

論文内容の要旨

論文題目：細胞周期におけるコンデンシンの制御機構と染色体構造

Analysis of the regulation of condensin and chromosome structure during the cell cycle

竹本 愛

序論

遺伝情報を担うクロマチン DNA は、M 期において高度に凝縮して M 期染色体を形成する。この M 期染色体凝縮は、狭い細胞内で長大なクロマチン DNA を娘細胞へと均等に分配するために必須の過程である。コンデンシンは、2 つの SMC ATPase サブユニットと 3 つの non-SMC サブユニットを含むタンパク質複合体で、M 期染色体凝縮に中心的な役割を担っている。3 年ほど前に、高等真核生物で、non-SMC サブユニットのみが異なるコンデンシン II が見つかると、従来から知られるコンデンシン (コンデンシン I) と両方が協調して M 期染色体の構築と構造維持に関与すると考えられている。

ツメガエル及びヒトのコンデンシン I からは、ATP 依存的に DNA に正のらせんを導入する活性 (スーパーコイル活性、及びノット活性) が検出されている。また、この活性は M 期のキナーゼによるリン酸化で促進されることから、M 期染色体凝縮に関与することが示唆される。一方、分裂酵母では SMC4 サブユニットの M 期におけるリン酸化がコンデンシンの核への移行に必須という報告がある。つまり、コンデンシン I の M 期のリン酸化は、染色体凝縮を促進する方向に寄与する。

本研究では、細胞周期におけるクロマチン構造変換の分子基盤を理解することを目的とし、クロマチン構造変換に寄与する因子コンデンシン I, II の制御機構を、細胞生物学的手法、生化学的アッセイ、ツメガエル卵抽出液の系で再構成した染色体構造の観察を併用して解析した。

結果と考察

I. コンデンシン I の細胞周期における制御

1) 細胞周期におけるコンデンシン I のタンパク質量、リン酸化による制御

まず、コンデンシン I の細胞周期におけるタンパク質量レベルの変化を調べた。各細胞周期に同調した HeLa 細胞において、コンデンシン I のタンパク質量は一定であり、またタンパク質の安定性もほとんど変動がなかった。一方、リン酸化を調べたところ、コンデンシン I は M 期において MPM2 抗体で認識される特異的な部位がリン酸化されていた。その M 期特異的なリン酸化は細胞周期が G1 期へ進行する際に速やかに除去されており、それと対応してコンデンシン I のスーパーコイル活性も減少した。また、M 期特異的なリン酸化のレベルは染色体上のコンデンシン I では高く、染色体に結合していないコンデンシン I では低かった。これらの結果から、M 期特異的なリン酸化は、コンデンシン I の DNA にらせんを導入する活性と、染色体への結合の両方を促進することが示された。

2) コンデンシン I のリン酸化制御の解析

(a) CK2 リン酸化によるコンデンシン I の活性抑制

M 期と間期の細胞を ^{32}P 正リン酸で標識し、M 期と間期のコンデンシン I のリン酸化レベルを比較したところ、間期においても M 期と同程度リン酸化されていることが明らかになった。ホスホペプチドマッピングによりリン酸化される部位を比較したところ、両者のリン酸化部位は異なっていた。そこで、それぞれのリン酸化の役割を調べるため、間期と M 期のコンデンシン I をフォスファターゼで脱リン酸化し、スーパーコイル活性への影響を調べた。これまでの知見から予想された通り、脱リン酸化により M 期コンデンシン I の活性は減弱した。一方、間期コンデンシン I は脱リン酸化処理で活性化した (図 1)。間期リン酸化の除去によるコンデンシン I の活性化は顕著であり、M 期コンデンシン I に近いレベルまで増加した。この結果から、間期リン酸化がコンデンシン I の制御において非常に重要であると考えられた。コンデンシン I は M 期において、主に Cdc2 キナーゼによってリン酸化されることはすでに示されている。そこで、コンデンシン I を間期においてリン酸化し、活性を抑制するキナーゼの特定を試みた。候補として、細胞周期を通して活性を有し、多くの基質を持つ、カゼインキナーゼ 2 (CK2) について検討した。

