

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
(東北薬科大学)
対応者：田中 耕三
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：中林 悠
(東北薬科大学)

研究費：物件費 10 万円，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。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。我々は微小管阻害剤 (TBZ および benomyl) に感受性を示し染色体分配に異常をきたす TBZ/benomyl sensitive (TBS) 出芽酵母ヒストン点突然変異株 24 株を取得し、変異により表現型を示す 24 残基のうち一つを除いた 23 残基が 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ることを報告してきた (論文 1)。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 (論文 1)。一方、平成 24, 25 年度の共同研究により TBS-III についてヒストン H2A のバリエーションである H2A.Z との関連を示唆してきた。

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未だに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 (H2B-D71, H4-L97, -Y98, -G99) のうちの特に H2B-D71 に着目した。分担者の中林が開発した FALC 法 (TBS-III 領域に

おける H2B-D71A 変異について「その変異に由来する表現型はカノニカルなヒストン H2A と H2B からなる二量体の機能不全に依るのか、あるいはヒストンバリエーション Htz1 [酵母 H2A.Z ホモログ] と H2B からなる二量体の機能不全に依るのか、を区別できるか?」という問題提起を行い、後者の機能不全に依るとの実験的証拠を得ることに成功し、[論文 2] として発表) を用いれば、脊椎動物細胞における H2A.Z とペアを組んだ H2B の D68A 変異 (酵母の D71A 変異に該当) を解析できる。そこで本年度は前年度に引き続き酵母 TBS-III 領域の解析に加え、ニワトリ DT40 細胞を用い、H2B-D68A 変異による染色体分配異常の検出とその性状解析を目指した。

概要

研究活動状況の概要は以下である。酵母のフローサイトメトリーによる細胞周期の解析や ChIP 解析およびニワトリ DT40 細胞を用いたヒストン H2A.Z の TBS-III 領域の解析を主に東北薬科大で行なった。一方、Delta vision (顕微鏡) を用いた細胞生物学的な解析およびテラド装置を用いた酵母株の樹立を東北大学加齢医学研究所で行なった。また分担者の中林が両研究室を往来し、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、分担者の中林が東北薬科大学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 3 ヶ月に一度は、関、田中、中林が一同に会し (東北薬科大学 or 加齢研究にて交互に)、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、出芽酵母において、TBS-III 変異体のセントロメアの転写産物量を RT-PCR 法により解析した。Htz1 は転写を制御し、また、セントロメア領域の転写が正常な染色体分配に関わることから、Htz1 のクロマチン結合が消失する TBS-III 変異体では、セントロメアの転写に異常が生じている

可能性が考えられた。実際、TBS-III 変異体および *htz1* 欠損株のセントロメアの転写産物量は、野生型よりも増加しているという結果を得た。

第2に、セントロメアの転写が細胞周期のどの時期に起こるのかを調べるために、細胞を G1 期、S 期、M 期にそれぞれ同調し、セントロメアの転写産物量を解析した。その結果、セントロメアの転写産物量は S 期に同調した細胞で一時的に増加し、G1 期、M 期では抑制されていることがわかった。一方、TBS-III 変異体では細胞周期を通じて高い転写産物量が観察された。

第3に、ガラクトース誘導性プロモーターを3番染色体のセントロメア領域に導入し、人工的にセントロメアの転写を誘導することができる酵母株を作製した。この酵母株は、ガラクトースの存在下で過剰なセントロメア転写が誘導されることを確認し、さらに微小管重合阻害剤に感受性を示すことを確認した。

第4に、TBS-III 変異 (H2B-D71A) の影響をニワトリ DT40 細胞で解析するために、FALC 法を用いた H2B 機能解析系の構築を行った。始めに、出芽酵母において解析系が働くか確認した。その結果、野生型 H2B が存在する条件下でも、FALC 法により Htz1 と結合した H2B-D71A 変異の表現型が観察されることを確認した。

第5に、DT40 細胞での FALC 法による H2B 機能解析系を構築した。ドキシサイクリン (Dox) の添加により H2A.Z の発現を抑制できる細胞株を用い、H2A.Z の代わりに H2B-H2A.Z 連結ヒストンを発現する細胞を作製した (FALC 法 [論文2 参照])。この細胞は Dox 添加後も通常の細胞と同様に増殖可能であることを確認し、また、H2B-H2A.Z 連結ヒストンも正常に発現していることを確認した。

第6に、第4および5で得られた結果を踏まえ、出芽酵母 H2B-D71A に相当するニワトリ H2B-D68A 変異を導入した H2B(D68A)-H2A.Z 連結ヒストン発現細胞を作製した。この細胞は、Dox 添加後3日目には細胞増殖が停止し、致死性を示すことが明らかとなった。これは、出芽酵母で得られた結果 (論文2) と同様に、H2B-D68A 変異により H2A.Z のクロマチン結合能が消失してしまうためであることが、細胞分画の実験から明らかとなった。

以上の実験結果を総合すると、TBS-III 変異により Htz1 のクロマチン結合が不全となり、細胞周期に依存したセントロメアの転写制御に破綻が生じる。S 期以外に起こるセントロメア領域の異常な転写は、

セントロメア周辺のクロマチン構造、あるいは動原体の形成に何らかの影響を与えることで染色体分配を阻害すると予想される。

また、出芽酵母だけでなく、ニワトリ DT40 細胞においても H2B-D68A 変異が H2A.Z のクロマチン結合に重要であることから、出芽酵母で同定された TBS-III が果たす役割は、脊椎動物細胞においても保存されていると考えられる。

(3-2) 波及効果と発展性など

本年度末で5年間継続の本共同研究は、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た (本年度末終了)。

本共同研究の中間点における、TBS-I と -II に関する成果は、論文(1)の発表に繋がり、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。また、TBS-III 領域における H2B-D71A 変異に着目した解析から FALC 法を開発 (論文2) し、その内容は、平成26年1月24日付けの科学新聞に記事として紹介された。

昨年度および本年度の TBS-III に関する成果もセントロメアにおけるヒストンの役割に関し、新しい視点を染色体分配の研究分野に提供する効果が期待される。本共同研究の締めくくりとしての論文発表を急ぎたい。

[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)
- (2) Yu Nakabayashi, Satoshi Kawashima, Takemi Enomoto, Masayuki Seki and Masami Horikoshi “Roles of common subunits within distinct multisubunit complexes” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 699-704, 2014(の2人ともに corresponding authors)