科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２６　年　　６　月　　４　日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2010～2013
課題番号：２２３１０１１６

研究課題名（和文）染色体凝縮因子コンデンシンによる遺伝子発現制御

研究課題名（英文）Regulation of gene expression by chromosome condensation protein, condensin

研究代表者
木村　圭志（KIMURA, Keiji）

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：５０３３２２６８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　15,400,000円、（間接経費）　　4,620,000円

研究成果の概要（和文）：ChIPアッセイから、二つのタイプのコンデンシン（I, II）は、間期で核小体のrDNAに結合することが分かった。また、コンデンシンをノックダウンしたとこころ、rRNAのヒストンのアセチル化が上昇し、コンデンシンが間期においてもクロマチン状態を抑制している可能性が示唆された。また、PP1とPP2Aの２種類のホスファターゼによる脱リン酸化が、M期終了の際のコンデンシンの局在制御に重要な役割を持つことを見出した。

研究成果の概要（英文）：ChIP assay indicated that both isoform of condensin (I and II) presented on the rDNA region in the interphase nucleolus. Knockdown of condensin (I or II) led to enhanced acetylation of histones in rRNA region, suggesting that condensin condenses interphase chromatin structures and suppresses gene expressions. We also found that dephosphorylation of condensin (I and II) by PP1 and PP2A at the exit of mitosis was important for dissociation of condensin from mitotic chromosomes.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：遺伝子発現制御　クロマチン　コンデンシン　核小体

１．研究開始当初の背景

真核生物において、DNA はヒストンをはじめとしたタンパク質と複合体を形成し、クロマチンとして核内に収納されている。細胞分裂期（M 期）には、クロマチンはさらに高度に凝縮して M 期染色体に変換される。染色体凝縮は、長大なゲノム DNA を狭い細胞内で分配するために必須な過程である。この過程は、真核生物で広く保存されているが、その分子メカニズムは、コンデンシンが発見されるまで長い間謎であった。高等真核生物では、コンデンシン I と II の二つのタイプが協調して M 期染色体凝縮に機能している。コンデンシンは、ATP の加水分解エネルギーを用いて DNA に超らせんを導入する活性を持つ。超らせんの導入は DNA をコンパクトにすることから、細胞内での染色体凝縮に寄与するものと考えられる。さらに申請者は、コンデンシンの染色体結合や超らせん導入活性が、種々のキナーゼやホスファターゼによって M 期特異的に促進されることを見出している。

M 期と比較して、間期におけるコンデンシンの機能はほとんど明らかになっていない。本申請者は、細胞分画及び蛍光染色の実験から、間期 HeLa 細胞でコンデンシン（コンデンシン I、II）が核小体に高濃度に局在していることを見出した。コンデンシン I は細胞質と核小体（高濃度）に、コンデンシン II は核質と核小体（高濃度）に存在する。核小体は、リボソーム生合成の中心的細胞内構造体で、100～150 コピー反復したリボソーム RNA（rRNA）遺伝子配列（rDNA 配列）を中心として構築されている。rDNA の一部は転写が活発な活性化型クロマチン状態をとり、残りは転写が不活性化されたヘテロクロマチン状態として存在する。rRNA 転写量、及びリボソーム生合成量はそれらの比率で規定される。

出芽酵母でもコンデンシンが核小体に局在し、アミノ酸枯渇によって、コンデンシンの核小体 rDNA 結合量が増加することが報告されている。コンデンシンが間期で核小体に局在すること、酵母ではその局在が環境因子で変化すること、コンデンシンが DNA に超らせんを導入し、クロマチンを凝縮できることから、コンデンシンが環境シグナルによって rDNA に超らせん構造を導入し、クロマチン構造を高次レベルで変換することにより、rRNA 転写をコントロールしている可能性が考えられる。

２．研究の目的

コンデンシンは、M 期の染色体凝縮に必須な因子として同定された。しかし、線虫ではコンデンシンが X 染色体の不活化に機能するとの報告があり、コンデンシンが M 期の染色体の構造だけではなく、間期クロマチンの構造や機能を制御する可能性が考えられる。また、間期細胞では、コンデンシンは核小体に高濃度に存在することから、核小体領域の rDNA の構造と機能と密接に関与している可能性がある。

