

## 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：2013～2015

課題番号：25440184

研究課題名(和文)コンデンシンIIを介した染色体複製と凝縮の連係メカニズム：脆弱部位を中心に

研究課題名(英文)Linkage between DNA replication and chromosome assembly mediated by condensin II: focusing on chromosome fragile sites

## 研究代表者

小野 教夫 (Ono, Takao)

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：20291172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：コンデンシンIIは分裂期染色体の凝縮過程で中心的な役割をもつ一方で、S期のうちに複製が完了した姉妹染色分体の分割を開始する。これはコンデンシンIIが染色体の複製と凝縮を連係する因子であることを示す。この連係の分子メカニズムを解明するため、複製ストレス存在下で染色分体の断裂が観察されやすい染色体脆弱部位(CFS)におけるコンデンシンIIの役割を解析した。解析の結果、コンデンシンIIはCFSにおける染色分体の断裂を抑制する役割を持たなかったが、適切な分離に必要な分岐型複製中間体の除去過程で働く、相同組換えヌクレアーゼの適切な局在に貢献していた。この機能は特にセントロメアで重要性が大きかった。

研究成果の概要(英文)：Condensin II plays a central role in the process of mitotic chromosome condensation, and initiates resolution of replicated regions of chromosome s (sister chromatids) during S phase. This indicates that Condensin II is a critical factor that links chromosome duplication to condensation. To clarify the molecular mechanisms of this linkage mediate by condensin II, the role of condensin II in chromosome fragile sites (CFS), where chromatid breaks/gaps are continually observed under the presence of replicative stress, was examined in the present study. Cytological and cytogenetic assays, however, revealed that condensin II does not suppress the incidence of chromatid breaks/gaps. Alternatively, it is found that condensin II contributes to the appropriate localization of nucleases required for the process of removing a branch type replicative intermediates. This feature was evident in the process of separation in the centromeric regions under the absence of condensin II.

研究分野：細胞遺伝学、細胞生物学

キーワード：コンデンシンII 染色体脆弱部位 複製ストレス 染色体凝縮 セントロメア 分岐型複製中間体 相同組換え 間期核ブリッジ

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核細胞において、娘細胞への正確な遺伝情報の分配には、S 期で複製された染色体の適切な凝縮が必要である。この過程で中心的な役割を担っているのがコンデンシン I と II と呼ばれるタンパク質複合体である。特にコンデンシン II は細胞周期を通じて核に局在し、コンデンシン I よりも早い時期から染色体凝縮に関わっている。このことから、コンデンシン II は間期から何らかの役割を持つことが予想されてきた。本研究を開始する前には、小頭症の責任タンパク質 MCPH1 が、分裂期以前からコンデンシン II の制御因子として機能することが見いだされた (Yamashita D, et al. J Cell Biol., 2011)。

(2) さらに申請者は、間期核におけるコンデンシン II は、複製を終えた染色体領域に S 期のうちに結合を開始して、姉妹染色分体を互いに引き離す役割 (分割) をもつことを明らかにしていた。 (Ono et al., J Cell Biol., 2013)。興味深いことに、この S 期から始まる分割は複製が弱く攪乱される (複製ストレス) 条件下では、分裂期染色体の凝縮と分離に必須であった。これらの知見から、コンデンシン II は複製に障害が起こった場合でも適切に染色体凝縮を行えるように、この 2 つの過程を連係する役割を持つことが予想された。

2. 研究の目的

コンデンシン II の S 期における働きは複製後の姉妹染色分体を分割することであり複製ストレス存在下で顕在化するという結果から、複製ストレスに感受性の高い染色体領域ではコンデンシン II の重要性が増すのではないかと推測した (図 1)。その第一の候補として挙げられるのは染色体脆弱部位 (common fragile site [CFS]) である。この領域では複製ストレス存在下で分裂期染色分体の断裂 (break または gap) が高頻度で観察される (CFS の発現と呼ばれる)。この異常は姉妹染色分体の複製が完了していないまま凝縮と分離が開始してしまうために起こると考えられている。

