

図1. 染色体の基本構造：ヌクレオソーム構造と30nmクロマチンファイバー

A：直径2nmのDNA (①) から始まり、このDNAが塩基性タンパク質であるヒストンH2A、H2B、H3、H4タンパク質から成る八量体に巻かれて、ヌクレオソームと呼ばれる直径約10nmの構造体ができる (②)、さらに、高次な構造体として、ヌクレオソームがリンカーヒストンであるH1を伴い折り畳まれて直径約30nmのクロマチンファイバーになるとされている (③)。この30nmのクロマチンファイバーは、30年以上研究されているにもかかわらず、どのようにヌクレオソームが折り畳まれているのか正確にわかっていない。さらに、このクロマチンファイバーがどのようにして、最終的に直径約1 μ mの分裂期染色体を作るのかについてはいまだまったくの謎である。細胞の分子生物学 第4版 Fig.4-55より改変。

B：ヌクレオソーム結晶構造 (1.9 Å)。黄はDNA、緑はヒストンH3、赤はH2A、H2B、H4を示している。ヒストンの八量体 (オクタマー) にDNAがちょうど2回巻き付いている (下段)。中心から外側に伸びている“ひげ”はヒストンのテールであり、リン酸化・メチル化・アセチル化などの多様な修飾を受けて、クロマチンの構造変化に貢献していると考えられる (詳細は本特集の他稿を参照のこと)。矢印の先のボール (上段) はヒストンH3の10番目と、28番目のセリン残基を示している。この残基は分裂期に特異的なリン酸化を受けるため、当初、染色体の凝縮を担っていると考えられていたが、直接の関連はなさそうである⁴⁾。スケールバーは2nm。

Ⅲ. 非ヒストンタンパク質の分裂期染色体における重要性 (染色体 Scaffold/radial loop モデル)

1970年代後半、Laemmliらは、最初に染色体中の非ヒストンタンパク質に目を向けた。彼らはまず、染色体を分裂期HeLa細胞から単離し、染色体からヒストンを除き、電子顕微鏡で観察した。すると図2Aのように、ヒストンを除かれた染色体は、黒っぽく見える非ヒストンタンパク質の構造体とそれを取り囲むDNAのハロー (halo) から成っていた⁵⁾。驚くべきことに、この非ヒストンの構造体はもとの分裂期の染色体の形に酷似していた (図2B)。このため、彼らはこの非ヒストンタンパク質から成る構造体を染色体 Scaffold (足場) と名付けた。以上の観察から、図2Cのように非ヒストンタンパク質から成る高次構造体“染色体 Scaffold (軸)”が染色体の中に存在してその形態を保持し、DNAを染色体に沿ってループ状に束ねているという、“染色体 Scaffold/radial loop モデル”が提唱された。

これとは別に、1978年、染色体の精緻な高圧電子顕微鏡観察をもとに hierarchical helical folding モデルと呼ばれる、染色体中でクロマチンファイバーが階層状に折り畳まれているとするモデルが提唱された⁶⁾。30nmのクロマチンファイバーが、らせん状に折り畳まれて100~130nm、200~250nmというようにだんだん太いファイバーを作っていく、最後に染色体が形成されると考える (図2D)。また最近、図2Dのように、後述するコンデンシンが太いファイバーの中心部に“のり”のように存在している、という helical folding モデルの新しいバージョンが提唱され⁷⁾、両者の間の本質的な違い (?) はなくなりつつあるように思える。

Ⅳ. 染色体 ScaffoldとしてのTopo II

もし、染色体 Scaffoldが染色体の構築に重要であるのなら、染色体 Scaffoldはどのような非ヒストンタンパク質から成るのだろうか？この疑問に答えるために、染色体 Scaffoldの分画を調べると、2つの主要なタンパク質 Sc1 と Sc2が見い