間期クロマチンは一様な構造ではなく、弛緩した領域、比較的凝縮した領域があり、その構造は種々の生命過程において動的に変動する。この間期クロマチン構造の制御機構の解析は、生命現象の理解に重要である。間期クロマチン構造の研究は、ヒストンの種々の化学修飾や DNA メチル化などを介したエピジェネティックな制御の解析を中心に進んできた。一方、コンデンシンの間期での機能はあまり知られていないが、コンデンシンが DNA の構造を変換する活性を持つことから、クロマチン構造をより高次のレベルで制御する可能性がある。

そこで、本研究計画では二つのタイプのコンデンシンによる、間期クロマチン構造と遺伝子発現制御の関連を解析し、クロマチン制御機構に新たな概念を導入することを目的とする。特に、コンデンシンは間期において核小体に高濃度に局在するので、核小体 rDNA 領域の制御機構を中心に解析を進める予定である。

３．研究の方法

本研究計画では、M 期染色体凝縮因子として同定されたコンデンシンの間期での機能を、特に核小体での機能と制御メカニズムに焦点を当て、以下の方法で研究した。

(1)コンデンシンの核小体クロマチンの制御メカニズムの解析

二つのコンデンシンのアイソフォームは、M 期には染色体に局在し、間期には染色体から解離し、核小体に高濃度に存在する。また、この局在制御には、種々のキナーゼ及びホスファターゼによる、リン酸化・脱リン酸化が関与している。本研究では、ツメガエルの卵抽出液のシステム、及び HeLa 細胞で、種々の阻害剤、抗体、siRNA を用いた解析により、コンデンシンの局在を制御している因子を特定する。

(2)コンデンシンの核小体での役割の解析

二つのコンデンシンのサブユニット、hCAP-H、hCAP-H2 の siRNA を HeLa 細胞に添加して、コンデンシンの量を低下させ、核小体の rDNA のヒストンの修飾状態を解析する。また、この領域の遺伝子発現の変化を解析する。また、栄養状態等の細胞外環境の変化が、核小体クロマチンの構造や遺伝子発現にどのように関わっているかを解析する。

(3)コンデンシンを中心とした核小体タンパク質のネットワークの解析

コンデンシンが、他の核小体因子と協調して機能を発現している可能性を検討するために、核小体に存在する 595 のタンパク質に対する siRNA ライブラリーを作製し、HeLa 細胞に添加する。それぞれの siRNA の核小体構造、染色体構造、細胞周期の進行に対する影響を解析する。さらに、変化が生じた因子に関しては、コンデンシンとの相互作用を解析する。

４．研究成果

本研究では、染色体凝縮因子として発見されたコンデンシンの分裂間期での機能を解析することを目的とした。高等真核生物には、２種類のコンデンシン、コンデンシン I とコンデンシン II が存在する。HeLa 細胞でコンデンシン抗体を用いた ChIP アッセイをしたところ、二つのタイプのコンデンシンは、間期で、核小体の rDNA に存在した。また、hCAP-H、hCAP-H の siRNA を用いてコンデンシンをノックダウンしたとこころ、いずれの場合でも、rRNA のヒストンのアセチル化が上昇した。従って、M 期の染色体凝縮因子であるコンデンシンが、間期においてもクロマチン状態を抑制している可能性が示唆された。

また、コンデンシンは M 期には染色体に結合し、M 期終了時に局在を変化させ染色体から解離する。コンデンシンの局在の制御が、間期でのコンデンシンの機能に重要であると考えられる。本研究では、PP1 と PP2A の２種類のホスファターゼによるコンデンシンサブユニットの脱リン酸化が、コンデンシンの局在制御に重要な役割を持つことを見出した。さらに、ツメガエルの系で PP2A のアイソフォームのうちで、B タイプが M 期終了時のコンデンシンサブユニットの脱リン酸化に機能することも見出した。また、M 期終了時にコンデンシンが染色体から解離するためには、コンデンシンサブユニットの脱リン酸化とともに ATP の加水分解も重要であることを見出した。

さらに、代表者らは、核小体に局在するタンパク質がネットワークを形成して、間期核小体の構造や M 期染色体の動態を制御する可能性を仮定した。その仮説を検証するために、核小体に局在する 595 種類の siRNA ライブラリーを作製し、網羅的な機能解析を行った。その結果、58 種類のタンパク質が細胞周期の進行に影響を与えていることを見出した。それらの因子のうちで機能未知な因子、Nucleolar protein 11 (NOL11)に着目して解析を進めたところ、NOL11 が WDR43、Cirhin とタンパク質複合体を形成して機能することを見出した。この複合体は、rRNA を介して核小体および染色体に局在し、細胞周期の進行と染色体の動態を制御していることを見出した。（論文投稿中）

