

蛍光マグネシウムイオンプローブの開発と
それを利用した新たな染色体凝縮メカニズムの解明

前島一博¹⁾、松田知己²⁾、永井健治²⁾

¹⁾情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所・ゲノムダイナミクス研究室

²⁾大阪大学産業科学研究所生体分子機能科学研究分野

Elucidation of chromosome condensation mechanism by a newly-developed fluorescent
indicator for magnesium ion

Kazuhiro Maeshima¹⁾, Tomoki Matsuda²⁾, Takeharu Nagai²⁾

¹⁾Structural Biology Center, National Institute of Genetics

²⁾The Institute of Scientific and Industrial Research

—総説—

蛍光マグネシウムイオンプローブの開発と それを利用した新たな染色体凝縮メカニズムの解明

前島一博¹⁾、松田知己²⁾、永井健治²⁾

¹⁾情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所・ゲノムダイナミクス研究室

²⁾大阪大学産業科学研究所生体分子機能科学研究分野

Elucidation of chromosome condensation mechanism by a newly-developed fluorescent
indicator for magnesium ion

Kazuhiro Maeshima¹⁾, Tomoki Matsuda²⁾, Takeharu Nagai²⁾

¹⁾Structural Biology Center, National Institute of Genetics

²⁾The Institute of Scientific and Industrial Research

Abstract

For cell division, negatively charged chromatin must be condensed into chromosomes and segregated. While proteins like condensin are critical to organize chromatin into the appropriate chromosome shape, free divalent cations such as Mg^{2+} and Ca^{2+} , which condense chromatin or chromosomes in vitro, have long been considered important. However, technical limitations to measure intracellular free divalent cations, especially Mg^{2+} , have prevented us from elucidating their function. Here, we developed a Förster resonance energy transfer (FRET)-based Mg^{2+} indicator MARIO that monitors free Mg^{2+} dynamics throughout the cell cycle. By combining this indicator with Ca^{2+} and ATP indicators, we demonstrate that the levels of free Mg^{2+} , but not Ca^{2+} , increase during mitosis. The Mg^{2+} increase is coupled with a decrease in ATP, which is normally bound to Mg^{2+} in the cell. ATP inhibited Mg^{2+} -dependent chromatin condensation in vitro. Chelating Mg^{2+} induced mitotic cell arrest and chromosome decondensation, while ATP reduction had the opposite effect. Our results suggest that ATP-bound Mg^{2+} is released by ATP hydrolysis and contributes to mitotic chromosome

永井健治

〒567-0047 大阪府茨木市美穂が丘 8-1

Takeharu Nagai

Mihogaoka 8-1, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan

TEL: 06-6879-8480 E-mail: ngl@sanken.osaka-u.ac.jp

condensation with increased rigidity.

キーワード：マグネシウムイオン、蛍光指示薬、染色体凝集

要 旨

細胞が分裂する際、ヒトにおいて全長2mにもおよぶゲノムDNAはコンパクトに凝縮し、「染色体」と呼ばれるDNAの束を作り、ゲノムDNAを2つの細胞に正確に分配しなくてはならない。半世紀以上前、細胞に大量に存在するマグネシウムイオン(Mg^{2+})がゲノムDNA凝縮の鍵となりうるということが提唱されていたが、証明する手段がなかった。今回筆者らを含む共同研究グループは、蛍光タンパク質工学の技術を駆使して細胞内 Mg^{2+} 濃度の変化を鋭敏に感知できる蛍光 Mg^{2+} プローブタンパク質MARIOを作製することに成功した。さらに、MARIOを発現させた細胞のタイムラプスイメージングにより、 Mg^{2+} 濃度が細胞分裂の際に一過的に上昇することを示すとともに、負に帯電しているDNAの反発を弱め、染色体の凝縮を促進していることを明らかにした。本総説では Mg^{2+} の動態解析により新たな染色体凝縮メカニズムを解明した筆者らの仕事を簡単に紹介したい。

