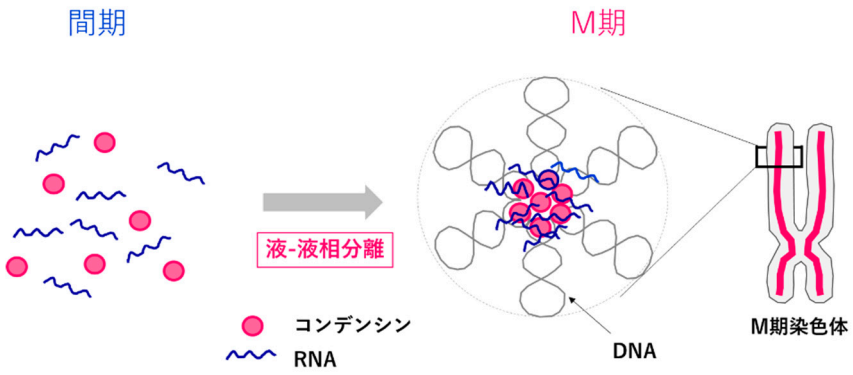
33　液ー液相分離を介した新規なM期染色体制御機構の解明	木村　圭志

【目的】液ー液相分離は、溶液が均質に混じりあわず 2 相に分離する現象で、*Science* 誌の 2018 年の “Breakthrough of the Year” に選ばれるなど、近年注目を集めている。液ー液相分離は、特定のタンパク質や RNA のある領域への濃縮に寄与し、核小体などの膜を持たないオルガネラの形成、ヘテロクロマチンの形成と転写調節、オートファジーの制御など、多様な生命現象に関与することがわかりつつある。我々は、分裂期（M 期）染色体から RNA を除去することにより、染色体骨格タンパク質コンデンシン I の染色体結合量が減少することを見出した。コンデンシン I サブユニットに液ー液相分離に関与する天然変性領域（IDR）が複数箇所存在すること、液ー液相分離が RNA によって促進されることから、RNA により促進された液ー液相分離がコンデンシン I の M 期染色体の軸領域への濃縮に寄与するとの仮説をたてた。本研究では、RNA とコンデンシン I との液ー液相分離を検証し、M 期染色体の構造制御における液ー液相分離の生理学的な意義を解明することを目的とした。

【方法】M 期染色体をスライドグラスに固定し、RNase A 処理により RNA を除去して染色体を構成するタンパク質の局在、及び M 期染色体の形態を詳細に観察した。また、M 期に同調した細胞に液ー液相分離の阻害剤 1,6 ヘキサンジオール（1,6-HD）を添加して、染色体の形態、及びコンデンシン I の局在変化を調べた。さらに、1,6-HD 除去と同時に、レンサ球菌の酸素感受性毒素ストレプトリジン O（SLO）を用いて細胞膜に一時的に孔をあけた細胞を、RNase A 存在下、非存在下で回復培養して、コンデンシン I の局在を調べた。さらに、精製したコンデンシン I に M 期細胞から精製した RNA を添加し、液滴の形成を観察することにより、試験管内で液ー液相分離の検証を行った。

【結果】スライドグラスに固定した M 期染色体を RNase A 処理処理したところ、M 期染色体が脆弱で細くなり周囲に繊維が伸びる構造変化が生じることを見出した。この構造変化は、機械学習による生体画像のパターン認識により定量化できた。また、RNase A 処理によって、コンデンシン I の染色体局在が約 50%に低下した。一方で、RNA polymerase I 阻害剤の添加により、M 期染色体表層部位のタンパク質局在は消失したが、コンデンシン I の局在は変化しなかった。この結果は、rRNA 以外の RNA がコンデンシン I の染色体局在に関与することを示唆する。また、M 期に同調した細胞を 1,6-HD 処理をしたところ、1,6-HD の濃度依存的、時間依存的にコンデンシン I が染色体から解離した。1,6-HD を除去することによってコンデンシン I の染色体局在は回復したが、同時に RNase A 処理をしたところコンデンシン I は染色体から解離したままであった。また、精製したコンデンシン I に M 期細胞から精製した RNA を添加したところ、液滴が形成された。以上の結果は、RNA がコンデンシン I の液ー液相分離を促進することを、試験管レベル、及び細胞レベル支持する。以上の研究結果から、RNA により促進された液ー液相分離がコンデンシン I の染色体の軸への濃縮に寄与し、コンデンシン I の DNA ループ形成能力と相まって M 期染色体骨格を形成するとのモデルを提示したい。

