

氏 名	酒 井 晶 子
学位の種類	博士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2717 号
学位授与の日付	平成 15 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	染色体ダイナミクスを支配するコンデンシンとコヒーシン複合体の分子構造形成の機能的解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 柳 田 充 弘 教 授 藤 吉 好 則 教 授 大 野 陸 人

論 文 内 容 の 要 旨

コンデンシンおよびコヒーシンは、それぞれ染色体凝縮、姉妹染色分体間結合を担い、ともに染色体の正確な分配に必須な進化上保存されたタンパク質複合体である。両複合体はそれぞれ異なる SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) ファミリータンパク質のヘテロ二量体と、3 つまたは 2 つの non-SMC からなるサブ複合体を含む。SMC タンパク質は ATP 結合モチーフを含む 2 つの globular ドメインが長い coiled-coil 領域で隔たれた、特徴的な共通構造を持つ。申請者は両複合体がそれぞれどのような分子機構で染色体高次構造の構築を司るかを知らるために、分裂酵母のコンデンシン、コヒーシンのそれぞれについて、酵母細胞の大量発現系を用いてサブ複合体、およびホロ複合体の形で精製を行い、*in vitro* における DNA との相互作用を検討した。

これまでにコンデンシン SMC 二量体 (Cut3-Cut14) は非常に強い DNA reannealing 活性 (相補的な一本鎖 DNA の再会合を促進する活性) を持つことが知られていた。そこで reannealing 活性が SMC 二量体の持つ基本的な活性であるかどうかを検討したところ、コヒーシン SMC 二量体では全く活性が検出されなかった。また DNA reannealing 活性はコンデンシンホロ複合体では弱かったことから、*in vivo* においては non-SMC サブ複合体により Cut3-Cut14 二量体の活性が制御されているものと考えられる。これらの結果はコンデンシン SMC の持つ DNA reannealing 活性がコンデンシン特異的な機能、すなわち *in vivo* における染色体凝縮に重要であることを示唆している。

DNA 結合能に関しても、コヒーシン SMC 二量体はコンデンシン SMC 二量体よりも弱いことが明らかとなった。しかし、コンデンシンでは SMC 二量体の活性を non-SMC が抑えるのに対し、コヒーシンでは SMC 二量体に non-SMC サブユニットの Rad21 が付加することにより強い DNA 結合能を得ること分かった。これらの結果から、SMC 複合体は non-SMC サブユニットの存在により特異的な機能を発揮するだけでなく、SMC タンパク質自身にコンデンシンとコヒーシンでは性質の違いがあることが初めて明らかとなった。一方、どちらの複合体も *in vitro* で高次構造を持つ DNA に高い親和性を示したことから、*in vivo* においては SMC 複合体がクロマチン DNA 中に存在する高次構造と相互作用することで機能を果たすことが示唆された。

次にコンデンシン特異的な機能に必要な Cut3-Cut14 のドメイン構造を知るために、部分欠失複合体を用いて解析を行った。その結果、Cut3-Cut14 ヘテロ二量体が強い reannealing 活性を持つにはどちらか一方のサブユニットは両端の globular ドメインを欠いた coiled-coil 領域のみで十分であるが、もう一方は globular ドメイン 1 セット持つ必要があることが明らかとなった。また、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて DNA reannealing 反応を観察したところ、一本鎖 DNA 上に Cut3-Cut14 が複数会合している中間体の像が見られた。DNA に結合した Cut3-Cut14 ヘテロ二量体同士が相互作用して相補鎖を集合させることにより素早い DNA reannealing が起こるというモデルが考えられる。コンデンシン SMC の機能に重要な性質の一つとして、DNA 上での SMC 複合体間の相互作用が示唆される。最後に、これらの結果をもとにそれぞれの SMC 複合体の構造、分子的性質と機能との関連について考察を行った。

論文審査の結果の要旨

コンデンシンとコヒーシンは類似したサブユニット構成を持ちながら、染色体凝縮と姉妹染色分体間接着という一見全く異なる、しかしどちらも細胞周期において非常に重要な染色体高次構造の制御をそれぞれ担う。これらの複合体の役割に関してこれまでに遺伝学的、細胞生物学的な解析は数多くなされてきたが、それぞれ具体的にどのような分子機構でその機能を果たすのかを示唆する知見は未だ乏しい。そのような中、申請者は分裂酵母のコンデンシン、コヒーシン複合体の精製を精力的に行い、それぞれのサブ複合体がどのような性質を持つのか、それらの組み合わせによりどのようにして機能的な分子構築がなされるのか、という視点で研究を進めた。特にDNAと相互作用に着目し、生化学的な解析、および原子間力顕微鏡（AFM）を用いた構造学的なアプローチから解析を行った結果、それぞれの複合体の機能を考える上で重要な知見をもたらした。

申請者はまず、コンデンシンとコヒーシンのSMC二量体のみに着目して両者の比較を行い、コンデンシンSMCヘテロ二量体を持つDNA reannealing活性はコヒーシンSMCヘテロ二量体には見られないことを示した。同じファミリーに属するSMCの二量体同士でありながら、コンデンシン型とコヒーシン型でSMCそのものが活性に違いを持つという結果は本研究が初めての報告である。この結果は原核生物で一種類しかないSMCが進化の過程で機能を分化させていったことを示しており興味深い。一方reannealing活性がコンデンシンに特異的であるということは、DNA reannealingという、一般的に考慮されていない分子機構が染色体凝縮過程に関わるという仮説を強く支持する。

次に申請者はホロ複合体に関しても生化学的な比較を行い、コンデンシンとコヒーシンでは非SMCサブユニットの役割が特にDNA結合において異なることを明らかにした。これは非SMCサブユニットによるSMCヘテロ二量体の制御についての新たな知見であり意義深い。

また申請者は、コンデンシン特異的なDNA reannealing反応のメカニズムについてさらに詳細な解析を行い成果を得た。特にAFMを用いてコンデンシンSMCヘテロ二量体が一本鎖DNAのreannealingを引き起こす様子を可視化することに成功している。この試みによりreannealing反応過程が非常に明快に示されており、反応機構の理解を深めたという点で高く評価できる。申請者は観察結果から、一本鎖DNAに結合したSMC二量体同士が相互作用することで素早いreannealingが引き起こされる、というモデルを提唱している。この結果はまたDNA上でのSMC同士の相互作用がコンデンシンの機能に重要であることを示唆しており、コンデンシンの働く分子機構の核心に迫る糸口を与えたと言える。

以上、本論文ではコンデンシンとコヒーシンのDNAとの相互作用を生化学的、形態学的に解析することにより、それぞれが異なる機能を発揮するための分子基盤の解明に貢献した。特にコンデンシンSMCに特異的なreannealing反応の分子機構を詳細に解析する過程でSMCの性質に関するより深い理解と新たな知見をもたらしたと言える。よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。