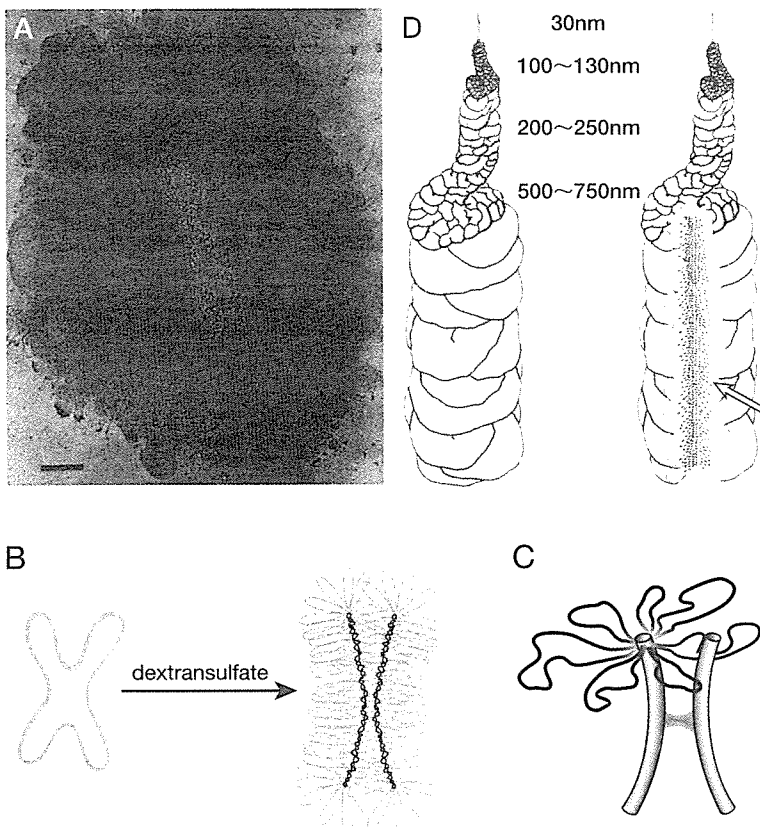


図2. 染色体構造に関する2つのモデル：Scaffold/radial loop モデルと hierarchical helical folding モデル

A：ヒストンが除去された分裂期染色体の電子顕微鏡像。染色体からヒストンを除くため、染色体をポリアニオン (dextran sulfate とヘパリン溶液) で処理し、グリット上で展開し電子顕微鏡で観察した。非ヒストンタンパク質の構造体 (染色体 Scaffold) と、それを取り囲む DNA のハロー (halo) から成っている⁵⁾。スケールバーは $2 \mu\text{m}$ 。Adolph KW, et al: Cell (1977) 12: 805-816 より転載。

B：模式図、ヒストンを除かれた染色体の中心に残存した非ヒストンタンパク質から成る構造体 (赤) は分裂期の未処理の染色体の形に酷似していた。

C：“染色体 Scaffold (軸)” が染色体の中に存在して染色体の形態を保持し、DNA を染色体に沿ってループ状に、そして放射状に束ねているという、“染色体 Scaffold/radial loop モデル” が提唱された。

D：hierarchical helical folding モデル。30nm のクロマチンファイバーが、規則正しく、らせん状に折り畳まれて $100 \sim 130\text{nm}$ 、 $200 \sim 250\text{nm}$ というようにだんだん太いファイバーを作っていく、最後に染色体が形成されていると考える。最新のモデルではコンデンシンが太いファイバーの中心部に“のり”のように存在している (矢印) とされた⁷⁾。このため、両者間には本質的には差がなくなっているように思われる。最近、*lac I*-GFP を用いて、染色体上に点状させた 256 リピートの *lac O* シークエンスを検出する新しいゲノムラベルシステムにより、初めて染色体中の $200 \sim 250\text{nm}$ ドメインが検出された。