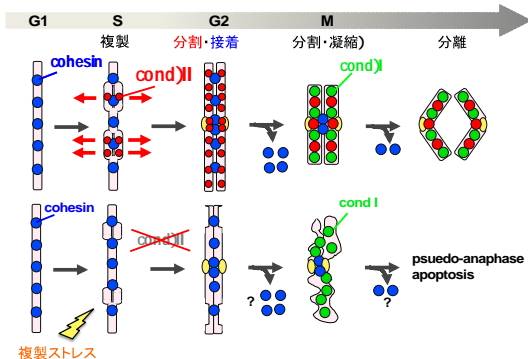


図 1. コンデンシンIIによる分割は複製ストレス存在下での染色体凝縮と分離において重要性が増す。

本研究では、先に明らかにしたコンデンシン II による姉妹染色分体の分割機能が、この

CFS における凝縮や分離にどのような貢献をしているのか、そして、染色体異常の発生とどのような関係があるのかを明らかにすることを目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) CFS の発現: CFS に見られる形態異常は低張処理 (0.075M KCl) とカルノア固定 (メタノール 3 : 酢酸 1) による細胞遺伝学的手法による標本を用いた。固定およびスライドガラスへの展開後に DAPI 染色を行い、顕微鏡下で染色パターンから各染色体を識別・同定した。染色分体の染色が非連続的な領域を断裂として、各条件下での断裂の頻度を解析した。複製ストレス実験では aphidicolin を 0.1 mg/ml ~ 1mg/ml の範囲で適宜加えた。複製ストレスに関する手法は Ono et al. (2013) に従っている。siRNA ノックダウン実験では、RPE-1 細胞は非同調で培養し、1 回ないし 2 回のトランスフェクションを行った。

(2) FISH 解析: FISH 解析には上述のカルノア固定標本を用いた。DNA プロブには各染色体部位に特異的な BAC clone を用いた。平均的な insert 長は約 150 kbp である。これらの BAC clone を biotin-dUTP でラベルしたのち標本と hybridization させ avidin-FITC で検出、もしくは Cy3-dUTP で直接蛍光ラベルした。FISH 標本は DAPI で対比染色したのち、染色分体断裂の有無と姉妹染色体での FISH シグナルの状態を解析した。シグナルが対となる 2 個からなる場合には分割・分離していると判断した。1 個の場合は未複製もしくは未分割・未分離と判断した。

(3) 免疫染色と顕微鏡観察: 免疫染色のためには細胞は PBS の buffer 背景で 2% PFA 固定を行った。0.5% triton X-100 による膜処理の後、対象となるタンパク質に対する一次抗体を反応させ、次に蛍光ラベルした二次抗体を反応させてシグナルを検出した。FISH および免疫染色における顕微鏡観察は DeltaVision にて行い、画像を deconvolution で鮮明化した。画像は目的に応じて 2 から 10µm の範囲で projection した。

4. 研究成果

(1) HeLa 細胞と RPE-1 細胞における CFS の発現の違い: CFS は複製ストレス存在下で染色分体の断裂 (break/gap) を示すが、その頻度は CFS 間で異なる。また、細胞株ごとにも出現頻度が異なることが知られている。そこで解析に適した CFS を選択するため、一般によく用いられている 2 つのヒト細胞 (HeLa と RPE-1) で 3 つの CFS (FRA1L: 1p31.1, FRA3L: 3q13.3, FRA6E: 6q26) の発現を形態学的手法によって比較した。その結果、FRA1L と FRA6E では RPE-1 細胞でより高い発現が見られる一方、FRA3L では HeLa 細胞でより高い発現が見られることが

分かった。ヒト1番染色体は形態学的に識別しやすいことから、本研究では RPE-1 細胞の FRA1L を中心に解析を進めることにした。

(2) CFS の発現にコンデンシン II が関与する可能性の検討：コンデンシン II は M 期に入る前から複製を完了した姉妹染色分体の分割を開始している。この働きは複製ストレス存在下で顕在化すること (Ono et. al., 2013) から、姉妹染色分体の分割の遅れが CFS の発現を促進するのではないかという作業仮説を立てた。そこで、siRNA によってコンデンシン II をノックダウンした RPE-1 細胞の FRA1L における断裂の頻度を解析した。その結果、コンデンシン II ノックダウン細胞では、僅かに断裂が増加したものの、その頻度はコンデンシンをノックダウンしていない RPE-1 細胞を複製ストレス条件下に置いた場合に比べて有意に低かった(図2)。したがって、コンデンシン II の除去は CFS の発現を大きく促進しないと考えられた。ここでは、コンデンシン II 除去と複製ストレスの共存は染色体全体が大きく膨潤化し prometaphase のまま細胞周期が進まないため (Ono et. al., 2013) CFS の発現を解析することはできなかった。

