

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20870004

研究課題名（和文）新規キネトコア結合因子Kapタンパク質群の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of Kap proteins, novel kinetochore-binding factors

研究代表者

杉山智康 (SUGIYAMA TOMOYASU)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：80503490

研究成果の概要（和文）：染色体上の機能性領域であるキネトコアは、染色体分配に極めて重要であるが、その構造の全容は未だ明らかにされていない。本研究では、分裂酵母を用いて新規のキネトコア結合因子を同定した。そのうちの一つ Kap1 の変異株では、染色体の不安定化や DNA 修復などの異常が生じていた。また、別のキネトコア因子 Kap2 の同定にも成功した。今後これらの研究を発展させることで、未解明な点の多いキネトコア機能の解明に繋がるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I have identified two novel proteins of fission yeast, Kap1 and Kap2, both of which associate with kinetochore. *kap1* mutation leads to defects in chromosome segregation and DNA damage responses. These results provide a new insight into kinetochore function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体分配・キネトコア・CENP-A

1. 研究開始当初の背景

CENP-A は、すべての真核生物に保存されているヒストン H3 バリエントであり、染色体セントロメア領域内の特定の部分にのみヌクレオソームの構成因子として存在している。この CENP-A を含むヌクレオソームを土台にして、非常に多数のタンパク質が集合

することで、キネトコアが形成される。キネトコアは、細胞分裂期に紡錘体から伸長してきた微小管が結合する部位であるために、正常な染色体分配に必要な不可欠の構造体である。したがって、CENP-A を正確にキネトコア形成領域にのみ局在化させる機構あるいはそれ以外のキネトコア機能に異常が生じる

ことは、染色体の異数化につながり、その結果、細胞のがん化やダウン症などの重篤な疾患を引き起こす。さらには、染色体の異数化は、がんの悪性化をも引き起こすため、これら疾患の発症する機構の解明、および対処療法を開発する手掛かりを得るためにも、キネトコアの形成、および機能を理解することは極めて重要な課題であると言える。

キネトコアはその機能の重要性から、キネトコアタンパク質をコードする遺伝子は大部分が生育に必須である。したがって、キネトコアの構築・調節に関わる因子を同定するためには、部分的な機能喪失あるいは温度感受性を示す変異株の探索に代表される遺伝学的なスクリーニングを用いることが一般的である。この外にも、既存の変異株の表現型を抑圧 (suppress) するマルチコピーサプレッサーを単離する方法が挙げられる。このようなスクリーニングが容易に行え、且つ高等真核生物と類似したシステムを用いている生物として分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) が挙げられる。実際、分裂酵母では遺伝学的なスクリーニングにより、多くの mis (minichromosome instability) タンパク質群を始めとする様々なキネトコア結合因子が同定されてきた。さらに、これらの分裂酵母で同定された遺伝子の殆どは、ヒトなどの高等動物にも存在しており、その機能も保存されていることが明らかになっている。これらの結果は、分裂酵母を用いた研究法が、高等動物における細胞レベルの生命現象を理解するためには、極めて有用・効果的なものであることを明確に示している。

近年の研究の進展により、キネトコアのみならず、キネトコアを取り囲むように存在しているヘテロクロマチン構造も、正常な染色体分配には不可欠であることが分かっている。分裂酵母からヒトにまで共通してみられるヘテロクロマチン構造の特徴として、ヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) のメチル化およびヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) の集積がよく知られている。我々は、ヘテロクロマチンの形成には RNA interference (RNAi) が重要であることを示してきた。RNAi はヘテロクロマチン領域由来の転写産物を分解し、small interfering RNA (siRNA) を産生する。この siRNA は Ago1、Chp1、Tas3 から形成される RITS (RNA-induced

initiation of transcriptional gene silencing) 複合体に取り込まれ、RITS 複合体に配列特異性を与える。これにより RITS 複合体はヘテロクロマチンを形成すべき領域に結合する。RITS 複合体は、Stc1 を介して RDRC (RNA-dependent RNA polymerase complex) や CLRC (Clr4 methyltransferase complex) をリクルートし、H3K9 のメチル化を行う。そして、H3K9 のメチルを認識してクロモドメインタンパク質 Swi6、Chp2 がクロマチン上に集積し、ヘテロクロマチン構造が完成する。このヘテロクロマチン構造を土台にして、Rad21 などのコヒーシン複合体や、様々なヒストン修飾酵素が機能する。これにより、染色体の対合や分配が正常に起こることが明らかにされている。