さらに、この複合体がコンデンシンの制御因子である PP1-gamma と相互作用し、協調的にクロマチンの機能を制御していることが示唆された。

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　５件）

1) Fujimura A, Kishimoto H, Yanagisawa J, Kimura K.
Enhancer of rudimentary homolog (ERH) plays an essential role in the progression of mitosis by promoting mitotic chromosome alignment. *Biochem Biophys Res Commun.* (2012) 423:588-592　（査読あり）

2) Nakajima Y, Akaogi K, Suzuki T, Osakabe A, Yamaguchi C, Sunahara N, Ishida R, Kako K, Ogawa S, Fujimura T, Homma Y, Fukamizu A, Murayama A, Kimura K, Inoue S, Yanagisawa J.
Estrogen regulates tumor growth through a nonclassical pathway that includes the transcription factor ERbeta and KLF5. *Science Signaling* (2011) 4:ra22. doi: 10.1126/scisignal.2001551　（査読あり）

3) Kumazawa T, Nishimura K, Kuroda T, Ono W, Yamaguchi C, Katagiri N, Tsuchiya M, Masumoto H, Nakajima Y, Murayama A, Kimura K, Yanagisawa J.
Novel nucleolar pathway connecting intracellular energy status with p53 activation. *J. Biol. Chem*. (2011) 288:20861-20869　（査読

あり）

4) Tsuchiya M, Katagiri N, Kuroda T, Kishimoto H, Nishimura K, Kumazawa T, Iwasaki N, Kimura K, Yanagisawa J.
Critical role of the nucleolus in activation of the p53-dependent postmitotic checkpoint.
Biochem Biophys Res Commun. (2011) 407:378-382 （査読あり）

5) Kuroda T, Murayama A, Katagiri N, Ohta Y, Fujita E, Masumoto H, Ema M, Takahasi S, Kimura K, Yanagisawa J.
RNA content in the nucleolus alters p53 acetylation via MYBBP1A.
EMBO J. (2011) 30:1054-1066 （査読あり）

〔学会発表〕（計 ９件）

1) 核小体因子による M 期染色体動態制御
木村圭志
第 30 回染色体ワークショップ 第 11 回核ダイナミクス研究会
淡路, 2012, 12 月 19 日

2) Nucleolar factors regulate faithful mitotic chromosome segregation
Kimura K, Fujimra A, Kishimoto H, Yanagisawa J.
第 8 回 3R シンポジウム
淡路, 2012, 11 月 25 日

3) ホスファターゼによる染色体分配制御
木村圭志
「細胞増殖制御」終了シンポジウム
東京工業大学, 2012, 8 月 30 日

4) 核小体因子 NOL11 による Aurora B を介した M 期染色体動態制御
木村圭志、藤村亜紀子、柳澤純
第 29 回染色体ワークショップ
仙台, 2012, 1 月 26 日

5) A dual function of PP2A to regulate the localization of chromosomal proteins
木村圭志
第 33 回日本分子生物学会年会シンポジウム
神戸ポートアイランド, 2010,12 月 18 日

6) Regulation of condensin by dual functions of PP2A
木村圭志
MEXT Priority Research Project “Cell Proliferation Control” International Symposium, Tokyo, 2010, 11 月 8 日

7) PP2A の新規機能による染色体タンパク質の制御機構
木村圭志
癌研究所セミナー
癌研究所, 2010, 8 月 6 日

8) Regulation of condensing by the dual functions of PP2A
Takemoto A, Maeshima K, Ikehara T, Hanaoka F, Yanagisawa J, Kimura K.
Cold Spring Harbor Symposium
Cold Spring Harbor, NY, USA. 2010, 6 月 4 日

9) PP2A によるコンデンシンを介した染色体構造制御
竹本愛、前島一博、柳澤純、木村圭志
第 9 回核ダイナミクス研究会
伊豆市, 2010, 5 月 28 日

〔図書〕（計 １件）

1) 竹本愛、木村圭志 「M 期を制御するホスファターゼとその新規機能」
細胞工学、秀潤社 (2011) Vol. 30, No. 6, 597-602

６．研究組織

(1)研究代表者

木村 圭志（KIMURA, Keiji）
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：50332268