液ー液相分離によるコンデンシン I の染色体軸への濃縮と M 期染色体構築（モデル）



33. 液－液相分離を介した新規なM期染色体制御機構の解明

木村　圭志

筑波大学 生命環境系 生体情報制御学研究室

Key words：液－液相分離，分裂期染色体，染色体骨格，コンデンシン，RNA

緒　言

核内に分散して存在しているクロマチン繊維は、細胞分裂期（M期）に高度に折りたたまれてコンパクトな棒状の構造体（M期染色体）に変換される。この現象は一般にM期染色体凝縮と呼ばれ、長大な染色体DNAを狭い細胞内で均等に分配するために必須な過程で、親細胞から娘細胞への遺伝情報の維持に必須である。M期染色体は、約4,000種類ものタンパク質と1,000種類を超えるノンコーディングRNAから構成されている。

染色体骨格は、M期染色体の軸をなす領域で、コンデンシン（I及びII）、DNAトポイソメラーゼII、KIF4Aなどのタンパク質が存在する。これらの染色体骨格タンパク質はM期染色体の構築と分配において必要不可欠な役割を担っている。コンデンシンはSMC（Structural Mintenance of Chromosomes）ATPaseヘテロ二量体（SMC2、SMC4）と3つのnon-SMCサブユニットから構成されるSMCタンパク質複合体で、ATP加水分解依存的にDNAにループを導入し拡大する活性（loop extrusion活性）を持つ［1］。このDNAへのループの導入と染色体でのコンデンシン同士の相互作用がM期染色体の構築に寄与するモデルが報告されている［2］。しかし、染色体骨格タンパク質がどのようなメカニズムでM期染色体軸に濃縮されるか、その詳細は不明である。我々は、M期染色体からRNAを除去した際にM期染色体の形態が変化し、染色体に局在するコンデンシンIの量が半減することを見出した。コンデンシンIには、決まった立体構造をとらない天然変性領域（IDR）が複数箇所存在する。IDRを持つタンパク質の一部は、液－液相分離というメカニズムで周囲とは別の相に液滴として濃縮される特徴がある。また、液－液相分離はRNAにより促進されることから、我々は、コンデンシンIが液－液相分離のメカニズムでM期染色体の軸へ濃縮されるのではないかとの仮説を立てた。この仮説を検証するために、M期細胞に液－液相分離の阻害剤である1,6-HDを添加したところ、コンデンシンIのM期染色体局在が減少し、この薬剤を除去すると回復した。

液－液相分離は、溶液が均質に混じりあわず2相に分離する現象で、*Science*誌の2018年の“Breakthrough of the Year”に選ばれるなど、近年注目を集めている。液－液相分離は、特定のタンパク質やRNAのある領域への濃縮を介して、膜を持たない構造体の形成、ヘテロクロマチン形成と転写の調節、オートファジーの制御など広汎な細胞機能に関与する。本研究課題では、コンデンシンIとRNAの液－液相分離がM期染色体の構造、動態の制御にいかに関与するかを、生化学的、細胞生物学的に解明することを目的とした。

方　法

1. M期染色体スプレッド調製とRNase A処理

M期同調したHeLa細胞を200 μl phosphate bufferd salin（PBS：140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4, and 8.1 mM K_2HPO_4）に懸濁し、1.5倍量のH_2Oを加えた低調液で5.5分間氷上でインキュベートして膨潤させた後に、CytospinTM 4 cytocentrifuge（Thermo Fisher Scientific）で113×gで5分間遠心して、M期染色体をスライドグラスに展開した。さらに、染色体スプレッドを0.1% Triton X-100を含んだPBS（PBST）で5分間処理し、PBSで洗浄した後に2% paraformaldehydeを含んだPBSで固定した。また、染色体スプレッドをPBST処理をする過程で、PBSTに1 mg/mlのRNase Aまたはコントロールとして1 mg/ml BSAを加えた。

