

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657124

研究課題名(和文) 分裂期染色体の表層領域が染色体安定性に寄与する機構

研究課題名(英文) Analysis of the possible contribution of perichromosomal field to the chromosomal stability

研究代表者

高木 昌俊 (Masatoshi, Takagi)

独立行政法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員

研究者番号：60324779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：分裂期染色体の表層領域(perichromosomal fieldの略でPCFと呼ぶ)は、具体的な機能が未知の細胞内領域である。PCFの主成分であるKi67抗原の解析を手がかりに、PCFが細胞分裂期過程の「品質」に関与している可能性を始めて示した。具体的には、PCFがタンパク質脱リン酸化酵素PP1などの因子を適切なタイミングで染色体上に局在させる「場」として分裂期過程の円滑な進行に貢献する可能性と、分裂期染色体の構造を外側から支持する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The outer layer around each mitotic chromosome, which we call PCF for 'perichromosomal field', is a cellular region with unknown functions. Derived from the knowledge obtained from the functional analyses of Ki67 antigen, a major constituent of PCF, we showed the possibility that the PCF might be involved in the 'quality' of the progression of mitosis. The PCF seems to contribute to the efficient progression of mitosis by providing a 'field' for factors such as PP1 gamma; (protein phosphatase 1 gamma;) to localize on mitotic chromosomes in appropriate timing. The PCF might have function also in supporting the structure of mitotic chromosomes from their outside.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：分裂期染色体 分裂期 脱リン酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

分裂期染色体の表層領域 (perichromosomal field を略して PCF と呼ぶ) の機能や重要性を調べる第一歩として、その主成分である Ki67 抗原に焦点をあてた解析を独自に展開してきた。Ki67 抗原を培養細胞から除去すると、細胞分裂期の多様な過程 (染色体の形態形成や整列、紡錘体の形成など) に異常が生じ、染色体不安定性が徐々に蓄積されていくことを見出した。PCF が分裂期過程の「品質」(染色体分離の精度) に積極的に関与することが強く示唆された。また分裂後期において染色体へ急激に集積することが知られている脱リン酸化酵素 PP1 γ について、Ki67 抗原と直接相互作用することを見出した。これにより、PCF が「特定因子を特定のタイミングで染色体上に集積させるための場」として機能している可能性が想起された。また一方で、Ki67 抗原除去細胞における分裂期染色体の形態異常 (比較的軽度) が、コンデンシン複合体との同時除去により著しく亢進することを見出した。これにより、PCF とコンデンシン複合体が染色体構築反応において相補的に機能している可能性が初めて示唆された。これら二つの可能性を掘り下げて研究することで、PCF の機能や重要性の理解に鋭く迫れるのではないかと考えるに至った。PCF に注目した研究を行うことにより、細胞分裂期研究 (特に染色体安定性に関わる研究) の新たな局面を切り拓けるのではないかと期待された。

2. 研究の目的

分裂期染色体の表層領域 (perichromosomal field を略して PCF と呼ぶ) は、具体的な機能が未知の細胞内領域である。本研究では PCF の主成分である Ki67 抗原の機能解析を手がかりに、PCF が分裂期過程の「品質」(染色体分離の精度) に関与することを示し、さらに PCF の作用機序の一端を理解することを目的とした。具体的には、Ki67 抗原の除去により引き起こされる分裂期過程の多様な異常 (染色体の整列異常や凝縮異常、紡錘体の機能異常、染色体不安定性など) を詳細に観察し、その背後にある分子メカニズムを探った。脱リン酸化酵素 PP1 γ などの酵素群を適切なタイミングで PCF に局在化させる機構の解析と、PCF が分裂期染色体構造を外側から支持しているという斬新な可能性の検証に特に注力した。

