

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770171

研究課題名(和文) セントロメア不活性化の抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism inhibiting centromere dysfunction

研究代表者

佐藤 浩 (Sato, Hiroshi)

久留米大学・分子生命科学研究所・助教

研究者番号：00421313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母を用いて、細胞分裂の際に重要な染色体の正確な分離を担う構造であるセントロメアが、どのようにして機能を失わず維持されるかの分子機構の解明を試みた。2本の染色体を人為的により簡単で効率よく一本につなぎ合わせる実験系を構築し、その株を用いて、染色体が融合した際に生存率が上昇する遺伝子破壊株8株をスクリーニングした。これらの遺伝子の破壊により、セントロメアがより不活性化しやすくなっていることが示唆される。これらはヒストン修飾等に関わる遺伝子であり、特定のヒストンの修飾がセントロメアの不活性化を抑えていることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Centromere is essential structure for accurate chromosome segregation in mitosis and meiosis. To elucidate the molecular mechanism maintaining the function of a centromere, we have developed the convenient and advantageous artificially inducible system fusing two chromosomes with the terminal in fission yeast. Screening of deletion mutants by this system indicated that eight strains increased the frequencies of survivors when fused chromosome was generated and two centromeres were harbored in one chromosome. In these mutant, many of survivors harbored a fused chromosome in which either centromere was epigenetically inactivated. These results suggested that the centromeres tend to inactivate in these gene deletions compared to a wild type. Because these genes encoded the proteins related to modification of histone, specific histone modification may be important for inhibition of centromere inactivation.

研究分野：分子生物学

キーワード：セントロメア クロマチン 染色体

## 1. 研究開始当初の背景

多くの生物では、染色体上の一箇所にセントロメア領域が存在し、細胞分裂期にその領域には染色体の均等分離に必要な動原体が形成されます。動原体はセントロメア DNA と多くのタンパク質の複合体で構成されていますが、セントロメア DNA の塩基配列は真核生物間を通して相同性がほとんど見られません。一方で動原体タンパク質は多くが保存されています。生物間で異なる配列上に、どのような仕組みで共通する動原体が形成されるのかについては、今なお不明な点が残されたままです。

さらに、ヒトの本来セントロメアとは無関係な染色体領域が、セントロメアとして機能しているネオセントロメアの解析から、セントロメアの形成には DNA の塩基配列以上にエピジェネティックな要因が重要であることが示唆されています。

染色体における、セントロメアの数量制御機構の崩壊による複数のセントロメアの形成は染色体の分断や不均等分離を引き起こすことから、正常な細胞増殖において必須の機構であると考えられます。しかしながら、これらセントロメアの調節制御を行う機構はほとんど分かっていません。

申請者はこれまでセントロメアの調節制御機構を調べるために、セントロメア活性の抑制機構の解明を試みてきました。染色体の構造改変技術を用いて、分裂酵母の 2 本の染色体の末端を融合させることでセントロメアを 2 つもつ染色体 (ダイセントリック染色体) を作製し、この融合染色体におけるセントロメアの状態や挙動の変化について解析を行いました。この結果から、セントロメアの活性は想像以上に動的に変化するものであり、実はセントロメアのエピジェネティックな不活性化は容易に起こり得ることが示唆されていました。

## 2. 研究の目的

セントロメアは細胞分裂の際に、染色体の分離に必要な微小管と染色体をつなぎとめる動原体が形成される領域です。通常の染色体分離の際、セントロメアの不活性化は紡錘体微小管との結合の欠損により、染色体を分配するための動力が発生せず、染色体の脱落を導きます。また、セントロメア不活性化にともなう融合染色体の安定化といった染色体構造の変化は、生物種の分化や進化を導く一方で、癌の発生や進行、不妊や先天性異常といった重篤な疾患をもたらすという弊害があります。故にそれらの弊害が起こらないように、何らかの機構によってセントロメアの不活性化が抑制されることで、セントロメア活性状態が調節されていると考えられます。故に、本研究ではセントロメアの不活性化抑制に関係する遺伝子をスクリーニングし、その分子機構を解明することを目的とします。

同時に、セントロメアの不活性化に関わる遺伝子についての解析も試みました。

## 3. 研究の方法

(1) 配列特異的組み換え酵素 FIp/FRT を用いて、二本の染色体を融合できる分裂酵母実験株を作製する。人為的に誘導のできる FIp を用いる事、さらにこの酵素は温度感受性であるため、より厳密な染色体融合の調節を可能にする。染色体融合の起こった細胞は、選択マーカーとして抗生物質 cloneNAT 耐性遺伝子を発現し、この抗生物質を培地に添加することで選択できる。