上記のように、キネトコアやヘテロクロマチン形成の機能および機構は徐々に明らかにされつつあるものの、未解明な点も残されている。例えば、CENP-A が何故キネトコア領域にのみ局在するのか、キネトコアを構成する因子は全て同定されたのか、などが挙げられる。したがって、染色体分配の全容を解明するためには、さらなる研究が必要とされている。

2. 研究の目的

正常な染色体分配は、ゲノム安定性の維持という観点から、通常の細胞増殖時だけではなく、配偶子を形成する減数分裂時においても正確に行うことが必要不可欠なプロセスである。本研究課題開始までに、分裂酵母をモデル生物として、二種類のキネトコア結合タンパク質候補 (kinetochore-associated protein, *kap1*, *kap2*) を見いだしていた。本研究期間内にこれらの研究を進展させ、Kap1 および Kap2 の機能解析を行い、キネトコア機能の新たな知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *kap1* 変異株の表現型解析および Kap1 の機能解析

kap1 温度感受性変異株が *kap1* 遺伝子のどこに変異を持つかをシーケンシングにより明らかにする。制限温度下において、①染色体の不均衡分配が起きているか否かを、酵母

を固定した後 DAPI で染色し蛍光顕微鏡で観察する、② CENP-A の局在に変化が起こるか否かを、CENP-A-GFP を用いた蛍光観察あるいは myc-CENP-A を用いたクロマチン免疫沈降により実験を行う、③ Kap1 が CENP-A と直接結合するか否かを、タグを融合させた株

(例:myc-CENP-A/Kap1-GFP) を用いて免疫沈降を行う。また、許容温度下において DNA 修復や微小管重合阻害剤 (TBZ, thiabendazole) などに対する反応に異常が見られないか否かを、DNA 障害を起こす薬剤 (例:MMS, methylmethane sulfonate, Bleomycin, Hydroxyurea) や TBZ を含む寒天培地上での生育、あるいは UV 照射後の生育を調べ検討する。

(2) *kap1* 変異と他の変異株との遺伝的相互作用の解析

上記の実験で Kap1 が CENP-A の局在化に関与する事明らかになった際には以下の実験を行う。① CENP-A の局在化に関与する既知の因子 Mis6, Mis18 (Takahashi et al, 2001; Hayashi et al, 2004) と Kap1 の遺伝学的上下関係を GFP 融合タンパク質の局在を指標に調べる。具体的には Mis6-GFP 温度感受性変異株、Kap1-GFP *mis6* 温度感受性変異株を制限温度下で培養後、顕微鏡で GFP シグナルを観察する。② 通常 CENP-A の局在に関与する因子の変異は、スピンドルチェックポイントに関与する因子 (例: *mad2*, *mis12*) の変異と遺伝学的相互作用を示し、二重変異株は著しく増殖が遅くなるか致死となる。そこで、*kap1* 変異株がチェックポイント因子との遺伝学的相互作用を示すかどうかを調べる。

(3) Kap2 の解析

Kap2 がキネトコアに存在するかどうかを、GFP を融合させた Kap2 の局在を観察する事、およびクロマチン免疫沈降法により Kap2 がキネトコア領域に結合しているかを検討する。キネトコアへの結合が確認されれば(1)で述べた Kap1 の解析方法により、Kap2 の機能を解析する。

(4) 新たな Kap 候補遺伝子の探索

分裂酵母ポストゲノムデータベース (http://cgl.riken.go.jp/gene/login_e.html) 中に、YFP 融合タンパク質の過剰発現による細胞内局在データベースがある。その中

で、キネトコアに局在すると思われる因子を選び、実際にキネトコアに存在するかどうかを一つずつ GFP 融合タンパク質を発現する株を作製し検証して行く。新たなキネトコア結合因子を見いだした際には、(1)および(2)で述べた方法で解析を進める。一般的にキネトコア結合因子は酵母においても 100 を超えると予想されている為、数多くの因子を見いださうと考えている。

4. 研究成果

(1) *kap1* 変異株の表現型解析および Kap1 の機能解析

kap1 温度感受性変異株の作製は、PCR を用いたランダム変異導入法により行った。このため変異がどの部分に、何カ所生じているのかは不明であった。そこで、*kap1*⁺ 遺伝子を含むゲノム領域を変異株から PCR により増幅した。この増幅断片をダイレクトシーケンスにより DNA 配列を決定した。その結果、Kap1 の N 末に近い部分に存在するグルタミン酸 (E: GAA) がグリシン (G: GGA) へと置換する変異が生じていた。他の部分は野生株と一致した。したがって、このアミノ酸置換が *kap1* 変異の原因であることが明らかになった。