3. 研究の方法

次項において説明するように、細胞生物学的手法、生化学的手法を主に用いた。また分裂期細胞における複雑な事象を正しく理解するには、生細胞観察技術と観察結果の統計処

理が必須であるので、これらが適切に行えるよう特に注意して研究を行った。

4. 研究成果

(1) Ki67 抗原を除去した培養細胞の観察 ヒト HeLa 細胞 (子宮頸ガン由来細胞) から RNA 干渉法により Ki67 抗原を除去すると、分裂期染色体の整列遅延が見られるものの、多くの場合において一見正常に細胞分裂を果たすことを以前に報告した。つづいて、本研究の予備実験において Ki67 抗原を除去した HeLa 細胞の運命をより長時間にわたり観察したところ、染色体の不等分配や、細胞質分裂の失敗に起因する二核細胞の出現が頻発した。Ki67 抗原は分裂期過程に必須ではないが、染色体分配の「品質」(染色体分配の精度) に関与する可能性が示唆された。この可能性を HeLa 細胞以外の培養細胞においても調べ、現象の普遍性を検討した。さらに Ki67 抗原の除去による効果について、siRNA 耐性になるように変異導入した Ki67 抗原発現ベクターの細胞導入によりレスキューされることを示し、特異性の確認を行った。

(2) 脱リン酸化酵素 PP1 γ が分裂後期への進入とともに PCF へ集積する分子機構 本研究の予備実験において、Ki67 抗原が PP1 γ と直接相互作用することを見出した。本研究ではまず、この相互作用が PP1 γ の細胞内挙動に寄与するのかを解析した。解析には YFP-PP1 γ (蛍光タンパク質 YFP に融合した PP1 γ) を安定発現する HeLa 細胞を用いた。YFP-PP1 γ は分裂後期への進入とともに染色体上に集積するが、この集積は siRNA により Ki67 抗原を除去することにより減弱し、Ki67 抗原を再度補うことにより回復した。PP1 γ と相互作用しない点変異型 Ki67 抗原を補っても回復しなかった。以上により、両者の相互作用が PP1 γ の細胞内挙動に寄与することが確認された。PP1 γ の後期染色体への集積には Repo-MAN タンパク質の寄与が既に示されていた (Trnkle-Mulcahy ら、2006) ので、つづいて Ki67 抗原および Repo-MAN の寄与を定量的に比較し、Repo-MAN がより優位に寄与することが示された。両者には明らかな進化的類縁性が認められ、機能的にも (少なくとも一部は) 相補するものと思われた。

つづいて Ki67 抗原と PP1 γ の相互作用の詳細を生化学的に解析した。分裂後期への進入とともに両者の親和性が増すのではないかと予想されたが、確認には至らなかった。また両者の親和性の調節に関与するリン酸化部位を探索したが、こちらも同定には至らなかった。

(3) Ki67 抗原-PP1 γ の基質探索 Ki67 抗原と

の相互作用を介して染色体局在した PP1 γ (Ki67 抗原-PP1 γ) について、その生理的意義を理解するための第一歩として、特異的基質の探索を行った。具体的には、Ki67 抗原の除去に応じてリン酸化状態が変化する染色体因子の探索を行った。コンデンシン複合体の成分やヒストンなど、染色体構築に密接に関連するタンパク質について特に注目した。リン酸化フォームを認識する特異抗体が入手可能なものについて優先的に調べたが、同定に至らなかった。Ki67 抗原除去による効果を Repo-MAN が相補している可能性が考えられた。

一方で、Ki67 抗原のリン酸化状態が(自らリクルートした) PP1 γ により制御される可能性について以下のように調べた。Ki67 抗原は約 350 kDa の巨大分子であるが、構造の大半を繰り返し構造が占めている。各繰り返し構造に含まれるリン酸化サイト (CDK1 キナーゼによりリン酸化されると予想されるサイト)に注目し、リン酸化型 Ki67 抗原抗体を作製した。これを利用し、Ki67 抗原の繰り返し構造が、分裂期の開始とともにリン酸化され、分裂後期の開始とともに速やかに脱リン酸化されることが示された。内在性 Ki67 抗原を PP1 γ と相互作用できない変異体に置換すると、分裂後期における脱リン酸化のタイミングが著しく遅延した。これにより、Ki67 抗原自身が Ki67 抗原-PP1 γ の基質である可能性が強くと示唆された。Ki67 抗原が決まったタイミングで脱リン酸化されることの生理的意義については、今後の検討が必要である (Ki67 抗原の脱リン酸化タイミングが遅延した場合においても、分裂期染色体の分離や娘細胞における核の再構築に明らかな異常は認められなかった)。