だされた。1985年、そのうち *Sci* はトポイソメラーゼ II (以下 Topo II) と呼ばれるタンパク質であることが判明した⁸⁾。Topo II は DNA の二本鎖を一時的に切断し、その間をもう 1 つの DNA 鎖を通過させることによって、DNA のトポロジーを変化させる酵素である。この発見は、Topo II が染色体の構築に何らかの役割を果たしていることを示唆し、Topo II がクロマチンのループを束ねているのではないかというモデルが提唱されることとなる。同じころ、Topo II が染色体の凝縮に必須であることが京大の柳田教授のグループにより、分裂酵母の遺伝学を駆使してエレガントに示された⁹⁾。また、Laemmli 研究室の足立らは *in vitro* で染色体を再構成できるアフリカツメガエルの系を用いて、Topo II が染色体の凝縮に必須であることを明らかにした¹⁰⁾。Topo II が染色体の凝縮に必須であることが、いくつかの系で示される一方、染色体の構造維持に関する Topo II の機能に対して疑問が提示されている。1993年平野らは、ある条件下では、アフリカツメガエルの系を用いて作った染色体から Topo II が比較的容易に外れることを見いだした¹¹⁾。この結果、染色体は少し膨らむ程度で、全体の形としては大差なかった。このため、Topo II は染色体凝縮の初期の段階では必須であるが、一度形成されてしまえば必要ないと推測されている。

V. コンデンシンの発見

1994年、染色体研究を取り巻く状況が一転する。平野らはアフリカツメガエルの卵細胞抽出液を用いて染色体に結合するタンパク質 (*Xenopus* chromosome associated polypeptides; XCAP) の体系的な単離を行った¹²⁾。その中の XCAP-C と XCAP-E は強固な二量体を形成し、染色体凝縮のタイミングに合わせてクロマチンに結合する。また、XCAP-C に対する抗体はアフリカツメガエルの系で一度形成された染色体の形態を変化させることに成功した。このことから、両者は染色体の形態維持にも関与していると考えられた。これらの cDNA が単離されると、発表されたばかりの出芽酵母の SMC (stability of mini chromosome) の遺伝子と高い相同性を持つことがわかった。また、京大柳田グループで単離されていた Topo II 欠損株と同様な表現型を持つ分裂酵母の *Cut* (cell untimely tone) と名付けられた一連の突然変異株のうち、*Cut3* と *Cut14* とも相同性を持つことがわかった¹³⁾。さらには、染色体 Scaffold の主要な構成タンパク質である Sc2 (Scaffold protein 2) は XCAP-E (Scm2) と相同性を持つこともわかった¹⁴⁾。このあたりの経緯については Cold Spring Harbor Laboratory の平野氏によるすばらしい総説に詳しく書かれているので、興味のある方はぜひ参照

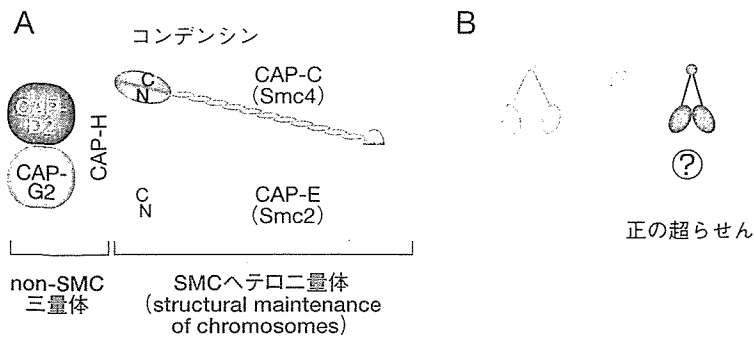


図3. 染色体凝縮におけるキープレーヤー、
コンデンシン

A: CAP-C (Smc4) と CAP-E (Smc2) は他の高分子量タンパク質 CAP-D2, CAP-G, CAP-H と五量体の巨大な複合体を形成している。脊椎動物以上の生物では、コンデンシン I とコンデンシン II という2つのコンデンシンがある。

B: コンデンシンが ATP に依存して裸の DNA に正のスーパーコイル (超らせん) を導入することがわかっている。しかしながら、そのメカニズム、また染色体凝縮における意義はまだ不明である。

