

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770176

研究課題名（和文） CENP-A のセントロメア局在化におけるバックアップ機構の解明

研究課題名（英文） Elucidating the molecular mechanisms of the centromere loading of CENP-A at G2 phase

研究代表者

高山 優子（TAKAYAMA YUKO）

帝京大学・理工学部・助教

研究者番号：90461467

研究成果の概要（和文）：分裂酵母CENP-AのG2期にみられるセントロメア局在化は細胞致死回避のバックアップとして働いていることが示唆されている。そこで、このバックアップ機構に関わる因子の探索を行った。候補遺伝子5つのうちの1つはRNA結合モチーフを持つ因子であり、G2期のセントロメア局在化ができないAms2遺伝子破壊株とは合成致死になることから、G2期のCENP-Aのセントロメア局在に重要な因子である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： In fission yeast, it is thought that the incorporation of CENP-A at G2 phase may act as a rescue of the cell lethality. To identify factors that involved in the G2-loading pathway, we screened for multicopy suppressors of G2-loading deficient cells. Five candidate genes are isolated, and one of them has RNA binding motifs. A double mutant lacking both this RNA binding motif and ams2 genes exhibits synthetic lethality. In this study suggest that the factor may be important in centromere deposition of CENP-A at G2 phase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：セントロメア・染色体構築

1. 研究開始当初の背景

動原体は、ゲノム情報を子孫細胞へ安定に伝達するために必須な構造体であり、セントロメア DNA と多くのタンパク質複合体で構成されています。セントロメアの塩基配列は真核生物において相同性が見られませんが、動原体タンパク質の多くは高度に保存されていることから、動原体構成タンパク質がセントロメアのアイデンティティを確立している

と考えられています。特にヒトから酵母まで高度に保存されている CENP-A は、セントロメア特異的ヌクレオソームを形成することから、動原体確立の主要因子であるといえます。CENP-A の不活化した細胞では、染色体の不均等分配が起こり、致死になることが様々な生物種で報告されています。

申請者はこれまで、分裂酵母を研究材料として CENP-A のセントロメア局在機構について

研究を進めてきました。CENP-A と遺伝学的に相互関連が見られる因子として単離された Ams2 は、GATA 転写因子と相同性があり、コアヒストンの S 期特異的転写活性化に関わる因子です。正常細胞では、CENP-A は細胞周期を通してセントロメアに局在していますが、Ams2 遺伝子破壊株は、S 期に一時的に CENP-A がセントロメアから離脱し、G2 期に再局在化することがわかりました。さらに、人為的に G2 期を短縮すると CENP-A の再局在化が行われず、細胞が致死になることがわかりました。これは、G2 期におこる CENP-A のセントロメア局在化は細胞の致死回避のバックアップとして働いていることを示しています。

2. 研究の目的

これまで、G2 期におこる CENP-A のセントロメア局在化に関与する因子は見つかっていません。そこで本研究では、G2 期におこる CENP-A のセントロメア局在化機構を明らかにすることを目的とし、染色体分配機構が正確に行われるためのバックアップ機構について分子レベルで解明します。

3. 研究の方法

(1) G2 期 CENP-A セントロメア局在に関わる因子のスクリーニング

Ams2 weel 二重変異株が致死になることを利用して、スクリーニングを行います。Ams2 プロモーターを薬剤誘導可能な nmt プロモーターと置き換えた細胞を作成します。この nmt プロモーターはビタミン B1 で知られるチアミンを培地に添加すると遺伝子の発現が抑制されます。nmt プロモーターと置き換えた Ams2 細胞に weel 変異を導入した細胞は、チアミンを添加することで Ams2weel 二重変異と同様な効果を示し致死になります。チアミン非存在下 (生育可能)、nmtAms2 weel 細胞に分裂酵母ゲノムライブラリーを導入し後、チアミン添加の培地上で増殖させます。CENP-A の G2 期局在に無関係な遺伝子が導入された細胞では、生育できませんが、関連遺伝子が導入された細胞は成育可能となります。成育できた細胞からライブラリープラスミドを単離し、塩基配列決定により導入遺伝子を特定します。

(2) G2 期 CENP-A セントロメア局在に関わる因子の遺伝子破壊株・温度感受性変異株の作成と表現型解析

(1) のスクリーニングで得られた遺伝子の破壊株または温度感受性変異株を作成します。また、各因子特性を解析します。具体的には、

- ①GFP タグを導入してたんぱく質を可視化し、細胞内局在を確認する。
- ②細胞周期のどの時期にたんぱく質が発現

しているのかを Northern blot により確認する。

③CENP-A との関連を、*cnpl-1* 温度感受性変異株との遺伝学的解析により明らかにします。

(3) CENP-A セントロメア局在化における役割

(2) で得られた遺伝子破壊株や温度感受性変異株において、G2 期に CENP-A のセントロメア局在化が阻害されているかどうかを確認します。まず、CENP-A を可視化するために GFP を導入した細胞株を作製し、変異株中では CENP-A の GFP シグナルがどのように変化するのかを固定細胞によって調べます。その後、生細胞観察によって、どの時期の CENP-A のセントロメア局在化に影響があるかを調べていきます。