(4)PCF が特定因子を特定のタイミングで濃縮する「場」として機能する可能性の検討 PP1 γ 以外の因子についても、PCF が(あるいは Ki67 抗原が) 高効率かつ適時的に機能するための「場」として機能するのか。一般性を検討するために以下の実験を行った。PCF に局在する因子はこれまで、特異的抗体による細胞染色により偶然見出されることが多かったが、最近までに行なわれた分裂期染色体因子の網羅的プロテオミクス解析および GFP 融合タンパク質を利用した局在解析 (Ohta ら、2010)により、そのリストが充実した。また本研究で、抗 Ki67 抗原抗体を用いて分裂期細胞抽出液からの免疫沈降および沈降物の質量分析による同定を行い、上記リストにはない複数の因子についても PCF に局在する可能性が示唆された。

これらの因子の幾つかについて、実際に PCF 局在することを確認した。さらに局在タ

イミングや、Ki67 抗原に依存して局在するのかを調べた。驚くべきことに、非常に多くの因子が Ki67 抗原に依存して PCF 局在した。解析した因子の機能は多岐に渡っており、PCF が多くの反応の微調整にかかわる重要な「反応場」である可能性が改めて示唆された。

(4) PCF が分裂期染色体の構造を外側から支持している可能性の検討 培養細胞から Ki67 抗原とコンデンシン複合体を同時除去すると、分裂期染色体の形態に著しい異常が生じることを見出した。どちらか一方の除去では(一見)正常な染色体が構築されることから、Ki67 抗原はコンデンシン複合体と相補的に機能していると考えられた。コンデンシン複合体が染色体構造を内側から支持するのに対し、Ki67 抗原は外側から(つまり、これまでの知見では全く予見されていない方法で)染色体構造を支持するものと予想された。Ki67 抗原とコンデンシン複合体の相対的な役割を調べることで、分裂期染色体凝縮機構の理解が得られると予想された。そこで本研究では第一に、各因子の時空間的な関係性(位置関係、局在の相互依存性など)を解析した。また各因子の機能的な関係性を明らかにするために、Ki67 抗原、コンデンシン複合体 I 型、II 型について、単独の除去、二因子ずつの除去、三因子の除去により導かれる染色体形態を比較した。各因子は柔軟に機能相補しており、明確な染色体形態異常は三因子除去によってのみ観察された。また染色体形態の評価について定量性のある方法を模索したが、十分な成果を得られなかった。

Ki67 抗原はどのような機構で染色体構造を変換するのか? Ki67 抗原の C 末領域 (LR ドメインと呼ぶ) に活性の本体があること、また LR ドメインが HP1 (heterochromatin protein 1) タンパク質に直接相互作用すること (Takagi et al., 1999; Kametaka et al., 2005)などを以前に示したが、具体的な機構は未知である。LR ドメインの生化学的性状の解析や立体構造解析が望まれるが、本研究では(当初の計画どおり)取り組まなかった。これらに対する今後の取り組みと、本研究における知見とを有機的に組み合わせ、分裂期染色体構造構築の未知局面に迫りたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Booth, D., Takagi, M., Sanchez-Pulido, L., Petfalski, E., Vargiu, G., Samejima, K., Imamoto, N., Ponting, C., Tollervey, D., Earnshaw, W., and Vagnerelli, P.. Ki-67 is a PP1-interacting protein that organizes the mitotic chromosome periphery. eLife, 査読有り、

2014;3:e01641.

DOI:<http://dx.doi.org/10.7554/eLife.01641>

41

Takagi, M., and Imamoto, N.. Control of Nuclear Size by NPC Proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 査読無し、Vol. 773, 2014, pp. 571-591.

DOI: 10.1007/978-1-4899-9032-8_26

〔学会発表〕(計2件)

高木 昌俊、Ki67 抗原により染色体表層領域へリクルートされる PP1 γ の役割、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸ポートアイランド

高木 昌俊、Ki67 抗原により染色体表層領域へリクルートされる PP1 γ の役割、第30回染色体ワークショップ、2012年12月20日、淡路夢舞台国際会議場

〔その他〕

今本細胞核機能研究室ホームページ

<http://www.riken.jp/celldynamics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 昌俊 (TAKAGI, Masatoshi)

独立行政法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員

研究者番号：60324779