2. 蛍光抗体観察

染色体スプレッドを 3% BSA を含んだ PBS (3% BSA-PBS)で 1 時間インキュベートした後に、3% BSA-PBS で希釈した一次抗体溶液で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後に、3% BSA-PBS で希釈した Alexa Fluor 488 または 594（Invitrogen Corporation）を結合させた二次抗体で 1 時間処理した。超解像度顕微鏡 STORM 解析の場合は、二次抗体に CAGE522（Abberior GmbH, Göttingen, Germany）を用いた。次に、0.1 μl の DAPI で 5 分間インキュベートした後に PBS で洗浄し、共焦点顕微鏡（LSM700; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany）あるいは超解像度顕微鏡（ELYRA 3D-PALM; Carl Zeiss AG）で観察した。

3. 液－液相分離阻害剤 1,6-HD 処理

HeLa 細胞を 50～100 μM モナステロール存在下で 4 時間培養して M 期に同調した。培養液に 0～5%の 1,6-HD を添加し 60 分間培養した。あるいは、3% 1,6-HD を添加して、0～60 分間培養した。

1,6-HD 除去実験では、3% 1,6-HD を 15 分間処理した後に、PBS で洗浄した。次に、PBS で 250～500 倍希釈したストレプトリジン O（SLO）を用いて細胞膜に一時的に孔を開け、1 mg/ml RNase A 存在下、あるは非存在下で 7～10 分間インキュベートした後に、通常の培地に戻してさらに 60 分間培養した。

結　果

1.　RNA 除去は、M 期染色体形態、及び M 期染色体骨格タンパク質の局在を変化させる

HeLa 細胞の M 期染色体スプレッドを調製し、RNase A 処理により RNA 除去したところ、M 期染色体の軸が細くジグザグ状になり、染色体の周辺に細い繊維状の構造が伸びるような形態の変化が生じた。さらに、この形態変化を詳細に解析するために、超解像度顕微鏡 STORM 解析を行ったところ、M 期染色体の周辺から繊維が伸びるのが観察された（図 1）。

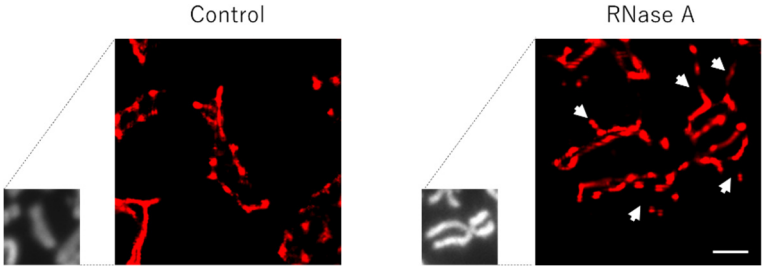


図 1.　RNA 除去は M 期染色体スプレッドの形態を変化させる
M 期染色体スプレッドを、mock 処理（Control）または RNaseA 処理（RNase A）して、
超解像度顕微鏡（STORM 解析）を行った。白黒写真は同視野の蛍光観察。
スケールバー：1 μm。

また、この M 期染色体の形態変化を、widchrm 機械学習画像解析により定量した。20 以上の染色体画像を解析することにより 80%以上の確率で、Mock 処理と RNase A 処理の M 期染色体画像を区別することができた。さらに、Mock 処理と RNase A 処理の M 期染色体画像を 2 つのサブグループに分けて画像の類似度を解析したところ、同じ処理をしたグループ（Mock 処理同士、RNase A 処理同士）は類似した画像にクラス分けされたのに対して、Mock 処理と RNase A 処理は形態的に異なった画像にクラス分けされ、形態の変化を Morphological Distance として定量することができた（今後の論文に投稿する予定の未発表データなので、具体的なデータは不掲載）。

これまでに、M 期染色体表層領域（PR）に局在する核小体因子、及びセントロメア領域の Aurora B 局在が RNA に依存することが報告されている。我々の解析でも、RNase A 処理によりこれらのタンパク質が M 期染色体から解離することを見出した。次に、RNase A 処理が M 期染色体の軸が細くジグザク状になることから、M 期染色体骨格タンパ