細胞を CK2 阻害剤で処理した実験、さらにツメガエル卵抽出液の系で CK2 を免疫除去した実験から、コンデンシン I の間期リン酸化が主に CK2 によるものであることが明らかになった。次に、CK2 リン酸化によるコンデンシン I のスーパーコイル活性への直接的な影響を調べた。Cdc2 がコンデンシン I の活性を促進したのに対し、CK2 は強く阻害

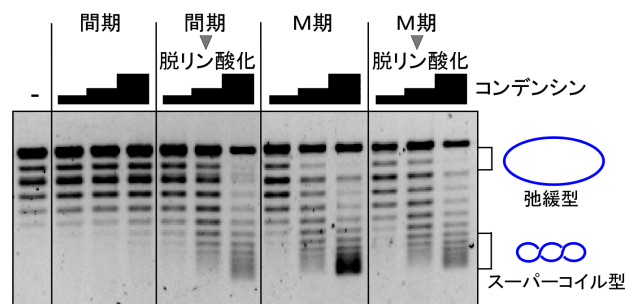


図1 脱リン酸化によるコンデンシン I の活性への影響

した。これらの結果から、CK2によるリン酸化でコンデンシンIが間期において抑制されていることが示唆された。

(b) CK2 サイトの脱リン酸化とその重要性

コンデンシンIを抑制するCK2依存的リン酸化の細胞周期における変動を調べるため、CK2のリン酸化サイトを特異的に認識する抗体を作製した。この抗体を用いた解析から、CK2サイトのリン酸化はM期のコンデンシンIで減少しており、特にM期染色体上のコンデンシンIではほぼ消失していた。また、ツメガエル卵抽出液の系にCK2を過剰に添加すると、CK2サイトのリン酸化が維持された。興味深いことにこの条件下では、M期の染色体凝縮が十分に進行せず正常よりも長い染色体が形成された。これらの結果から、コンデンシンIのCK2によるリン酸化が染色体上で除去されることが、正常な染色体の構築に必要であることが示唆された。

図1に示した通り、脱リン酸化したコンデンシンIのスーパーコイル活性はM期コンデンシンの活性に近い。そこで、コンデンシンIがCK2による抑制的リン酸化制御を受けなければ、間期でもM期のように染色体凝縮を起こすのかを検

証した。しかし、コンデンシンIがCK2サイトのリン酸化を受けない条件でも、M期のような染色体凝縮を起こすことはなかった。理由としては、これまでの報告にもあるように、コンデンシンIのクロマチンへの結合にはCdc2によるM期特異的なリン酸化が必須であるためと考えられる。以上のことから、Cdc2とCK2の2種類のリン酸化によって、コンデンシンの機能がそれぞれ促進的、抑制的に制御され、細胞周期におけるクロマチンの構造変換に深く関与していることが示された(図2)。

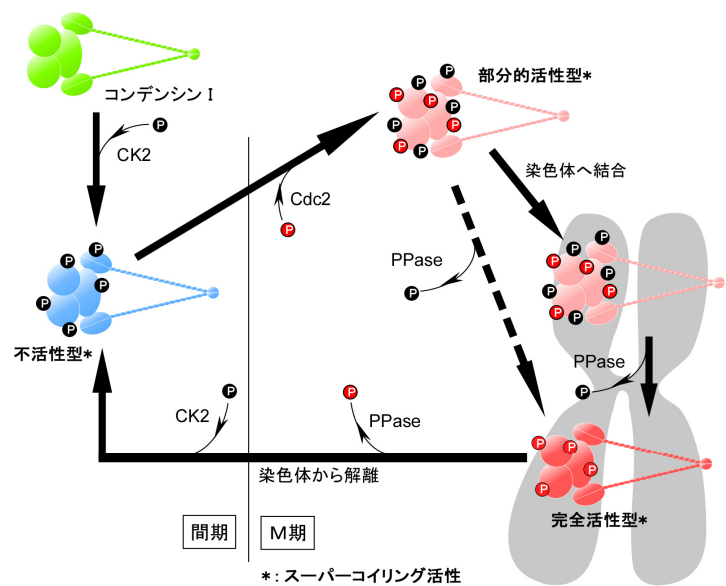


図2 2種類のリン酸化によるコンデンシンIの制御モデル

II. コンデンシンIとIIの制御の違い

高等真核生物においてはコンデンシンIに加え、もうひとつのアイソフォームのコンデンシンIIが存在し、両者が共に染色体凝縮に重要な機能を果たす。細胞周期における両者の局在の違いがいくつか報告されているが、その違いに関する分子メカニズムの報告はない。本研究において、新たにコンデンシンIとIIの制御の違いを示唆する知見を得た。フォスファターゼPP2Aの阻害剤を添加すると、M期染色体からコンデンシンIIが消失し、染色体の形態が異常になった。一方、コンデンシンIの染色体結合量は変わら