研究の背景

私たちの体は約40兆個の細胞からできている。その1個1個の細胞に、全長約2mにも達するゲノムDNAが収められている。ゲノムDNAは、細胞が分裂する際に切れたり、絡まったりするのを防ぐために凝縮し、染色体と呼ばれる46本のDNAの束になる。近年、コンデンシンなどの染色体を形作るタンパク質群が同定され、染色体レベルでの凝縮メカニズムが明らかにされつつある。一方、DNAは直径2nmのとても細い糸で、負電荷を持っている(Fig.1)。このDNAは正電荷を有するヒストンタンパク質の複合体に巻かれて、直径約11nmのヌクレオソーム線維を作ることが知られている(Fig.1)。しかしながらヌクレオソームには負の電荷が残っていて、互いに反発するため、細胞などの小さな空間に折り畳むことが困難であることが知られていた¹⁾。そこで、細胞内に10–20mMと多量に存在する Mg^{2+} ²⁾がヌクレオソームの負電荷を中和して反発を弱め、染色体の凝縮を引き起こすのではないかと半世紀以上前から予想されてきた³⁾。しかしながら、細胞内にフリーで存在している Mg^{2+} の変化を細胞周期を通じて計測する手法が存在しなかったため、実際に Mg^{2+} が染色体凝縮に働いているのかは未解明のままであった。

細胞内の Mg^{2+} の変化を計測する方法として蛍光プローブの利用が先ず想起されるが、長い歴史と豊富なデータの蓄積があるカルシウムイオン(Ca^{2+})を可視化する蛍光プローブに比して、 Mg^{2+} のそれはほとんど開発が進んでいないと言っても過言ではない。その理由は、競合する Ca^{2+} 結合能を抑えて Mg^{2+} 選択性を向上させることが難しいことにある。既存のプローブでも、 Ca^{2+} 選択性が完全に失われているわけではなく、生理的条件下の Mg^{2+} 濃度測定に影響がない程度に Ca^{2+} 親和性を低下させることにより細胞内の Ca^{2+} 濃度変化による影響が無視できるようになっている。有機小分子を用いた Mg^{2+} プローブは、開発が精力的に行われてきた Ca^{2+} プローブには及ばないものの多数報告があ

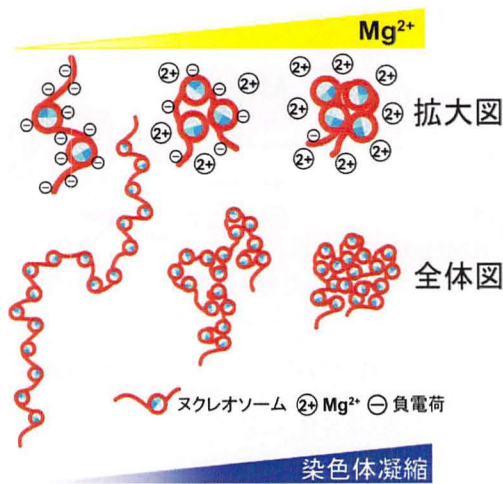


Fig. 1 DNA がヒストンに巻かれたヌクレオソーム線維は負電荷を持つため、反発して伸びている(左)。 Mg^{2+} イオンが増えてくると負電荷が中和され、反発が抑えられることによりヌクレオソーム同士が結合し、染色体の凝縮が進む(右)。文献 4 より修正後転載。

り、市販されているものを購入して用いることもできる⁵⁾。我々の染色体凝縮メカニズムの解明でも、細胞周期の各ステップでのスナップショットを解析する場合には市販のプロープ Mag-Fura-2 を用いていた⁴⁾。しかし、アセトキシメチルエステル化により Mag-Fura-2 の細胞内への取り込みは効率よく行われるものの、長時間観察している間に細胞外へ排出されてしまい、同一細胞内で細胞周期を通して起こる Mg^{2+} 濃度変化を時系列観察するのは困難であった。長時間観察に適した蛍光タンパク質を用いた遺伝子コードされたプロープも開発され始めてはいたが、あとで紹介する MARIO が開発される以前はわずかに 2 例の報告のみであった^{6,7)}。また、その中でもより実用に即したプロープと考えられた MagFRET は、 Mg^{2+} に対する結合親和性が高すぎ、かつ Mg^{2+} が結合した時の蛍光シグナル変化が微小なため、細胞内の Mg^{2+} 濃度変化を検出することが不可能であった。