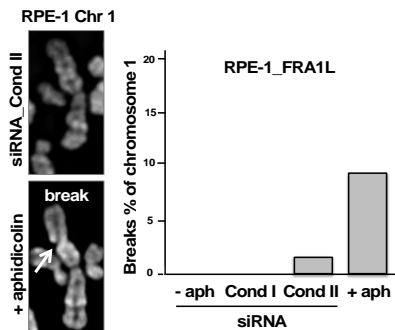


図2. コンデンシンIIの除去はCFSの発現を大きく促進しない。

(3) コンデンシン II 除去によるセントロメア領域の分離異常の解析：コンデンシン II が CFS の発現(染色分体の断裂)に関与する可能性は低いことを示す結果の一方で、コンデンシン II を siRNA でノックダウンすると後期において、多くの染色体ブリッジやラギング染色体が見られることに加え、DNA 染色では見えない微細な染色体ブリッジが出現することが分かった。このブリッジ(Ultrafine bridge [UFB])を、Bloom 症候群の責任タンパク質である BLM ヘリケースに特異的な抗体で検出したところ、コンデンシン II を除去した RPE-1 細胞ではセントロメア領域が完全に分離せず、それらのセントロメア間をつなぐ UFBs が形成されていることが分かった(図3A)。コンデンシン I の除去や複製ストレス存在下でも UFBs は誘導されるが、その多くは染色体腕に形成されることからセントロメア領域を巻き込んだ UFBs はコンデンシン II の除去に特異的ではないかと考えられた。興味深いことに、コンデンシン

II は分裂期染色体においてセントロメア領域 (CENP-A と重なる領域)に強く集中することからも、この領域におけるコンデンシン II の重要性が示された。

(4) 間期において見られたセントロメア領域の形態異常：コンデンシン II を除去した RPE-1 細胞は、分裂を終えた間期において形態的に識別可能な“間期ブリッジ”を形成することが示された(図3B)。このブリッジには免疫染色でセントロメア領域を含むことが示された。さらに、BLM は排除されていたが、二本鎖 DNA 切断の指標となる  $\gamma$ H2A.X が集中していた。また、同様に、セントロメア領域を含み  $\gamma$ H2A.X 陽性の微小核も多く観察された。この“間期ブリッジ”は細胞が S 期に入る時期でも残っており、コンデンシン II ノックダウン細胞は次の分裂期には入らなかった。これらの結果は、分裂期に分離されずに残ったセントロメア領域の DNA は、次の間期においてヌクレアーゼによって切断されるが完全に修復されることはなく、元の核に収まらない染色体は微小核を形成すると思われた。

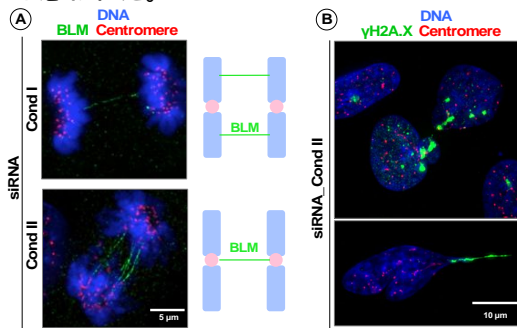


図3. コンデンシンIIノックダウンはセントロメア領域を含んだ分離異常を引き起こす。

(5) コンデンシン II による分岐型複製中間体の除去の可能性：ここまでの解析結果から、コンデンシン II は CFS の発現には直接関与しない一方で、セントロメア領域の分離に大きく貢献していることが分かった。さらに、コンデンシン II を除去したときには、BLM ヘリケースによる(相同組換えに依存しない)修復機構が主に働いている可能性が示された(図4)。