されたい¹⁵⁾。“Structural Maintenance of Chromosomes” にちなむ Smc ファミリーはさらに増え続け、現在、細菌からヒトに至るまで広く保存されていることがわかっている。このことは、染色体凝縮の原理が生物界で広く保存されていることを意味する。1997年、CAP-C (Smc4) と CAP-E (Smc2) は他の高分子量タンパク質 CAP-D2, CAP-G, CAP-H と五量体の巨大な複合体を形成していることがわかり、アフリカツメガエルの系を用いてこの複合体が染色体凝縮 (chromosome condensation) に必須であることが証明された¹⁶⁾。このためこの五量体複合体はコンデンシン (condensin) と名付けられた (図3A)。

VI. コンデンシンと染色体凝縮

それでは、コンデンシンはどのようにして染色体凝縮を引き起こすのだろうか？ 1997年、精製したカエルのコンデンシンが ATP に依存して裸の DNA に正の超らせんを導入することがわかった¹⁷⁾ (図3B)。一番単純な解釈は、リラックしたプラスミド DNA (開環状) が ATP に依存してコンデンシンに巻き付き (local wrapping), 正のスーパーコイルを導入することである。1999年には、コンデンシンが Topo II の存在下で開環状プラスミドに正の結び目 (kot) を導入することがわかった¹⁸⁾。ここで重要なことは、どちらの反応においてもコンデンシンは正の方向に DNA トポロジーの歪みを導入する点である。この正の結び目を入れる活性により、コンデンシンが局所的に DNA を巻き付けるというより、もっとグローバルに右向き大きな“らせん”を形成することが示唆される。しかしながら、電子顕微鏡によるコンデンシン-DNA 複合体の直接的な観察によると、やはり、コンデンシンにプラスミドが局所的に巻き付いているように観察された¹⁹⁾。このようにコンデンシンがどのようにして裸の DNA に正のスーパーコイルを導入するか、そのメカニズムについては多少混沌としている (図3B)。また、正のスーパーコイルの導入という活性がどのように分裂期染色体の凝縮につながるかはいまだ明らかではないが、エネル

ギー依存性のアクティブな反応によって制御されている可能性を初めて明確に示した意義は非常に大きい。

最近では、脊椎動物以上の生物において、コンデンシン I とコンデンシン II という2種類のコンデンシンが染色体凝縮の機能を担っていることもわかってきた²⁰⁾。現在、コンデンシン II は間期の核に存在し分裂前期のクロマチン凝縮を担い、コンデンシン I は分裂期の核膜崩壊が起こるころ、クロマチンに結合してさらなる染色体凝縮を担っていると、考えられている^{21)~23)}。

VII. コンデンシンと染色体 Scaffold

染色体 Scaffold の構成物質の1つである Sc2 がコンデンシンのサブユニットの1つである Smc2 であることが1994年にわかって以来、Scaffold の研究はまったくと言っていいほど進んでいなかった。そこで1999年、筆者らは染色体 Scaffold とコンデンシンや Topo II との関係調べた。染色体 Scaffold を精製し、SDS-PAGE を行うと5つ程度の主要なバンドが観察され、その中の Sc1 と Sc2 が顕著であった (図4A)。さらに、コンデンシンと Topo II の抗体を用いてウェスタンブロットを行うと、染色体 Scaffold にはコンデンシンのすべてのサブユニットと Topo II α が含まれていることがわかった (図4A)²⁴⁾。また、コンデンシンと Topo II α はともに染色体上に軸状に存在し、コンデンシンと Topo II α のシグナルのピークは互い違いにずれているように思われた (図4B)。これらの結果は、染色体 Scaffold が本質的に Topo II α とコンデンシンから成ることを示している。透過電子顕微鏡を用いて、コンデンシンのサブユニットと Topo II の局在を調べた結果、筆者らは、染色体のクロマチンがループ状に中心部から放射状に伸びており、染色体 Scaffold を構成するコンデンシン (Topo II α も) がその根もとに近接して存在することを明らかにした (図4C)²⁵⁾。また、電顕像では、コンデンシンのシグナルは非常に近接しているため、染色体上ではコンデンシン同士が相互作用しているだろう。また、最近の AFM (原子間力顕微鏡) による観察

