

## 染色体分配時のコアヒストン機能の解明

### [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：中林 悠  
(東北大学大学院薬学研究科)

研究費：物件費 16万1,599円, 旅費 0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、DNA 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。変異により表現型を示す 24 残基のうち一つを除いた 23 残基は TBS-I-III と名付けたヌクレオソームの領域のいずれかにマップされた。TBS-I と -II に関しては平成 22, 23 年度の共同研究により Sgo1 (染色体分配に関わるタンパク質)との関係が深いことを報告した。一方、TBS-III の機能については不明のままである。

#### 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 TBS-III 領域に属する

コアヒストンの 4 残基に着目し、それらの性状解析を行ない、ヒストンの TBS-III 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 解析や 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。主に分担者の中林が両研究室を往復し、実験を行ない、田中と関はデータの解釈、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、分担者の中林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の解釈や、次の実験の方針などを議論し、さらに1~2ヶ月に一度は、関、田中、中林が一同に会し(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TBS-IIIと名付けた領域はヌクレオソームの内部に位置する4残基(H2B-D71, H4-L97, -Y98, -G99)が該当する。TBS-IIIのどの残基に変異が入った株も、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-III株の表現型が、TBS-Iや-IIの株と同様にSGO1の過剰発現により相補されるか調べたところ、されなかった。このことは、TBS-IIIとTBS-I & -IIの機能に相違があることを示唆している。

第3に、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、Delta vision顕微鏡でTBS-III株の中のH4-L97A株を代表とし、染色体分配異常を観察した。その結果、nocodazole非

存在下で H4-L97A 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、H4-L97A 株に染色体分配の異常が誘導された。

第 4 に、TBS-III に属する残基はヌクレオソームの内部に位置するため、セントロメアに存在するヒストン H3 バリエント Cse4、セントロメア周辺に存在するヒストン H2A バリエント Htz1 のクロマチン結合に関わる可能性が考えられた。そこで、これらのヒストンバリエントのセントロメア周辺での存否を ChIP 法により定量した。その結果、Cse4 の C 末にタグをつけると TBS-III 株は合成致死となることが半明した。さらに Htz1 のクロマチン結合は極端に低下することがわかった。以上を総合すると、TBS-III 残基は染色体分配を制御するヒストンバリエントの機能に重要であることが考えられた。

第 5 に、上記で観察されたセントロメア周辺のクロマチンの動態異常が、セントロメアに相互作用する一群の染色体関連タンパク質のクロマチン結合の異常に繋がるのか、ChIP 法を用いて調べた。その結果、Scm3 や Mif2 などを含めた複数の因子のクロマチン結合が TBS-III に属する H2B-D71A 株において野生型に比べ大きく低下していた。

第 6 に、クロマチンへの結合が低下したタンパク質 (第 5 の結果) は、細胞内のタンパク量が一定にも関わらずクロマチンに結合できないのか? そもそもタンパク質量の低下によるものなのか? などの可能性を区別できない。そこで次に、第 5 で調べたタンパク質の細胞内の総量をウェスタンブロッティング法により調べた。その結果、驚くべき事に Scm3, Mif2, Htz1 などの複数の因子のタンパク質量が H2B-D71A 株で大きく低下していた。一方、染色体分配に関わるコヒーシン複合体のサブユニット Smc1 のタンパク質量に変化はなかった。

第 7 に、第 6 の実験でタンパク質量が低下した因子について、1)分解されやすい? 2)転写量が少ない? などの可能性が考えられた。そこで、SCM3, HTZ1, CSE4 の mRNA の量をノザンブロッティング法により調べた。その結果、H2B-D71A 変異株において HTZ1 の転写量は野生型と同じであったのに対し、CSE4 と SCM3 の転写量は半分程度まで低下した。第 4, 6 の結果から、H2B-D71A 株において HTZ1 は十分に転写されているが、その翻訳産物はクロマチンに結合できず、不安定化して Htz1 のタンパク質量が低下したと考えられた。Htz1 はプロモーター領域に存在することから、CSE4 や SCM3 の転写の低下が H2B-D71A 株における Htz1 の機能不全により副次的に誘導される可能性

が考えられた。そこで、htz1 欠損株で CSE4 や SCM3 の転写の低下が起こると予想した。ノザン法により、予想通りであることが確かめられた。

最後に、H2B-D71A と Cse4 へのタグの付加が合成致死になる事象が、htz1 欠損と Cse4 へのタグ付加でも起こるか否かを調べた。その結果、合成致死性は観察されなかった。このことは、H2B-D71A の機能は Htz1 の機能のみを支えているわけではないことを強く示唆している。

以上より、現時点で考えられる TBS-III の機能を推測してみる。TBS-III 変異により Htz1 の機能が不全なり、それに伴う染色体分配因子の転写量の低下が起こる。さらにセントロメア周辺での染色体分配因子群の結合不全が起こる。この事象と並行して、セントロメアの要である Cse4 の量の低下 (転写量とタンパク質量) と機能の低下 (合成致死性) が起こり、Cse4 の細胞における機能も低下する。このような複合的なセントロメア周辺の機能の欠損が TBS-III 株において引き起こされ、その結果として染色体分配に異常が起こると考えられる。

### (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。

4 年間継続の本共同研究中の平成 22 年度に「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、その年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、継続中である。昨年度の TBS-I と -II に関する成果は、下記の論文発表に繋がり、その内容は平成 23 年 8 月 5 日付けの科学新聞に記事として紹介されている。本年度の TBS-III に関する成果も発展性があり、論文による公表を急ぎたい。

### [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.* 30, 3353-3367, 2011 ( の 3 人ともに corresponding authors)