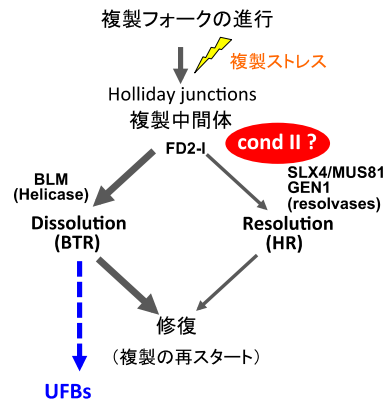


図4. 複製ストレス存在下において予想されるコンデンシンIIの相同組換えへの関与。

加えて、間期ブリッジ”はヌクレアーゼによる切断を受けている可能性はあるが、正しく修復されずに残ってしまうものが多いと予想できる。したがって、コンデンシン II を除去すると、複製中に生じた分岐型複製中間体を除去するための機構のうち、相同組換え (Homologous recombination:HR) による“resolution”の経路に障害が起こり、BLM による“dissolution”経路による修復が多くなること、しかし、セントロメア領域は“resolution”の経路では修復を完全に終えることができないこと、さらに、間期での HR による修復にも何らかの障害が起こっている可能性が考えられた。

(6) 相同組換え関連ヌクレアーゼ GEN1 とコンデンシン II の除去による重篤な染色体異常：相同組換えによる“resolution”と、BLM ヘリケースによる“dissolution”にコンデンシン II がどのように関与しているのかを明らかにするため、それぞれの経路に関与する因子とコンデンシン II のノックダウンを組み合わせたときの、分裂期染色体の形態異常を解析した (図5)。

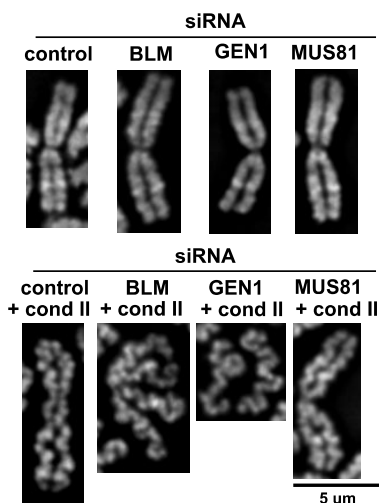


図5. コンデンシンIIの除去によって相同組換えに関与するヌクレアーゼの働きが攪乱される可能性がある。

BLM および HR に関与する GEN1、MUS81 を単独で siRNA を用いてノックダウンしても、染色体形態には異常は見られなかった。コンデンシン II をノックダウンすると、これまでの報告と一致して染色体腕がジグザグになった染色体が見られた(Ono et al., 2003)。BLM とコンデンシン II を同時に除去するとさらに腕が開いた染色体が形成された。この条件にさらに GEN1 や MUS81 の除去を加えると染色体腕は閉じることから、BLM の除去によってヌクレアーゼによる HR 経路が優勢になることが確かめられた。一方、ヌクレアーゼのうち MUS81 の除去はコンデンシン II を同時に除去しても大きな変化は認めなかった。しかし、GEN1 とコンデンシン II の同時除去はセントロメアが解

離し、さらに腕の屈曲が進行した特徴的な形態異常を示した。このうち解離したセントロメア間には、 $\gamma$ H2A.X のシグナルが見られた。以上の結果から、コンデンシン II を除去するとセントロメア領域で MUS81 などのヌクレアーゼが過剰に働く可能性が示唆された。しかし、細胞周期解析では GEN1 とコンデンシン II を同時に除去すると G1 期に停滞する細胞が多く、実際に解析出来た分裂期細胞が十分にノックダウンされているかという問題が残った。

(7) 間期における MUS81 の適切な局在とコンデンシン II の役割の解析：前項の問題を受けて、コンデンシン II を除去した細胞をもちいて間期における MUS81 の局在を解析した。その結果、コンデンシン II 存在下で複製ストレスを与えると、MUS81 は複製フォークの停滞のマーカーとなる FD2 と良く共局在して foci を形成した。この foci は後期複製部位に多く観察され、特に不活性 X 染色体には大きなシグナルが観察された。その一方で、コンデンシンを除去すると複製ストレスを与えても、MUS81 は FD2 と共局在が認められず、核全体にぼんやりとした弱いシグナルが観察されるのみであった(図6)。この結果は、間期核において MUS81 が障害のある DNA 領域へ適切に局在するためには、コンデンシン II が必要あることを示唆している。MUS81 は“resolution”の経路で GEN1、SLX4 とともに働いていることが知られているが、コンデンシン II の無い条件では、セントロメア領域で異常に働くヌクレアーゼの候補として挙げられる。