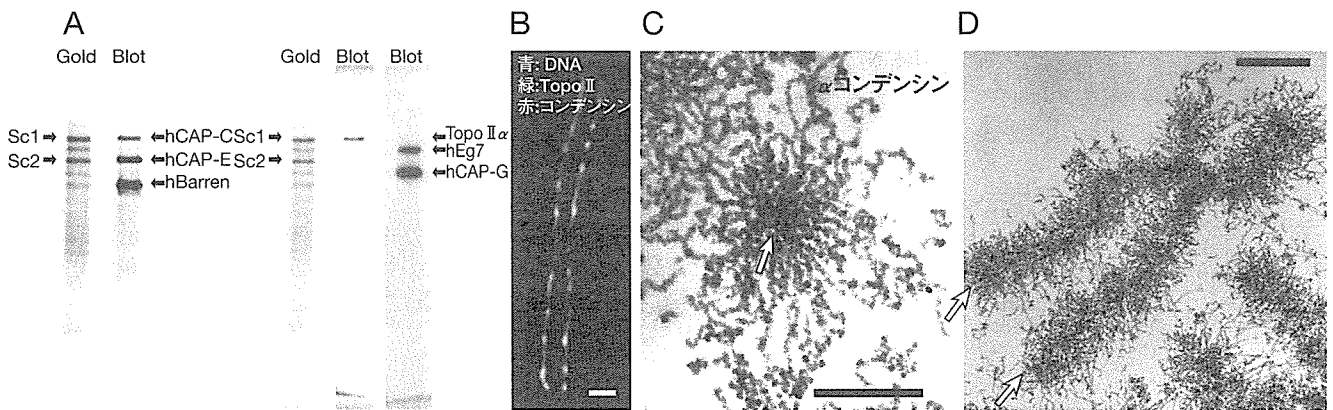


図4. コンデンシンと染色体 Scaffold の関係

A: 染色体 Scaffold を精製し、SDS-PAGE を行うと5つ程度の主要なバンドが見え、その中の Sc1 と Sc2 が顕著であった (Gold のレーン)。そして、コンデンシンと Topo II の抗体を用いてウェスタンブロットを行うと、染色体 Scaffold にはコンデンシンのすべてのサブユニットと Topo II α が含まれていることがわかった (Blot のレーン)²⁴⁾。

B: コンデンシンと Topo II α はともに染色体中に軸状に存在し、またコンデンシンと Topo II α のシグナルのピークは互い違いにずれているように思われた。スケールバーは1 μ m。

C: 走査電子顕微鏡を用いて、コンデンシンのサブユニットと Topo II の局在を調べてみると、染色体のクロマチンがグループ状に中心部から放射状に伸びており、染色体 Scaffold を構成するコンデンシン (Topo II α も) がその根もとに近接して存在する²⁵⁾。コンデンシンのシグナルは非常に近接しているため (矢印)、染色体上ではコンデンシン同士が相互作用しているのだろう。スケールバーは300nm。さらに、水平方向の切片では、染色体の腕に沿ってコンデンシンが見える (D) スケールバーは1 μ m。

A, B は Maeshima K, et al: Dev Cell (2003) 4: 467-480, C, D は Maeshima K, et al: Chromosoma (2005) 114: 365-375 より転載。

では、コンデンシンが DNA 上で自己相互作用により、大きな構造体を作ることがわかっている²⁶⁾。これらは、コンデンシンが自己相互作用して、染色体中に軸状の高次な構造体 (= 染色体 Scaffold) を構築している可能性を示唆している。