(2) 上記の染色体融合系を用いて、遺伝子破壊株の作成。Bioneer 社の分裂酵母非必須遺伝子破壊ライブラリーと上記の株を掛け合わせることで、遺伝子破壊株において染色体融合を可能にする。

(3) 上記作成の染色体融合誘導可能な遺伝子破壊株ライブラリーを用いて、寒天培地上で 48h、30℃ で FIp 酵素の発現を誘導し、一定数の細胞を寒天プレート上にスポットし、融合染色体の生存株の出現割合を寒天培地上において判別する。

(4) 液体培養による組み換え酵素誘導により、染色体融合生存株の出現率を解析し、野生株と比較して生存率が上昇もしくは減少する株のスクリーニングを行う。

(5) 染色体融合生存株において、パルスフィールド電気泳動における染色体核型の解析と制限酵素 *StuI*、*BglI* 二重切断によるセントロメア領域の DNA の変化を解析することで、どのような機構でダイセントリック染色体が安定化しているのかの分類を行う。これにより生存株における染色体構造の変化を解析する。

## 4. 研究成果

(1) 本申請研究ではモデル生物である分裂酵母を用いて実験を計画し、研究目的の「セントロメア不活性化の抑制機構の解明」に焦点を絞って解析を行った。方法としてダイセントリック染色体が形成された際にセントロメアの不活性化が促進される変異体をスクリーニングし、その変異した原因遺伝子を同定することで、セントロメア不活性化抑制機構に関わる因子を明らかにしようとした。そこで、申請者開発のダイセントリック作成用株を用いた非必須遺伝子破壊株ライブラリーの作成を計画した。

しかしながら、このダイセントリック染色体の作成株に用いた部位特異的酵素 Cre の発現、抑制の調節が不完全であったため、破壊株ライブラリー作成時にすでに酵素が発現し、細胞の死やダイセントリック染色体誘導時の野生株と変異株の間で生育の違いが見

分けにくく、解析に適していなかった。そこで、より人為的に切れ味よく組み換え制御が行えるように、これまで使用していた Cre/loxP の部位特異的組換え酵素もよりも調節のしやすい、配列特異的組み換え酵素 Flp/FRT を用いたシステムを構築した(図 1)。

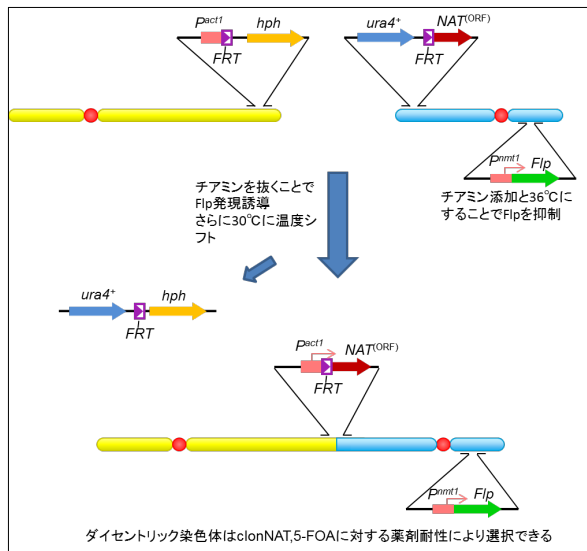


図 1 Flp/FRT による染色体融合系

この実験系を用いることで、培地のチアミンを抜き、温度を 36 から 30 に下げるといふ二重の操作によって、組み換え酵素の ON と OFF の調節が可能になり、意図しない組み換えによるスクリーニングの欠点が解消できた(図 2)。この方法は、染色体融合のみならず、人為的時期特異的な他の染色体構造改変や遺伝子破壊に応用が期待できる。

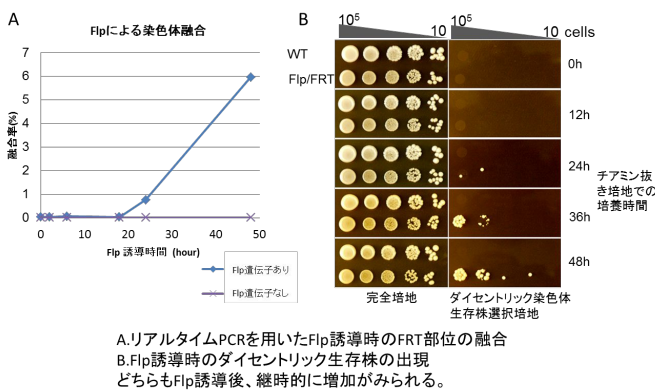


図 2 Flp による組み換え

(2)Bioneer 社の非必須遺伝子破壊株ライブラリーと、上記作成の Flp/FRT 株を掛け合わせることで、遺伝子破壊のダイセントリック染色体誘導株を作製した。この際、クロマチン関連の株に重点を置いた 214 の遺伝子破壊株を用いて解析を行った。染色体融合が起こった細胞のみが生育可能な寒天プレート培地上に細胞をスポットすることで、ダイセントリック染色体形成後の生存株の出現を調べたところ、このスクリーニングによって 8 株のダイセントリック細胞の生存率が上昇