そこで、我々は新たに原核生物の Mg^{2+} 輸送タンパク質 CorA の細胞内 Mg^{2+} 感受性領域 (CorA-CD) に着目し、立体構造情報が既知であった超好熱性の細菌 *Thermotoga maritima* と超好熱性のメタン菌 *Methanocaldococcus jannaschii*、および当時は立体構造が解かれていなかった大腸菌からクローニングした CorA-CD に 2 種類の蛍光タンパク質を組み合わせることで蛍光 Mg^{2+} プロープを作製し、評価を行った⁸⁾。その中で、 Mg^{2+} 濃度変化によりもっとも大きな変化率を示した大腸菌由来の CorA-CD を用いたプロープにさらに改良を加えることにより、細胞内の Mg^{2+} 動態を高精度に検出可能な蛍光 Mg^{2+} プロープ MARIO (MAGnesium Ratiometric Indicator for Optical imaging) を開発した (Fig. 2)⁴⁾。MARIO は細胞内の Mg^{2+} 濃度に合わせた結合力 (解離定数 K_d は mM レンジ) を有するように CorA-CD を改変されており、 Mg^{2+} が結合すると、2 種類の蛍光タンパク質が近くに引き寄せられて FRET が起こる結果、蛍光色が青から黄緑に大きく変化する。この MARIO の遺伝子をヒト HeLa 細胞内に導入して、プロープタンパク質を安定的に発現させ、蛍光顕微鏡で細胞周期を通してタイムラプス観察をおこ

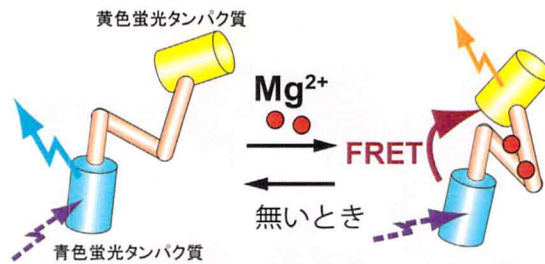


Fig. 2 新しい Mg^{2+} プローブ MARIO の原理 2 種類の蛍光タンパク質青色と黄色が、CorA-CD (肌色) でつながっている (左)。 Mg^{2+} イオンが CorA-CD に結合していない状態では青色蛍光タンパク質を励起すると青色の蛍光が放射される。一方、 Mg^{2+} イオンが CorA-CD に結合すると立体構造が変化する結果、2 種類の蛍光タンパク質が引き寄せられる。この構造変化により FRET (Förster resonance energy transfer) が生じ、青色蛍光タンパク質 (供与体) の励起エネルギーが黄色蛍光タンパク質 (受容体) に移動し、黄色蛍光が放出される (右)。

なった (Fig. 3)⁴⁾。その結果、細胞が分裂する際にフリー Mg^{2+} 濃度が顕著に上昇することを発見した (Fig. 3)。一方で、もう一つの細胞内の重要なイオンである Ca^{2+} の濃度動態を、研究グループが以前開発した蛍光 Ca^{2+} プローブ YC3.60⁹⁾ で調べたところ、変化が見られなかった⁴⁾。