VIII. 染色体凝縮に必須な二価陽イオン

染色体凝縮のメカニズムを考えるうえで忘れてはならないのが二価陽イオンである。1960年代、Coleらは染色体を分裂期の細胞から単離し、位相差顕微鏡下で観察した²⁷⁾(詳しくは文献3参照)。高度に凝縮している染色体は、位相差顕微鏡下でコントラストの強い黒っぽい構造体として観察され非常によく見える。そして、蒸留水の中に入れてやると、染色体は大きく膨らみ(数倍)、コントラストが低くなり見にくくなる。そこに、3mMのMg²⁺イオンを加えると、再び凝縮する。驚くべきことに、この過程は何回も繰り返すことができた。まるで染色体は自らの“形”を記憶しているかのようなのである。また、単離した染色体をEDTAで処理すると、染色体は膨らみ、容易に互にくっつき、壊れやすくなる(fragile)。これらの事実は、染色体凝縮にはタンパク質因子ばかりでなく、二価陽イオンが重要であることを明確に示している。Earnshawのグループは、コンデンシンのない染色体ではColeの行った実験は追試できないことを示した²⁸⁾。つまりEDTAなどで、この染色体を膨らませると、Mg²⁺イオンを加えても、形が元に戻らず、クロマチンが凝

集した単なる“塊”のようになってしまう。このことは、コンデンシンがクロマチンを染色体の形に正しく折り畳むのに必要であり、染色体の形を維持している(記憶している)分子であることを示している。

さらに、StrickらはSIMS (secondary ion microscopy) と呼ばれる測定法を用いて、分裂期染色体内でMg²⁺とCa²⁺イオンが高度に蓄積していることを明らかにした。彼らの報告では、間期の核内ではMg²⁺とCa²⁺イオンの蓄積はほとんど見られないが、分裂期に入ると、凝縮した染色体内に20mMもの非常に高い濃度で両イオンが蓄積される。一方、他の二価陽イオンでは、間期と分裂期において有意な差が見られなかった。このため、Mg²⁺とCa²⁺イオンが染色体凝縮には重要であることが示唆された。実際、キレーターで処理すると染色体の凝縮は阻害される。このため、二価陽イオンが染色体凝縮を引き起こす原動力の1つであることは間違いないだろう。しかしながら、Mg²⁺とCa²⁺イオンが染色体凝縮を引き起こすために、いつ、どのように供給されるかはまったくわかっていない。さらに、二価陽イオンによるクロマチンの凝集反応がコンデンシンによる凝縮とどのように連携しているのであろうか? 今後の課題である。

おわりに

本稿では“染色体はどのようにして1本のDNAから形成されるのであろうか?”という問題に対して、どのようにア

アプローチがなされてきたかを振り返ってきた。この10年間、コンデンシンが発見され、それが染色体中に軸状に存在することがわかった。このコンデンシンはDNA上で大きな構造体を形成し²⁴⁾、これはScaffold/radial loopモデルが提唱していたScaffoldを彷彿させる。(図2C)。その一方で、hierarchical helical foldingモデルで予測された250nmのドメインもまた見いだされている。上述のように、もはやどちらの古典的なモデルが正しいか、というレベルではないのかもしれない。また、コンデンシンがどのようにして染色体凝縮を引き起こすのかについては、いまだまったくわかっていないといつてよい。次なる課題は“コンデンシンはクロマチンを染色体内でどのように束ねているのだろうか？”ということに尽きるだろう。ループ状かもしれないし、違うかもしれない。この疑問に答えるために、筆者らは染色体を含む厚い切片を透過電子顕微鏡で角度を変えて撮影し、コンピュータで三次元再構成を行うトモグラフィーというテク

ニックにより、染色体の再構築像を作製し、染色体中のクロマチン線維をたどることで、直接クロマチンのorganizationを見ようとしている。また、コンデンシンやTopo II α はヒト染色体に軸状に存在する。これらは、ヒトゲノム上のどこに存在するのだろうか？ゲノム上の決まった場所か、ランダムか、染色体凝縮のメカニズムに対する疑問は尽きない。また、姉妹染色分体を束ねる働きを持つコヒーシオンも染色体凝縮に深く関与すると考えられる。コヒーシオンについては、本特集の他稿を参照していただければ幸いである。