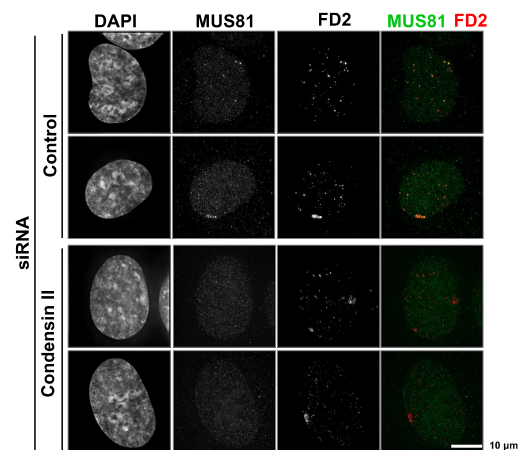


図6. コンデンシンIIのノックダウンすると間期核内におけるMUS81ヌクレアーゼの局在が不明瞭になる(複製ストレス存在下)。

(8) 結論：今回の研究では、当初の予想とは異なり、コンデンシン II が CFS の発現、すなわち染色分体の断裂には直接関与しないことが明らかになった。しかし、コンデンシン II を除去したときにセントロメア領域に起こる分離異常が BLM ヘリケースによって修復されようとしていることと、相同組換えに関連するヌクレアーゼがコンデンシン II の除去によって適切に機能しなくことを明

らかにした。このなかで MUS81 はコンデンシン II によって間期での適切な局在にコンデンシン II が貢献していることを示す結果を得た。このように本研究結果から、コンデンシン II が複製ストレス存在下で相同組換え(HR)に関わる因子(ヌクレアーゼ)の制御に貢献している可能性が初めて示された。

#### <引用文献>

Yamashita D, Shintomi K, Ono T, et al., MCPH1 regulates chromosome condensation and shaping as a composite modulator of condensin II, J Cell Biol.,194 巻,2011, 841-854  
Ono, T., Yamashita, D. and Hirano T., Condensin II initiates sister chromatid resolution during S phase, J Cell Biol.,200 巻,2013, 429-441  
Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, MP., Neuwald, AF. and Hirano, T., Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells, Cell, 115 巻、 2003、 109-121

#### 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)

小野教夫、西出賢次、平野達也、分裂期を超えたコンデンシン II の多様な役割、実験医学、査読無、31 巻、2013、2586-2591 (この特集号の表紙への写真提供、ISBN 978-4-7581-0120-2)

##### [学会発表](計3件)

小野教夫、平野達也、コンデンシン II による染色体複製と分離の機能連係、日本人類遺伝学会第 58 回大会、江陽グランドホテル(仙台) 2013 年 11 月 20 日~11 月 23 日

Ono, T. and Hirano, T. Diverse functions of condensin II through the cell cycle, The 5<sup>th</sup> Asian Chromosomes Colloquium, Bangkok(Thailand), 2015 年 4 月 29 日~4 月 30 日(Invited lecture)

小野教夫、平野達也、コンデンシンがつくる染色体軸の特性：可逆的再組織化アッセイを用いた解析、第 33 回染色体ワークショップ、松島温泉湯元松島一の坊(宮城県松島町) 2016 年 1 月 12 日~1 月 14 日

##### [その他]

ホームページ等

フリー百科事典ウィキペディア

染色体 <https://ja.wikipedia.org/wiki/コンデンシン>

姉妹染色分体

<https://ja.wikipedia.org/wiki/姉妹染色分体>

染色体凝縮

<https://ja.wikipedia.org/wiki/染色体凝縮>

コンデンシン

<https://ja.wikipedia.org/wiki/コンデンシン>

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

小野 教夫(ONO, Takao) 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：20291172