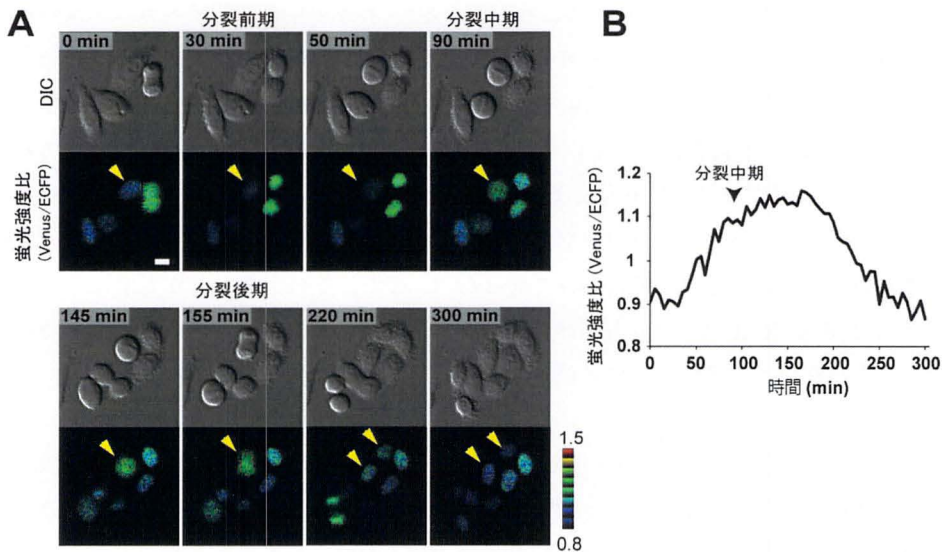


Fig. 3 (A) MARIO を安定的に発現させた HeLa 細胞のタイムラプスイメージング。上段の DIC 画像シリーズにより、分裂する細胞の形態を確認できる。下段の画像シリーズは MARIO の FRET 蛍光強度比を示したものである。時間経過と共に分裂している矢印の細胞において蛍光強度比が上昇し、2 つの細胞に分裂完了後、低下しているのが分かる。(B) 蛍光強度比を定量化したグラフ。横軸は時間を表し、分裂開始付近で上昇し、中期付近でピークになっている。文献 4 より修正後転載。

それではこの増加した Mg^{2+} はどこからやってきたのであろうか？ 筆者らは細胞内の Mg^{2+} の多くは ATP やタンパク質と結合していることが知られていたため、ATP の動態に注目することにした。そこで現・京大の今村らが開発した蛍光 ATP プローブ ATeam¹⁰⁾ を細胞内に発現させ、細胞内の ATP 量の変化を調べてみた。その結果、細胞が分裂する際に ATP 濃度が 1mM 程度減少していることが

わかった(Fig. 4)⁴⁾。この ATP の減少は細胞分裂を進めるために、紡錘体形成や染色体凝縮・分離によって、この時期エネルギーを貯蔵している ATP が多く消費されることによると思われる。その ATP 減少の際に ATP に結合し、ATP-Mg として存在していた Mg^{2+} が放出され、 Mg^{2+} 濃度が上昇し、染色体の凝縮が促進されると考えられた(Fig. 4)。実際、in vitro 実験では、ATP の存在下では Mg^{2+} による染色体凝縮が阻害され、ATP の加水分解により、再び染色体凝縮が起こった⁴⁾。また、細胞内の ATP 量を減らすと Mg^{2+} 濃度が上昇し、染色体はさらに凝縮した。逆にキレーターを用いて Mg^{2+} 濃度を低下させると、染色体は脱凝縮した⁴⁾。以上の結果は Mg^{2+} が反発するヌクレオソームの電荷を弱め、ヌクレオソームを互いに近づけて、染色体凝縮を促進していることを示している(Fig. 1)。in vitro では Mg^{2+} 濃度の上昇により、染色体は強度が増加することが知られている。 Mg^{2+} の上昇は染色体にストレスがかかる、2つの娘細胞への染色体運搬過程にも都合が良いと思われる。以上、本成果はゲノム DNA の「新たな凝縮メカニズム」を提唱するものである(Fig. 4)。