ク質（コンデンシンⅠ、コンデンシンⅡ、DNA トポイソメラーゼⅡ、KIF4a）の局在を解析した。まず、コンデンシンⅠの局在を解析したところ、M 期染色体軸にビーズ状に局在していたコンデンシンⅠのシグナルが約 50%に減少し、染色体に一様に局在した。コンデンシンⅡ、KIF4a に関しては、コンデンシンⅠほどの大きな局在の変化は観察されなかったが、染色体上のシグナルの強度が約 70%に低下した。一方で、DNA トポイソメラーゼⅡの染色体結合量はほとんど変化しなかった（未発表データ）。この結果から、何らかの RNA が染色体骨格タンパク質の局在に影響を与えることが示された。これまでの研究で、M 期染色体の PR への核小体因子の局在が pre-rRNA に依存することが報告されている。実際に、我々の研究でも RNA polymerase Ⅰ 阻害剤であるアクチノマイシン D（Act D）を添加して pre-rRNA 転写を抑制した際に、核小体タンパク質 nucleophosmin、MYBBP1A、NOL11 が PR から解離した［3］。一方、Act D の添加はコンデンシンⅠの染色体局在には影響を与えなかった。この結果は、コンデンシンⅠの局在には pre-rRNA 以外の RNA が関与することが示された（未発表データ）。

2. ATP 加水分解がコンデンシンⅠの染色体からの解離と M 期染色体構造変化に関与する

コンデンシン（Ⅰ、Ⅱ）は、SMC ATPase2 量体をコアサブユニットとしており、その Walker A モチーフと Walker B モチーフからなるヘッド部位への ATP の結合と加水分解と共役して、コンデンシンのヘッド部位が開閉することが報告されている。従って、ATP 加水分解を阻害することにより、コンデンシンのヘッド部位が閉じて DNA との結合が安定化される可能性がある。そこで、M 期染色体スプレッドを RNase A 処理する際に遅水解性の ATP アナログである ATPγS を同時に添加したところ、コンデンシンⅠの染色体からの解離が抑制された。一方で、ATPγS の添加は核小体タンパク質 nucleophosmin、MYBBP1A が PR からの解離は抑制しなかった。

次に、我々は ATP 加水分解が RNase A 処理の際の M 期染色体の形態に与える影響を解析した。共焦点顕微鏡の観察から、ATPγS の添加が RNase A 処理の際の M 期染色体の形態変化を抑制することを見出した。また、超解像度顕微鏡 STORM 解析をしたところ、RNase A 処理による M 期染色体の周辺の繊維の突出が ATPγS の添加によって抑えられることを見出した（未発表データ）。

これらの解析結果から、RNase A 処理によるコンデンシンⅠの M 期染色体からの解離、及び M 期染色体の形態変化が ATPγS の添加により抑制されることが示された。また、ATPγS の添加は PR からの核小体の解離は抑制しなかったので、RNase A 処理による M 期染色体の形態変化は主にコンデンシンⅠの局在変化に依存することが示唆された。

3. 液ー液相分離の阻害によりコンデンシンⅠは M 期染色体から解離する

コンデンシンⅠの non-SMC サブユニットは IDR を複数持つ。IDR を持つタンパク質の一部は液ー液相分離することにより周囲と別の相に濃縮される性質を持つ。また、RNA などの核酸が液ー液相分離を促進することが報告されているので、我々は RNA がコンデンシンⅠの液ー液相分離を促進することにより、染色体骨格に濃縮させるのではないかとの仮説をたてた。この仮説を検証するために、M 期に同調した HeLa 細胞の培地に液ー液相分離の阻害剤 1,6-HD を添加したところ、1,6-HD の濃度依存的に染色体上のコンデンシンⅠが減少し M 期染色体が脱凝縮した形態に変化した。また 3%1,6-HD 存在下では、時間依存的にコンデンシンⅠが M 期染色体から解離し M 期染色体が脱凝縮した。さらに、培地から 1,6-HD を除去したところコンデンシンⅠの M 期染色体局在、及び M 期染色体凝縮が回復した。興味深いことに、1,6-HD の除去と同時に SLO により細胞をセミインタクトな状態にして、RNase A 存在下、非存在下で回復培養したところ、RNase A 非存在下ではコンデンシンⅠの M 期染色体局在が回復したのに対して、RNase A 存在下では回復しなかった（図 2）。これらの結果は、コンデンシンⅠは液ー液相分離のメカニズムで M 期染色体に濃縮され、何らかの RNA が液ー液相分離を促進することを示唆する。