以上の結果を総合して、得られた遺伝子と CENP-A のセントロメア局在化の関連性を解読します。

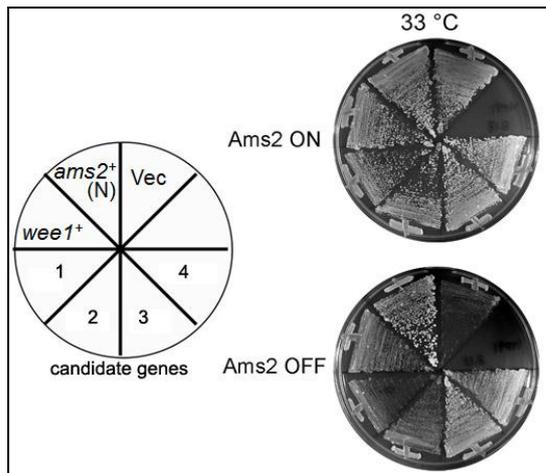
4. 研究成果

(1) G2 期 CENP-A セントロメア局在に関わる因子のスクリーニング

Ams2 weel 二重変異株が致死になることを利用して、致死性を回避できる遺伝子のスクリーニングを行った。Ams2 weel 変異株に分裂酵母ゲノムライブラリーを導入した。およそ 10 万コロニーのスクリーニングを行い、チアミン添加 (Ams2 発現抑制) 培養条件下、細胞生育可能な 209 クローンを得た。これらのクローンからゲノムライブラリーを回収後、PCR の確認により positive control である Ams2, histone, weel 遺伝子を除外した。残った候補遺伝子は 5 つで、ヒストンメチル化に関連する因子が 3 種類、RNA 結合モチーフを持つ新規遺伝子が 1 種類得られた。もう一つ rDNA 遺伝子が候補として得られたが、サブレッサープラスミド自身に変化している可能性があり現在のところ確定に至っていない。

(2) G2 期 CENP-A セントロメア局在に関わる因子の遺伝子破壊株・温度感受性変異株の作成と表現型解析

候補遺伝子の多コピー型プラスミドおよび Rep 型プラスミドを作製し、Ams2weel 二重変異株に対する致死性の抑圧能を再確認した。RNA 結合モチーフを持つ新規遺伝子は強く抑圧したが、ヒストンメチル化酵素関連因子の抑圧能は弱いことがわかった (次頁図参照)。

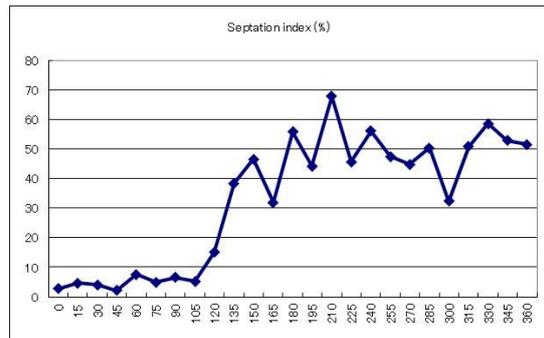


Ams2 *wee1*変異株にVectorを導入した株では、チアミン添加によりAms2発現を抑制すると、33度で生育することができない (Ams2 OFF, Vec)。スクリーニングにより得られたプラスミド (1~4) を導入すると、Ams2発現抑制条件下の33度でも生育可能であることがわかる (Ams2 OFF, 1~4)。

次に、スクリーニングで得られた遺伝子の機能を調べるために、それぞれの遺伝子破壊株を2段階PCRにより作成した。目的遺伝子がマーカー遺伝子と置換されていることをサザン解析により確認した。これらの遺伝子破壊株は、これまで報告のある1種類を除き、どれも生育可能であったことから、候補遺伝子はすべて非必須遺伝子であることがわかった。

