量体はクロマチン上に点状にランダムに分布していた (図2 : $\Delta D2$)。もう一方の CAP-G を欠く ΔG 四量体は、 $\Delta D2$ とは明らかに異なり、極めて特徴的な異常な染色体構造を形成した。DAPI 染色によると、雲状のクロマチン領域の中心に、より DNA 密度の高い軸様構造が観察される。 ΔG の局在はまさにこの DNA 密度の高い異常な染色体軸上に集中していた (図2 : ΔG)。染色体構築が不完全な状況においても軸構造が独立に形成されるという意味において、この表現型は我々の予想を越えた驚くべき表現型であった。

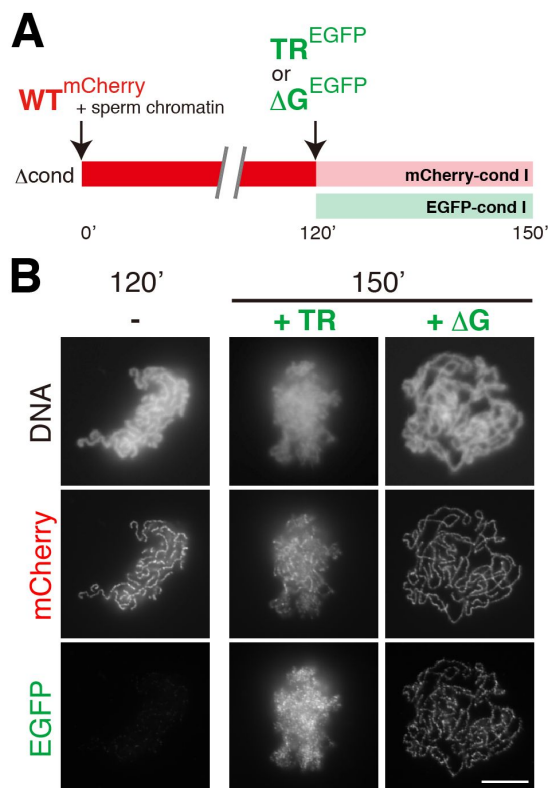


図3 逐次添加法 (sequential add-back assay) による染色体構築変化の観察。(A) カエル卵細胞抽出液 ($\Delta cond$) に二種類の蛍光タグ mCherry および EGFP で標識した複合体を逐次的に添加して染色体の構造変化を追跡・観察した。(B) ATPase 加水分解変異複合体 (TR) は野生型 (WT) が形成した染色体軸を不安定化するのに対し、CAP-G を欠失したサブ複合体 (ΔG) は軸構造を細長く変形 (伸長) させる。

二つの HEAT サブユニットの役割をさらに調べるため逐次添加実験をおこなったところ、 ΔG と $\Delta D2$ は野生型複合体が形成する染色体軸に対してきわめて対照的な効果を及ぼすことがわかった。大変面白いことに、後から添加した ΔG は染色体軸に選択的に取り込まれ、その結果として染色体全体が劇的に伸長した (図3 : ΔG)。一方、 $\Delta D2$ を後から添加すると染色体軸が壊されてしまうことから、 $\Delta D2$ は野生型複合体に対してドミナントネガティブな効果を及ぼしていると考えられた。

以上の結果から、コンデンシン I の作用において、CAP-D2 が染色体軸を安定化させる方向に働くのに対して、CAP-G は染色体軸を不安定化する方向に働くことが示唆された。我々は、この2つの HEAT サブユニットが拮抗して働くことによってはじめてダイナミックな野生型の染色体軸構造を形成・維持できるというモデルを提唱した (図4)。

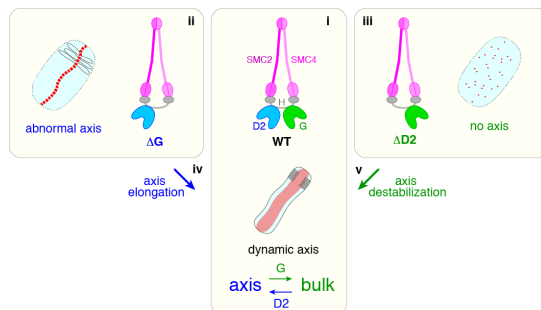


図4 二つの HEAT サブユニットの拮抗作用による染色体軸構造の形成・維持モデル。野生型 (WT) コンデンシン I が形成するダイナミックな染色体軸構造の形成・維持には二つの HEAT サブユニット CAP-D2 と CAP-G が拮抗して働くことが重要である (i)。 ΔG では異常な軸様構造が形成されるが (ii)、 $\Delta D2$ では軸形成が見られない (iii)。 ΔG は野生型軸構造を伸長させる一方 (iv)、 $\Delta D2$ は軸を不安定化する (v)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Kazuhiisa Kinoshita, Tetsuya J. Kobayashi and Tatsuya Hirano. Balancing Acts of Two HEAT Subunits of Condensin I Support Dynamic Assembly of Chromosome Axes. *Developmental Cell*. 査読有、33巻、2015、94-106. DOI: 10.1016/j.devcel.2015.01.034

木下和久、平野達也、コンデンシン I による染色体の軸構造の形成機構、ライフサイエンス 新着論文レビュー、査読無、2015年4月27日、2015、<http://first.lifesciencedb.jp/archives/10028>

〔学会発表〕(計7件)

Kazuhisa Kinoshita. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. International Symposium on "Chromosome Orchestration System". 2016年3月3日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

Kazuhisa Kinoshita. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム、2016年2月9日、一橋講堂(東京都千代田区)

Kazuhisa Kinoshita. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. NIG International Symposium 2016 Japan Q-BIO WEEK. 2016年1月9日、東京大学生産技術研究所(東京都目黒区)

Kazuhisa Kinoshita. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会(BMB2015)ワークショップ「ヘリカルリピートタンパク質の構造特性と細胞内機能」, 2015年12月1日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

Kazuhisa Kinoshita. Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. EMBO workshop on "SMC proteins: chromosomal organizers from bacteria to humans". 2015年5月13日、ウィーン(オーストリア)

木下和久、組換えサブユニットの再構成によるコンデンシン I の分子複合体解析、第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「染色体維持継承の原理解明を目指して」, 2013年12月4日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

木下和久、コンデンシン I の分子解剖：HEAT サブユニットの拮抗作用による染色体軸形成、第31回染色体ワークショップ・第12回核ダイナミクス研究会、2013年11月25日、ホテルおかだ(神奈川県足柄下郡箱根町)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 和久 (KINOSHITA, Kazuhisa)
国立研究開発法人理化学研究所・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