次に、RNA がコンデンシンⅠの液ー液相分離を促進するかを、試験管内で検証した。コンデンシンⅠの non-SMC サブユニットには IDR が複数箇所存在するので、バキュロウイルス発現系でコンデンシンⅠの non-SMC3 量体を発現・精製した。精製したコンデンシンⅠの non-SMC3 量体に M 期細胞から精製した RNA を添加したところ、RNA 存在下で液滴の形成が観察された。また、M 期に同調した HeLa 細胞からコンデンシンⅠをアフィニティー精製し、RNA を添加したところ液滴の形成が促進され、1,6-HD 添加により液滴が消失した。これらの結果は、コンデンシンⅠの液ー液相分離が RNA により促進されることが示された（未発表データ）。

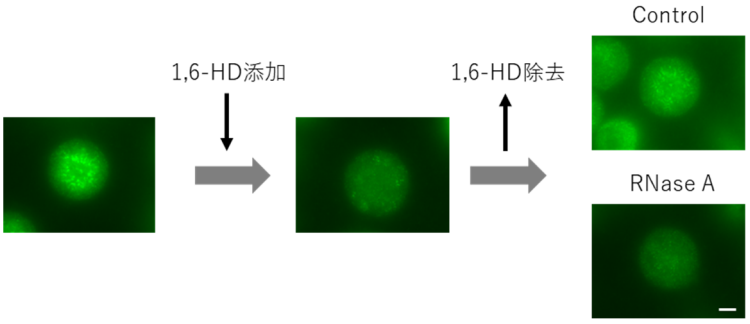


図 2. 1,6-HD 処理によりコンデンシン I は染色体から解離する
M 期に同調した HeLa 細胞（左）を、3% 1,6-HD 存在下で 15 分間培養した（中）。1,6-HD を除去し、RNase A 非存在下（右上）または存在下（右下）で 60 分間回復培養した。細胞を固定し、コンデンシン I のサブユニット（hCAP-G）の抗体で蛍光染色した。スケールバー：5 μ m。

考　察

細胞内には、タンパク質をコードしている RNA に加えて、多くの種類のタンパク質をコードしていないノンコーディング RNA が存在する。ノンコーディング RNA はタンパク質の合成に直接的には関与しないが、クロマチン構造制御、遺伝子発現制御、細胞内構造体骨格、がんをはじめとする様々な疾患に関与するなど、多岐にわたる機能を果たしていることが解明されつつある。また、ノンコーディング RNA が IDR を持つタンパク質の液ー液相分離を促進することが近年注目を集めている。

我々は、M 期染色体に約 1,000 種類の RNA が存在する報告［4］に着目し、RNA が M 期染色体の構造や動態にいかに影響を与えるかを解明することを本研究の目的とした。我々は、M 期染色体から RNA を除去したところ、M 期染色体の形態が変化し、コンデンシン I をはじめとする染色体骨格タンパク質の M 期染色体局在が低下することを見出した。これまで、M 期染色体の PR やセントロメアのタンパク質の局在が RNA に依存することが報告されているが、染色体骨格タンパク質に関してははじめての知見である。興味深いことに、pre-rRNA 転写を阻害した際に、PR の核小体タンパク質は染色体から解離したのに対し染色体骨格タンパク質の局在には影響がなかった。一方で、ATPγS の添加により ATP 加水分解を抑制した際には、RNase A 処理をした際のコンデンシン I の解離を抑制したのに対して、PR のタンパク質の解離は抑制しなかった。これらの研究結果は、M 期染色体の骨格と PR では異なった種類の RNA が別々のメカニズムで局在の制御をしていることを示唆する。また、RNase A 処理をした際の M 期染色体の形態変化が ATPγS の添加により抑制されたことから、RNA 除去による染色体の形態変化が染色体骨格タンパク質の局在変化に依存することが示唆された。