謝辞 筆者は2004年までスイスジュネーブ大学Laemmli教授のもとで染色体構造の研究を行った。教授との日々の刺激的なディスカッションが本稿の土台となっている。深く感謝したい。本稿執筆の機会を与えてくださった渡邊嘉典先生、本稿に貴重なコメントをくださった大木本 圭博士に感謝いたします。本稿に対するご意見ご批判をお待ちしております。

— 文献 —

- 1) 細胞の分子生物学 第4版 (株式会社ニュートンプレス): 2004
- 2) Bradbury EM: Bioessays (1992) 14: 9-16
- 3) 前島一博: 蛋白質核酸酵素 (2005) 50: 1620-1629
- 4) Prigent C, et al: J Cell Sci (2003) 116: 3677-3685
- 5) Adolph KW, et al: Cell (1977) 12: 805-816
- 6) Sedat J, et al: Cold Spring Harb Symp Quant Biol (1978) 42: 331-350
- 7) Kireeva N, et al: J Cell Biol (2004) 166: 775-785
- 8) Gasser SM, et al: J Mol Biol (1986) 188: 613-629
- 9) Uemura T, et al: Cell (1987) 50: 917-925
- 10) Adachi Y, et al: Cell (1991) 64: 137-148
- 11) Hirano T, et al: Cell Biol (1993) 120: 601-612
- 12) Hirano T, et al: Cell (1994) 79: 449-458
- 13) Saka Y, et al: EMBO J (1994) 13: 4938-4952
- 14) Saitoh N, et al: J Cell Biol (1994) 127: 303-318
- 15) 平野達也: 実験医学 (1997) 15: 39-44
- 16) Hirano T, et al: Cell (1997) 89: 511-521
- 17) Kimura K, et al: Cell (1997) 90: 625-634
- 18) Kimura K, et al: Cell (1999) 98: 239-248
- 19) Bazett-Jones DP, et al: Mol Cell (2002) 9: 1183-1190
- 20) Hirano T: Curr Biol (2005) 15: 265-275
- 21) Ono T, et al: Cell (2003) 115: 109-121
- 22) Ono T, et al: Mol Biol Cell (2004) 15: 3296-3308
- 23) Hirota T, et al: J Cell Sci (2004) 117: 6435-6445
- 24) Maeshima K, et al: Dev Cell (2003) 4: 467-480
- 25) Maeshima K, et al: Chromosoma (2005) 114: 365-375
- 26) Yoshimura SH, et al: Curr Biol (2002) 12: 508-513
- 27) Cole A: Theoretical Biophysics (1967) 1: 305-375
- 28) Hudson DF, et al: Dev Cell (2003) 5: 323-336

— for beginners —

- ・ 細胞の分子生物学 第4版: 株式会社ニュートンプレス (2004)
- ・ 「染色体: 生命を担う驚異の構造」前島一博: 蛋白質核酸酵素 50, 1620-1629 (2005)

細胞工学 | CELL TECHNOLOGY
別刷

Printed in Japan © SHUJUNSHA Co., Ltd. 2006

本書の内容の一部あるいは全部を無断で複写複製(コピー)することは、法律で定められた場合を除き、著作者および出版者の権利の侵害となります。複写複製する場合には予め小社あて許諾を求めてください。

発行人
発行所

須摩春樹
株式会社 秀潤社

〒101-0054 東京都千代田区神田錦町3-5-1 興和一橋ビル別館
TEL: 03-5281-0551 (大代表) FAX: 03-5281-0550
03-5281-0552 (営業部直通) 03-5281-0555 (編集部直通)
E-mail: info@shujunsha.co.jp
URL: <http://www.shujunsha.co.jp/>

印刷・製本

株式会社 廣済堂