①たんぱく質の細胞内局在や発現量を解析するため、遺伝子C末側にエピトープタグ (GFP および Flag) の導入を行った。これらのエピトープタグに対する抗体を用いてWestern blot を行ったところ、各たんぱく質を検出することができた。次に、各たんぱく質の細胞内局在を調べるために、GFP融合たんぱく質を導入した細胞をメタノール固定し、蛍光顕微鏡下で観察を行った。ヒストンメチル化酵素関連因子のほとんどは、核にGFPシグナルが検出された。一方、RNA結合モチーフを持つ因子では、細胞全体にGFPシグナルが検出された。これらの結果は、ヒストンメチル化酵素関連因子は核に、RNA結合モチーフを持つ因子は核だけでなく細胞質にも存在していることを示している。

②細胞周期のどの時期にたんぱく質が発現しているのかを調べるために、C末端にエピトープタグを導入した*cdc25*変異細胞を作成した。*Cdc25*変異により高温下でG2期に同調することができた。その後、低温下に戻して細胞周期を進行させたが、細胞分裂に異常を示したため細胞周期の解析を行うことができず、結果を得ることができなかった。



高温温度下でG2期に細胞周期を同調後、低温下に移して細胞周期を進行させた。Septumをもつ細胞の割合を示した。通常、一過的にseptumを持つ細胞が増加 (S期) して減少していく (G2-M期) が、本実験ではseptumを複数持つ細胞が増加した。

③CENP-Aとの関連を調べるために、*cnp1-1*温度感受性変異株に各遺伝子を多コピーで導入し、温度感受性に変化が見られるかどうか確認した。ヒストンメチル化酵素関連因子を導入した*cnp1-1*細胞では、vectorのみ導入したものと温度感受性に変化は見られなかった。しかしながら、RNA結合モチーフを持つ因子を*cnp1-1*に導入すると、生育可能である低温条件下でも細胞生育ができないことがわかった。さらに、この細胞増殖阻害が*cnp1-1*変異株特異的であるか調べるために、野生株やams2破壊株にもRNA結合モチーフを持つ因子をもつプラスミドを導入した。すると、プラスミドからの発現量の増加に比例して細胞増殖抑制が見られたことから、この因子の過剰発現は、細胞生育に阻害的に働くことがわかった。この細胞増殖阻害現象について、現在のところ「G2期のCENP-Aセントロメア局在は、細胞致死に対抗するための緊急回避であり、G2期バックアップを使ったセントロメアには何らかのダメージが起こっている可能性」を考慮しており、さらに研究を進めている。

(3) CENP-A セントロメア局在化における役割

CENP-AのS期セントロメア局在化に必要なAms2との遺伝学的な関連を調べるために、候補遺伝子破壊株との2重変異株の作成を行った。すると、RNA結合モチーフをもつ因子と合成致死になることがわかった。つまり、この因子とAms2が近い機能を担っていることが推察される。また、Ams2との2重遺伝子破壊株におけるCENP-Aの局在を確認したところ、ほとんどの細胞でCENP-Aがセントロメアに局在できないことがわかった。これら結果は、RNA結合モチーフを持つ因子がG2期のCENP-Aのセントロメアの局在化に重要な役割を持つことを示唆している。残念ながら、*cnp1-1*-IGFPを使ったCENP-A reloading解析を行うことができず、実際どの時期のCENP-A取り込みが異

常になっているのかを明らかにすることができなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Zhou, ZX., Zhang, MJ., Peng, X., Takayama, Y., Xu, XY., Huang, LZ. Du, LL. Mapping genomic hotspots of DNA damage by a single-strand-DNA-compatible an strand-specific ChIP-seq method, Genome Research, 2013, 23,705-715 査読有
doi:10.1101/gr.146357.112

② Sato, H., Masuda, F., Takayama, Y., Takahashi, K. Saitoh, S. Epigenetic inactivation and subsequent heterocentric chromatinization of a centromere stabilize dicentric chromosomes, Current Biology, 2012, 22, 658-667 査読有
doi: 10.1016/j.cub.2012.02.062.

[学会発表] (計 4 件)

① 高山優子、副島朗子、ヒストン転写と DNA 複製進行のカップリング機構の分子解明、日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日～14 日、福岡国際会議場

② 高山優子、副島朗子、ヒストン転写因子 Ams2 と S 期進行の関連解明、日本分子生物学会、2011 年 12 月 14 日～16 日、パシフィコ横浜

③ 高山優子、副島朗子、ヒストン転写と DNA 複製進行のカップリング機構の分子解明、核ダイナミクス研究会、2011 年 10 月 26 日～28 日、クラッセホテル北広島

④ 高山優子、副島朗子、ヒストン転写因子 Ams2 分解制御と S 期進行の関連解明、酵母遺伝学フォーラム、2011 年 9 月 5 日～7 日、九州大学医学部百年講堂

[その他]

<http://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/2000/32>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 優子 (TAKAYAMA YUKO)

帝京大学・理工学部・助教

研究者番号 : 90461467

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号 :