また、コンデンシン I の M 期染色体局在が液ー液相分離の阻害剤である 1,6-HD の阻害され、1,6-HD の除去により回復したこと、1,6-HD 除去の際に RNase A 処理をするとコンデンシン I の染色体局在が回復しなかったこと、コンデンシン I には液ー液相分離に関与する IDR が存在することから、コンデンシン I が液ー液相分離のメカニズムで M 期染色体に局在し、何らかの RNA がこの過程に関与することが示唆された。M 期細胞から精製した RNA が精製コンデンシン I の液滴の形成を促進したこともこの可能性を支持する。

我々は、コンデンシン I が、ATP 加水分解のエネルギーを用いて、DNA に正のスーパーコイルを導入する活性（スーパーコイリング活性）を持つことを見出した［5, 6］。最近になって他のグループから、コンデンシンが DNA を“押し出して”ループを拡張する活性（loop extrusion 活性）を持つことが示されている［1］。我々の発見したスーパーコイリング活性と loop extrusion 活性との関連は明らかではない。しかし、両者ともに ATP 加水分解に依存することから、コンデンシン I が正のスーパーコイルの入ったループを拡張する可能性がある。数理モデリングとシミュレーション解析により、コンデンシンによる DNA へのスーパーコイルの入ったループの導入とコンデンシン分子間の相互

作用が、M 期染色体の凝縮と分配に寄与するモデルが提唱されている［2］。しかし、精製したコンデンシン I はショ糖濃度勾配遠心で 13S（コンデンシン I の 1 分子に相当する）に沈降し［7］、コンデンシン I 分子同士の相互作用を示す実験的な証拠は認められていない。我々は、本研究結果に基づき、RNA との液ー液相分離によるコンデンシン I の M 期染色体の軸領域への濃縮が、コンデンシン I 分子同士の相互作用のトリガーとなり、コンデンシン I の DNA ループ拡張能力と相まって、M 期染色体の構造と動態の制御に寄与するモデルを提唱する。

今後は、コンデンシン I の液ー液相分離が特定の RNA によるものか、それとも RNA の特異性は必要ないかの検証が必要である。また、M 期特異的なコンデンシン I のリン酸化と液ー液相分離との関係の解析も重要であると考える。さらには、M 期染色体骨格タンパク質の多くが IDR を持つことから、RNA と染色体骨格タンパク質群の液ー液相分離を介したネットワークの解明が今後の課題であろう。

共同研究者

本研究の共同研究者は、公益財団法人がん研究会癌研究所実験病理部の広田亨部長と公益財団法人がん研究会癌研究所がん生物部の斉藤典子部長である。

文　献

1) Davidson IF, Peters JM. Genome folding through loop extrusion by SMC complexes. Nat Rev Mol Cell Biol. 2021 Jul;22(7):445-464. doi: 10.1038/s41580-021-00349-7. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33767413

2) Sakai Y, Mochizuki A, Kinoshita K, Hirano T, Tachikawa M. Modeling the functions of condensin in chromosome shaping and segregation. PLoS Comput Biol. 2018 Jun 18;14(6):e1006152. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006152. eCollection 2018 Jun. PMID: 29912867

3) Fujimura A, Hayashi Y, Kato K, Kogure Y, Kameyama M, Shimamoto H, Daitoku H, Fukamizu A, Hirota T, Kimura K. Identification of a novel nucleolar protein complex required for mitotic chromosome segregation through centromeric accumulation of Aurora B. Nucleic Acids Res. 2020 Jul 9;48(12):6583-6596. doi: 10.1093/nar/gkaa449. PMID: 32479628

4) Meng Y, Yi X, Li X, Hu C, Wang J, Bai L, Czajkowsky DM, Shao Z. The non-coding RNA composition of the mitotic chromosome by 5'-tag sequencing. Nucleic Acids Res. 2016 Jun 2;44(10):4934-46. doi: 10.1093/nar/gkw195. Epub 2016 Mar 25. PMID: 27016738

5) Kimura K, Hirano T. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. Cell. 1997 Aug 22;90(4):625-34. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80524-3. PMID: 9288743

6) Kimura K, Rybenkov VV, Crisona NJ, Hirano T, Cozzarelli NR. 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation. Cell. 1999 Jul 23;98(2):239-48. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81018-1. PMID: 10428035

7) Hirano T, Kobayashi R, Hirano M. Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein. Cell. 1997 May 16;89(4):511-21. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80233-0. PMID: 9160743