なかった。また、PP2AはコンデンシンIIにのみ特異的に結合していることが分かった。さらに、PP2A阻害剤存在下ではPP2Aの染色体局在も阻害されていた。これらの結果から、コンデンシンIIの染色体局在には、PP2Aのフォスファターゼ活性を介したリン酸化による制御、もしくはPP2Aとの相互作用を介した染色体へのリクルートの2つの可能性が示唆された(図3)。

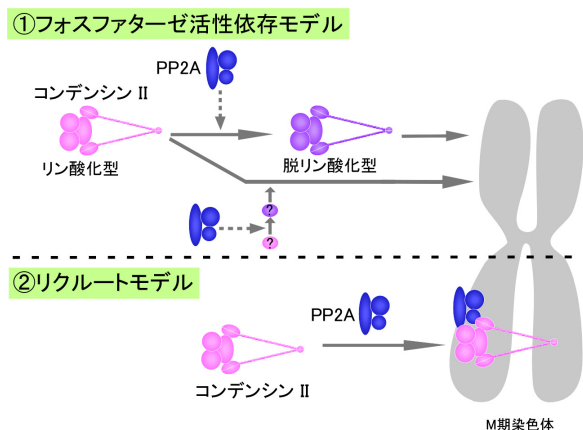


図3 PP2AによるコンデンシンIIの染色体結合制御

まとめと展望

本研究では、コンデンシンの制御と染色体構造変換の解析を行い、コンデンシンIの細胞周期におけるリン酸化制御の詳細を明らかにした。コンデンシンIは、間期でCK2によるリン酸化で活性が抑制されており、M期に入るとCdc2でリン酸化されて、染色体への結合能と活性が増し、さらに抑制的なCK2サイトが脱リン酸化されることで完全に活性化し、M期染色体の構築にはたらくというモデルを示した(図2)。

コンデンシンIは、間期でもM期と同程度のタンパク量が存在し、CK2によるリン酸化制御を受けていた。このことは、近年報告が増えているコンデンシンの間期における機能の制御と関連づけて考えると興味深い。例えば、出芽酵母とショウジョウバエではコンデンシンIが遺伝子抑制にはたらく、分裂酵母ではDNA修復やチェックポイント応答に必要であるという報告がある。また、線虫ではX染色体の遺伝子量補償に働く。特に興味深いのは、様々な生物種でコンデンシンが遺伝子の発現を負に制御することである。間期においてコンデンシンIは大部分が細胞質に存在し、核内に存在するのはごく少量(1%未満)であるが、核内のわずかのコンデンシンIの活性が、間期クロマチンの構造変換を介し、転写抑制に関与する可能性がある。よって今後、コンデンシンのクロマチン機能に関する解析が進むにつれて、本研究で示されたCK2によるリン酸化制御の間期における生理的意義が明らかになるかもしれない。また間期において、大部分が核内に存在するコンデンシンIIの方が、間期クロマチン構造と機能の関係においては、その制御機構がより重要かもしれない。本研究では、解析の大部分がコンデンシンIの制御に集中したが、この知見が今後、コンデンシンIIとの活性や制御の違いを知るための糸口となることを期待する。また、本研究では、新たにPP2AがコンデンシンIとIIの制御の違いに関与することを示唆した。コンデンシンIIの染色体局在はPP2Aに依存していたが、どのような分子機構で制御されているかの解析が今後の課題である。コンデンシンIとIIの制御の違いは、高等真核生物において出現したコンデンシンIIの存在意義の理解や、複雑なクロマチン構造に対するコンデンシンの作用機序の理解に繋がる可能性もあり重要と思われる。