

染色体分配時のクロマチン制御機構の解明

〔1〕組織

代表者：関 政幸
(東北大学大学院薬学研究科)
対応者：田中 耕三
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：川嶋 聡
(東北大学大学院薬学研究科)

研究費：物件費 40 万円，旅費 0 千円

〔2〕研究経過

背景

真核細胞の DNA は、塩基性のタンパク質であるヒストン八量体(ヒストン H2A, H2B, H3, H4 のそれぞれ二分子から成る)に巻き付き、ヌクレオソームと呼ばれる構造をとる。転写、DNA 複製、修復などの様々な DNA 介在反応はヌクレオソーム構造によって負に制御されているため、それぞれの DNA 介在反応が進行するためには、適正なヌクレオソームの制御が必要と考えられている。染色体分配の基質である染色体自身もヌクレオソーム構造をもつ DNA から構成されているため、染色体分配時に特有のヌクレオソームの制御機構の存在が予想できる。実際、我々は出芽酵母の 439 のヒストン点突然変異株に対し、微小管阻害剤 (TBZ および benomyl) 感受性を指標に、染色体分配に異常をきたす **TBZ/benomyl sensitive (TBS)** ヒストン点突然変異株 24 株を取得していた。

目的

ヌクレオソームと様々な DNA 介在反応に関する研究は、近年ますますその重要性を増している。しかし、染色体分配におけるヌクレオソームの役割についてはほとんど研究がなされていない。本共同研究では、背景で紹介した 24 の TBS 株に着目し、それらの性状解析を行ない、ヒストンが染色体分配に寄与する分子機構の解明を本研究の目的とした。

概要

以下、研究活動状況の概要を記す。FACS 解析、ChIP 解析などは主に東北大学大学院薬学研究科で

行ない、Delta vision (顕微鏡) を用いた細胞生物学的な解析およびテトラド装置を用いた新規な酵母株の樹立を東北大学加齢医学研究所で行なった。主に分担者の川嶋が両研究室を行き来し、実験を行ない、田中と関はデーターの解釈、議論を行ない、研究を円滑に遂行する体制をとった。

研究打ち合わせ等の開催状況

基本的には、分担者の川嶋が薬学研究科において関と議論し、加齢研において田中と議論し、関と田中は電話やメールなどで新規なデーターの解釈や、次の実験の方針などを議論した。

さらに 1~2 ヶ月に一度は、関、田中、川嶋が一同に会し (薬学研究科 or 加齢研究にて)、研究打ち合わせを開催した。

〔3〕成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、24 種の TBS 株のうち、H2A-I112A, -L116A, -L117A, -S121A の 4 株について焦点を当てて解析した。どの株も微小管阻害剤 nocodazole による G2/M arrest の解除後に、細胞周期が異常になることを FACS 解析で明らかにした。

第 2 に、上記の TBS 株の表現型が spindle checkpoint の異常に由来するのか、それが欠損する *mad2* 株を positive control として、FACS 解析および Pds1 の存否 (ウェスタン法にて) を指標に調べた、その結果、いずれの TBS 株も spindle checkpoint は正常に作動していることがわかった。

第 3 に、上記の TBS 株の中から H2A-I112A 株を代表として選び、nocodazole 処理で H2A-I112A 株に生じる染色体分配の異常を、細胞生物学的に捉える実験を行なった。具体的には、微小管およびセントロメア (染色体の中で微小管と結合して、その分配の基礎となる構造) を蛍光タンパク質で可視化し、nocodazole の処理の有無で H2A-I112A 変異株に生じる異常を Delta vision 顕微鏡で観察した。その結果、nocodazole 非存在下で H2A-I112A 株は

野生型と同様に、染色体分配の異常は見られなかった。一方、nocodazole 処理後、H2A-I112A 株に特異的に染色体分配の異常が現れた。

第4に、上記の表現型は tension-sensing と呼ばれる機構の異常が原因と推測された。そこで、tension-sensing を担う Key 分子である CPC 複合体および Sgo1 のセントロメアへの結合が H2A-I112A 株でどうなっているのか、クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) を用いて調べた。その結果、CPC のサブユニット Ipl1 の量が H2A-I112A 株において、野生型の半分まで低下していた。さらに、Sgo1 については H2A-I112A 株で検出限界まで激減していた。これより、H2A-I112A 株で tension-sensing に何らかの異常が起きている可能性が高まった。