する株と、9 株の減少する株が得られた(図 3)。

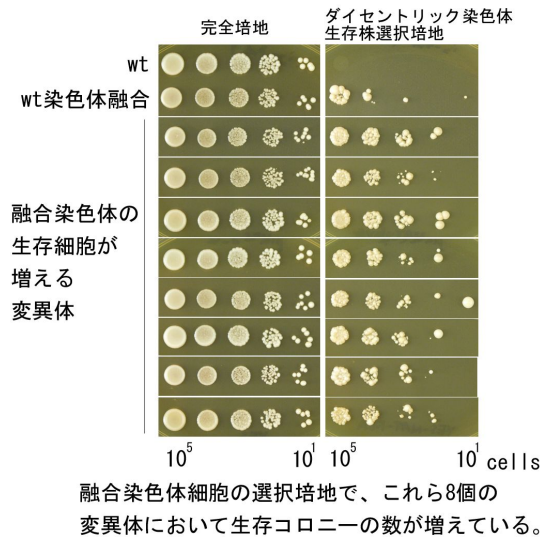


図 3 スポットテストによるダイセントリック生存株解析

さらに詳細な生存株出現率の解析の結果、5 株において、生存率の上昇が確認できた。これらは、ヒストン自体やヒストンのアセチル化またはメチル化に係る遺伝子の破壊株であった。パルスフィールドゲル電気泳動を用いた核型変化の解析を基に、それらのダイセントリック染色体生存株において染色体や、セントロメアのどのような変化がこの生存に寄与しているのかを調べた。その結果、セントロメアが DNA 配列はそのままに機能を失うこと(エピジェネティックなセントロメア不活性化)により、機能的セントロメアが染色体上に一つになり安定化した細胞がほとんどであることが示された。このことから、これら遺伝子の破壊株において、セントロメアが不活性化しやすくなっていることが示唆される。

一方、ダイセントリック細胞の生存率が特に減少する株は、詳細な解析により 8 株が得られた。これらはセントロメアのエピジェネティックな不活性化が起きにくくなっており、セントロメア DNA の欠損や染色体の切断の割合が増加することが予想された。しかし、その予想に反してセントロメアの不活性化の割合が優位に観察された。この原因については不明であるが、これらの遺伝子破壊株においてはセントロメアの活性維持以外の原因によって、ダイセントリック染色体の生存率が減少している可能性が考えられる。

ダイセントリック染色体の生存率の増加がみられる株の遺伝子はヒストン及びその修飾に係るタンパク質をコードしていることから、ヒストンの修飾がセントロメアの不活性化を抑制している因子の一つであることが示唆される。ヒストン修飾が及ぼす直接的なセントロメアのクロマチン状態の変化などをより詳細に解析し、セントロメア

不活性化抑制機構の解明を進め結果をまとめる予定である。

#### 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)

Hiroshi Sato and Shigeaki Saitoh  
Switching the centromeres on and off: epigenetic chromatin alterations provide plasticity in centromere activity stabilizing aberrant dicentric chromosomes.,  
Biochemical Society Transactions 41, pp.1648–1653, 2013、査読無、  
DOI:10.1042/BST20130136.

Hiroshi Sato, Fumie Masuda, Yuko Takayama, Kohta Takahashi, and Shigeaki Saitoh,  
Epigenetic Inactivation and Subsequent Heterochromatinization of a Centromere Stabilize Dicentric Chromosomes., Current Biology, 22, pp.658–667, 2012、査読有、  
DOI: 10.1016/j.cub.2012.02.062

[学会発表](計 4件)

佐藤浩

セントロメア不活性化の抑制機構の解明、第32回 イーストワークショップ、2014年11月14日～15日、ビュー・ポートくれ(広島県・呉市)

Hiroshi Sato

Epigenetic inactivation of a centromere to stabilize dicentric chromosomes、EMBO Conference on Fission Yeast: pombe 2013、7th International Fission Yeast Meeting、24-29 June 2013、London,(UK)

佐藤浩

Epigenetic inactivation and subsequent heterochromatinization of a centromere stabilize dicentric chromosomes、第35回 日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡県・博多区)

佐藤浩

分裂酵母のダイセントリック染色体を安定化する機構の解析、酵母遺伝学フォーラム第45回研究報告会、2012年9月4日～6日、京都大学宇治キャンパス、おうばくプラザ(京都府・宇治市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 浩 (SATO, Hiroshi)

久留米大学・分子生命科学研究所・助教

研究者番号：00421313

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし