

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440012

研究課題名(和文) 精製タンパク質を用いた分裂期染色体の試験管内再構成

研究課題名(英文) Reconstitution of mitotic chromosomes with purified factors

研究代表者

新富 圭史 (Shintomi, Keishi)

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・研究員

研究者番号：60462694

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)：細胞が分裂する際、ゲノムDNAは種々のタンパク質とともに「分裂期染色体」の中に収納され娘細胞へと伝達される。染色体の基本構造単位はコアヒストンの8量体にDNAが巻きついたヌクレオソームであるが、この構造が染色体構築にどのような貢献をするのか殆どわかっていない。この根源的な疑問を解くために、本研究では、精製タンパク質やカエル卵抽出液を使って試験管内で染色体を作るという独自の方法を考案した。解析を行った結果、ヌクレオソームがなくても染色体の中心となる軸構造が作られるものの、よりコンパクトな染色体が作られるにはヌクレオソームとコンデンシンの協調的作用が不可欠であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The nucleosome is the fundamental structural units of eukaryotic chromatin. Immediately before cell division, duplicated nucleosome fibers are organized into a pair of rod-shaped structures within a mitotic chromosome. However, it remains unclear whether nucleosome assembly is indeed an essential prerequisite for mitotic chromosome assembly. To settle this naive question, I have established chromosome reconstitution system with a minimum set of purified proteins and the cell-free chromosome assembly assay made from frog eggs. A substantial set of our results convincingly indicates that, although formation of chromosome axes does not rely on nucleosomes, functional interaction between nucleosomes and the multi-protein complexes termed condensins is required for assembly of fully compact chromosomes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：染色体 ヒストン ヌクレオソーム コンデンシン 再構成 カエル卵無細胞系

### 1. 研究開始当初の背景

染色体はあらゆる生命現象の根本に位置する細胞内構造である。19世紀後半には、光学顕微鏡を用いた染色体の観察が行われるようになり、その形態が細胞周期の進行に応じてダイナミックに変化することが知られるようになった。その後、分裂期に観察される染色体凝縮は、遺伝情報の正確な分配に不可欠なプロセスと考えられてきたが、その分子メカニズムにアプローチする手がかりが得られたのは最近20年余りのことであった。

染色体研究に大きなブレイクスルーをもたらしたアプローチのひとつに、カエル卵抽出液の無細胞系が知られている (Lohka & Masui, 1983, *Science*)。この系を用いて、

型 DNA トポイソメラーゼ (トポ ) とコンデンシン が凝縮に必須であることが見いだされたばかりでなく (Adachi et al, 1991, *Cell*; Hirano et al, 1997, *Cell*)、本計画の研究代表者の解析によって、2種類のコンデンシン ( と ) の機能の違いが明確化されるまでに至った (Shintomi & Hirano, 2011, *Genes & Development*)。しかし、いまだ染色体凝縮に必要なかつ十分な因子のリストが完成している訳ではなく、最も代表的な染色体構成タンパク質であるヒストンの役割にいたっては、解析に適切な実験方法すら確立されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的のひとつは、精製タンパク質を用いて染色体を試験管内に再構成するという独創的な方法論を確立し、染色体構成タンパク質が凝縮を実現するメカニズムの理解を目指すことにあった。このような再構成が実現すれば、性状の良くわかった限られた種類の因子だけを解析対象とすればよいので、染色体凝縮のように、一見すると複雑な細胞内現象の背後にある本質的な分子機能のつながりだけを抽出することが容易になる。また、ある現象のみに焦点を絞って解析できるので、多様な現象に関与するタンパク質の機能解析にも大きな威力を発揮すると期待された。特に、本計画では、上記のような再構成系の特徴を活かして、染色体の基本構造単位であるヌクレオソームがどのようにして分裂期染色体凝縮に貢献するのか、また、分裂期に特徴的な多種多様なタンパク質のリン酸のうちどのリン酸化が最も重要なのかという、根源的な問題を解決することを試みた。さらに、ヌクレオソームの機能をより詳細に検討するためには、その構成タンパク質であるコアヒストンを精密に操作できる実験系の開発も急務であると考えた。そうした試みのひとつとして、従来から知られているカエル卵抽出液の無細胞系を改良することにも挑戦した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 精製タンパク質を用いた染色体の再構

#### 成法の確立

精子クロマチンを分裂期のアフリカツメガエル卵抽出液中でインキュベートすると、分裂期に特徴的な繊維状の構造 ( 細い単一染色分体が絡まったもの ) が作られる。本研究では精製タンパク質のみを使ってこの繊維状構造を再構成することを当面のゴールとした。この染色体を構成する主要タンパク質を調べると、( 卵抽出液中におよそ 10,000 種類のタンパク質が存在するのは対照的に ) その種類は驚くほど少なく、ヒストン、トポ II、コンデンシン I のみが傑出している。さらに重要なことに、卵抽出液から除去した際に染色体凝縮過程が著しく阻害される因子は、トポ II とコンデンシン I 以外に知られていなかった。一方、( 直接的な証明はなされていないものの ) ヌクレオソームを構成するコアヒストンも必要であることは想像に難くなかった。したがって、コアヒストン、トポ、コンデンシン の精製タンパク質をゲノム DNA と適切に相互作用させることができれば、染色体再構成に向けて大きな第一歩になるのではないかと予想した。

ゲノム DNA を含む出発材料として用いるアフリカツメガエルの精子クロマチンは、プロタミンに加えて十分な量のコアヒストン H3-H4 を含んでいる。この精子クロマチンからプロタミンのみを除去してヌクレオソームを作るには、ヌクレオプラスミンと Nap1 という 2 種類のヒストンシャペロンを H2A-H2B とともに加えれば十分であった。この反応はわずか 2-3 分間で完了し、同時に高度にパッキングした精子クロマチンの形状は大きく膨潤する。このようにして得られた構造を染色体再構成のための基質とした。一方、トポ II は酵母由来のリコンビナントタンパク質を精製し、コンデンシン I は分裂期卵抽出液からアフィニティー精製した。しかし、上記のクロマチン基質にトポ II とコンデンシン I の精製標品を ATP と共に加えても、繊維状構造は形成されなかった。すなわち、上記の 5 種類のタンパク質因子 ( H2A-H2B、ヌクレオプラスミン、Nap1、トポ II、コンデンシン I ) 以外にも必要な因子があることが示唆された。そこで、卵抽出液を生化学的に分画して 5 種類の因子と混合し、どのフラクションに繊維状構造を再構成する活性が検出されるかを調べた。

#### (2) ヌクレオソームの除去を可能にする新規無細胞系プロトコルの確立

意外にも、ヌクレオソームが染色体凝縮にどのように貢献するのかというナイーブな問題について、これまで十分な検討がなされてこなかった。その要因のひとつとして、染色体に含まれるヒストンを自在に操作する実験法がなかったことが挙げられる。例えば、染色体研究の最も有力な実験系のひとつであるカエル卵抽出液の無細胞系においても、従来のプロトコルでは、( 上記のとおり ) ヒ

ストン H3-H4 を含むカエルの精子クロマチンを基質として用いるため、ヒストンに施せる操作は極めて限られていた。こうした実験上の制約を克服するために、ヒストンをほとんど含まないマウスの精子クロマチンを無細胞系に導入できないかを検討した。実際に、マウス精子由来のクロマチンを調製し、それをカエル卵抽出液でインキュベーションしたところ、ヒストンやコンデンシンなどカエル卵由来のタンパク質が取り込まれ、やがてロッド状の染色体が形成できることを確認した。この反応において、Asf1 というヒストンシャペロンタンパク質が、マウス精子由来のクロマチンへのヒストンの取り込みに中心的な役割を果たすと予想されたので、カエル卵抽出液から Asf1 を除いた時の影響を詳細に解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 精製タンパク質を用いて染色体は再構成できる。

染色体再構成にはわずか 6 種類の精製タンパク質で必要かつ十分である：先に述べた方法で、未同定因子を探索した結果、最終的に絞り込まれたフラクションは、おもにヒストンシャペロン FACT を構成する Spt16 と Ssrp1 という 2 つのタンパク質を含んでいた。このフラクションの染色体再構成を促進する活性はリコンビナント FACT で置き換えることができた。以上の結果から、精子クロマチンにたった 6 種類の因子（ヒストン H2A-H2B, ヌクレオプラスミン, Nap1, FACT, トポ II, コンデンシン I）を加えることで染色体を再構成できることがわかった(図 1)。

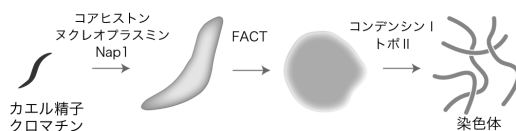


図 1. 染色体再構成系におけるクロマチンの形態変化

また、この染色体再構成系に H2A-H2B を加えない場合には、H3-H4 のみを含む膨潤したクロマチンが作られた。このクロマチン上には、トポ II やコンデンシン I が結合するにもかかわらず、繊維状構造への変化が起こらなかった。この結果は、ヒストン 8 量体からなるヌクレオソームの形成が染色体構築の必要条件であることを初めて明確に証明したものと見える。

染色体を構築するためには動的なヌクレオソームの形成が重要である：厳密には、再構成に成功した上記の実験では、改変型のヒストン H2A-H2B を用いた。すなわち、初期胚型のバリエーション H2A.X-F とカノニカル H2B (バリエーションではない標準的な H2B) の両者の N 末端のヒストンテイルを欠いたものを用いた。これ組み合わせを、カノニカル H2A を含

む様々なリコンビナント H2A-H2B (N 末端欠失型および全長型) で置き換えてもポジティブな結果が得られなかった。これらの結果から、ヌクレオソーム内で DNA との相互作用部位に位置する H2A.X-F の C 末端領域が再構成反応に重要であると考えられた。さらに、近年報告された FACT の構造解析や H2A.X-F の C 末端は他の H2A と比べて長く酸性アミノ酸を含むことを併せて考えると、このバリエーションと FACT の組み合わせは、ヌクレオソームの不安定化に寄与することによりトポ II やコンデンシン I が働くために適した場を与えている可能性が示唆された。

染色体構築において最も重要な分裂期特異的制御は Cdk1 によるリン酸化である：染色体再構成に用いた精製タンパク質のうち 5 種類はリコンビナントタンパク質であり、細胞周期特異的な修飾を受けていない。唯一の例外は、コンデンシン I であり、これは「分裂期」のカエル卵抽出液から精製したものである。この分裂期型コンデンシン I を間期型コンデンシン I に置き換えた混合液では、染色体を作ることができなかった。そこで、この間期型コンデンシン I を含む混合液に、分裂期キナーゼを加えたときの影響を調べた。驚くべきことに、分裂期のマスターキナーゼであるサイクリン B-Cdk 1 を加えただけで、コンデンシン I のサブユニットがリン酸化され、繊維状構造ができた。一方、染色体上で多くの基質をリン酸化することが知られるオーロラ B を加えても、繊維状構造はできなかった。したがって、6 種類の因子のうち分裂期特異的な制御を受けるターゲットはコンデンシン I のみであり、しかも Cdk1 によるリン酸化が染色体再構成に必要なかつ十分であると結論された。

ここまでの成果を雑誌論文として発表した。

(2) カエル卵無細胞系ではヌクレオソームがなくても染色体様構造が構築できる。

ヌクレオソームがないと染色体が脆弱になる：ヒストンシャペロン Asf1 を除いた卵抽出液中でマウスの精子クロマチンをインキュベートすると、ヒストンのクロマチンへの取り込みが完全に阻害されることを確かめた。興味深いことに、このヌクレオソーム形成が起こらない条件下でも、DAPI で強く染色される軸を持つ染色体様構造が形成された。上記のとおり、精製タンパク質を用いた染色体再構成の実験結果からヌクレオソームは染色体構築に不可欠であると結論されていたので、この実験で比較的軽微な異常しか観察されないことは一見矛盾するよう思われた。しかし、このヌクレオソームを欠く染色体様構造は、ヌクレオソームを含む通常の染色体と比べると、高い頻度で DNA 損傷が起きている可能性が示唆され、ヌクレアーゼの攻撃に対する感受性が極めて高いなど、

構造的に脆弱であることを示す結果が得られた。

染色体構築にはヌクレオソームとコンデンシンの機能的相互作用が重要である：染色体構築過程におけるヌクレオソームの役割をより深く理解するために、ヌクレオソームを欠く染色体様構造に特徴的な軸構造に注目して解析を進めた。2種類のコンデンシンの局在を詳細に調べると、ヌクレオソームを欠く染色体様構造ではコンデンシンはもっぱら軸に局在していたが、コンデンシンは軸とその周囲に広がったクロマチンループの両方に観察された。一方、Asf1とコンデンシンを同時に除去しても、コンデンシンは軸に観察されるのに対し、Asf1とコンデンシンを除去すると、コンデンシンの軸局在は見られなくなり、クロマチン全体がきわめて不明瞭な形状になった。これらの結果より、「染色体軸の形成」は必ずしもヌクレオソームを必要とせず、主にコンデンシンの作用によって促進されると考えられた。一方、「クロマチンループの凝縮」は、主にヌクレオソームとコンデンシンIによって促進されるようだ(図2)。ヌクレオソームはコンデンシンIが効果的に機能するためのプラットフォームになっていると考えれば、染色体再構成実験で得られた結論とも矛盾しない。さらに、このモデルは、実際の細胞内で分裂期の初期(前期)にコンデンシンIがクロマチンに結合し始め、核膜崩壊後に(前中期以降に)コンデンシンIが染色体に集積するという観察とも一致する。

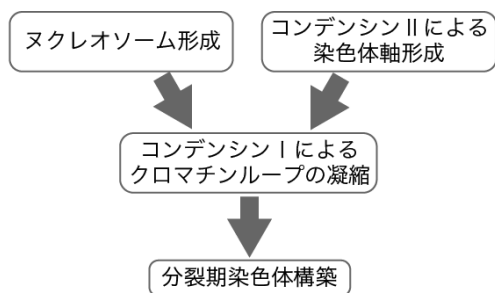


図2. ヌクレオソームとコンデンシンの機能的相互作用

本研究で確立した無細胞系の新しいプロトコル(マウス精子クロマチンとAsf1を除去した卵抽出液を組み合わせたもの)は、分裂期染色体の構築過程に限らず、クロマチン上で起こるあらゆる現象とヌクレオソームとの連関を詳細に検討するためには、極めて有用な方法となるポテンシャルを秘めたものと言える。

ここまでの成果を雑誌論文として発表した。

## 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 3 件)

Keishi Shintomi, Fukashi Inoue, Hiroshi Watanabe, Keita Ohsumi, Miho Ohsumi, Tatsuya Hirano (2017). Mitotic chromosome assembly despite nucleosome depletion in *Xenopus* egg extracts. *Science* (掲載決定). 査読有 DOI: 10.1126/science.aam9702

Keishi Shintomi, Tatsuya Hirano (2017). A sister chromatid cohesion assay using *Xenopus* egg extracts. *Methods in Molecular Biology*, 1515: 3-21. 査読無 DOI: 10.1007/978-1-4939-6545-8\_1

Keishi Shintomi, Tatsuro S. Takahashi, Tatsuya Hirano (2015). Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors. *Nature Cell Biology*, 17: 1014-1023. 査読有 DOI: 10.1038/ncb3187

[学会発表](計 5 件)

新冨 圭史 他、分裂期染色体構築におけるヌクレオソームの役割、第34回染色体ワークショップ、2017/1/12、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)

新冨 圭史 他、ヒストンはどのようにして染色体構築に貢献しているのか? 第33回染色体ワークショップ、2016/1/13、松島一の坊(宮城県松島町)

Keishi Shintomi et al. Large-scale assembly of mitotic chromatids depends on nucleosome dynamics. International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function. 2015/8/24、淡路夢舞台(兵庫県淡路市)

Keishi Shintomi et al. Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors. EMBO Workshop SMC proteins. 2015/5/14、ウィーン(オーストリア)

Keishi Shintomi et al. Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified components. The 9th 3R Symposium. 2014/11/19、御殿場高原ホテル(静岡県御殿場市)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

所属研究室ホームページ

<http://www.riken.jp/chromdyna/index.htm>

l

6．研究組織

(1)研究代表者

新富 圭史 (SHINTOMI, Keishi)

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