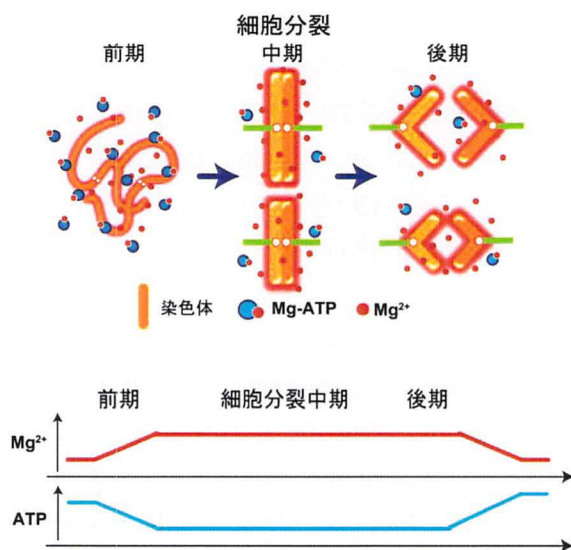


Fig. 4 細胞が分裂する際に Mg^{2+} イオンが増加し、染色体の凝縮が促進される。 Mg^{2+} イオンは ATP の減少により Mg-ATP から遊離することによって供給される。文献 4 より修正し転載。

細胞分裂の際に染色体が正常に形成されないと、遺伝情報が均等に受け継がれなくなり、遺伝情報の発現異常が起こる。また、DNA が損傷することによって細胞死やがん化などのさまざまな異常が起こると考えられている。また、 Mg^{2+} は細胞内に多量に存在して多くのタンパク質の働きを助けており、欠乏するときさまざまな細胞異常が現れることが知られている。本研究で得られたゲノム DNA が凝縮する仕組みや、蛍光 Mg^{2+} プロブ MARIO の利用により、細胞機能の破綻によって引き起こされる関連疾病の理解が進むことが期待される。

謝 辞

本研究の共同研究者の皆さま、とりわけ、細胞内 Mg^{2+} 測定に協力頂いた慶應義塾大学理工学部・岡浩太郎教授・新藤豊特任助教、細胞内 ATP 測定に協力頂いた京都大学生命科学研究科・今村博臣准教授・東京大学工学研究科・野地博行教授に深く感謝いたします。本研究で用いた *Thermotoga maritima* および *Methanocaldococcus jannaschii* のゲノム DNA は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを通して理研 BRC から提供を受けました。本研究は文部科学省科研費・新学術領域「少数性生物学」、科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 (CREST) (JPMJCR15G2, JPMJCR15N3)、および科研費 (16H04746) の支援を受けました。

文 献

1. Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., and Nozaki, T. (2014). Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma* 123, 225-237.
2. Romani, A. M. (2011). Cellular magnesium homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 512, 1-23.
3. Cole, A. (1967). Chromosome structure. *Theoretical Biophysics* 1, 305-375.
4. Maeshima, K., Matsuda, T., Shindo, Y., Imamura, H., Tamura, S., Imai, R., Kawakami, S., Nagashima, R., Soga, T., Noji, H., et al. (2018). A Transient Rise in Free Mg^{2+} Ions Released from ATP-Mg Hydrolysis Contributes to Mitotic Chromosome Condensation. *Curr Biol* 28, 444-451 e 446.
5. Trapani, V., Schweigel-Röntgen, M., Cittadini, A., and Wolf F. I. (2012). Intracellular magnesium detection by fluorescent indicators. *Methods Enzymol* 505, 421-444.
6. Lindenburg, L. H., Vinkenborg, J. L., Oortwijn, J., Aper, S. J., and Merckx, M. (2013). MagFRET: the first genetically encoded fluorescent Mg^{2+} sensor. *PLoS One* 8, e82009.
7. Koldenkova, V. P., Matsuda, T., Nagai, T. (2015). MagIC, a genetically encoded fluorescent indicator for monitoring cellular Mg^{2+} using a non-Förster resonance energy transfer ratiometric imaging approach. *J Biomed Opt* 20, 101203.
8. Payandeh, J., and Pai, E. F. (2006). A structural basis for Mg^{2+} homeostasis and the CorA translocation cycle. *Embo j* 25, 3762-3773.
9. Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., and Miyawaki, A. (2004). Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10554-10559.
10. Imamura, H., Nhat, K. P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., and Noji, H. (2009). Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15651-15656.