次に、*kap1* 温度感受性変異株が高温以外のストレスに高感受性を示すかを検討した。野生株、および *kap1* 温度感受性変異株を許容温度下 (26 °C) で培養し、その後培養液の希釈系列を用意する。これらの希釈系列を、MMS、Bleomycin、Hydroxyurea、あるいは TBZ を含む薬剤プレートにスポットした。また、通常の完全培地にスポットした後、UV クロスリンカーを用いて、種々の強度の UV を照射した。これらを 3~4 日間培養した (30 °C)。その結果、*kap1* 温度感受性変異株は Bleomycin、Hydroxyurea、UV、TBZ に高感受性を示した。しかし、MMS には特に感受性を示さなかった。これらの結果から、*kap1* 温度感受性変異株では、様々な DNA 障害 (Bleomycin: DNA double strand break、Hydroxyurea: dNTP プールの枯渇、UV: ピリミジンダイマー) への応答、すなわち DNA 障害への反応あるいは、DNA 修復に異常が生じていることが示唆された。さらに、TBZ に感受性を示す株は、染色体分配に異常が生じていることが知られているため、*kap1* 温度感受性変異株でも染色体分配が

正常に機能していないことが示唆された。

TBZ 高感受性の結果から、*kap1* 温度感受性変異株ではゲノム不安定化が起こっていると推測される。これを確かめるために、分裂酵母 3 番染色体由来のミニ染色体 Ch16m23 を用いた実験を行った。まず、Ch16m23 を保持する野生株と *kap1* 温度感受性変異株を作製した。これらの株を一定時間培養後、プレートに蒔き、Ch16m23 を保持したままであるかをアッセイした。その結果、*kap1* 温度感受性変異株では分裂を繰り返すたびに、Ch16m23 の喪失頻度が上がっていることが観察された。したがって、*kap1* 温度感受性変異株では単に TBZ に対する感受性が上昇しているというのではなく、実際に染色体を安定的に次世代に伝えることが部分的に不可能になっていることを示している。

上記のような、染色体分配異常および Kap1 がキネトコアに結合しているという結果より、Kap1 が CENP-A のキネトコアへの結合を性に制御している可能性が考えられた。これを検討するために、まず GFP タグを付加した CENP-A を発現する野生株、*kap1* 温度感受性変異株を作製した。次に、これらの株を許容温度下で一定時間培養したのに、制限温度下で培養を継続した。そして、制限温度下での培養後、継時的にサンプリングを行い、CENP-A シグナルに変化が生じるかどうかを蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。しかしながら、制限温度下で培養を続けても特に CENP-A シグナルに変化は観察されなかった。したがって、少なくとも我々が用いている *kap1* 温度感受性変異株では、CENP-A の局在に異常が生じないことが明らかとなった。

(2) *kap1* 変異と他の変異株との遺伝的相互作用の解析

CENP-A の局在に関与する因子の変異は、スピンドルチェックポイントに関与する因子 (例: *mad2*、*mis12*) の変異と遺伝学的相互作用を示し、二重変異株は著しく増殖が遅くなるか致死となる。しかしながら、*kap1* 温度感受性変異株と *mad2* 欠損株あるいは *mis12* 温度感受性変異株と組み合わせても、顕著な増殖遅滞は観察されなかった。したがって、Kap1 の機能は CENP-A 局在に関与するというよりは、スピンドルチェックポイントに関与することが示唆された。

(3) Kap2 の解析

Kap2 が本当にキネトコアに結合するかどうかを検討した。まず、Kap2 に GFP タグを付加した。その結果、核内にドットを形成していることが明らかとなった。さらに、クロマチン免疫沈降を行ったところ、キネトコアに結合していたが、その周辺のセントロメア領域のヘテロクロマチンには結合していなかった。また、*kap2* 欠損株を作製し、表現型を調べた。しかしながら、*kap1* 温度感受性変異株で観察されたような、TBZ 高感受性は観察されなかった。Kap2 の機能は CENP-A などに代表されるキネトコアタンパク質とは異なることが予想されるが、詳細な機能解明は今後の課題である。

(4) 新たな Kap 候補遺伝子の探索

分裂酵母ポストゲノムデータベース中で、キネトコアに局在すると思われる因子を選び、実際にキネトコアに存在するかどうかを一つずつ GFP 融合タンパク質を発現する株を作製した。現在までに、10 以上の遺伝子について観察を行ったが、キネトコアに結合すると思われる遺伝子は見つかっていない。実際に、キネトコア因子を見つけるにはさらなる検討が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 智康 (SUGIYAMA TOMOYASU)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：80503490