第5に、tension-sensing の異常の帰結として mono-polar attachment (2つのセントロメアが微小管により両極に引っ張られないため見られる事象) の頻度の上昇が H2A-I112A 株に起っていると考えられた、そこで、positive control として *ipl1* 変異株を用いて、mono-polar attachment の頻度を調べた。その結果、H2A-I112A 株では *ipl1* 株には及ばないが野生型に比べ顕著に、その頻度の上昇が観察された。

第6に、H2A-I112A 株で観察された Sgo1 のセントロメアへの結合量の低下 (第4の結果) が、*SGO1* 遺伝子の転写の低下によるものか調べた。その結果、*SGO1* および *IPL1* の転写は H2A-I112A 株で野生型と同程度起っていた。次に、Sgo1 の細胞内含量をウェスタン法で調べたところ、驚くべきことに Sgo1 のタンパク量が野生型の 1/3 程度まで低下していた。この現象は、Ipl1 には起きていなかった。Sgo1 はつい最近、ヒストンと機能的に関連があるとの報告が他のグループからなされており、Sgo1 が H2A-I112A を含んだヌクレオソームへの相互作用が減弱し、free の Sgo1 分子が選択的に分解されている可能性が示唆された。

第7に、これまでの結果 (第4,6) から、Sgo1 が H2A-I112A 変異による影響を受ける直接の候補タンパク質であることが予想された。そこで、*SGO1* 遺伝子を H2A-I112A 株に大量発現させ、変異株の TBZ/benomyl 感受性が相補されるか調べた。その結果、部分的にはあるが、*SGO1* の過剰発現は H2A-I112A の表現型を抑制した。

第8に、上記の *SGO1* 過剰発現の系を、H2A-I112A 株以外の TBS 株にも適応した。その結果、第1で述べた H2A-L116A, -L117A, -S121A 株および H3-R52A 株も部分的に相補された。H2A-I112, -L116, -L117, S121, H3-R52 はヌクレオソームエントリー部位と呼ばれる領域に局在しており、この領域が Sgo1 との機能的な相互作用に重要と想定された。驚いたことに、H2A-E57A 株の TBZ/benomyl 感受性も *SGO1* により部分的に相補された。H2A-E57 はヌクレオソームエントリー領域とは空間的に離れている “acidic patch” と呼ばれている領域に属している。従って、Sgo1 はヌクレオソームの2つの異なる領域と機能的に関連することがはじめて示唆された。

以上より、ヌクレオソームは Sgo1 が機能するための基盤を提供する役割を担うことが示唆された。Sgo1 はセントロメアのコヒーシンの分解を防ぐため (守護神 ; Shugoshin, Sgo) と命名された経緯がある。本研究の第6の結果より、H2A-I112A 株では Sgo1 が選択的に分解を受けている可能性が示唆されている。このことは、ヌクレオソーム自身が Sgo1 の守護神として機能すること意味する。今後の Sgo1 とヌクレオソームとのより詳細な物理的、機能的関連を解析することが重要であろう。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、東大分生研の堀越博士を含めた学外研究者との交流にも結びつき、飛躍的に活性化しつつある。

また本共同研究の「コアヒストンの視点から DNA 介在反応におけるクロマチン制御機構を捉える」という新しい視点が評価され、平成 22 年度に新規に発足した新学術研究領域「ゲノム複製・修復・転写のカップリングと普遍的なクロマチン構造変換機構」中の計画研究のひとつに採用され、今後の発展が大いに期待されている。

[4] 成果資料

- (1) Satoshi Kawashima, Yu Nakabayashi, Kazuko Matsubara, Norihiko Sano, Takemi Enomoto, Kozo Tanaka, Masayuki Seki and Masami Horikoshi “Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation” *EMBO J.* revise 準備中 (の 3 人ともに corresponding authors)